

IMMOBILISATION DE SPORES  
DE *STREPTOMYCES MELANOSPOROFACIENS* EF-76 DANS DES BILLES DE  
CHITOSANE: APPLICATION EN LUTTE BIOLOGIQUE

par

Guy Jobin

Thèse présentée comme exigence partielle  
pour l'obtention du diplôme de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2004

Le 21 juin 2004,  
Date

*le jury a accepté la thèse de M. Guy Jobin dans sa version finale.*

*Membres du jury*

Mme Carole Beaulieu  
Directrice  
Département de biologie

M. Brian Talbot  
Membre  
Département de biologie

M. Claude P. Champagne  
Membre externe  
- Centre de recherche et de développement sur les aliments

M. Ryszard Brzezinski  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Dans notre laboratoire, une souche de streptomycète, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76, a été isolée et caractérisée phénotypiquement et génétiquement. Son efficacité en lutte biologique a été démontrée contre *Phytophthora fragariae* var. *rubi* et *Streptomyces scabiei*, les agents causaux respectifs de la pourriture racinaire du framboisier et de la gale commune de la pomme de terre. Le chitosane est un biopolymère dont les propriétés chimiques et physiques l'habilitent à former des hydrogels en présence de polyanions. Il est aussi toxique envers plusieurs espèces bactériennes dépourvues de la capacité de synthétiser la chitosanase. Les oligomères de chitosane sont pour leur part reconnus comme des agents éliciteurs des mécanismes de défense des plantes. L'application conjointe de flocons de chitosane et de spores lyophilisées de la souche EF-76 sur des tubercules de semence est un traitement ayant prouvé son efficacité à réduire les symptômes de la gale commune de la pomme de terre chez les tubercules descendants. Toutefois, l'application de ce traitement à grande échelle pose quelques difficultés techniques qui compromettent son intégration dans les pratiques agricoles usuelles. En considération de l'absence démontrée de toxicité du chitosane envers la souche EF-76 et de la capacité du chitosane de former des billes d'hydrogel, la possibilité d'immobiliser des spores de la souche EF-76 dans des billes de chitosane méritait d'être vérifiée. Cette possibilité apparaissait comme une solution aux problèmes techniques empêchant l'application à grande échelle de l'usage conjoint du chitosane et des spores de la souche EF-76. Mes travaux de recherche visaient principalement à mettre au point un procédé d'immobilisation de spores de streptomycètes dans des billes de chitosane et à se servir de ces billes comme outil de lutte biologique contre la gale commune de la pomme de terre.

Pour qu'elles puissent agir efficacement comme outil de lutte biologique, ces billes devaient se dégrader facilement dans le sol afin de libérer l'agent antagoniste. La formation d'un complexe macromoléculaire résultant de la réaction du chitosane avec le polyphosphate

pouvait toutefois entraîner un encombrement stérique empêchant la chitosanase de réagir avec le chitosane. Comme la biodégradabilité des billes de chitosane dépendait de l'efficacité de la chitosanase produite par la souche EF-76 (ou de celle produite par toute autre espèce microbienne de la microflore du sol), il fallait vérifier cette hypothèse. À cette fin, des billes de chitosane à 1% ont été produites avec des lots de chitosane de diverses masses moléculaires. Ces billes ont été placées dans une solution de chitosanase soumise à une agitation et le phénomène de biodégradabilité a été quantifié en dosant les extrémités réductrices des oligomères de chitosane produits par l'action de la chitosanase. Ce travail a permis d'infirmier la thèse de l'encombrement stérique et de vérifier la biodégradabilité des billes par la chitosanase.

L'efficacité de ces billes de chitosane comme outil de lutte biologique dépendait aussi de la viabilité des spores immobilisées. Des coupes ultra-minces de billes hydratées ont donc été imprégnées d'un colorant indicateur de la viabilité des spores et observées en microscopie optique. Ces observations ont montré que des spores demeuraient vivantes en assez grand nombre après leur immobilisation dans les billes de chitosane et après la lyophilisation de ces billes.

La structure interne des billes de chitosane devait aussi être élucidée car elle influençait directement le délai de germination des spores immobilisées et de libération du mycélium dans le sol environnant. Des coupes ultra-minces de billes hydratées ont donc été imbibées d'une solution de bleu de toluidine et observées en microscopie optique. Ces observations ont montré que les billes sont limitées par une membrane et constituées d'un réseau de microfibrilles. Les spores individuelles et les agrégats de spores étaient présents seulement dans les microfibrilles. Toutefois, l'observation à l'état frais (sans colorant) de coupes ultra-minces en microscopie sur fond noir montrait la présence de spores individuelles et d'agrégats de spores autant dans les microfibrilles que dans les lacunes limitées par ces microfibrilles. Ces spores lacunaires seraient donc les premières à entrer en contact avec la

solution de sol, à germer et à produire un mycélium et constituaient en quelque sorte une assurance d'un délai de germination assez court.

Des billes entières et fracturées ont aussi été observées en microscopie électronique à balayage avant et après leur métallisation. La surface des billes est ridée et poreuse et montre plusieurs spores et agglomérats de spores. La présence de spores à la surface des billes est un gage d'un délai de germination très court, car ces spores entreraient en contact avec la solution de sol immédiatement après leur incorporation dans le sol. L'observation d'une coupe transversale révèle la présence d'un réseau de microfibrilles ayant l'aspect d'une éponge.

Des billes de chitosane hydratées et lyophilisées renfermant des spores de la souche EF-76 ont été mélangées avec un terreau d'enracinement stérile placé dans un microcosme afin de vérifier la capacité de germination des spores immobilisées. À ce terreau a été ajouté du glucose marqué uniformément de  $^{14}\text{C}$ . La germination des spores de l'agent antagoniste était révélée par la transformation du glucose radiomarké en bioxyde de carbone radioactif ( $^{14}\text{CO}_2$ ). Le dosage du  $^{14}\text{CO}_2$  témoignait de la germination des spores et de la colonisation du terreau par le mycélium. Les spores immobilisées dans les billes hydratées et lyophilisées ont germé dans un délai de 24 h après leur mise en terre. Ce résultat confirmait les hypothèses appuyées par les observations microscopiques.

Enfin, un essai phytosanitaire a été réalisé en conditions contrôlées avec des billes lyophilisées afin de tester leur efficacité à protéger les tubercules de pomme de terre contre les symptômes de la gale commune. Quatre quantités de billes lyophilisées renfermant des spores de la souche EF-76 ont été déposées près des tubercules de semence afin de vérifier une relation inversement proportionnelle entre ces quantités et l'incidence de la gale commune chez les tubercules descendants. Les trois quantités testées (0,05, 0,25 et 0,50 g par tubercule de semence) protégeaient les tubercules mais celle de 0,25 procurait la plus

faible incidence de gale commune. Ces résultats s'annoncent prometteurs pour ce nouvel outil de lutte biologique.

## REMERCIEMENTS

Je désire en premier lieu exprimer mes remerciements à ma directrice de recherche, le docteur Carole Beaulieu, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance manifestée en mon endroit en me confiant ce projet ainsi que pour son encadrement et son support financier tout au long de mes travaux.

Mes deux conseillers, les docteurs Ryszard Brzezinski et Brian Talbot, méritent ma gratitude pour leurs précieux conseils et leur analyse critique de ma démarche expérimentale.

Je tiens à remercier tout spécialement le docteur Severian Dumitriu, du département de génie chimique de la Faculté de Génie, pour m'avoir guider tout au long de mon auto-apprentissage dans le domaine des biopolymères. Son étudiante au doctorat, Mme Delphine Magin, m'a familiarisé à l'utilisation pratique du viscosimètre pour la mesure de la masse moléculaire de divers lots de chitosane.

La compagnie Marinard Biotech Inc. a contribué au projet par sa participation financière et par la fourniture de plusieurs lots de chitosane. Le Conseil de recherches en pêches et en agroalimentaire du Québec (CORPAQ) a aussi apporté une contribution financière au projet.

Il est impossible de passer sous silence les années heureuses que j'ai vécues dans le Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne. Mes très sincères remerciements à tous les membres de cette équipe pour leur aide précieuse et l'atmosphère de camaraderie qu'ils ont fait régner.

Derniers de la liste mais certainement pas dans mon cœur, mon père récemment décédé, ma mère, mon frère et ma sœur m'ont constamment encouragé de plusieurs façons durant mes

années de travail et d'efforts nécessaires à la réalisation de ce projet. Bien plus qu'un remerciement, cette thèse leur est dédiée.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
INTRODUCTION.....	1
Mise en contexte.....	1
Description et rôle des actinomycètes en lutte biologique.....	2
Effet des streptomycètes sur les microorganismes et les plantes.....	3
Description et rôle du chitosane en lutte biologique.....	8
Effet du chitosane sur la plante.....	9
Effet du chitosane sur les microorganismes.....	11
Physico-chimie du chitosane.....	20
Technologies d'immobilisation.....	22
Coacervation simple.....	23
Coacervation complexe.....	25
Description du polyphosphate et sa présence dans la nature.....	26
Émulsification.....	29
CHAPITRE 1.....	33
1.1 Examen microscopique de billes de chitosane-polyphosphate Renfermant des spores d'un agent de lutte biologique, <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> EF-76.....	33

1.2	Microscopic Examination of Beads of Chitosan-Polyphosphate with Entrapped Spores of a Biocontrol Agent, <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> EF-76. Soumis pour publication.....	36
CHAPITRE 2.....		61
2.1	L'immobilisation de spores de streptomycète dans des billes de chitosane comme un nouvel outil de lutte biologique contre les maladies des plantes.....	61
2.2	Streptomycete Spores Entrapped in Chitosan Beads as a Novel Tool for Biocontrol of Plant Diseases.....	65
CONCLUSION.....		95
BIBLIOGRAPHIE.....		99

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

Tableaux tirés de Jobin *et al.*, 2003. Soumis pour publication.

1. Characteristics of chitosan lots.....41
2. Viable counts during the bead fabrication process.....46

### CHAPITRE 2

Tableau tiré de Jobin *et al.*, 2003. Soumis pour publication.

1. Effect of spore-loaded chitosan beads on the soil population of geldanamycin-resistant actinomycetes and on common scab of potato.....79

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

1.	Structure moléculaire de la geldanamycine.....	7
2.	Structure moléculaire du chitosane.....	8
3.	Classification des procédés de coacervation pour la préparation de microcapsules (Arshady, 1990).....	25
4.	Structure moléculaire du polyphosphate (Mi <i>et al.</i> , 1999b).....	26
5.	Transition échelle-boucle du chitosane avec le polyphosphate (Mi <i>et al.</i> , 1999b).....	27
6.	Transition échelle-boucle du chitosane avec le tripolyphosphate (Mi <i>et al.</i> , 1999b).....	28

### CHAPITRE 1

Figures tirées de Jobin *et al.*, 2003. Soumis pour publication.

1.	Evolution of 1% chitosan beads hydrolysis by chitosanase (3 U / 25 ml) as measured by the accumulation of oligomers.....	45
2.	Observations in fluorescence microscopy of spores stained with the live/dead dye.....	46

3.	SEM observation of the surface of a lyophilized spore-loaded chitosan bead without metallization.....	47
4.	SEM observation of a lyophilized spore-loaded chitosan bead after metallization with gold-palladium.....	48
5.	SEM observation of a lyophilized sporeless chitosan bead after metallization with gold-palladium.....	50
6.	Enlarged view of inner core of a hydrated, spore-loaded 1% chitosan bead after staining with toluidine blue.....	51
7.	Observation of unstained sections of a hydrated spore-loaded chitosan 1% bead.....	52

## CHAPITRE 2

Figures tirées de Jobin *et al.*, 2003. Soumis pour publication.

1.	Microbial production of $^{14}\text{CO}_2$ in biometers amended with $^{14}\text{C}$ -glucose.....	76
2.	Estimation of chitosan content and enumeration of geldanamycin resistant actinomycete (GRA) numbers in sterile (A) and non sterile (B) soil amended with spores of <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> EF-76 entrapped in chitosan-polyphosphate.....	78
3.	Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the microbial communities generated with Biolog EcoPlates.....	80

4. Effect of different quantities of spore-loaded chitosan beads on  
common scab of potato.....81

## INTRODUCTION

### Mise en contexte

En raison d'une prise de conscience environnementale de plus en plus vive manifestée par l'opinion publique, l'usage traditionnel de bactéricides et de fongicides chimiques est remis en question dans le domaine de la lutte contre les agents pathogènes en agriculture, en horticulture et en foresterie. Beaucoup d'efforts ont ainsi été déployés ces dernières années pour mettre au point des méthodes de lutte plus respectueuses de la qualité de l'environnement et cherchant à tirer profit des mécanismes naturels de défense chez les plantes. Le chitosane, un polymère naturel dérivé de la chitine, et les microorganismes antagonistes présentent un important intérêt dans cette perspective. Outre sa disponibilité en grandes quantités, un des avantages importants du chitosane pour son emploi en lutte biologique est sa capacité d'activation des mécanismes de défense des plantes contre l'attaque des agents pathogènes (El Ghaouth *et al.*, 1994; Lafontaine et Benhamou, 1996; Benhamou et Picard, 1999). Un autre avantage du chitosane est qu'il forme des hydrogels stables lorsqu'il est complexé avec des polymères anioniques minéraux et organiques. Il est ainsi utilisé pour l'immobilisation des molécules et des microorganismes et trouve déjà de nombreuses applications dans les industries agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, dans l'optimisation des procédés de production en bioréacteurs et dans le traitement des eaux usées (Kaş, 1997). Comme le chitosane se retrouve initialement sous une forme solide, il doit forcément être mis en solution afin de faciliter sa participation dans la formation d'un gel stable.

En ce qui regarde l'usage des microorganismes antagonistes, les exigences liées à la préservation de leur viabilité pendant l'entreposage et la nécessité de recourir à plusieurs applications pendant un cycle de production pour assurer leur permanence dans les substrats d'enracinement font qu'il est difficile de mettre au point un système de distribution économiquement et opérationnellement efficient. La présente étude vise à mettre au point

une nouvelle technologie phytosanitaire: la fabrication de billes de chitosane pour le relâchement progressif d'agents antimicrobiens dans le sol. L'approche adoptée dans ce projet constitue une première en la matière, car l'immobilisation d'agents antimicrobiens dans des billes de chitosane dans un but de lutte biologique n'a pas encore fait l'objet d'une évaluation quantitative systématique. L'intérêt de combiner le chitosane et un microorganisme antagoniste dans une technologie phytosanitaire est de constituer une alternative rivalisant en efficacité avec l'usage à grande échelle de pesticides de synthèse nocifs pour l'environnement.

### **Description et rôle des actinomycètes en lutte biologique**

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif, sporulantes et formant pour la plupart un mycélium. Le mode de formation des spores varie et permet de séparer les principaux sous-groupes. La composition en paires de base de l'ADN de toutes les espèces d'actinomycètes se caractérise par une étendue relativement étroite de 63 à 78% en guanine et en cytosine (Brock *et al.*, 1994). Les actinomycètes se retrouvent abondamment dans la nature et en particulier dans les sols, où ils jouent leur rôle écologique majeur, soit la décomposition de la matière organique. Plusieurs actinomycètes produisent des antibiotiques qui, en plus de leur importance médicale, pourraient influencer les relations écologiques entre différentes populations microbiennes (Atlas et Bertha, 1993; Sanglier *et al.*, 1993).

Les actinomycètes sont antagonistes à divers agents pathogènes (Broadbent *et al.*, 1971; Rothock et Gottlieb, 1984; Weller, 1988; Sutherland et Papavizas, 1991) et permettent un contrôle de diverses maladies végétales (Liu *et al.*, 1995; Yuan et Crawford, 1995; Valois *et al.*, 1996). Ces caractéristiques ont favorisé leur usage commercial comme biopesticides en Chine (Yin *et al.*, 1965), en Europe (Lahdenperä *et al.*, 1991) et aux États-Unis (Chamberlain et Crawford, 1999). Au Québec, des souches d'actinomycètes permettant la protection des cultures contre la gale commune de la pomme de terre (Doubou *et al.*, 1998) et contre les maladies causées par les oomycètes ont été identifiées (Valois *et al.*, 1996; Toussaint *et al.*, 1997). L'application conjointe de spores de la souche EF-76 de *Streptomyces*

*melanosporofaciens* avec des flocons de chitosane a réussi à diminuer significativement les symptômes de la gale commune de la pomme de terre (Beauséjour *et al.* 2002). L'antagonisme des actinomycètes envers les phytopathogènes résulte de leur production d'antibiotiques (Toussaint *et al.*, 1997; Eckwall et Schottel, 1997), d'enzymes glucanolytiques et chitinolytiques entraînant la rupture de leur paroi cellulaire (Valois *et al.*, 1996; Yuan et Crawford, 1995; Singh *et al.*, 1999) ou de protéines antifongiques et non-enzymatiques qui se fixent sur les conidies germées et sur les extrémités des hyphes de manière à altérer la morphogenèse cellulaire (Bormann *et al.* 1999). Un autre mécanisme antagoniste des actinomycètes consiste à dégrader les phytotoxines produites par les agents pathogènes. Ainsi, deux souches de *Streptomyces mirabilis* ont montré une capacité à utiliser la thaxtamine A produite par *Streptomyces scabies*, l'agent causal de la gale commune de la pomme de terre (Doubou *et al.*, 1998).

### **Effet des streptomycètes sur les microorganismes et les plantes**

L'effet phytoprotecteur des streptomycètes antagonistes a été associé à quelques reprises à leur capacité à coloniser la rhizosphère des plantes. Une étude confirmatoire a ainsi été réalisée sur l'effet de *Streptomyces flavescens* GV1 sur la croissance de semis de concombre dans de la gélose à l'extrait de sol (GES) infectée ou non avec *Fusarium oxysporum* 55071 et *Botrytis cinerea* 15692. L'effet phytoprotecteur global exercé contre les mycètes phytopathogènes par le streptomycète était attribué à deux modes d'action. La colonisation des semences, du phylloplan et du rhizoplan des semis par le streptomycète empêchait les cellules fongiques d'atteindre les racines ou le feuillage tandis que sa synthèse d'antibiotiques et de facteurs de croissance contribuait à favoriser le développement des plantules tout en inhibant les cellules de l'agent pathogène (Kolomiets *et al.*, 1997).

L'habileté colonisatrice de l'antagoniste *Streptomyces griseoviridis* envers la rhizosphère de la carotte et du navet a aussi été mise en évidence. Des expériences étaient menées avec une suspension de spores et avec la préparation commerciale Mycostop mise au point par la compagnie Kemira Oy (Lahdenperä *et al.*, 1991). La densité de population de l'antagoniste

était toujours plus élevée dans la rhizosphère que celle mesurée dans le sable hors de la rhizosphère et dans le sable sans racines (témoin). La colonisation était toutefois moins efficace dans le cas de la carotte et plus efficace avec le navet. Cette différence d'efficacité serait attribuable à l'absence dans les exsudats racinaires de carotte de substances nécessaires pour la prolifération du streptomycète (Kortemaa *et al.*, 1994, 1997).

D'autres équipes de recherche ont aussi isolé et caractérisé une ou plusieurs souches d'actinomycètes pour des besoins spécifiques de lutte biologique. Ainsi, un groupe britannique a isolé et caractérisé 267 souches d'actinomycètes, en grande majorité des streptomycètes, en ce qui regarde leur croissance en milieu acide et alcalin et leur antagonisme *in vitro* et *in vivo* envers *Pythium ultimum*, l'agent causal de la fonte des semis de laitue. La plupart des souches croissaient bien à des pH de 6,5 à 8,0. Douze des souches ayant montré un antagonisme lors du test sur gélose à l'extrait de maïs moulu (*cornmeal*) ont fait l'objet d'un essai, en l'absence d'un agent pathogène, afin de vérifier leur effet sur la germination des semences et la croissance des plantules. Aucune d'entre-elles n'a empêché la germination des semences, mais six des souches ont retardé la germination et la croissance des plantules par un délai de un à trois jours. Au terme d'un essai de croissance de 18 jours, la biomasse foliaire (sèche et fraîche) des plantules inoculées avec un actinomycète, sans la présence d'un agent pathogène, demeurait semblable à celle des plantules témoins. Le même essai réalisé en présence d'un agent pathogène a permis de discriminer sept souches ayant entraîné une hausse du taux de résistance de 36% chez les plantules témoins (avec *Pythium* et sans actinomycète) à 56-66% chez les plantules inoculées avec un actinomycète (Crawford *et al.*, 1993).

Une autre équipe a également isolé et caractérisé 45 souches d'actinomycètes d'une rhizosphère de carotte afin de trouver des antagonistes efficaces contre *Pythium coloratum*, l'agent causal de la tache de la carotte (*cavity-spot disease*). Sept d'entre elles ont contribué à réduire ou à prévenir la formation de lésions sur des morceaux de carotte lors d'un essai *in vitro*. Elles produisaient des substances antifongiques non-volatiles mais aucune substance

antifongique volatile. Deux de ces souches ont montré un phénomène d'hyperparasitisme contre l'agent pathogène. Lors d'un essai en serre avec un sol inoculé artificiellement avec l'agent pathogène, les sept souches ont réduit significativement l'incidence de la maladie (El-Tarabily *et al.*, 1997).

D'autres essais de lutte biologique visaient à vérifier l'efficacité de l'antagonisme de souches de streptomycètes contre un agent phytopathogène. Des études ont été entreprises afin de vérifier les conditions sous lesquelles l'antagoniste *Streptomyces violaceusniger* (syn: *hygroscopicus*) YCED9 inhibait la croissance de mycètes responsables de maladies de l'herbe à gazon. Ils ont constaté que dans les substrats à base de sol, seulement la nigericine était produite par l'antagoniste, alors que ce dernier produisait en plus de la geldanamycine et un complexe de polyènes, qui incluait la guanidylfungine A, dans les substrats à base de chaume. Ils ont émis l'hypothèse qu'un contenu plus riche en matière organique (lignine, cellulose, polysaccharides et acides aminés) dans les sols plus fertiles favorisait la production d'une plus grande variété d'antibiotiques (Trejo-Estrada *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été confirmée par un essai d'antagonisme *in vitro* réalisé avec un filtrat d'une culture de l'antagoniste sur du chaume. Sur des géloses à l'extrait de pomme de terre ou de maïs moulu supplémentées avec ce filtrat à raison de 5% (v/v), la croissance de plusieurs agents pathogènes était inhibée à l'exception de *Pythium ultimum*. Cette exception pourrait être attribuable à l'absence, ou à une concentration trop faible, dans le filtrat de la geldanamycine nécessaire à l'inhibition des oomycètes. Il pourrait aussi s'agir de l'absence de production d'enzymes nécessaires à la dégradation pariétale lors de la croissance de l'antagoniste sur la chaume et/ou de la fourniture par le chaume de nutriments qui auraient permis à *P. ultimum* de contrer l'effet antagoniste du streptomycète. Les filtrats témoins, sans culture du streptomycète, ne montraient pas d'activité antifongique. En revanche, une stimulation de la croissance des agents pathogènes par les filtrats témoins était observée dans plusieurs cas (Chamberlain et Crawford, 1999).

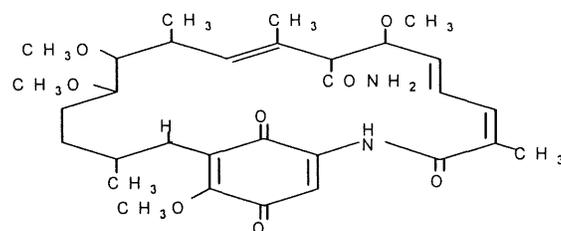
Une autre étude a montré la capacité de *Streptomyces* sp. 385 à produire de la chitinase et de la  $\beta$ -1,3-glucanase lors de sa croissance en présence de chitine colloïdale comme seule source de carbone. L'incubation de parois cellulaires de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en présence de fractions enzymatiques partiellement purifiées a mené à la libération de N-acétyl-D-glucosamine. L'action de ces enzymes hydrolytiques a été invoquée pour expliquer la suppression du dépérissement fusarien du concombre par l'addition au terreau de culture d'une formulation 1:1 de *Streptomyces* sp. 385 avec *Paenibacillus* sp. 300 dans du zéolite amendé en chitosane à raison de 0,25% (Singh *et al.*, 1999).

Un essai de lutte biologique a montré la capacité de deux souches de streptomycètes à contrôler la gale commune de la pomme de terre lors d'un essai au champ d'une durée de quatre ans. À la fin de la quatrième année, l'inoculation des antagonistes à une concentration de 1% a donné un taux de suppression de 80%. La capacité de production d'antibiotiques de ces souches avait été démontrée lors d'études précédentes (Eckwall et Schottel, 1997; Lorang, 1998, cité par Liu *et al.*, 1995). Les chercheurs soulignent l'importance du choix du matériau transporteur et de la base nutritionnelle dans la préparation de l'inoculum des antagonistes (Liu *et al.*, 1995).

Des résultats inattendus d'une autre expérience ont révélé un effet moins connu des streptomycètes envers les agents pathogènes. La souche mutante NP51 de *Streptomyces tendae* Tü901 produisait une protéine antifongique, AFP1 (*antifungal protein 1*). Cette protéine se fixe à la chitine, au chitosane et à des parois de *Paecilomyces variotti*. Sa faible masse moléculaire de 9,8 kilodaltons lui permettrait de pénétrer les pores pariétaux (15-20 kilodaltons) et de déstabiliser la synthèse des parois. Une étude microscopique de la protéine AFP1 marquée à la fluorescéine a montré qu'elle se fixe préférentiellement aux sites de cette synthèse, soit sur les conidies et les extrémités hyphales (Bormann *et al.*, 1999).

Notre équipe de recherche a aussi isolé et caractérisé des souches d'actinomycètes afin de trouver des antagonistes contre *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, l'agent causal de la

pourriture racinaire du framboisier. Lors d'une première étape, ces chercheurs ont isolé treize souches d'actinomycètes productrices de  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- et  $\beta$ -1,6-glucanases. Ces enzymes pouvaient hydrolyser les glucanes des parois cellulaires de *Phytophthora* et lyser les cellules du même agent pathogène. Lors d'un essai de lutte biologique réalisé avec des plantules de framboisier en présence de l'agent pathogène, l'inoculation de onze souches d'actinomycètes a permis de réduire significativement l'index de pourriture racinaire. Douze souches d'actinomycètes appartenaient au genre *Streptomyces* (Valois *et al.*, 1996). La seconde étape visait à caractériser davantage les onze souches citées précédemment. Ces onze souches montraient des caractéristiques phénotypiques quasi-identiques à celles du genre *Streptomyces*. Deux souches ont affiché une grande plasticité physiologique en croissant à 4, 15 et 30°C sur une gélose au jus de légumes V-8 dont le pH avait été ajusté à 5, 7 et 9. Un test de tolérance à plusieurs pesticides a montré que la croissance de la plupart des souches était inhibée par le captan et le ferbam, mais que le métalaxyl n'avait aucun effet sur elles. Le spectre d'action des métabolites antifongiques de trois souches de streptomycètes couvrait non seulement *P. fragariae* var. *rubi* et *P. ultimum*, mais aussi neuf autres espèces de mycètes. Les souches étudiées n'exerçaient aucun effet inhibiteur envers les bactéries à Gram négatif, mais quatre souches inhibaient la croissance d'au moins une espèce à Gram positif. L'une de ces trois souches, EF-76, produisait aussi un antibiotique, la geldanamycine (figure 1), isolée à partir d'une culture de *Streptomyces melanosporofaciens* (antérieurement *S. hygroscopicus* sbsp. *geldanus*). Un test d'hybridation de l'ADN génomique de la souche EF-76 avec celui de *Streptomyces hygroscopicus* sbsp. *geldanus* ATCC 55256 a montré une homologie de 99,5% entre les deux ADN, ce qui permet de confirmer l'appartenance de la souche EF-76 à cette espèce (Toussaint *et al.*, 1997). Cette souche est aussi efficace dans le combat de la gale commune de la pomme de terre (Agbessi *et al.*, 2003).



**Figure 1. Structure moléculaire de la geldanamycine**

## Description et rôle du chitosane en lutte biologique

Le chitosane (figure 2) est un biopolymère hydrophile résultant de la déacétylation partielle ou totale de la chitine. La chitine est le constituant majeur des carapaces des crustacés comme le crabe, la crevette ou le homard. Il est aussi présent dans la paroi cellulaire de certains mycètes. (Kaş, 1997). La chitine et le chitosane sont déjà considérés comme des produits phytosanitaires à fort potentiel en agriculture. L'addition au sol de carapaces de crustacés, dont la chitine est le constituant majeur (Vruggink, 1970; Kim *et al.*, 1997), et de composts fabriqués à partir de résidus chitineux (Roy *et al.*, 1997) permettrait le contrôle de certains agents phytopathogènes. L'amendement du sol avec du chitosane a aussi contribué à réduire l'incidence et la sévérité de la pourriture racinaire causée par *Phytophthora capsici* sur le piment (Kim *et al.*, 1997) et de la gale commune de la pomme de terre (Beauséjour *et al.*, 2002). L'enrobage des semences dans le chitosane (Benhamou *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1999) ou l'addition de chitosane aux substrats de culture (Bell *et al.*, 1998; Lafontaine et Benhamou, 1996) montrent aussi un effet phytoprotecteur contre diverses maladies végétales.

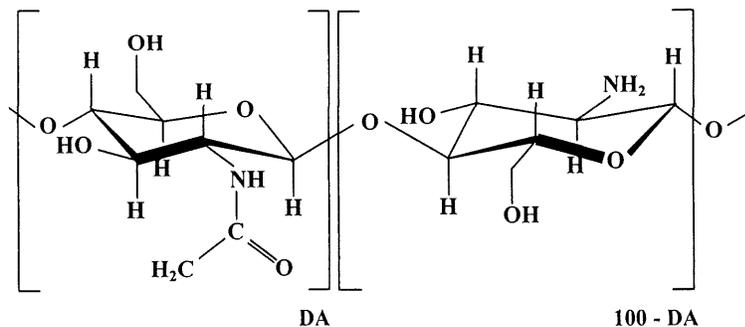


Figure 2. Structure moléculaire du chitosane (DA : % déacétylation)

L'inhibition de la croissance des agents pathogènes et l'activation des mécanismes de défense de la plante sont deux mécanismes qui peuvent expliquer l'habileté du chitosane à protéger les cultures végétales contre diverses maladies. Ainsi, le chitosane inhibe la croissance des mycètes (El Ghaouth *et al.*, 1994) et chez certains agents phytopathogènes comme *Alternaria alternata*, il réduit en plus sa capacité de production de phytotoxines (Reddy *et al.*, 1998). À forte concentration, le chitosane a aussi un effet bactériostatique

(Tsai et Su, 1999) ou anti-bactérien (Helander *et al.*, 2001). Les différents mécanismes de défense des plantes comme les protéines PR (*pathogenesis-related*), les inhibiteurs de protéases et kinases, les phytoalexines, la déposition de callose et de lignine sont induits à la suite d'un contact de la plante avec le chitosane (El Ghaouth *et al.*, 1994; Doares *et al.*, 1995; Stratmann et Ryan, 1997; Stratmann *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 1999; Benhamou, 1995; Vander *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1995). La capacité phytoprotectrice du chitosane dépend de sa concentration et de son degré de déacétylation et de polymérisation (Vander *et al.*, 1998).

### **Effet du chitosane sur la plante**

Le chitosane est considéré comme un puissant exoéliciteur des réactions de défense des plantes (Benhamou et Picard, 1999). Ce groupe de recherche a mené plusieurs études sur l'influence exercée par le chitosane sur la réponse de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) à l'infection par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), l'agent causal de la pourriture fusarienne des racines et du collet. L'immersion des graines dans des solutions de chitosane retarde le développement des symptômes, mais se révèle insuffisant à conférer aux semis une protection complète (Benhamou *et al.*, 1994). Par contre, l'introduction de solutions de chitosane dans le milieu d'enracinement déclenche des mécanismes de défense dans les tissus racinaires. Dans les cellules épidermiques envahies par l'agent pathogène, des signes typiques de nécrose sont apparus et étaient accompagnés par une désorganisation marquée du cytoplasme. En revanche, le cortex interne encore intact montrait de fortes réactions de défense sous la forme de dépôts de substances phénoliques et de  $\beta$ -1,3-glucanes, tel que révélé par l'examen au microscope électronique à transmission (Benhamou *et al.*, 1994; Benhamou, 1995; Lafontaine et Benhamou, 1996; Benhamou *et al.*, 1998). Des changements cellulaires semblables ont été induits par une pré-inoculation des plantules avec *Bacillus pumilus* SE 34. Un accroissement substantiel de ces changements induits par cette bactérie, en étendue et en amplitude, a été constaté lorsque des solutions de chitosane étaient introduites dans le milieu d'enracinement (Benhamou *et al.*, 1998). Un autre essai avec le concombre en culture hydroponique et le *Pythium aphanidermatum* a aussi permis de mettre en évidence le rôle d'exoéliciteur du chitosane. L'ajout de chitosane dans la solution

nutritive, à raison de 100 ou 400 µg/ml, a réussi à contrôler la pourriture causée par *Pythium* et à déclencher plusieurs mécanismes de défense dans les tissus racinaires et foliaires, soit l'induction de barrières structurales et la synthèse d'hydrolases antifongiques, comme la chitinase, la chitosanase et la  $\beta$ -1,3-glucanase (El Ghaouth *et al.*, 1994). De plus, le chitosane s'est révélé comme un inducteur de l'accumulation d'un inhibiteur de type protéinase dans les feuilles de tomate. Cette réponse physiologique était fortement réduite par l'application de deux inhibiteurs du sentier métabolique de l'octodécanoïde, les acides salicylique et diéthylthiocarbamique, ce qui confirme le rôle joué par cette voie métabolique dans la reconnaissance du signal entraîné par l'action des oligosaccharides. La concentration foliaire en acide jasmonique, le produit final de la voie métabolique de l'octodécanoïde, s'élevait jusqu'à un niveau trois fois plus grand que celle du plant témoin à l'intérieur d'un délai de deux heures après l'absorption d'une solution de chitosane (Doares *et al.*, 1995). L'injection de solutions de chitosane partiellement acétylé dans des feuilles de blé a aussi contribué à induire une plus grande activité des enzymes phénylalanine ammonia-lyase et peroxydase, une plus grande déposition de lignine et une sévérité accrue des zones nécrotiques. Cet effet était maximal avec du chitosane acétylé à 35% (Vander *et al.*, 1998). Le chitosane entraîne aussi une augmentation de l'activité d'une kinase myéline basique de 48 kilodaltons (*myelin basic protein kinase*) dans les tissus foliaires de tomate, mais l'acide jasmonique et l'acide phytodiénoïque, des produits de la voie métabolique de l'octodécanoïde, n'arrivent pas à induire une réponse semblable. Ces chercheurs pensent que cette kinase fonctionne à une étape rapprochée après la perception du signal primaire, en amont du produit du gène *DEF 1* et qu'elle est une étape clé dans les événements intracellulaires impliqués dans le couplage de la perception des divers signaux primaires de défense à la voie métabolique de l'octodécanoïde (Stratmann et Ryan, 1997).

Le traitement au chitosane de semences de deux cultivars de blé (*Triticum aestivum*) de printemps a permis de réduire les dommages causés par l'infection due à *Fusarium graminearum*, un agent pathogène endémique sur les semences, en stimulant la synthèse des acides phénoliques et de précurseurs de lignine dans les feuilles primaires. L'efficacité de

cette stimulation augmentait avec l'accroissement des concentrations en chitosane (Reddy *et al.*, 1999).

### **Effet du chitosane sur les microorganismes**

Un essai a permis de mettre en évidence l'effet bactériostatique du chitosane. Ainsi, la souche *Escherichia coli* CCRC 10674 a été cultivée en bouillon nutritif sous diverses conditions afin de vérifier l'effet de l'âge, de la température, du pH et de la concentration en sels sur l'activité bactériostatique de chitosane déacétylé à 98%. Les pertes cellulaires en glucose et en lactate déshydrogénase ont aussi été mesurées. Les cellules parvenues au stade tardif de la phase exponentielle de croissance étaient les plus sensibles à l'effet du chitosane. Cet effet de l'âge serait attribuable au fait que le nombre de charges négatives à la surface membranaire augmente de la phase initiale à la phase tardive de la croissance exponentielle. À l'intérieur d'une gamme de 4 à 37°C, l'activité antibactérienne du chitosane augmente avec la température. Aux températures plus froides, la cinétique réactionnelle entre le chitosane et les cellules serait ralentie et les cellules subirait un stress thermique ayant pour effet de modifier la structure membranaire d'une façon telle que le nombre de charges négatives disponibles pour le chitosane serait réduit. À l'intérieur d'une gamme de pH allant de 5,0 à 9,0, l'activité antibactérienne du chitosane est optimale à des pH acides. À des pH acides, les groupes amines (NH<sub>2</sub>) du chitosane sont chargés positivement (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) et peuvent donc interagir avec les charges négatives des membranes. À l'intérieur d'une gamme de concentrations en sels (cations monovalents et bivalents) allant de 0 à 100 mM, l'activité antibactérienne du chitosane est maximale aux faibles concentrations en sels. Le chitosane réussit à lier les cations par l'intermédiaire de ses groupes hydroxyles (OH) et amines (NH<sub>2</sub>). Comme les groupes amines assurent la liaison du chitosane aux cellules, la formation d'un complexe entre le chitosane et les cations empêcherait l'interaction entre le chitosane et les charges négatives des membranes. Dans le bouillon nutritif supplémenté en chitosane à raison de 800 ppm, les pertes cellulaires en glucose sont inversement proportionnelles au compte viable, tandis que l'activité de la lactate déshydrogénase demeurerait systématiquement plus élevée en comparaison avec celle observée dans le bouillon sans chitosane (témoin). Ce

phénomène serait attribuable à l'augmentation de la perméabilité membranaire résultant de la liaison du chitosane aux charges négatives des membranes (Tsai et Su, 1999). La même équipe de recherche a étudié l'effet d'un mélange d'oligomères de chitosane, préparé par une digestion d'un lot de chitosane par la cellulase de *Trichoderma viride*, sur la croissance de diverses espèces bactériennes dans du bouillon nutritif, du lait stérilisé et du lait cru. Le pourcentage en poids des oligomères ayant un degré de polymérisation (DP) de 6 à 8 était de 44,3%. La concentration minimale létale de ce mélange d'oligomères dans le bouillon nutritif incubé à 37°C variait de 5 à 29 ppm contre les espèces à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, et contre les espèces à Gram négatif *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Thyphimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerea* et *V. parahaemolyticus* comparativement à 50-1000 ppm pour le chitosane brut. Dans le lait stérilisé et inoculé artificiellement avec *L. monocytogenes*, *S. Thyphimurium*, *E. coli* et *S. aureus* la croissance bactérienne était plus fortement inhibée à 4°C qu'à 37°C. Comme le mélange d'oligomères de chitosane affichait une forte activité antibactérienne dans le bouillon nutritif à 37°C, la perte de cette activité dans le lait stérilisé pourrait être attribuable à l'interférence des composantes du lait dans la cinétique réactionnelle entre les oligomères et les cellules. Dans le lait cru supplémenté à 0,48% avec les oligomères de chitosane, les comptes viables obtenus à des températures d'incubation de 7°C et 37°C avoisinaient  $10^4$  à  $10^5$  UFC/ml comparativement à  $10^{12}$  UFC/ml pour le lait dépourvu d'oligomères. Dans le lait cru conservé à 4°C, le compte viable en coliformes est resté inchangé dans le lait supplémenté en oligomères à 0,24% et 0,48%, par rapport au lait témoin sans oligomères. Toutefois, le compte viable en staphylocoques a décliné jusqu'à une extinction complète au bout de quatre jours dans le lait supplémenté en oligomères et de huit jours pour le lait témoin. Le compte en salmonelles a augmenté à partir du huitième jour dans le lait supplémenté en oligomères à 0,48% tandis qu'il augmentait régulièrement jusqu'à  $10^5$  UFC/ml dans le lait témoin. Aucune cellule de *Listeria* spp. n'a été détectée dans le lait témoin et expérimental (Tsai *et al.*, 2000).

Un mélange semblable d'oligomères de chitosane a été produit dans un réacteur enzymatique contenant la chitosanase de *Bacillus pumilus*. Le mélange contenait en majorité des tétramères et des pentamères. Un ajout de 0,5% de ce mélange d'oligomères dans du bouillon d'hydrolysate tryptique de soja y a complètement inhibé la croissance de *E. coli* (Jeon et Kim, 2000). Trois mélanges d'oligomères de différentes tailles (i.e. moins de 1,5 kilodaltons [kDa], de 1,5 à 6 kDa et de 7 à 24 kDa) ont aussi été produits par cette équipe de recherche. Le mélange renfermant les oligomères les plus lourds a montré une capacité à inhiber complètement la croissance de plusieurs espèces bactériennes à Gram négatif et positif à l'exception de *P. aeruginosa* (Jeon et al., 2001).

No et al. (2002a, b) ont pour leur part étudié l'effet de six lots de chitosane, allant de 59 à 1671 kDa et de six lots d'oligomères de chitosane, allant de 1 à 22 kDa, sur la croissance de bactéries à Gram négatif et positif. Les lots de chitosane montraient une meilleure activité antibactérienne que les oligomères et inhibaient la plupart des espèces testées bien que leur performance variait avec la masse moléculaire et l'espèce cible. Les concentrations minimales inhibitrices variaient de 0,05% à 0,1% ou plus selon la masse moléculaire du chitosane et l'espèce cible.

Un nouveau type de chitosane, l'hydroxypropylchitosane (HPC), a été synthétisé par une étherification du chitosane avec de l'époxyde de propylène sous des conditions alcalines. Dans une seconde étape, de l'acide maléique sodique (AMS) a été greffé par copolymérisation à l'HPC afin de produire un dérivé multiple du chitosane, le HPC-g-AMS-n. À comparer au chitosane, l'HPC montrait une plus grande réactivité à la copolymérisation par greffage. Le dérivé HPC-g-AMS-1, formé en présence d'une concentration en monomère d'AMS de 0,6 M, était insoluble dans l'eau tandis que les dérivés HPC-g-AMS-2 (1,2 M d'AMS) et HPC-g-AMS-3 (1,8 M d'AMS) étaient hydrosolubles. L'activité antibactérienne de ces trois dérivés a été testée sur un tapis de *E. coli* et *S. aureus* formé sur une gélose nutritive (*Nutrient agar*) comportant un puits central où était déposé les dérivés sous forme de poudre. La zone d'inhibition était plus grande chez *S. aureus* que chez *E. coli* pour ces

trois composés et la plus grande avec HPC-g-AMS-2 et HPC-g-AMS-3 chez une même espèce tandis qu'elle était inexistante dans le cas du chitosane et de l'HPC, en raison peut-être de leur insolubilité dans l'eau. L'HPC-g-AMS-3 a été placé en présence de ces mêmes espèces à des concentrations de 1 et 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  et 100  $\text{ng ml}^{-1}$  et le compte viable a été mesuré dans des aliquotes prélevées à des temps différents. Plus de 99,9% des cellules de *S. aureus* et *E. coli* sont mortes pendant les premières 30 minutes de contact avec l'HPC-g-AMS-3, même à la plus faible concentration de 100  $\text{ng ml}^{-1}$ . À cette plus faible concentration, l'effet antibactérien était toutefois moins efficace sur *E. coli* que sur *S. aureus*. Cette différence d'efficacité est reliée aux différences structurales entre les membranes des bactéries à Gram positif et celles des bactéries à Gram négatif. Dans ce dernier cas, la paroi cellulaire est constituée d'une mince couche de peptidoglycanes, laquelle est recouverte d'une deuxième membrane (externe) phospholipidique sur laquelle sont ancrés des lipopolysaccharides. Cette structure en double couche, absente chez les bactéries à Gram positif, empêcherait la pénétration des molécules étrangères de haute masse moléculaire. Comme le test antibactérien a été réalisé dans de l'eau distillée (pH = 7), le mécanisme antibactérien attribué au groupe amine présent en position C-2 sur les unités de glucosamine, lequel assure la nature cationique du chitosane en milieu acide, ne peut dans ce cas être mis à contribution. Toutefois, à pH 7, la majeure partie des groupes amines de l'HPC-g-AMS-3 existe sous la forme non ionisée ( $\text{NH}_2$ ) et il y a alors une faible répulsion électrostatique et des ponts hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires peuvent ainsi s'établir et favoriser la formation de micro-régions hydrophobes. Pour leur part, les groupes carboxyles des monomères d'AMS sont fortement hydrophiles. Le dérivé est donc muni de régions hydrophobes et hydrophiles et sa nature amphiphile lui confère donc plus de facilité à se fixer aux parois cellulaires des bactéries (Xie *et al.* 2002).

Tel que mentionné plus tôt, le mécanisme antibactérien du chitosane implique une fixation des ses groupes  $\text{NH}_3^+$  sur les charges négatives présentes à la surface des cellules, ce qui entraîne une perméabilité accrue de la membrane. Cette hypothèse bénéficie maintenant d'une évidence expérimentale directe. Des cellules de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S.*

*typhimurium* ont été traitées avec une solution de chitosane (250 ppm, pH 5,3) et leur capacité à intégrer une sonde hydrophobe, le 1-*N*- phénylnaphtylamine (NPN), a été confirmée par fluorescence. La même expérience réalisée à un pH de 7,2 avec *S. typhimurium* a livré des résultats négatifs. L'effet du chitosane a aussi été vérifié en mesurant la sensibilité des cellules de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. typhimurium* à la bactériolyse induite par les détergents SDS (anionique) et Triton-X (non ionique). Le Triton-X a montré aucun effet bactériolytique chez les espèces étudiées. En revanche, l'effet bactériolytique du SDS était marqué chez *P. aeruginosa* et *S. typhimurium* et de moindre envergure chez *E. coli*. L'absence d'acides gras ou de lipopolysaccharides (LPS) dans le surnageant de cultures cellulaires traitées au chitosane a été vérifiée respectivement par chromatographie en phase gazeuse et par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide chargé de SDS. Une observation en microscopie électronique à transmission de cellules traitées au chitosane a montré une altération de la membrane externe et une membrane interne relativement intacte chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Enfin, la souche *S. typhimurium* SH7426, porteuse de la mutation *pmrA* et montrant des LPS anormalement cationiques, et la souche *S. typhimurium* SH9178, porteuse d'un gène *pmrA*<sup>+</sup> fonctionnel et montrant des LPS anioniques normaux ont été soumises à l'action de chitosane. Les cellules ayant atteint le milieu de la phase de croissance logarithmique et exposées au chitosane ont montré une viabilité pendant 24h dans le cas de la souche mutante cationique tandis que le compte viable de la souche parente anionique montrait une réduction de l'ordre de trois unités de logarithme UFC/ml. Ces expériences ont donc montré que le chitosane chargé positivement en milieu légèrement acide se lie aux groupes carboxyles et phosphates présents sur la surface bactérienne et chargés négativement et entraîne une altération de la membrane externe (Helander *et al.*, 2001).

Une étude sur le mycète phytopathogène *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, l'agent causal du chancre de la tige de la tomate et de la moisissure noire des tomates mûres a aussi permis de caractériser l'effet du chitosane sur sa physiologie. L'agent pathogène a été cultivé dans du bouillon à l'extrait de pomme de terre supplémenté en dextrose auquel on ajoutait du chitosane en concentrations variées. Une réduction de 78% du poids de mycélium a été

observée à une concentration en chitosane de 3200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en comparaison avec le bouillon sans chitosane (témoin). Cette même concentration en chitosane a aussi entraîné une réduction de 86,73% de la production d'alternariol (AL) et de 72,55% d'alternariol monoethyl éther (AME), deux toxines spécifiques à l'hôte. L'effet inhibiteur minimum du chitosane envers la production d'AL et d'AME s'observait à des concentrations respectives de 493,34  $\mu\text{g ml}^{-1}$  et de 675,43  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en comparaison avec une concentration de 937,65  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pour la croissance mycéliale. L'observation microscopique du mycélium exposé à diverses concentrations en chitosane montrait des anomalies structurales telles du gonflement, du branchement excessif et des torsions. Les hyphes étaient aussi plus hyalins et de la lyse cellulaire fut notée. Ces anomalies étaient plus prononcées à une concentration en chitosane de 3200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . À des concentrations sous-létales en chitosane, une sporulation excessive révéla un stress cellulaire. La viabilité des spores a chuté de 92,66% chez la culture en bouillon témoin à 0% chez le bouillon supplémenté en chitosane à 3200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . La quantité de protéines récupérées du bouillon variait de 3,32 à 13,48  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pour des concentrations en chitosane allant de 0 à 3200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ce qui laissait supposer une augmentation de la perméabilité membranaire. Des aliquotes de filtrat de culture de l'agent pathogène soumis à l'action du chitosane ont été déposées sur des disques de tomates vertes parvenues à leur taille finale afin de vérifier la capacité des toxines à activer la phospholipase des tissus de la tomate. Le contenu en phospholipides des tissus traités avec des filtrats de cultures réalisées en présence de chitosane était significativement plus grand que celui obtenu avec les filtrats sans chitosane (témoin), ce qui laisse supposer que le chitosane a pour effet de diminuer la capacité des toxines à causer des dommages tissulaires. L'activité de la xylanase et de la pectine méthylestérase, des enzymes impliquées dans la dégradation pariétale, a aussi été mesurée dans les extraits bruts des disques de tomate. Les extraits bruts des disques de tomate soumis à l'action de filtrats de cultures réalisées sans chitosane montraient la plus forte activité enzymatique tandis que cette activité diminuait de 50% dans le cas d'une concentration en chitosane de 3200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . À des concentrations sous-létales en chitosane, l'agent pathogène conserve sa capacité de production de toxines, mais celles-ci

perdent leur potentiel d'activation des enzymes de façon proportionnelle à l'augmentation de la concentration en chitosane (Reddy *et al.*, 1998).

Des études cytologiques et ultra-structurales ont aussi confirmé l'effet inhibiteur du chitosane envers les agents phytopathogènes lors d'expériences *in vivo*. L'examen microscopique des hyphes montrait un décollement pariétal, une vacuolisation et une désintégration protoplasmique, ce qui expliquait l'incapacité de l'agent pathogène à coloniser les tissus racinaires et sa présence quasi-exclusive à la surface des racines. Ces observations furent notées dans le cas du concombre avec *Pythium aphanidermatum* (El Ghaouth *et al.*, 1994), de la tomate avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Lafontaine et Benhamou, 1996; Benhamou et Picard, 1999) et de la carotte avec *Sclerotinia sclerotiorum* (Cheah *et al.*, 1997). Laflamme *et al.* (1999) ont étudié l'effet du chitosane sur *Cylindrocarpon destructans*, *Cylindrocladium floridanum*, *Fusarium acuminatum* et *F. oxysporum*, des agents causaux de la pourriture racinaire chez les semis de conifère cultivés en pépinière. Des géloses à l'extrait de pomme de terre et au dextrose (*Potato Dextrose Agar*) ont été inoculées avec une pastille de chacun des organismes phytopathogènes précités afin de mesurer l'inhibition en croissance radiale résultant d'un amendement en chitosane à raison de 0,5, 1 et 2 mg ml<sup>-1</sup>. *C. destructans* montrait la plus forte vulnérabilité au chitosane avec des inhibitions de croissance de 43 et 71% aux concentrations en chitosane de 1 et 2 mg ml<sup>-1</sup> respectivement. Des niveaux intermédiaires d'inhibition ont été remarqués chez *C. floridanum* et *F. oxysporum*, tandis que *F. acuminatum* était l'espèce la moins inhibée (21 et 23% à 1 et 2 mg ml<sup>-1</sup> respectivement). Une observation du jeune mycélium en microscopie optique et électronique à transmission montrait de sévères altérations morphologiques et ultrastructurales telles qu'une vacuolisation accrue, une rétractation de la membrane plasmique, un épaissement de la paroi cellulaire, une distorsion hyphale et une aggrégation cytoplasmique. Ces évènements pouvaient même entraîner un effondrement cellulaire total comme en témoignait la présence de cellules hyphales vides (Laflamme *et al.* 1999).

El Ghaouth *et al.* (1992) ont étudié l'effet du chitosane et de d'autres polyions sur l'enzyme déacétylase de la chitine (DC) chez *Rhizopus stolonifer*, un agent causal majeur de la pourriture des fruits après la récolte. Après une croissance dans du bouillon à l'extrait de pomme de terre et au dextrose, des extraits crus de protéines ont été analysés pour la présence de DC après une séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide sans SDS et avec SDS. Le chitosane a entraîné une augmentation de la DC. Cette stimulation de la DC par le chitosane pourrait être attribuable à sa nature polycationique si l'on considère que le polyéthylèneimine a montré un effet similaire alors que les polyanions (polygalacturonate et carboxyméthylcellulose) et le polymère neutre (hydroxypropylméthylcellulose) n'ont montré aucun effet sur cette enzyme. De plus, l'effet du chitosane peut aussi être relié à la densité de charge des groupes cationiques des monomères et leur basicité. En effet, l'augmentation en DC était plus grande en présence de polyéthylèneimine que celle entraînée par le chitosane. Comme la DC est impliquée dans la biosynthèse du chitosane chez les Zygomycètes, la stimulation de cette enzyme par l'application de chitosane pourrait modifier le ratio chitine-chitosane dans les parois cellulaires et influencer le délicat équilibre entre la biosynthèse et la dégradation des composantes de la paroi cellulaire.

Cuero (1999) a procédé à une revue de l'effet antimicrobien du chitosane. L'efficacité antimicrobienne est profondément influencée par la nature du matériel chitineux. Ainsi, *in vitro*, le chitosane natif montre une activité antimicrobienne moins importante qu'un de ses dérivés : le N-carboxyméthyl de chitosane (NCCM). Le NCCM a un potentiel antimicrobien plus important que le chitosane, même lorsque sa concentration est plus faible. L'efficacité du NCCM serait reliée à sa capacité d'immobiliser les cations métalliques, comme le cuivre, le zinc et le fer, et de priver ainsi les microorganismes de cette source vitale de nutriments. De même, le N-carboxybutyl de chitosane (NCBC) présente *in vitro* une meilleure activité bactériostatique que les autres types de chitosane. Les polyaminosaccharides cationiques et amphotères interagissent avec la paroi cellulaire des bactéries et altèrent sa structure par la formation d'un complexe de polyélectrolytes et l'action perturbatrice sur l'équilibre apporté par les ions métalliques. Les enzymes autolytiques contrôlent la division chez les bactéries

mais deviennent létales en présence de composés cationiques. Il est donc possible qu'un mécanisme similaire soit induit par la présence du chitosane cationique. De plus, les groupes amines cationiques du chitosane peuvent se combiner par interaction électrostatique avec des composés anioniques comme l'acide N-acétylmuramique, l'acide muramique et l'acide sialique à la surface de la paroi cellulaire et supprimer la croissance bactérienne. Il semble aussi qu'il existe un degré de polymérisation (DP) optimal chez les oligomères de chitosane pour inhiber la croissance bactérienne. Ainsi, Kendra et Hadwiger (1984) ont testé l'activité antifongique d'oligomères de chitosane de différents DP sur *Fusarium solani*. Les hexamères et les heptamères déacétylés montraient les plus fortes activités antifongiques. La forme du chitosane influence aussi fortement l'efficacité antimicrobienne. Le chitosane en solution est plus facilement assimilable par les cellules microbiennes que le chitosane pulvérisé. Dans ce dernier cas, le diamètre des particules doit être inférieur à 50  $\mu\text{m}$  pour exercer une activité antifongique notable, mais celle-ci variait avec l'espèce fongique (Stössel et Leuba, 1984). La nature polycationique du chitosane expliquerait la relation inverse observée entre le diamètre des particules et son activité antifongique, car les plus petites particules ont un plus grand nombre de cations exposés à leur surface qui peuvent interagir avec la paroi cellulaire et augmenter sa perméabilité (Stössel et Leuba, 1984). Le chitosane déacétylé à 91% montrait une plus grande activité antifongique que celui déacétylé à 66%. Toutefois, l'activité antifongique du chitosane était plus forte dans le milieu de Vogel que dans le milieu au jus de légumes V8. Cette différence pourrait être attribuable à la faible concentration (300  $\text{mg L}^{-1}$ ) en cations bivalents du milieu de Vogel. Un moins grand nombre de cations bivalents cause moins d'interférence entre les charges positives du chitosane et les charges négatives de la paroi cellulaire (Stössel et Leuba, 1984). En influençant les propriétés polycationiques et la solubilité du chitosane, le pH joue aussi un grand rôle sur son activité antifongique. Celle-ci était plus grande à pH 4 qu'à pH 8 (Stössel et Leuba, 1984). Allan et Hadwiger (1979) ont testé l'effet antifongique du chitosane et de la chitine sur 46 espèces de mycètes réparties en quatre catégories de composition de la paroi cellulaire. Le chitosane a inhibé la croissance de 32 de ces espèces à des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 75 à 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  tandis que la chitine a inhibé seulement six de ces espèces à des

CMI allant de 250 à 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . De plus, toutes les espèces inhibées par la chitine étaient également inhibées par le chitosane à une concentration au moins égale ou inférieure à celle de la chitine. Le fait marquant était qu'avec les concentrations utilisées (8 à 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), le chitosane n'exerçait aucun effet contre les espèces aux parois cellulaires composées de chitine et de chitosane. À l'intérieur d'une même catégorie de paroi cellulaire, la sensibilité au chitosane variait non seulement entre les genres mais aussi entre les isolats et espèces d'un même genre. Le type d'acide utilisé pour la préparation des solutions de chitosane influence aussi son activité antimicrobienne. Les solutions de chitosane préparées avec de l'acide acétique exercent un effet antifongique plus rapide que celles préparées avec de l'acide lactique (Cuero, 1999). De même, l'acide acétique à 1% s'est révélé efficace dans l'inhibition de plusieurs espèces bactériennes, sauf pour le cas des lactobacilles qui étaient plus efficacement inhibés par l'acide lactique ou formique à 1% (No *et al.*, 2002a). Par ailleurs, les solutions de chitosane préparées avec de l'acide acétique peuvent être conservées pendant trois ans ou plus à la température de la pièce sans perdre leur capacité antimicrobienne tandis que celles préparées avec l'acide lactique perdent cette activité dans un délai inférieur à trois ans à la température de la pièce (Cuero, 1999). La source de chitosane influence aussi sa capacité antimicrobienne. Le chitosane fabriqué à partir des carapaces de crustacés semble exercer son activité antimicrobienne par l'intermédiaire de divers mécanismes comme l'induction de chitosanase et de composés phénoliques ainsi que le blocage de la disponibilité en nutriments des cellules microbiennes tandis que le chitosane d'origine microbienne agit surtout par l'induction de chitosanase (Cuero, 1999).

### **Physico-chimie du chitosane**

Le chitosane, un copolymère de glucosamine et de N-acétyl-glucosamine, est soluble dans des solutions acides dont le pH est inférieur à 6,3. Le chitosane peut former des hydrogels en présence de polyanions multivalents ou de glutaraldéhyde. Sa densité de charge est très élevée en raison de la présence d'une charge positive par unité de glucosamine. Le chitosane est une polyamine linéaire munie de groupes amines disponibles pour des réactions chimiques et pour la formation de sels en présence d'acides. Les caractéristiques importantes

du chitosane comprennent sa masse moléculaire, sa viscosité, son degré de déacétylation, son indice de cristallinité, son nombre de monomères, sa valeur de rétention en eau ( $pK_a$ ) et son énergie d'hydratation (Kaş, 1997).

Le comportement du chitosane en solutions diluées a fait l'objet de nombreuses études. À une concentration molaire constante en un type d'acide, le nombre de groupes amines chargés positivement ( $NH_3^+$ ) dépend de la constante de dissociation ( $pK_a$ ) de l'acide utilisé pour solubiliser le chitosane. À partir de mesures de conductivité et de viscosité, il a été démontré que la solubilité du chitosane évolue en parallèle avec l'augmentation du nombre de groupes amines chargés positivement (Rinaudo *et al.*, 1999). Dans les solutions de faible force ionique, où la concentration du contre-ion est plus faible, la molécule de chitosane existe sous une conformation étendue, ce qui maintient la viscosité intrinsèque du chitosane à des valeurs élevées. Une situation inverse prévaut dans les solutions de forte force ionique, car la concentration plus forte du contre-ion a pour effet de "masquer" les groupes amines chargés positivement, ce qui entraîne une disparition des forces électrostatiques de répulsion et par voie de conséquence la contraction de la molécule de chitosane et une diminution de la viscosité intrinsèque. Cette même viscosité s'accroît aussi dans les solutions renfermant de l'urée 4 M. Cet accroissement est plus marqué dans le cas du chitosane de haut poids moléculaire parce que l'urée brise les liens hydrogène intra-moléculaires, maintient la molécule de chitosane sous une forme étendue et assure ainsi des valeurs élevées de viscosité intrinsèque. La viscosité intrinsèque du chitosane de même degré de déacétylation dans des solutions de même force ionique et de même pH diminue avec la diminution du poids moléculaire (Tsai et Chen, 1997; Domard et Domard, 2002).

Une étude portant sur l'optimisation de la solubilisation du chitosane dans des solutions diluées de divers acides organiques a été effectuée (Diagne, 1998). Les essais ont permis d'identifier l'acide formique et l'acide acétique comme les meilleurs solvants du chitosane. Ainsi, l'acide formique permet la préparation de solutions quatre fois plus concentrées en chitosane que le solvant avec une solubilité du polymère égale ou supérieure à 99 % dans une

étendue de concentration pondérale du solvant de 0,01% à 1% et de 0,04% à 4% pour le chitosane. Les résultats obtenus avec l'acide acétique montrent aussi une solubilité du chitosane égale ou supérieure à 99%, mais avec un rapport de solubilisation de 1/3, soit une concentration en chitosane trois fois plus élevée que celle du solvant, pour des concentrations du solvant comprises entre 0,2% et 1%.

En résumé, l'ionisation des unités glucosamine du chitosane lui confère des charges électriques positives qui peuvent potentiellement interagir avec des charges électriques négatives portées par des polyanions. Cette potentialité du chitosane le rend apte à former des hydrogels lorsqu'il est placé en présence d'un polyanion.

### **Technologies d'immobilisation**

Cette section vise à présenter les caractéristiques essentielles de chacune des méthodes d'immobilisation recensée dans la littérature. Les applications principales de chacune d'elles seront aussi décrites par quelques exemples. La définition de microcapsule ou de microsphère varie selon les auteurs consultés. Elles se définissent lâchement comme des particules ayant un diamètre de 50 nanomètres à deux millimètres et composées d'une matrice de polymère(s) dans laquelle est renfermée un composé actif ou un microorganisme. Le terme particule implique une certaine rigidité qui est plus grande que des unités compressibles comme des cellules ou des liposomes. Dans un sens strict, les microsphères sont des microcapsules vides, mais ces deux termes sont souvent utilisés comme des synonymes. Les microsphères ou microcapsules dont le diamètre est inférieur à 1,0 micromètre sont appelées nanosphères ou nanocapsules afin de mettre en évidence leur petite taille (Arshady, 1989). Une dernière source de confusion mérite d'être clarifiée. Le terme *immobilisation* en langue anglaise, surtout dans le cas de l'immobilisation de cellules, implique la présence d'une membrane à la limite de la microsphère tandis que le mot anglais *entrapment* s'applique à la précipitation sous forme de microsphère du polymère (coacervation simple) ou à la formation d'une microsphère résultant de l'interaction entre deux polymères de charges opposées (coacervation complexe). Le mot *entrapment*

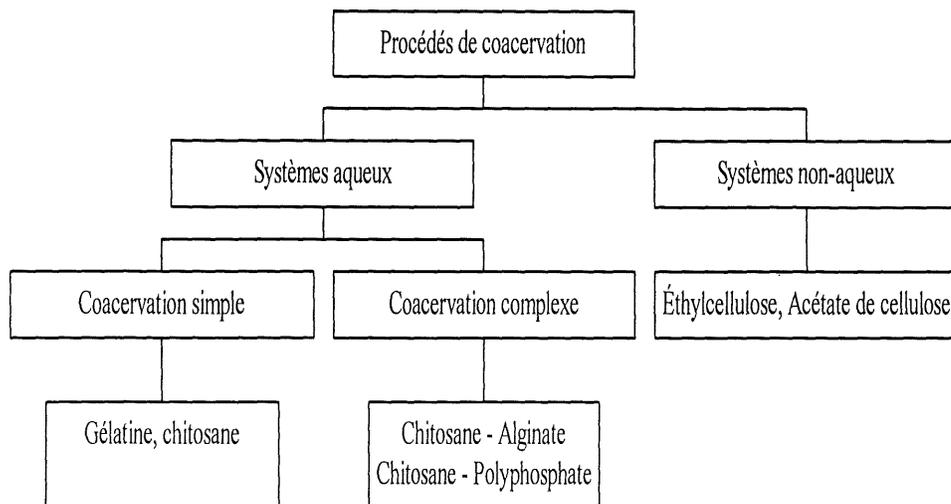
n'implique donc pas la présence d'une membrane (Hartmeier, 1988). Comme il n'existe pas de mot équivalent à *entrapment* dans la langue française, il faut donc emprunter le mot immobilisation (créé à partir du verbe immobiliser) à la langue anglaise, tout en ayant conscience de ces nuances sémantiques.

### **Coacervation simple**

Le mot coacervation est dérivé du latin *coacervus* qui veut dire tas ou pile. Il se rapporte à l'agrégation macromoléculaire (ou à la séparation de phase) résultant de la l'enlèvement partiel des molécules du solvant agglomérées autour des macromolécules (Arshady, 1990). Le chitosane est dissous dans une solution diluée d'acide acétique. Au moyen d'une seringue munie d'une aiguille cette solution est distribuée goutte à goutte dans une solution de NaOH (Kawamura *et al.*, 1997), de NaOH et de méthanol (Shinonaga *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1986; Chen et Tsaih, 1997), d'éthanediamine (Yao *et al.*, 1995) ou de polyvinylalcool (Stolberg *et al.*, 1999). Comme la solution de NaOH possède un pH supérieur à 6,5, le chitosane devient insoluble et précipite immédiatement sous la forme de microsphères. Dans le cas de la solution de NaOH et de méthanol, l'interaction plus forte entre les molécules d'eau et celles de méthanol conduit à une réduction graduelle de l'hydratation des molécules de chitosane. Cette déshydratation graduelle mène à son tour à des interactions plus fréquentes entre les molécules de chitosane elles-mêmes et par voie de conséquence à la formation d'agrégats macromoléculaires ou de coacervats partiellement déshydratés. Sous des conditions statiques, ces agrégats se rapprocheraient pour former une phase séparée de la phase aqueuse. Pour des fins d'immobilisation, il faut donc agiter la solution réceptrice pendant l'ajout goutte à goutte de la solution de chitosane à une vitesse suffisamment élevée pour éviter ce phénomène mais suffisamment basse pour permettre la formation de microsphères. Le chitosane a été utilisé en coacervation simple pour encapsuler l'ampicilline (Chandy et Sharma, 1993a), le chlorure ferrique (Chandy et Sharma, 1996), un facteur de croissance de cellules endothéliales (Elçin *et al.*, 1996), du charbon activé (Chandy et Sharma, 1993b), la phthalocyanine (Stolberg *et al.*, 1999), l'adriamycine (Nishimura *et al.*, 1986) et des cellules de levure (Shinonaga *et al.*, 1992). Une variante de cette méthode a été

développée en utilisant le sulfate de sodium comme agent de précipitation afin d'encapsuler une drogue, la prednisolone (Berthold *et al.*, 1996). Le chitosane est dissous dans une solution diluée d'acide acétique qui contient aussi du polysorbate 80 à 1% en guise d'agent émulsifiant. Une solution de sulfate de sodium y est ajoutée goutte à goutte pendant qu'elle est soumise à une agitation légère et à une ultrasonication. L'apparition graduelle d'une turbidité confirme la formation des microsphères, qui sont recueillies par centrifugation et suspendues dans l'eau distillée.

Il convient ici d'introduire quelques notions de classification des méthodes de coacervation. Les polymères hydrosolubles comme le chitosane (si le  $\text{pH} < 6,5$ ) et la gélatine sont aussi appelés des colloïdes hydrophiles tandis que l'éthylcellulose est un polymère soluble dans des solvants non-aqueux comme le cyclohexane et le dichlorométhane et est par conséquent considéré comme un colloïde hydrophobe. Le système de coacervation peut donc être aqueux ou non-aqueux. Les termes aqueux et non-aqueux s'appliquent à la solution du polymère qui participe à la formation de la matrice et non pas à la substance qui est encapsulée. Dans les systèmes aqueux de coacervation, la substance à encapsuler est nécessairement insoluble (ou peu soluble) dans l'eau. Les substances hydrosolubles sont encapsulées au moyen de systèmes non-aqueux. Les systèmes aqueux de coacervation sont eux-mêmes subdivisés en coacervation simple et en coacervation complexe. La coacervation simple implique l'usage d'un seul polymère (e. g. alginate ou chitosane) tandis que la coacervation complexe se réfère à l'usage de deux polymères de charge opposée (e. g. chitosane et alginate). La figure 3 montre la classification conventionnelle des différents procédés de coacervation.



**Figure 3: classification des procédés de coacervation pour la préparation de microcapsules (Arshady, 1990)**

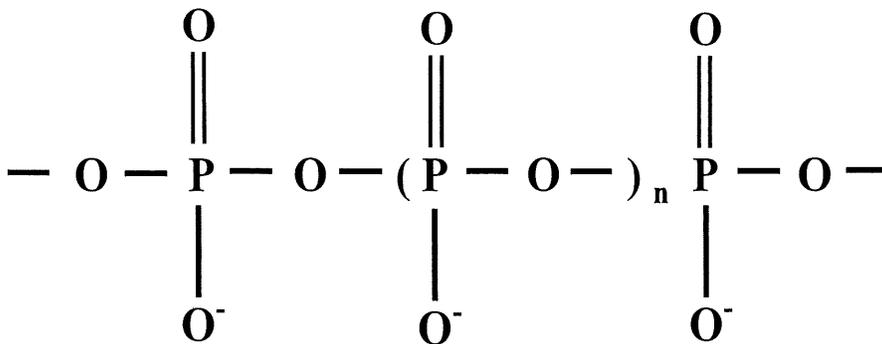
### Coacervation complexe

La coacervation complexe se nomme aussi gélification (du verbe gélifier) ionotropique, un terme dérivé de l'expression anglaise *ionotropic gelation* (Dulieu *et al.*, 1999; Kaş, 1997). Le phénomène de gélification se produit lorsqu'une solution de polymère est introduite goutte à goutte dans une solution faiblement agitée renfermant un autre polymère de charge opposée (contre-ion). Le chitosane a servi à l'immobilisation de cellules du colibacille en le complexant avec le ferrocyanure de potassium ou le tripolyphosphate de sodium (Vorlop et Klein, 1981) et avec le polyphosphate de sodium (Vorlop et Klein, 1987). Le polyphosphate de sodium  $(\text{NaPO}_3)_{16-19}$  et surtout le tripolyphosphate de sodium  $(\text{NaPO}_3)_3$  ont été utilisés à maintes reprises avec le chitosane pour encapsuler divers composés d'intérêt thérapeutique comme le vaccin de la maladie de Newcastle (Mi *et al.*, 1999a), l'indométhacine (Shiraishi *et al.*, 1993), le piroxicam (Sezer et Akbuğa, 1995), la theophylline (Kawashima *et al.*, 1985), la griséofulvine, le tolbutamide, la sulfadiazine, l'ibuprofène et l'indométhacine (Bodmeier et Paeratakul, 1989), la caféine, la quinine et l'acide salicylique (Bodmeier *et al.*, 1989), la calcitonine de saumon (Aydin et Akbuğa, 1996), le diclofenac de sodium (Açikgöz *et al.*, 1992; 1996) et des fibroblastes (Zielinski et Aebischer, 1994). Dans ce dernier cas, les

microcapsules étaient laminées d'une couche d'alginate à 0,8% préalablement dissous dans le NaCl à 0,8%.

### Description du polyphosphate et sa présence dans la nature

Le polyphosphate (figure 4) peut être produit artificiellement ou naturellement par un phénomène géologique ou par certaines espèces microbiennes. Le polyphosphate de sodium est préparé à partir de monophosphate de sodium monohydraté  $[\text{Na}(\text{H}_2\text{PO}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}]$ . Ce dernier est déshydraté par un chauffage à  $34^\circ\text{C}$  pour donner du monophosphate de sodium, lequel est chauffé à plus de  $160^\circ\text{C}$  pour produire du diphosphate de sodium  $[\text{Na}_2(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7)]$ . Ce dernier produit est chauffé à plus de  $240^\circ\text{C}$  pour produire du trimétaphosphate de sodium  $[\text{Na}_3(\text{P}_3\text{O}_9)]$ , une molécule cyclique. Ces molécules cycliques sont linéarisées et condensées par un chauffage à  $625^\circ\text{C}$  pour donner le polyphosphate de sodium  $(\text{NaPO}_3)_n$  sous une forme de verre liquéfié. Ce verre liquéfié est refroidi pour donner le produit final sous une forme de verre solide (Thilo, 1962). Ce procédé de fabrication a cours naturellement lors de la condensation des laves volcaniques ou dans les cheminées du plancher océanique (Kornberg, 1999).

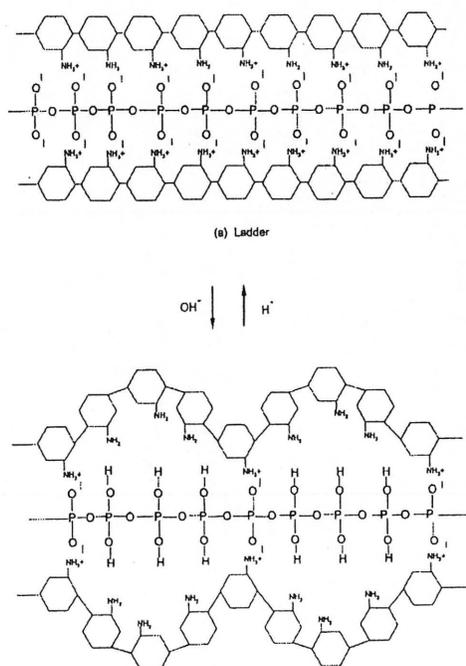


**Figure 4 Structure moléculaire du polyphosphate**

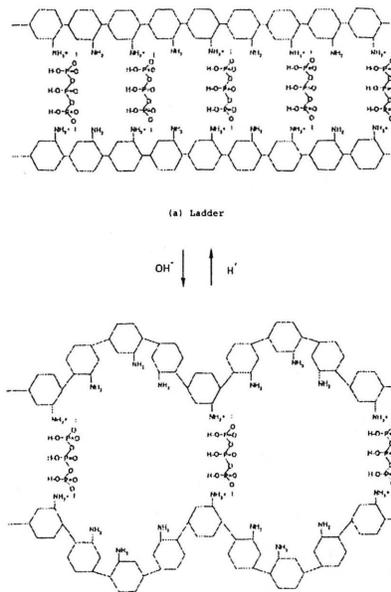
Le polyphosphate se rencontre chez tous les organismes vivants: bactéries, mycètes, protozoaires, plantes et animaux. Il remplit des fonctions biologiques nombreuses et variées selon sa localisation (espèce, cellule, organe cellulaire) et le moment de sa nécessité. Ainsi, le polyphosphate peut servir de substitut de l'ATP dans les réactions kinases, de réservoir de

phosphate inorganique ( $P_i$ ), d'agent chélateur des métaux lourds (e.g.  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ), de tampon contre les substances alcalines, à l'enlèvement du phosphate polluant et d'ajusteur physiologique de la croissance, du développement, du stress et de la privation (Kornberg, 1999).

L'influence du pH de la solution du contre-ion sur les caractéristiques des billes de chitosane et de polyphosphate ou de tripolyphosphate a fait l'objet d'une étude. Les billes ont été analysées en spectrométrie infra-rouge afin de mesurer l'absorbance causée par le groupe  $P=O$  du tripolyphosphate et le groupe  $P-O$  du polyphosphate. Un modèle appelé échelle-boucle du complexe de polyélectrolytes a ainsi été développé pour le polyphosphate (figure 5) et le tripolyphosphate (figure 6).



**Figure 5. Transition échelle-boucle du chitosane avec le polyphosphate (Mi *et al.*, 1999b)**



**Figure 6. Transition échelle-boucle du chitosane avec le triphosphate (Mi *et al.*, 1999b)**

À des pH basiques ( $> 6,5$ ), une plus faible proportion du nombre total de groupes amines ionisés ( $\text{NH}_3^+$ ) entraîne une faible charge de répulsion et le chitosane adopte ainsi une conformation en pelote statistique (*random coil*) et rend plus difficile l'établissement de liens ioniques avec le contre-ion. Le complexe de polyélectrolytes présente alors une forme en boucle. Toutefois, à des pH acides ( $\leq 6,5$ ), le chitosane montre une conformation plus linéaire en raison de l'hydratation des groupes amines ionisés alors plus nombreux et de la forte répulsion entre les charges positives de ces mêmes groupes  $\text{NH}_3^+$ . Le complexe de polyélectrolytes peut donc former dans ces conditions une structure en échelle (Mi *et al.*, 1999b).

Le chitosane a aussi été complexé avec la caséine pour l'immobilisation de l'hydrochlorure de diltiazem (Bayomi *et al.*, 1998). L'alginate a aussi été utilisé avec le chitosane pour encapsuler de l'albumine sérique bovine (Polk *et al.*, 1994), de l'hémoglobine humaine et du dextran (Huguet et Dellacherie, 1996), du dextran bleu et de l'hémoglobine (Huguet *et al.*, 1996), un colorant alimentaire et des cellules de carotte et de céleri (Pandya et Knorr, 1991) et des embryons somatiques de carotte et de colza (Tay *et al.*, 1993). Le xanthane a aussi

servi de contre-ion au chitosane pour encapsuler la lipase (Dumitriu *et al.*, 1995), la xylanase (Dumitriu et Chornet, 1997), la xylanase et la protéase (Dumitriu *et al.*, 1994) et la xylanase, la lipase et la protéase (Dumitriu et Chornet, 1998).

La dureté des microsphères ainsi produites peut être augmentée par une réticulation (*cross-linkage*) avec du glutaraldehyde (Carreño-Gomez et Duncan, 1997), de la formaldehyde (Bayomi *et al.*, 1998) ou de l'éthylène glycol diglycidyl ether (Mi *et al.*, 1999a). Le glutaraldehyde s'est toutefois révélé toxique envers la lignée cellulaire B16 F10 du mélanome de la murine (Carreño-Gomez et Duncan, 1997).

### **Émulsification**

Cette méthode implique la formation de gouttelettes stables de la solution du polymère dans un liquide immiscible, un durcissement graduel des gouttelettes par une réticulation covalente (*covalent cross-linking*) et la récupération des microsphères réticulées du polymère. La solution du polymère renferme une substance dissoute ou dispersée qui doit nécessairement avoir une plus grande affinité pour la phase des gouttelettes que pour le liquide immiscible. Dans le cas contraire, la substance à encapsuler ne pourrait demeurer à l'intérieur des gouttelettes. Il est essentiel de maintenir l'individualité des gouttelettes pendant la réaction de réticulation. Cette individualité est préservée au moyen d'une agitation constante par un rotor ou/et par sonication en présence d'un agent émulsifiant. Cet agent émulsifiant favorise la formation d'un mince film autour des gouttelettes ou particules et prévient donc leur coagulation. L'agent émulsifiant est de préférence un polymère ou un oligomère insoluble dans la phase des gouttelettes et peu soluble dans le liquide immiscible (Arshady, 1989). Cette méthode produit des microsphères d'un diamètre de quelques micromètres à un millimètre. De l'ordre de 30 à 50% de la moyenne, la variation du diamètre est toutefois plus grande que dans le cas des méthodes d'immobilisation décrites précédemment. Cette méthode se prête en revanche à une production à l'échelle industrielle (Dulieu *et al.*, 1999). L'augmentation de la vitesse d'agitation, de la concentration de l'agent émulsifiant et de l'agent de réticulation favorise la diminution de la taille des microsphères et

de la distribution des diamètres alors que l'augmentation de la concentration en chitosane produit l'effet contraire (Denkbaş et Odabaşı, 2000).

Le chitosane a été utilisé à maintes reprises pour encapsuler diverses molécules d'intérêt thérapeutique au moyen de cette méthode. De l'insuline a ainsi été encapsulée en utilisant de l'huile de paraffine comme phase organique et l'ascorbyl palmitate comme agent émulsifiant (Aiedeh *et al.*, 1997) ou encore l'huile minérale comme phase organique et l'ascorbyl palmitate et le dehydroascorbyl palmitate comme agents émulsifiants (Bugamelli *et al.*, 1998). Le pamidronate et le suberoylbiphosphonate ont été encapsulés en utilisant le dioctyl sulfo succinate comme phase organique et le glutaraldehyde comme agent de réticulation (Patashnik *et al.*, 1997). Le 5-fluorouracile et ses dérivés ont été encapsulés en utilisant le toluène comme phase organique, le Span 80 comme agent émulsifiant et le glutaraldehyde comme agent de réticulation (Ohya *et al.*, 1994). La furosemide a été encapsulé en utilisant la paraffine liquide, l'huile minérale et l'huile de graine de soya comme phase organique et le glutaraldehyde comme agent de réticulation (Akbuğa et Durmaz, 1994). Le phenobarbitone a été encapsulé en utilisant la paraffine liquide légère comme phase organique, le sorbitan monooleate comme agent émulsifiant et le glutaraldehyde comme agent de réticulation (Al-Helw *et al.*, 1998). Une variante de cette méthode (*dry-in-oil emulsion*) a été utilisée pour encapsuler du kétoprofène avec des lots de chitosane de faible, moyenne et haute masse moléculaire. Le mélange de chitosane et de kétoprofène était dispersé dans l'huile de paraffine renfermant du Span 20. L'émulsion était ensuite chauffée progressivement jusqu'à 60°C et agitée sous des conditions de vide partiel jusqu'à l'évaporation complète du solvant (Genta *et al.*, 1998). L'oxytétracycline a été encapsulée au moyen d'une autre variante de cette méthode (*interfacial acylation*) en utilisant des lots de chitosane de différentes masses moléculaires. Le mélange de chitosane et d'oxytétracycline était dispersé dans de l'huile de graine de soya pour former une émulsion au moyen d'une agitation à 150 RPM. De l'anhydride acétique était ensuite ajouté goutte à goutte pour solidifier les microsphères, dont le diamètre variait de 150 à 700 micromètres (Mi *et al.*, 1997). Une autre variante de cette méthode (*emulsification-coacervation technique*) a été utilisée à deux reprises. De

l'hydrochlorure de propanolol a été encapsulé dans du chitosane par une dispersion dans un mélange de paraffine liquide légère et lourde renfermant du dioctyl sulphosuccinate de sodium comme agent émulsifiant. À cette émulsion était ajouté à intervalles réguliers un volume constant d'une solution de tripolyphosphate de pentasodium pour former des microsphères dont le diamètre variait de 150 à 350 micromètres (Lim et Wan, 1998). La même variante de la méthode a fait l'objet d'une étude faisant varier la concentration du chitosane, de l'agent émulsifiant et du NaOH ainsi que le temps de l'émulsification et de l'agitation et la vitesse de l'agitation. La solution de chitosane était versée dans de l'isooctane renfermant du Span 85 (sorbitan trioleate). Après la formation de l'émulsion, un volume constant d'une solution de NaOH était ajouté à tous les 30 minutes et le brassage était par la suite poursuivi pendant 2 à 4 heures pour former des microsphères dont le diamètre de 70% d'entre-elles variait de 500 à 1000 micromètres lorsque la vitesse d'agitation était de 500 RPM (Lim *et al.*, 1997).

Une étude portant sur l'immobilisation de cellules de *Lactococcus lactis* par émulsification a été réalisée en faisant varier plusieurs paramètres. Le chitosane était d'abord dissous dans une solution d'acide acétique de 0,35 à 1,05M tamponnée avec de l'acétate de sodium à 0,9N et le pH était ajusté à 5,6 avec un volume minimal de NaOH à 5N. Une pastille de 0,5 gramme (masse humide) de cellules était suspendue dans 10 millilitres d'une solution de chitosane (viscosité à 23°C = 60 centipoises) à 4%. Cette suspension cellulaire était ensuite dispersée dans 50 millilitres de phase organique supplémentée en Span 85 à 2%. Le cyclohexane et diverses huiles minérales et végétales servaient de phase organique. Après la formation de l'émulsion, les microsphères étaient réticulées avec du glutaraldehyde (GA; OHC-[CH<sub>2</sub>]<sub>4</sub>-CHO), du chlorure de terephthaloyl (CT; ClCO-Ph-COCl) ou du diisocyanate d'hexaméthylène (DIH; OCN-[CH<sub>2</sub>]<sub>6</sub>-NCO) mélangé avec 10 millilitres de la phase organique respective. Le cyclohexane favorisait la récupération des microsphères en raison de sa faible viscosité (1 centipoise à 23°C) mais sa biocompatibilité était inadéquate. Le concentration en chitosane de 4% constituait le meilleur compromis entre la viscosité de sa solution (60 centipoises) et la résistance mécanique des microsphères produites. La viscosité

de la solution de chitosane doit être supérieure ou égale à celle de l'huile afin de faciliter la récupération des microsphères. La résistance mécanique des microsphères augmentait avec la concentration en chitosane jusqu'à une valeur de 4%. Une concentration en chitosane de 1% était insuffisante pour assurer la formation de microcapsules alors que le diamètre des microsphères augmentait de 220 à 620 micromètres lorsque la concentration en chitosane passait de 2 à 6%. Les microsphères formées à partir d'une solution de chitosane à 4% dispersée dans des huiles minérales d'une viscosité inférieure ou égale à 20 centipoises étaient décantées de la phase organique en 2 minutes. La résistance mécanique des microsphères augmentait avec la diminution de leur diamètre, qui à son tour variait selon la différence de viscosité entre les phases aqueuse et organique. Les membranes formées avec le GA et le DIH étaient les plus résistantes (Groboillot *et al.*, 1993).

Mon projet de recherche comporte donc cinq parties: 1) la mise au point d'une méthode d'immobilisation de spores de la souche antagoniste EF-76 dans des billes de chitosane et de polyphosphate; 2) la confirmation de la biodégradabilité de ces billes par l'action de la chitosanase; 3) la vérification de la viabilité des spores immobilisées et de leur distribution dans la structure interne des billes de chitosane; 4) la capacité des spores immobilisées à germer dans un sol et d'y produire un mycélium et 5) la capacité de ces billes de chitosane à réduire les symptômes de la gale commune chez la pomme de terre sous des conditions contrôlées.

## CHAPITRE 1

### 1.1 Examen microscopique de billes de chitosane-polyphosphate renfermant des spores d'un agent de lutte biologique, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76

Les essais d'immobilisation d'agents microbiens dans des billes de biopolymères répertoriés dans la littérature montrent de nombreuses lacunes. Ainsi, la viabilité des agents microbiens après leur immobilisation dans des billes de chitosane n'a pas été observée directement, de même que leur distribution dans la structure interne de ces billes. L'hydrolyse enzymatique des billes n'a pour sa part jamais été vérifiée. Pourtant, ces trois paramètres influencent directement le délai de libération dans le sol des microorganismes immobilisés. Des cellules de *E. coli* ont été immobilisées dans des billes de chitosane-polyphosphate afin de construire un biocatalyseur (Vorlop et Klein, 1981, 1987). Plusieurs autres essais consistaient à immobiliser des espèces microbiennes promotrices de la croissance des plantes dans des billes constituées d'alginate complexé avec du  $\text{Ca}^{+2}$  (Strullu et Plenchette, 1991; Paul *et al.*, 1993; Trevors *et al.*, 1993; Galiana *et al.*, 1994; Declerck *et al.*, 1996; Bashan et Gonzalez, 1999; Vassilev *et al.*, 2001) et de  $\kappa$ -carraghénine complexé avec du  $\text{K}^{+}$  (Leung *et al.*, 1995). Une étude portant sur l'immobilisation de cellules de *Bacillus mycoides* et de *Streptomyces* sp. dans des billes de  $\text{Ca}^{+2}$ -alginate visait à créer un outil de lutte biologique pour lutter contre les maladies racinaires des plantes (Hammad et El-Mohandes, 1999). La plupart de ces études utilisaient très peu ou pas du tout les techniques de microscopie optique (MO) ou électronique (ME) pour réaliser un examen systématique des deux premiers paramètres cités plus haut.

Dans ce travail, nous avons étudié la faisabilité technique de l'immobilisation de spores de *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 dans des billes de chitosane-polyphosphate comme une étape initiale de la mise au point d'un outil de lutte biologique pour lutter contre les maladies racinaires. Nous avons mis à contribution plusieurs techniques microscopiques afin de réaliser un examen systématique de ces billes et d'estimer leur efficacité éventuelle. Un essai d'hydrolyse enzymatique par la chitosanase a été réalisé.

Une coloration d'un homogénat de ces billes avec un colorant indicateur de vitalité a permis de confirmer la viabilité des spores après leur immobilisation dans les billes hydratées et après la lyophilisation de ces billes.

La coloration au bleu de toluidine de coupes ultra-minces a pour sa part révélé une structure interne des billes caractérisée par une membrane encerclant un réseau de microfibrilles, lesquelles délimitaient des espaces lacunaires. Les spores sont distribuées uniformément à travers la bille, aussi bien à la surface qu'à l'intérieur, sous la forme d'agrégats minuscules ou d'unités individuelles. Les spores semblaient distribuées exclusivement dans les microfibrilles, mais une observation de coupes ultra-minces à l'état frais (sans coloration) en MO à fond noir a plutôt montré la présence de spores et d'agrégats de spores aussi bien dans les microfibrilles que dans les espaces lacunaires. Des observations de coupes ultra-minces à l'état frais ont été réalisées en MO interférentielle et à fond clair afin de montrer le réseau de microfibrilles avec plus de détails.

L'aspect tridimensionnel (3-D) de billes avec et sans spores a été montré en microscopie électronique à balayage (MEB) avant et après leur enrobage d'une couche d'or et de palladium. Une comparaison des photographies prises avant et après cet enrobage montre que ce traitement ne cause pas d'artefacts. La surface ridée des billes sans spores est parsemée de pores et de crevasses. La surface des billes avec spores présente en plus des agrégats de spores et des spores individuelles. L'intérieur des deux types de billes se caractérise par la présence d'une structure en forme d'éponge montrant une matrice formée de feuillets entremêlés délimitant de nombreux espaces lacunaires. Ces observations en 3-D venaient confirmer celles réalisées en MO.

La liaison de molécules de chitosane avec des molécules de polyphosphate pouvait créer un encombrement stérique susceptible de gêner, voire empêcher, l'action de la chitosanase sur le chitosane, et compromettre ainsi la biodégradabilité des billes. Pour tester cette hypothèse, nous avons fabriqué des billes avec trois lots de chitosane de masses moléculaires différentes. Ces billes hydratées ont fait l'objet d'un essai d'hydrolyse enzymatique dans une solution de

chitosanase. La progression du phénomène était mesurée au moyen d'une méthode de dosage spectrophotométrique des extrémités réductrices des oligomères de chitosane ainsi générées. Les trois types de billes se sont dissous progressivement durant les 7 premières heures suivant leur placement dans la solution de chitosanase à un rythme pratiquement semblable. La biodégradabilité des billes de chitosane-polyphosphate par la chitosanase se trouvait ainsi confirmée et la thèse de l'encombrement stérique infirmée.

Ces travaux sont décrits avec plus de détails à la section 1.2. Cette section est constituée de l'article de Jobin, G., G. Grondin, G. Couture et C. Beaulieu. 2003. Microscopic Examination of Beads of Chitosan-Polyphosphate with Entrapped Spores of a Biocontrol Agent, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76. (Microscopy and Microanalysis: soumis pour publication). La contribution de chacun des auteurs dans cette publication est la suivante. J'ai mis au point le procédé d'immobilisation des spores de streptomycète dans des billes de chitosane-polyphosphate, fabriqué les dites billes et effectué les travaux de coloration et de lyophilisation. G. Grondin a réalisé les travaux de microscopie et de montage des planches photographiques. G. Couture a déterminé le taux de survie des spores au processus de d'immobilisation. J'ai rédigé l'article qui a été révisé par G. Couture et G. Grondin. C. Beaulieu a supervisé l'ensemble des travaux.

**1.2 Microscopic Examination of Beads of Chitosan-Polyphosphate with Entrapped Spores of a Biocontrol Agent, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76. Soumis pour publication.**

## **Microscopic Examination of Chitosan-Polyphosphate Beads with Entrapped Spores of the Biocontrol Agent, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76**

Running title: Chitosan-Polyphosphate Beads with Entrapped Streptomycete Spores

Guy Jobin,<sup>1</sup> Gilles Grondin,<sup>2</sup> Geneviève Couture,<sup>1</sup> and Carole Beaulieu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, 2500, boul. Université, Sherbrooke, Québec, Canada J1K 2R1

<sup>2</sup>Service de microscopie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1K 2R1

\*Corresponding author

Phone: (819) 821-8000 (ext. 2997)

Fax : (819) 821-8049

e-mail : carole.beaulieu@USherbrooke.ca

**Abstract:** Spores of the biocontrol agent, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76, were entrapped by complex coacervation in beads composed of a macromolecular complex (MC) of chitosan and polyphosphate. A proportion of spores entrapped in beads survived the entrapment procedure as shown by treating spores from chitosan beads with a dye allowing the differentiation of live and dead cells. The spore-loaded chitosan beads could be digested by a chitosanase suggesting that, once introduced in soil, the beads would be degraded to release the biocontrol agent. Spore-loaded beads were examined by optical and scanning electron microscopy because the release of the biological agent depends on the spore distribution in the chitosan beads. The microscopic examination revealed that the beads had a porous surface and contained a network of inner microfibrils. Spores were entrapped in both the chitosan microfibrils and the bead lacuna.

**Key words:** *Streptomyces melanosporofaciens*, spores, biopolymer, chitosan, entrapment, complex coacervation, ionotropic gelation, biocontrol.

## INTRODUCTION

The use of synthetic chemicals to control plant diseases has negative effects on our environment. The public is aware of the persistence of chemicals in the environment and of their detrimental effect on human health, making the popularity of organically grown, pesticide-free food constantly expanding. Several companies have developed biopesticides to control plant diseases. Among them, Keymira Oy has introduced Mycostop, a biopesticide consisting of live cells of *Streptomyces griseoviridis*, to control root diseases caused by *Fusarium* and *Alternaria* species (Lahdenperä et al., 1991). In China, the strain *Streptomyces* sp. 5406 has been used for more than 30 years to protect cotton crops against soil-borne pathogens (Yin et al., 1965). Our research group has isolated and characterized several streptomycetes that are potent antagonists against plant pathogens (Valois et al., 1996; Doumbou et al., 1998; Agbessi et al. 2003). One of these strains, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 (Doumbou et al., 2001) inhibited the growth of most fungi and Gram-positive bacteria by synthesizing geldanamycin (Toussaint et al., 1997). It also showed an excellent physiological adaptability since it was able to grow from 4 to 30°C and between pH 5 to 9 (Toussaint et al., 1997). This strain efficiently controlled common scab of potato in field conditions (Agbessi et al. 2003).

Introduction of antagonistic streptomycetes into soil has been done by combining bacterial inocula with talc (Beauséjour et al. 2003), vermiculite (Liu et al., 1996), wheat bran (El-Tarabily et al., 1997), zeolite (Trejo-Estrada et al., 1998), or peat moss (Singh et al., 1999). However, the manipulation of these biopesticide carriers is too complex in the context of large scale production (Weller, 1988; Lumsden et al., 1995).

Entrapment of antagonists in a polymer matrix is an alternative that merits exploration. Entrapment in alginate has been carried out with cells of *Azospirillum lipoferum* (Paul et al., 1993), *Rhizobium trifolii* and *Yarrowia lipolytica* (Vassilev et al., 2001), *Pseudomonas fluorescens* (Trevors et al., 1993), *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense*

(Bashan & Gonzalez, 1999), *Lactobacillus helveticus* (Selmer-Olsen et al., 1999), *Streptomyces* spp. and *Bacillus mycoides* (Hammad and El-Mohandes, 1999) and *Bradyrhizobium* strains (Galiana et al., 1994), with vesicles and mycelium fragments of *Glomus* sp. (Strullu and Plenchette, 1991) and with spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* (Declerck et al., 1996). Kappa-carrageenan has also been used to entrap cells of *Pseudomonas aeruginosa* (Leung et al., 1995). However, some difficulties have been reported with both of these polymers. Calcium-alginate and  $\kappa$ -carrageenan matrixes are unstable in phosphate-buffered solutions and in the presence of  $\text{Na}^+$  cations, respectively (Vorlop and Klein, 1987; Fraser and Bickerstaff, 1997). Furthermore, entrapment in  $\kappa$ -carrageenan required temperatures of 30 to 50°C depending on cell loading and salt content (Vorlop and Klein, 1987; Iborra et al., 1997).

Apart from these biopolymers, chitosan, a co-polymer of N-acetyl-glucosamine and glucosamine that is produced by an alkaline treatment of chitin, appears to have several advantages. Chitosan can be dissolved in aqueous solutions of mild organic acids at low concentrations. The amino groups of the polymer are positively charged (Kaş, 1997) under acidic conditions and they can interact with polyanionic counterions to form hydrogels by a process called complex coacervation or ionotropic gelation (Arshady, 1990; Dulieu et al. 1999).

The use of polyphosphate as a polyanionic counterion has already been reported for the preparation of chitosan gel beads. Such beads were used for both the controlled release of an anticancer drug (Mi, F.-L. et al. 1999a, 1999b) and the production of a phosphate fertilizer (Frossard et al., 1994). The same polyanion was also used for the entrapment of microbial cells (Vorlop and Klein, 1981, 1987). In contrast to  $\kappa$ -carrageenan, chitosan bead production can be carried out at room temperature, ensuring a better post-entrapment survival rate of the bacteria.

The advantages of chitosan over other polymers are not limited to its physical and chemical properties. Chitosan is also known as a potent elicitor of plant defense mechanisms (Hadwiger et al., 1994; Tada et al., 2001) and its oligomers inhibit the growth of several fungal phytopathogens (Hadwiger et al., 1994). Consequently, chitosan would not only act as an entrapment matrix but could also contribute, in combination with the bacterial antagonist, to the control of plant diseases. Beauséjour et al. (2003) demonstrated that the combined utilization of chitosan flakes and *S. melanosporofaciens* spores protected tubers against common scab of potato. We also showed that chitosan beads containing *S. melanosporofaciens* spores reduced common scab symptoms caused by *S. scabiei* on potato tubers (Jobin, 2004).

Up to now, the various entrapment experiments of microorganisms in biopolymers devoted little or no effort toward characterizing the internal structure of the polymer beads. Bashan (1986) presented one of the few studies where alginate beads containing cells of *Azospirillum brasilense* were observed by scanning electron microscopy (SEM). Such microscopic observation is essential to understand the effect of the bead structure on the release rate of the entrapped bacteria. Indeed, spore distribution within the polymer matrix as well as the bead internal structure are two elements that will influence the bead degradation kinetics. The aim of our work was thus to examine the microscopic structure of the macromolecular complex constituting the chitosan–polyphosphate beads and to assess the spore distribution inside the beads. The viability of the spores after the entrapment process as well as the biodegradability of the beads were also assessed.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Production of Streptomyces melanosporofaciens EF-76 spores***

Yeast malt extract agar (YME, Pridham, et al., 1957) plates were inoculated with a 1-ml aliquot of a 4-day culture of EF-76 grown in trypticase soy broth and were then incubated at 30°C until sporulation. Spores were collected, suspended in 20% glycerol (v/v) and stored at -20°C. The viability count of the spore suspension was evaluated by serial dilutions on YME

plates. A stock of dead spores was prepared to verify the efficiency of the live/dead stain (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). To produce dead spores, 1.0 ml of a suspension of spores [ $0.5-1.0 \times 10^9$  colony-forming units (CFU)/ml] was centrifuged. The supernatant was discarded and the spore pellet was suspended in 70% propanol (v/v) and left at room temperature for 12 h with occasional vortexing. A 100- $\mu$ l aliquot of this suspension was plated on YME agar in order to confirm the effective killing of the spores.

### ***Fabrication of chitosan beads***

The chitosan lots were kindly provided by Marinard Biotech Inc. (Rivière-au-Renard, Canada) and were produced by chemical deacetylation of chitin from shells of cold water shrimp (*Pandalus borealis*). Their physico-chemical characteristics appear on table 1.

**Table 1.** Characteristics of chitosan lots

Lot number	Viscosity (centipoises) <sup>1, 2</sup>	Deacetylation degree <sup>1</sup>	M <sub>v</sub> <sup>3</sup>
1	400-450	80-85	43369
2	1000-1200	75-80	51978
3	2300	85-90	66513

<sup>1</sup>Provided by the producer

<sup>2</sup>Solution of 1% at 25°C

<sup>3</sup>Viscosimetry method (Terbojevich and Cosani, 1997)

Their molecular weight (M<sub>v</sub>) was determined by viscosimetry (Young and Lovell, 1991; Terbojevich and Cosani, 1997). These chitosan lots were used to prepare chitosan solutions in 0.9% (v/v) glacial acetic acid. The solutions were adjusted to pH 5.5-5.8 with NaOH 2.0 M, giving a final chitosan concentration of 1.2% or 1.6%. They were used immediately for the fabrication of sporeless beads or for the entrapment of *S. melanosporofaciens* EF-76. To prepare spore-loaded beads, one volume of spore suspension in 20% glycerol was mixed thoroughly and uniformly with nine volumes of the chitosan solution. A 1-ml aliquot of this mixture was diluted and spread on YME agar plates in order to estimate the bacterial count of the chitosan solution. This mixture was aspirated twice in a sterile 60-ml syringe for a total

volume of 120 ml. The syringe was thereafter fitted with a pre-autoclaved 8-channel manifold (Drummond Scientific Co., Broomall, Pennsylvania), and distributed dropwise into 400 ml of a lightly agitated, sterile 2% sodium polyphosphate (w/v) solution at pH 5.7-5.8. In order to produce sporeless beads, the spore suspension was replaced by a sterile solution of 20% glycerol. The coacervation reaction was allowed to take place for 2.5 h. The resulting hydrated beads were washed in sterile water and used for the digestibility tests and the microscopic examinations. One part of the hydrated, spore-loaded beads was lyophilized (Virtis freeze dryer Model 24DX24, Gardiner, New York) for 14 h. Their weight was measured before and after lyophilization and the water content of the beads could therefore be estimated. Before being discarded, a 100- $\mu$ l aliquot of the polyphosphate solution was spread on YME agar plates to verify the presence of spores that had not been entrapped. These agar plates were incubated at 30°C for six days.

#### ***Digestibility of chitosan beads***

The method of Lever (1973) as modified by Schep et al. (1984) for colorimetric determination of carbohydrates was used to measure degradation of chitosan. It is based on a measure of reducing ends of the oligomers generated by the action of chitosanase (EC 3.2.1.132) on chitosan. The *p*-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) reagent reacts with the reducing end of a chitosan oligomer to form a substance that absorbs light preferentially at 405 nm wavelength. The digestibility of sporeless and hydrated 1% chitosan beads made from three different lots (table 1) was tested as follows. One gram (wet weight) of beads was placed in 25 ml of acetate buffer 0.1 M pH 5.5 containing 3 U of chitosanase produced by *Streptomyces* sp. N174 (Boucher et al. 1992). One unit of chitosanase is defined as the amount of enzyme that liberates 1  $\mu$ mol equivalent of D-glucosamine per minute at 37°C. Beads were incubated at 30°C on a rotary shaker set at 200 rotations per minute. One 500- $\mu$ l aliquot of the digestion medium was taken out each hour for a 7 hour period. The chitosanase reaction was then stopped by mixing the 500- $\mu$ l aliquot with 1.0 ml of 1% PAHBAH reagent supplemented with  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.05 M,  $\text{CaCl}_2$  0.01 M, trisodium citrate 0.025 M and NaOH 0.25 M. The tube containing the chitosanase reaction medium was then placed in boiling water for 5

min and cooled in cold water for 5 min. The unhydrolyzed chitosan was pelleted by centrifugation at  $800 \times g$  for 5 min. and the optical density ( $OD_{405}$ ) was read in order to have an indirect estimate of the accumulation of chitosan oligomers in the digestion medium.  $OD_{405}$  readings were converted to  $\mu\text{mol/ml}$  of glucosamine. A negative control consisted of chitosan beads incubated in an acetate buffer without chitosanase. The digestibility test was run in triplicate for each bead type. For each sample, the confidence limits of the mean glucosamine concentration were calculated for a 5% level of probability, using the standard error formulae for a whole population (Little and Hills, 1978, Vonhoegen, 1999).

#### *Assessment of survival rate of entrapped spores*

Hydrated and lyophilized spore-loaded beads, made with a 1.6% solution of chitosan lot number 1 (table 1) were digested for 8 h in 2.0 ml of filter-sterilized chitosanase (20 U/ml) prepared in acetate buffer 0.1M pH 5.5. After the complete dissolution of beads, the resulting hydrolysate was diluted and spread in duplicate on YME plates. These plates were incubated at  $30^\circ\text{C}$  for six days. A post-entrapment viability count ( $V_{PE}$ ) was thus obtained for hydrated beads and provides the number of live spores present in beads following their fabrication. A post-lyophilization viability count ( $V_{PL}$ ) was similarly measured for lyophilized beads and provides the number of live spores present in the lyophilized beads.

The live/dead Bac Light Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon) was used to distinguish between live and dead spores. This dye stains the dead spores in red and the live ones in green. The live/dead dye was filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  filter (Millipore, Billerica, Massachusetts) and a  $500\text{-}\mu\text{l}$  aliquot of it was mixed with a  $500\text{-}\mu\text{l}$  hydrolysate of beads digested with filter-sterilized chitosanase (20 U) for 8 h. The dye was allowed to react with the spores in the bead hydrolysate for 15 minutes. A  $20\text{-}\mu\text{l}$  aliquot of this reaction mixture was observed under an epifluorescence microscope (Olympus IX 70, Tokyo, Japan).

### ***Observation of beads by optical microscopy***

Hydrated 1% chitosan (lot no. 1) beads were placed on a Tissue-Tek II microtome cryostat (MI-SS, Inc., Corona, California) in optimal cutting temperature compound (Sakura Fintek, Torrance, California). The beads were sliced at  $-20^{\circ}\text{C}$  to obtain 3- $\mu\text{m}$  thick cuts. The bead cuts were stained with 1% toluidine blue (in 1% borax) for 5 min. at room temperature and observed by bright field microscopy. Unstained sections were also observed in bright field, dark field and interference microscopy using a Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) photomicroscope.

### ***Observation of beads in scanning electron microscopy***

Lyophilized sporeless and spore-loaded 1.4% chitosan (lot no. 1) beads were coated with gold-palladium. Metallized and unmetallized beads were observed using a variable pressure scanning electron microscope (UP-SEM, Hitachi, Tokyo, Japan) operating at 5 kV.

## **RESULTS**

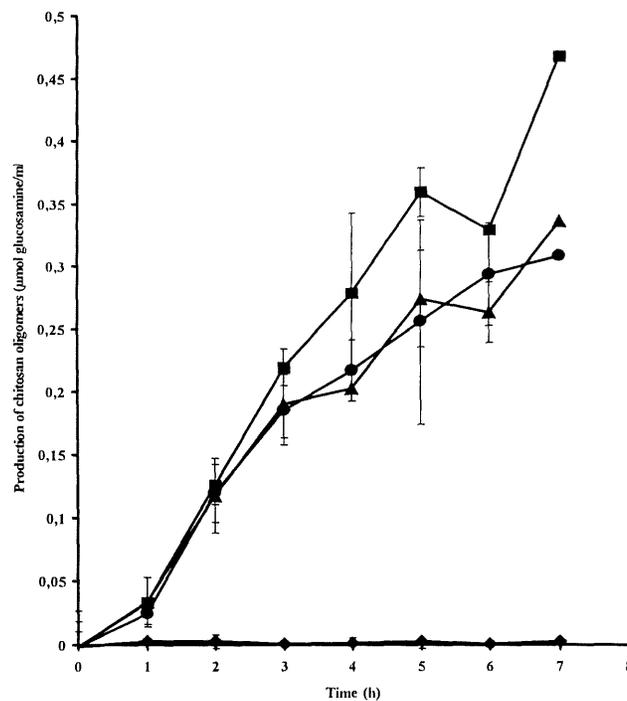
### ***Digestibility of the chitosan beads***

Digestibility of chitosan beads is essential to allow liberation of the entrapped antagonist into soil. Once introduced into soil, chitosan beads must be degraded to allow the germination of entrapped spores and the release of the ensuing mycelium. The biodegradation process should be accomplished by the combined action of the chitosanase produced by the entrapped antagonist (Beauséjour et al., 2003) and by other chitosanase-producing members of the soil microflora. However, the complexation of chitosan molecules with polyphosphate molecules may bring about a steric hindrance capable of preventing the action of chitosanase. The gradual increase of the  $\text{OD}_{405}$  on Figure 1 demonstrated the accumulation of chitosan oligomers resulting from the digestion of chitosan-polyphosphate beads by chitosanase. Chitosan bead digestion was thus not hampered by a hypothetical steric hindrance resulting from the interaction between chitosan and polyphosphate. Digestibility of chitosan beads did

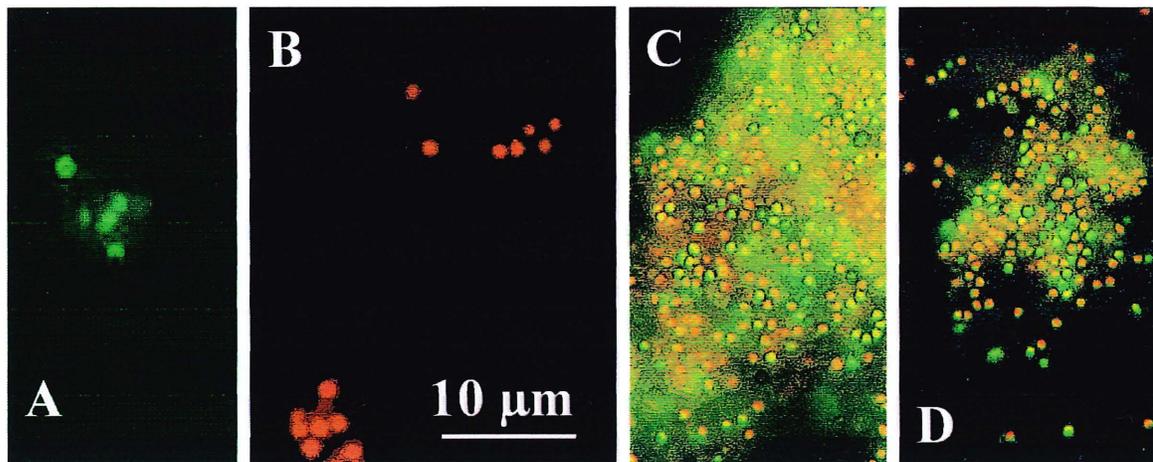
not appear to depend on the molecular weight of the chitosan since no significant difference was observed between the three bead types analyzed.

### *Spore viability after the entrapment procedure*

To assess the survival of *S. melanosporofaciens* spores after the entrapment procedure and the lyophilisation, both hydrated and lyophilized beads were digested with chitosanase. The spores from these hydrolysates were then stained with the dead/live dye. The efficiency of the dead/live dye to distinguish between live and dead spores was confirmed by the fact that most spores from a live spore suspension were green (figure 2A) while spores treated with propanol were red (Figure 2B). The presence of green spores or spore clumps after the digestion of chitosan beads indicates that a proportion of spores survived both the entrapment procedure (Figure 2C) and the lyophilization (Figure 2D).



**Figure 1. Evolution of 1% chitosan beads hydrolysis by chitosanase (3 U / 25 ml) as measured by the accumulation of oligomers. The glucosamine concentrations are the mean of three replications. Intervals of confidence were calculated for an error rate of 5%. No chitosanase: ♦; MW = 43369: ●; MW = 51978: ▲; MW = 66513: ■**



**Figure 2. Observations in fluorescence microscopy of spores stained with the live/dead dye. Live (A) and dead (B) spores in a glycerol solution. Spores from a hydrolysate of hydrated (C) and lyophilized (D) beads. Notice the live spores in green and dead spores in red.**

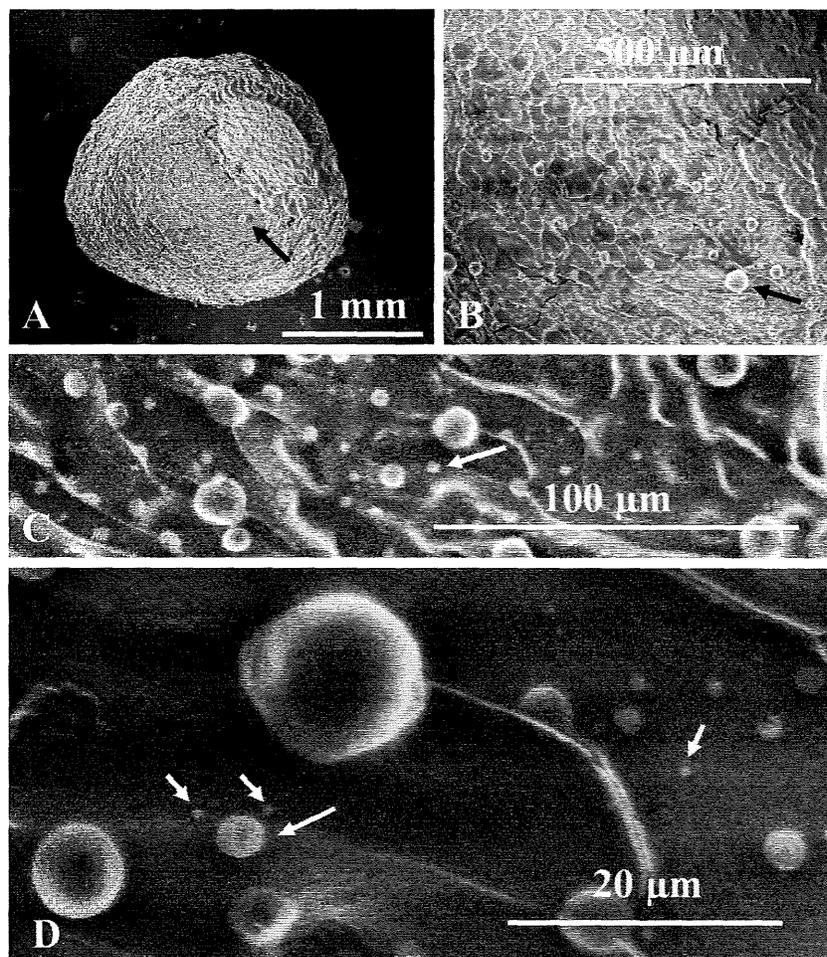
Most of the spores contained in the chitosan solution used for bead fabrication were entrapped in beads. Indeed, the polyphosphate solution used for the coacervation reaction contained only  $8 \times 10^4$  free spores at the end of the reaction while the chitosan mixture used to produce the beads contained about  $3.5 \times 10^9$  CFU. The post entrapment viability count was estimated at  $1.2 \times 10^8$  CFU for 4500 hydrated beads. The post-lyophilization viability count after 14 h of lyophilization was half of the post entrapment viability count (Table 2). The moisture content of hydrated beads was 95% and that of lyophilized beads was 5%.

**Table 2. Viable counts during the bead fabrication process**

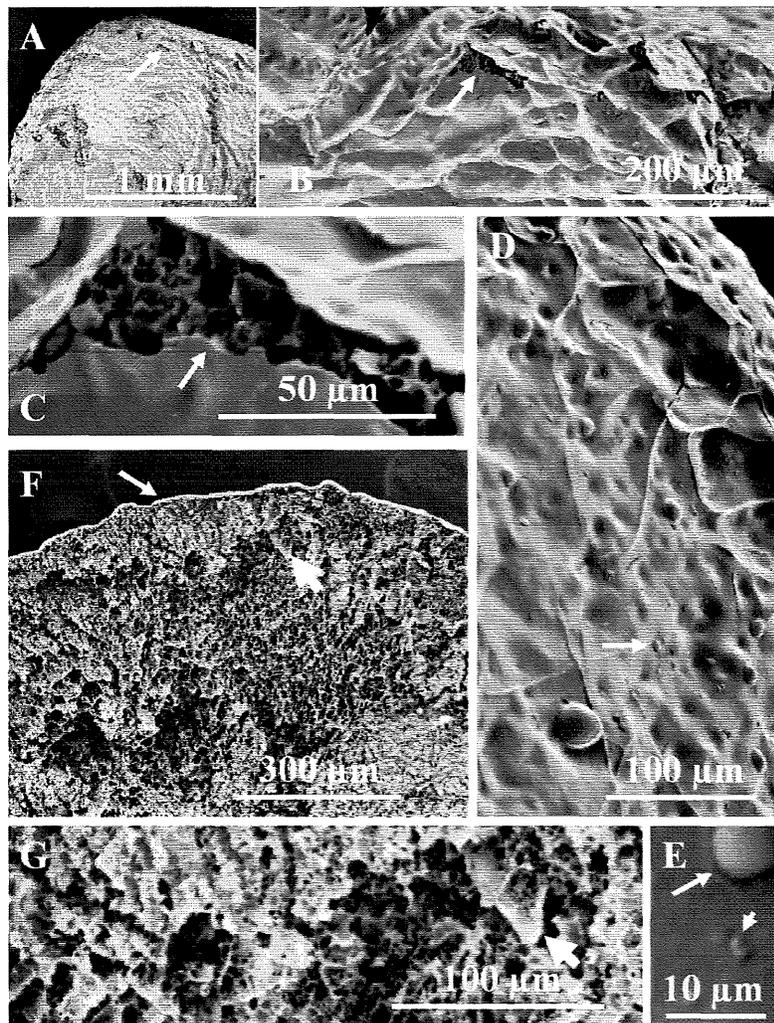
Step	Viable count (CFU) <sup>1</sup>
Spores added to the chitosan solution	$3.5 \times 10^9$
Spores not entrapped in the beads	$8.0 \times 10^4$
Spores entrapped in hydrated beads	$1.2 \times 10^8$
Spores in lyophilized beads	$6.0 \times 10^7$

### *Structure of the chitosan beads*

The 3-D structure of the spore-loaded lyophilized beads was observed by SEM without (Figure 3) and with metallization (Figure 4). No major artefact was induced by the metallization process but spores were more apparent on the surface of unmetallized beads (Figure 3C and D). Spore-loaded lyophilized beads (Figure 4) were also compared to sporeless (Figure 5) lyophilized beads. The smoother surface of sporeless beads on Figure 5D contrasts with the surface of the spore-loaded beads on Figure 4D. The roughness of spore-



**Figure 3.** SEM observation of the surface of a lyophilized spore-loaded chitosan bead without metallization. A and B: The same microbead of chitosan shown at two different magnifications (see arrows). C and D: Microbeads of chitosan (long arrows), individual spores (short arrows) and wrinkles at two different magnifications.



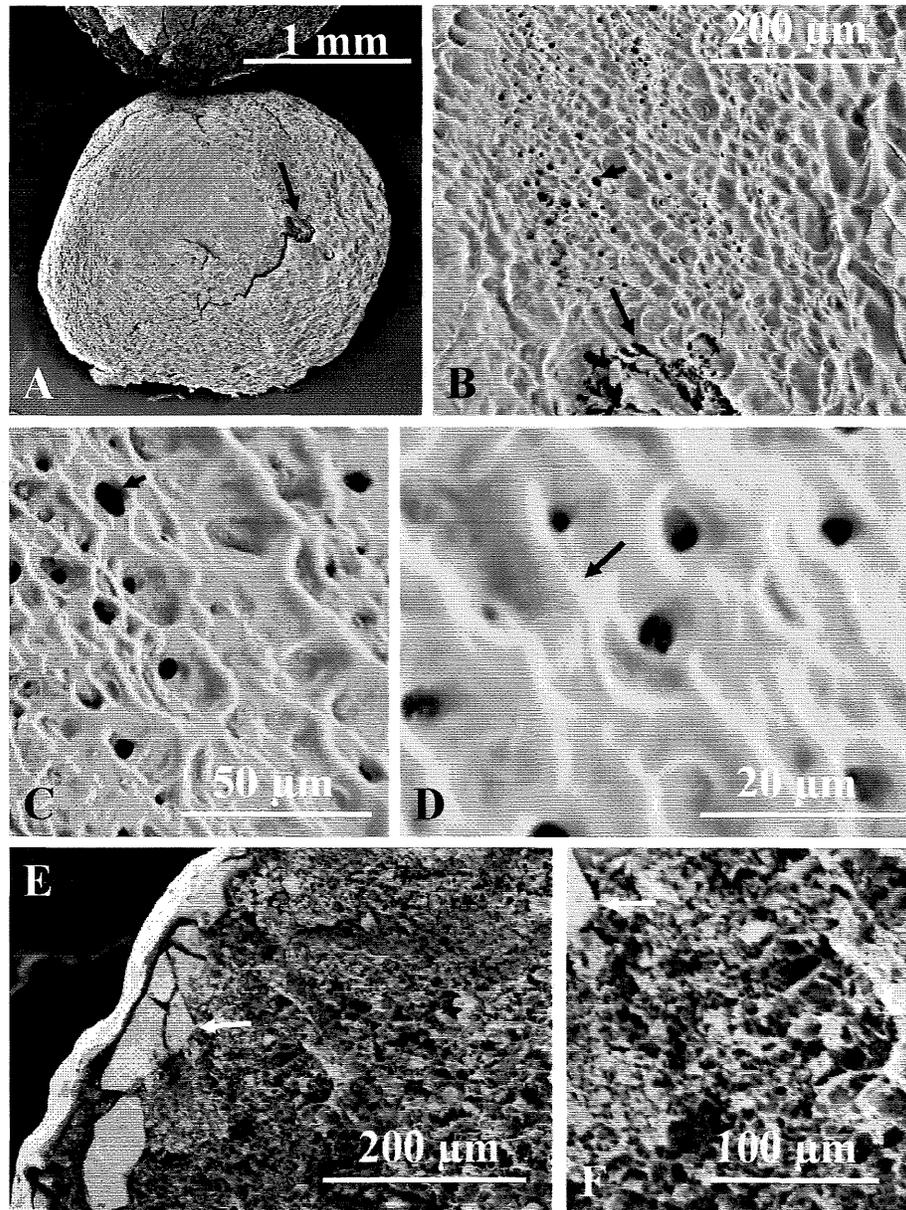
**Figure 4.** SEM observation of a lyophilized spore-loaded chitosan bead after metallization with gold-palladium. A to C: Section of surface at different magnifications (see arrows) showing the same fracture giving an insight of the internal structure. D and E: Another section of the surface showing a microbead of chitosan (longs arrows) and two individual spores (small arrow). F and G: Cross-section at two different magnifications showing the outer layer of the bead (F, long arrow) and a section of the inner core (F and G, small arrows).

loaded beads was due to the presence of spore aggregates and microbeads of chitosan on the bead surface (Figure 4D and E). The bead outer layer appeared porous and fractured (Figures 4 and 5). Fractures (ruptured surface beads) were found on both spore-loaded and sporeless bead (Figures 4 and 5). Pores were holes of relatively uniform diameters that were mostly

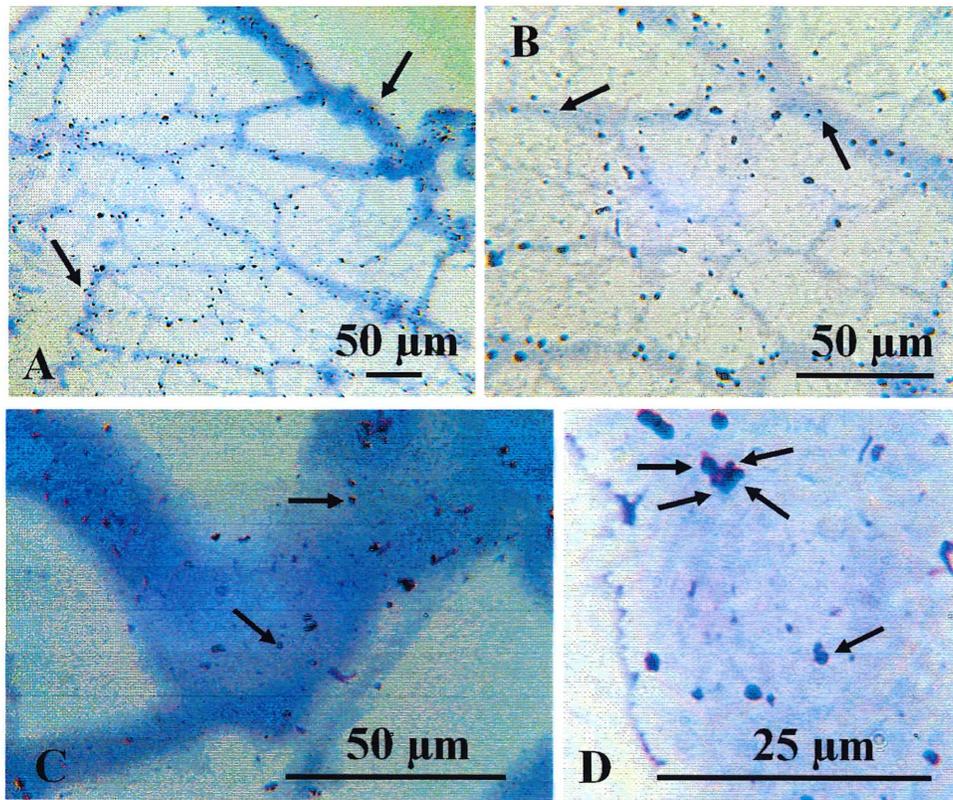
associated with the surface of sporeless chitosan beads (Figure 5). Threadlike protuberances that we called wrinkles were found both on spore-loaded (Figures 3C, D and 4B and D) and sporeless (Figure 5D) metallized beads. These wrinkles were also seen on Figure 6A and B (small arrows) depicting a cut of a hydrated bead observed in bright and interferential microscopy respectively.

The internal bead structure was characterized by a network of microfibrils resembling a sponge for both spore-loaded (Figure 4F and G) and sporeless beads (Figure 5E and F). These two bead types were delineated by an outer layer. Both microfibrils and the outer layer were constituted of chitosan-polyphosphate. However, microfibrils were intertwined layers thinner than the outer layer.

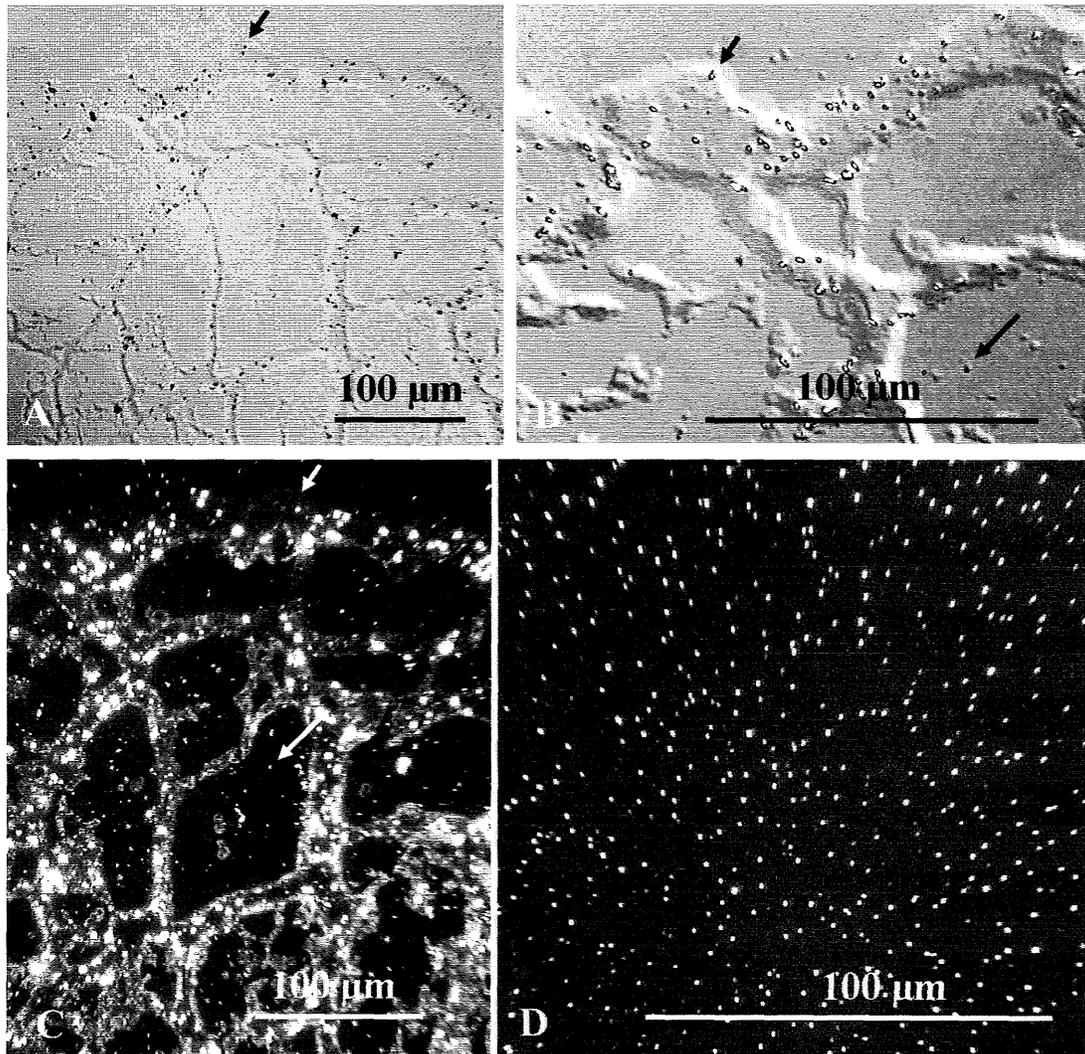
Since SEM did not allow the direct observation of the entrapped spores, observations of sliced beads in optical microscopy were carried out and toluidine blue stain was used to reveal the spore distribution inside the beads. At lower magnification, spore distribution was seen as minute patches (darker than the microfibrils) present across the whole bead. At higher magnifications, these patches were revealed as individual spores or spore clumps. The spores or spore clumps were visible in the outer layer (Figure 6A) as well as in the inner core of the bead (Figure 6B, C and D). Their distribution in both the outer layer and the internal microfibrils was not uniform but rather spotty. Observation of unstained sections in bright field (Figure 7A) and interference microscopy (Figure 7B) also showed the distribution of spores in the bead microfibrils. However, interference and dark field microscopy revealed that spores were also entrapped in bead lacuna (Figure 7B and C). Figure 7D showed the purity of the spore suspension that was used for bead fabrication.



**Figure 5.** SEM observation of a lyophilized sporeless chitosan bead after metallization with gold-palladium. A and B: Section of surface at two different magnifications showing fractures (long arrows). B and C: Section of surface showing individual pores (short arrows). D: Section of surface showing wrinkles (arrow) and pores. E and F: Cross-section showing the thick outer membrane (arrows) and inner core at two magnifications.



**Figure 6.** Enlarged view of inner core of a hydrated, spore-loaded 1% chitosan bead after staining with toluidine blue. A to D: Spores and spore clumps are visible in the outer layer (A, arrow in upper right corner) as well as in the inner core of the bead (A to D).



**Figure 7.** Observation of unstained sections of a hydrated spore-loaded chitosan 1% bead in A: bright field and B: interferential microscopy showing spore clumps and spores between the microfibrils of the macromolecular complex (long arrows), in the microfibrils (bright spots) and in the outer layer (short arrow). C: Observation in dark field microscopy of spores in the outer layer (short arrow) and between the microfibrils (long arrow) and D: of a spore suspension.

## DISCUSSION

In a previous publication, we showed that *S. melanosporofaciens* spores entrapped in chitosan beads protected potato against common scab under controlled conditions (Jobin 2003). To be an efficient biopesticide in field conditions, these spore-loaded chitosan beads must fulfill some prerequisites. Beads must contain a sufficient amount of live spores and they have to be biodegradable to allow liberation of the entrapped spores.

*S. melanosporofaciens* spores were entrapped in chitosan beads using the complex coacervation technique. Other studies have reported the survival of bacterial cells after this entrapment procedure (Vorlop and Klein, 1981, 1987) but to our knowledge, survival of streptomycete spores after entrapment in chitosan beads is reported here for the first time. The viability of *S. melanosporofaciens* EF-76 spores was confirmed by staining entrapped spores with the live/dead stain but the post-entrapment viability count was thirty times lower than the initial viability count.

In this work, we produced both hydrated and lyophilized beads since the shelf life of spores entrapped in hydrated beads is shorter than it is for lyophilized beads. Hydrated beads have to be stored in a buffer solution but their structure was not maintained after prolonged storage. In contrast, lyophilized beads were stable for at least 4 months (data not shown). The 50% spore survival rate of *S. melanosporofaciens* after lyophilization of spore-loaded chitosan beads was similar or better than that obtained with other bacterial species using different drying techniques. After being dried in a fluidized-bed dryer, survival rate of *Lactobacillus helveticus* cells entrapped in Ca-alginate gel beads varied between 57% to 71% (Selmer-Olsen et al., 1999). The survival rates of *Azospirillum lipoferum* cells entrapped in Ca-alginate gel beads and dried with a stream of dry air were 8.5% and 0.5% at low and high drying rates respectively (Paul et al., 1993). Survival percentage was 0.05 to 0.1% for *A. brasilense* cells entrapped also in alginate beads and dried by lyophilization after being frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  (Bashan, 1986).

Chitosan-polyphosphate beads could be digested by chitosanase despite a hypothetical steric hindrance due to the complexation of both polymers. Our results show that chitosan of molecular weight between 43,000 and 66,000 can be used to produce beads digestible by chitosanase. These beads could possibly also be digested both by the chitosanase produced by the entrapped *S. melanosporofaciens* strain (Agbessi et al. 2003) and by other chitosanase-producing soilborne microorganisms. Since a proportion of the entrapped spores are viable and the chitosan-polyphosphate matrix can be digested by chitosanase, the entrapped antagonist may exit the beads and colonize the soil and rhizosphere wherein it may fight phytopathogenic microorganisms. These results look promising for the conception and fabrication of a new biopesticide.

After being tested for their digestibility by chitosanase and their content in live spores, the internal structure of the chitosan beads was examined. Indeed, the internal structure as well as the spore distribution inside the chitosan microfibrils dictate the release rate of the biocontrol microorganism and therefore the efficacy of the spore-loaded chitosan beads as a biopesticide. The internal bead structure was characterized by a network of microfibrils resembling a sponge that was delineated by an outer layer. A network of microfibrils has also been associated with chitosan-polyphosphate beads containing *E. coli* cells (Vorlop and Klein, 1981). The presence of a wide outer layer around the beads confirms the observations of Mi et al. (1999a, 1999b) and Vorlop and Klein (1981, 1987) on chitosan-polyphosphate beads. The formation of an outer layer thicker than the internal microfibrils was ascribed to the increased diffusion resistance encountered by polyphosphate molecules during their diffusion through gelled film into the inside matrix (Mi et al. 1999a, 1999b). The formation of a wide outer layer did not appear to depend on the nature of entrapped objects since it occurred with *S. melanosporofaciens* spores (this work) as well as with *Escherichia coli* cells (Vorlop and Klein, 1981, 1987) and an anti-cancer drug (Mi et al., 1999a, 1999d).

The outer surface of the beads was characterized by the presence of pores, fractures and wrinkles. The fact that spore-loaded beads show fewer pores than sporeless beads is an

indication that the presence of spores could facilitate the formation of the polymer matrix. As fractures (Figure 4C) and pores (Figure 5C) seen in the outer layer of the chitosan beads are larger than 2 micrometers, they would probably act as entrance ports for soil solution carrying nutrients and chitosanase-producing microorganisms that would play a role in bead degradation.

Hydrated chitosan beads produced in this work were studied by optical microscopy. Most spores were embedded in the outer layer or in the bead microfibrils although some spores were also present in the bead lacuna. In the lyophilized beads, no free spores were seen in the bead lacuna. These free spores were probably retrieved along the surfaces of the bead microfibrils after the removal of free water by the lyophilization procedure. The dual location of the spores is interesting in a biocontrol perspective. Spores that are not entrapped inside the microfibrils would come into contact with soil solution directly upon its absorption by the beads. Their germination would yield a chitosanase-producing mycelium that would trigger the digestion of the beads and the germination of the microfibrillar bound spores. The disruption of the chitosan-polyphosphate matrix would also be accelerated as chitosanase-producing species of the soil microflora gain access to the inner core of the beads. This chain of events would thus cause a progressive liberation of the entrapped antagonist into soil. Work is under progress to follow the degradation process of this novel biocontrol tool under different environmental conditions.

#### **SUMMARY**

Complex coacervation is a technique suitable for entrapment of the biocontrol agent *S. melanosporofaciens* EF-76. The chitosan-polyphosphate beads produced by coacervation are biodegradable. Their diameter varied between 2.0 and 2.5 mm. The chitosan-polyphosphate beads were characterized by a network of microfibrils resembling a sponge and a wide outer layer. Spores were not only entrapped in bead lacuna but were distributed in both the internal microfibrils and the outer membrane.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pierre-Mathieu Charest and Brian Talbot for a critical review of the manuscript. This work was supported by grants from the Conseil de recherche en pêches et en agroalimentaire du Québec (CORPAQ) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Chitosan lots were kindly donated by Marinard Biotech Inc. (Rivière-au-Renard, Canada). Part of this work was first made public during the Microscopy & Microanalysis 2002 Meeting held in Quebec City as a poster presentation that won the Traveling Poster Exhibit Award.

## REFERENCES

- AGBESSI, S., BEAUSÉJOUR, J., DÉRY, C. & BEAULIEU, C. (2003). Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 233-238.
- ARSHADY, R. (1990). Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques. Part II: coacervation. *Polym Eng Sci* **30**, 905-914.
- BASHAN, Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol* **51**, 1089-1098.
- BASHAN, Y. & GONZALEZ, L.E. (1999). Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 262-266.
- BEAUSÉJOUR, J., CLERMONT, N. & BEAULIEU, C. (2003). Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato *Plant & Soil* **256**, 463-468
- BOUCHER, I., A. DUPUY, P. VIDAL, W. A. NEUGEBAUER, & BRZEZINSKI, R. (1992). Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 188-193.
- DECLERCK, S., STRULLU, D.G., PLENCHETTE, C. & GUILLEMETTE, T. (1996). Entrapment of *in vitro* produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: *in vitro* and *in vivo* inoculum potentials. *J Biotechnol* **48**, 51-57.

- DOUMBOU, C.L., AKIMOV, V. & BEAULIEU, C. (1998). Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4313-4316.
- DOUMBOU, C.L., AKIMOV, V., CÔTÉ, M., CHAREST, P.-M. & BEAULIEU, C. (2001). Taxonomic study on nonpathogenic streptomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Syst Appl Microbiol* **24**, 451-456.
- DULIEU, C., PONCELET, D. & NEUFELD, R.J. (1999). Encapsulation and immobilization techniques. In *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics*. Kührtreiber, W.M., Lanza, R.P. & Chick, W.L. (Eds), pp. 3-17. Boston. Birkhäuser.
- EL-TARABILY, K.A., ST. J. HARDY, G.E., SIVASITHAMPARAM, K., HUSSEIN, A.M. & KURTBÖKE, D.I. (1997). The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol* **137**, 495-507.
- FRASER, J.E. & BICKERSTAFF, G.F. (1997). Entrapment in calcium alginate. In *Immobilization of enzymes and cells*. Bickerstaff, G.F. (Ed), pp. 61-66. Totowa, New Jersey. Humana Press.
- FROSSARD, E., TEKELY, P. & MOREL, J.L. (1994). Chemical characterization and agronomic effectiveness of phosphorus applied as a polyphosphate-chitosan complex. *Fertil Res* **37**, 151-158.
- GALIANA, A., PRIN, Y., MALLET, B., GNAHOUA, G.-M., POITEL, M. & DIEM, H.G. (1994). Inoculation of *Acacia mangium* with alginate beads containing selected *Bradyrhizobium* strains under field conditions: long-term effect on plant growth and persistence of the introduced strains in soil. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3974-3980.
- HADWIGER, L.A., OGAWA, T., & KUYAMA, H. (1994). Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 531-533.
- HAMMAD, A.M.M. & EL-MOHANDES, M.A.O. (1999). Controlling fusarium wilt disease of cucumber plants via antagonistic microorganisms in free and immobilized states. *Microbiol Res* **154**, 113-117.

- IBORRA, J.L., MANJÓN, A. & CÁNOVAS, M. (1997). Immobilization in carrageenans. In *Immobilization of enzymes and cells*. Bickerstaff, G.F. (Ed), pp. 53-60. Totowa, New Jersey. Humana Press.
- JOBIN, G. (2004). *Immobilisation de spores de Streptomyces melanosporofaciens EF-76, un agent de lutte biologique dans des billes de chitosane*. Thèse de doctorat. Département de biologie. Faculté des sciences. Université de Sherbrooke. Sherbrooke. Canada.
- KAŞ, H.S. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsulation* **14**, 689-711.
- LAHDENPERÄ, M.-L., SIMON, E. & UOTI, J. (1991). Mycostop – a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. In *Biotic interactions and soil-borne diseases*. Beemster, A.B.R., Bollen, G.J., Gerlach, M., Ruissen, M.A., Schippers, B. & Tempel, R.A. (Eds), Proceedings of the 1st Conference of the European foundation for plant pathology. p. 258-263. Amsterdam. Elsevier.
- LEUNG, K., CASSIDY, M.B., HOLMES, S.B., LEE, H. & TREVORS, J.T. (1995). Survival of  $\kappa$ -carrageenan-encapsulated and unencapsulated *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells in forest soil monitored by polymerase chain reaction and spread plating. *FEMS Microbiol Ecol* **16**, 71-82.
- LEVER, M. (1973). Colometric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochem Med* **7**, 274-281.
- LITTLE, T.M. & HILLS, F.J. (1978). *Agricultural Experimentation. Design and Analysis*. New York. John Wiley & Sons.
- LIU, D., ANDERSON, N.A. & KINKEL, L.L. (1996). Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Can J Microbiol* **42**, 487-502.
- LUMSDEN, R.D., LEWIS, J.A. & FRAVEL, D.R. (1995). Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In *Biorational Pest Control Agents. Formulation and delivery*. Hall, R.H. & Barry, V (Eds), pp.167-182. Washington, DC. American Chemical Society.
- MI, F.-L., SHYU, S.-S., KUAN, C.-Y., LEE, S.-T., LU, K.-T. & JANG, S.-F. (1999a). Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of

- anti-cancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. *J Appl Polym Sci* **74**, 1868-1879.
- MI, F.-L., SHYU, S.-S., WONG, T.-B., JANG, S.-F., LEE, S.-T. & LU, K.-T. (1999b). Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anti-cancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *J Appl Polym Sci* **74**, 1093-1107.
- PAUL, E., FAGES J., BLANC, P., GOMA, G. & PAREILLEUX, A. (1993). Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 34-39.
- PRIDHAM, T.G., ANDERSON, P., FOLEY, C., LINDENFELSER, L.A., HESSELTINE, C.W. & BENEDICT, R.G. (1956-57). A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiot Annu* 947-953.
- SCHEP, G.P., SHEPERD, M.G. & SULLIVAN, P.A. (1984). Purification and properties of a  $\beta$ -1,6-glucanase from *Penicillium brefeldianum*. *Biochem J* **223**, 707-714.
- SELMER-OLSEN, E., SØRHAUG, T., BIRKELAND, S.-E. & PEHRSON, V. (1999). Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 79-85.
- SINGH, P.P., SHIN, Y.C., PARK, C.S. & CHUNG, Y.R. (1999). Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* **89**, 92-99.
- STRULLU, D.G. & PLENCHETTE, C. (1991). The entrapment of *Glomus* sp. in alginate beads and their use as root inoculum. *Mycol Res* **95**, 1194-1196.
- TADA, Y., HATA, S., TAKATA, Y., NAKAYASHIKI, H., TOSA, Y. & MAYAMA, V. (2001). Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defence response of oats to infection and elicitors. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 477-486.
- TERBOJEVICH, M. & COSANI, A. (1997). Molecular weight determination of chitin and chitosan. In *Chitin Handbook*. Muzzarelli, R.A.A. & Peter, M.G. (Eds), pp.87-101. Atec, Grottammare, Italy. European Chitin Society.

- TOUSSAINT, V., VALOIS, D., DODIER, M., FAUCHER, E., DÉRY, C., BRZEZINSKI, R., RUEST, L. & BEAULIEU, C. (1997). Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Phytoprotection* **78**, 43-51.
- TREJO-ESTRADA, S.R., RIVAS SEPULVEDA, I. & CRAWFORD, D.L. (1998). *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World J Microbiol Biotechnol* **14**, 865-872.
- TREVORS, J.T., VAN ELSAS, J.D., LEE, H. & WOLTERS, A.C. (1993). Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**, 637-643.
- VALOIS, D., FAYAD, K., BARASUBIYE, T., GARON, M., DÉRY, C., BRZEZINSKI, R. & BEAULIEU, C. (1996). Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1630-1635.
- VASSILEV, N., VASSILEVA, M., AZCON, R. & MEDINA, A. (2001). Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into a soil-plant system. *Biotechnol Lett* **23**, 149-151.
- VONHOEGEN, H. (1999). *Microsoft Excel 2000. Grand Livre*. Paris, France. Micro Application.
- VORLOP, K.-D. & KLEIN, J. (1981). Formation of spherical chitosan biocatalysts by ionotropic gelation. *Biotechnol Lett* **3**, 9-14.
- VORLOP, K.-D. & KLEIN, J. (1987). Entrapment of microbial cells in chitosan. *Methods Enzymol* **135**, 259-268.
- WELLER, D.M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **26**, 379-407.
- YIN, S.Y., CHANG, J.K. & XUN, P.C. (1965). Studies in the mechanisms of antagonistic fertilizer "5406". IV. The distribution of the antagonist in soil and its influence on the rhizosphere. *Acta Microbiol Sin* **11**, 259-288.
- YOUNG, R. J., & LOVELL, P. A. (1991). Introduction to polymers. 2nd Edition. Chapman and Hall. London. England.

## CHAPITRE 2

### 2.1 L'immobilisation de spores de streptomycète dans des billes de chitosane comme un nouvel outil de lutte biologique contre les maladies des plantes

Dans un travail précédent (Jobin *et al.*, 2003), nous avons démontré la faisabilité technique de l'immobilisation de spores de streptomycète dans des billes de chitosane-polyphosphate. À cette occasion, nous avons confirmé la viabilité des spores immobilisées dans des billes hydratées et lyophilisées et démontré la biodégradabilité enzymatique des billes hydratées par la chitosanase. Un examen rigoureux et systématique des billes par MO et par MEB a permis de caractériser la distribution des spores dans la structure interne des billes.

L'immobilisation d'agents antagonistes dans des billes de biopolymères a été réalisée à au moins une reprise comme nouvel outil de lutte biologique contre les maladies racinaires (Hammad et El-Mohandes, 1999). Bien que couronné de succès, cet essai comportait au moins deux lacunes. D'abord, la capacité de libération de l'agent antagoniste dans un sol stérile n'avait pas été préalablement établie. Ensuite, il manquait un essai de dosage de l'accumulation des oligomères du biopolymère dans le sol. Le présent travail visait à combler ces deux lacunes et à tester dans un essai sous conditions contrôlées la capacité phytosanitaire des billes de chitosane renfermant des spores de streptomycète à contrôler les symptômes de la gale commune chez la pomme de terre.

Nous avons donc fabriqué des billes de chitosane renfermant des spores de la souche antagoniste *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76. Pour l'essai de libération de l'agent antagoniste dans un sol stérile, nous avons testé des billes hydratées et lyophilisées. L'ajout de glucose marqué uniformément au  $^{14}\text{C}$  dans le sol stérile a permis de détecter l'activité métabolique associée à la germination des spores et à la croissance du mycélium. Les premières traces d'activité métabolique sont apparues aussitôt que 24 h après l'introduction des deux types de billes dans le sol. Par la suite, l'accumulation de radio-activité s'est

effectuée au même rythme pour les deux types de billes jusqu'à 7 h après leur introduction dans le sol. À l'usage, les billes hydratées se sont révélées friables et difficiles à mélanger au sol. Comme les billes lyophilisées ne présentaient pas ces désavantages, nous avons opté pour ce type de billes pour la réalisation des essais subséquents.

Les deux essais suivants ont été réalisés dans les mêmes sols stériles et non stérilisés (fertile). Le premier essai visait à quantifier la libération de l'agent antagoniste au moyen de la technique classique de l'énumération des microorganismes par dilution-étalement d'un extrait de sol sur des milieux de culture solidifiés à l'agar. Dans le sol fertile, le compte viable des actinomycètes résistants à la geldanamycine (un antibiotique produit par la souche EF-76) a commencé à croître à partir du troisième jour après l'introduction des billes dans le sol pour atteindre  $4,3 \times 10^{10}$  unités formatrices de colonies (UFC)  $g^{-1}$  à la huitième journée. Dans le sol stérile, la même population s'est accrue entre la première et la quatrième semaine après l'introduction des billes pour atteindre  $2 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$ .

Le second essai consistait à quantifier la biodégradation des billes en mesurant dans le sol la concentration en chitosane au moyen d'une technique enzymatique. Dans le sol fertile, la concentration en chitosane est restée constante durant les trois premiers jours après l'introduction des billes dans le sol et diminue graduellement jusqu'au septième jour pour devenir indétectable. Le même phénomène fut beaucoup plus lent dans le sol stérile. La concentration en chitosane y est restée à  $85 \text{ mg } g^{-1}$  pendant la première semaine pour atteindre  $58 \text{ mg } g^{-1}$  après six semaines.

Cette technique enzymatique a donc permis de comparer la cinétique de la dégradation des billes de chitosane renfermant des spores de la souche EF-76 dans les sols fertiles et stériles. Comme cette dégradation s'est produite dans un sol stérile, il est plausible d'en attribuer la responsabilité partielle à la capacité chitosanolytique de la souche EF-76. Cependant, le phénomène de dégradation a progressé beaucoup plus rapidement dans le sol fertile, ce qui

signifie que certains membres de la microflore du sol ont pu apporté leur concours dans l'hydrolyse enzymatique du chitosane.

Une coïncidence entre la réduction de la concentration en chitosane et l'accroissement de la population des actinomycètes résistants à la geldanamycine (ARG) a été remarquée dans les sols fertiles et stériles. Comme la souche EF-76 produit cet antibiotique (Toussaint *et al.*, 1997) et montre une résistance envers ce métabolite secondaire (Agbessi *et al.*, 2003), il est permis de penser que le catabolisme du chitosane par cette souche a contribué à l'augmentation du compte viable des ARG.

Un essai de lutte biologique contre *Streptomyces scabiei*, l'agent causal de la gale commune de la pomme de terre, a été réalisé sous des conditions contrôlées avec différentes quantités de billes de chitosane lyophilisées et renfermant des spores de la souche EF-76. Le meilleur traitement a entraîné une proportion de tubercules sains de 92% et consistait à appliquer 0,25 g de billes par tubercule de semence. En guise de comparaison, cette proportion atteignait 84% pour le témoin négatif et 59% pour le témoin positif. Comme l'application de 0,05 et 0,50 g de billes a donné des proportions de tubercules sains respectives de 81 et 78%, il est permis de penser que le niveau de protection est indépendant de la quantité appliquée. L'application conjointe de chitosane et de spores de la souche EF-76 semble donc contribuer à l'établissement et à la survie de *S. melanosporofaciens* dans la rhizosphère ainsi qu'à augmenter sa compétitivité contre d'autres espèces microbiennes, comme *S. scabiei*, dépourvues de capacité chitosanolytique (Agbessi *et al.*, 2003; Beauséjour *et al.*, 2003). Une hypothèse s'appuyant sur la diversité fonctionnelle existant chez les communautés microbiennes du sol consiste à proposer que la protection observée contre la gale commune ne saurait être attribuée à la seule action de la souche EF-76 mais plutôt à celle d'un consortium composé d'autres espèces microbiennes agissant par des mécanismes différents et complémentaires.

Ces travaux sont décrits avec plus de détails à la section 2.2. Cette section est constituée de l'article de Jobin, G., G. Couture, C. Goyer, R. Brzezinski et C. Beaulieu. 2003. Streptomycete Spores Entrapped in Chitosan Beads as a Novel Tool for Biocontrol of Plant Diseases ( Applied and Environmental Microbiology: soumis pour publication). La contribution de chacun des auteurs dans cette publication est la suivante. J'ai fabriqué les billes de chitosane-polyphosphate, effectué les essais en microcosmes et l'essai phytosanitaire. G. Couture a réalisé l'essai de dosage enzymatique du chitosane dans le sol ainsi que l'énumération des actinomycètes résistants à la geldanamycine. J'ai rédigé l'article en collaboration avec G. Couture. C. Goyer, R. Brzezinski et C. Beaulieu ont supervisé l'ensemble des travaux et révisé le manuscrit.

**2.2 Streptomyces Spores Entrapped in Chitosan Beads as a Novel Tool for Biocontrol of Plant Diseases**

# **Streptomycete Spores Entrapped in Chitosan Beads as a Novel Tool for Biocontrol of Plant Diseases**

RUNNING TITLE: ENTRAPPED SPORES IN CHITOSAN BEADS

**Guy Jobin,<sup>1</sup> Geneviève Couture,<sup>1</sup> Karine Prévost,<sup>1</sup> Claudia Goyer,<sup>2</sup> Ryszard Brzezinski,<sup>1</sup> and Carole Beaulieu<sup>1\*</sup>**

Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de Biologie,  
Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) Canada J1K 2R1, <sup>1</sup>  
and Agriculture and Agri-Food Canada, Potato Research Centre, Fredericton (New  
Brunswick) Canada E3B 4Z7<sup>2</sup>

\*Corresponding author. Mailing address: Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1K 2R1. Phone: (819) 821 8000, ext. 2997. Fax: (819) 821 8040. E-mail: [carole.beaulieu@usherbrooke.ca](mailto:carole.beaulieu@usherbrooke.ca)

*A biocontrol tool for potato scab was developed using chitosan beads containing spores of Streptomyces melanosporofaciens EF-76. The spores were incorporated in beads of chitosan and polyphosphate using the entrapment technique called complex coacervation. This biocontrol product allowed a progressive release of both chitosan oligomers and the antagonistic microbial agent. The degradation of spore-loaded beads was monitored by measuring the residual amount of chitosan in soil and by enumerating the S. melanosporofaciens population over time. After their introduction into soil, entrapped spores germinated within 24 h. The amount of chitosan in sterile soil remained at 1.550 mg/g throughout the first week and diminished to 0.101 mg/g after 7 weeks. Degradation of the beads appears to be due at least in part to the chitosanolytic ability of S. melanosporofaciens EF-76 since it occurred in a sterilized soil and coincided with an increase in the S. melanosporofaciens population. Application of spore-loaded chitosan beads on seed tubers increased the proportion of healthy progeny tubers under both controlled and field conditions. Field application of spore-loaded chitosan beads did not significantly changed the metabolic profiles of soil bacterial communities during the growing season although variations in geldanamycin resistant actinomycetes (GRA) populations were observed.*

Actinomycetes are known for their capacity to control plant diseases and to promote plant growth by diverse mechanisms (8). Antagonistic actinomycetes may exert their biocontrol activity through root colonization, thereby preventing phytopathogenic microorganisms from attacking root tissues (23, 24, 25). Actinomycetes also produce antibiotics (5, 10, 39, 46) and lytic enzymes (5, 13, 50) that may inhibit the growth of plant pathogens. Some antagonistic actinomycetes are also producers of plant growth-promoting metabolites and can therefore help plants to withstand attacks by pathogens (5, 19, 49). These characteristics enable antagonistic actinomycetes to control plant diseases as diverse as root rot (55, 56), basal rot (18) and common scab (27). In our laboratory, we are currently investigating the biocontrol properties of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 (1, 4, 46, 50). This strain synthesizes geldanamycin, an ansamycin-type antibiotic with inhibitory activity against diverse phytopathogenic fungi and Gram-positive bacteria (46). *S. melanosporofaciens* EF-76 has been shown to reduce symptoms induced by *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (50) and by *S. scabies* (1) on raspberry and potato, respectively.

Chitosan or poly- $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan is a natural polymer that can reduce the incidence and severity of plant diseases when used as a soil amendment (4, 22). Chitosan inhibits the growth of several microorganisms (17) and is known as a potent elicitor of plant defense mechanisms (15, 44). Beauséjour et al. (4) demonstrated that the combined application of chitosan and EF-76, a chitosanolytic strain of *S. melanosporofaciens*, can be used to control common scab of potato.

Chitosan is obtained from the chemical (21) or enzymatic (48) deacetylation of chitin, the main constituent of crustacean shells. Apart from its biological activities, chitosan is

endowed with useful chemical characteristics. Chitosan can be dissolved in aqueous solutions of mild organic acids at low concentrations as long as the pH is less than 6.3 wherein its amino groups are positively charged (21). It can therefore interact with polyanionic counterions such as polyphosphate to form hydrogels by a process called complex coacervation or ionotropic gelation (2, 9). Polyphosphate and chitosan were combined to produce beads that were effective in the controlled release of an anticancer drug (29, 30) and in the immobilization of microbial cells (51, 52).

The aim of this study is to evaluate the potential of the entrapment of a biocontrol agent in chitosan beads as a general technique to control plant diseases. Chitosan beads containing *S. melanosporofaciens* EF-76 spores were fabricated using the complex coacervation technique. The degradation of the chitosan beads and the population dynamics of the antagonistic *S. melanosporofaciens* EF-76 were monitored after the introduction of the spore-loaded chitosan beads into sterile and non sterile soils. The capacity of the beads to protect potato tubers against common scab was evaluated both under controlled and field conditions and the effect of the biocontrol tool on the soil bacterial communities was assessed.

## MATERIALS AND METHODS

**Production of *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 spores.** Yeast malt extract (YME, 35) plates were inoculated with a 1-ml aliquot of a 4-day-old culture of *S. melanosporofaciens* EF-76 (ATCC BAA-668) grown in Tryptic Soy Broth (Difco, Detroit, Illinois) and were then incubated at 30°C until sporulation. Spores were collected, suspended in glycerol 20% (v/v) and stored at – 20°C. The viable spore concentration was evaluated by

serial dilutions on YME plates. For the control experiment, a stock of dead spores was produced by centrifugation of 1.0 ml of a spore suspension ( $1.0 \times 10^9$  CFU/ml) followed by resuspension in 2-propanol 70% (v/v) for 12 h at room temperature. A 100- $\mu$ l aliquot of this suspension was plated on YME agar to confirm the effective killing of the spores.

**Production of chitosan beads.** Chitosan was kindly provided by Marinard Biotech Inc. (Rivière-au-Renard, Canada) and was produced by chemical deacetylation of chitin from shells of cold water shrimp (*Pandalus borealis*). Its average molecular weight ( $M_v$ ) of 43,000 was determined by viscosimetry (45, 54). According to the producer, the chitosan lot has a deacetylation degree of 80-85% and a viscosity of 400-450 centipoises at 25°C for a solution of 1% (w/v). The complex coacervation technique was used to prepare chitosan beads. Chitosan was dissolved in acetic acid 0.9% and adjusted to a pH between 5.5 and 5.8 with NaOH 2.0 M. The final chitosan concentration was 1.7% (v/v). One volume of spore suspension was mixed thoroughly and uniformly with nine volumes of the chitosan solution in a sterile beaker. This mixture was aspirated in a 60 ml syringe fitted thereafter with a pre-autoclaved 8-channel manifold (Drummond Scientific Co., Broomall, Pennsylvania). A total volume of 120 ml of spore suspension in chitosan was distributed drop wise in 400 ml of a lightly agitated, sterile sodium polyphosphate 2% (w/v) solution at pH 5.8. The coacervation reaction was allowed to take place for 2.5 h. A portion of the beads was washed in sterile water and was lyophilized (Virtis freeze dryer Model 24DX24, Gardiner, New York) during 14 h. The remaining beads were kept hydrated.

**Measurement of glucose consumption.** The capacity of the entrapped spores to germinate and produce mycelium in a rooting medium was verified by measuring glucose consumption. Germination medium was prepared by mixing sphagnum peat-based rooting medium (Pro-Mix, Premier Horticulture, Rivière-du-Loup, Canada) with sand [2:1]. Sterile or nonsterile germination substrate (15 g) was placed in sterile biometer flasks (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey) (3). Each soil lot was then moistened with 6 ml of sterile acetate buffer 0.1 M pH 6.5 followed by one of the five following treatments: 1) sterile rooting medium supplemented with a 1 ml suspension of dead spores, 2) sterile rooting medium supplemented with 1 ml of live spore suspension ( $1.0 \times 10^9$  CFU/ml), 3) nonsterile rooting medium supplemented with 1 ml of sterile acetate buffer, 4) sterile rooting medium supplemented with 0.5 g of spore-loaded lyophilized beads ( $2.7 \times 10^9$  CFU) and with 1 ml of sterile acetate buffer and 5) sterile rooting medium supplemented with 7.2 g of spore-loaded hydrated beads ( $1.5 \times 10^9$  CFU) and with 1 ml of sterile acetate buffer. All treatments were run in triplicate. To detect the metabolic activity linked to spore germination and mycelial growth, each biometer received 111,000 DPM (disintegrations per minute) of uniformly labelled  $^{14}\text{C}$ -glucose (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin). The ensuing  $^{14}\text{CO}_2$  was trapped in 20 ml of KOH 0.5 M placed in the lateral tube of each biometer.

Periodically, 1.0 ml of the KOH solution was sampled from the lateral tube, mixed with 5.0 ml of scintillation liquid (Scintiverse, Fisher, Fair Lawn, New Jersey) and 60  $\mu\text{l}$  of glacial acetic acid. Radioactive counts per minute (CPM) were estimated with a scintillation counter (LS 6000, Beckman Instruments Inc., Fullerton, California).

**Quantification of chitosan in soil.** After its introduction into soil, the degradation of spore-loaded beads was monitored by measurement of the residual chitosan over time. Lyophilized chitosan beads containing *S. melanosporofaciens* spores (2.5 mg) were added to a 50-ml screwcap tube containing 1 g of sterile or nonsterile potting soil (Fafard et frères Ltée, St-Bonaventure, Canada) for which the level of humidity was maintained at 50%. The tubes containing sterile potting soil and those containing nonsterile soil were incubated at room temperature for 7 weeks and 9 days, respectively. Periodically, the content of chitosan in the soil samples was estimated by measuring the chitosanase,  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase and glucosaminidase-hydrolysable fraction (CNGHF) using the following enzymatic technique.

CNGHF was determined by suspending the contents of each tube in 10 ml of 50 mM acetate buffer pH 5.5 followed by treating it overnight at 37°C with 5 units of chitosanase, 0.2 units of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase and 1 unit of  $\beta$ -D-glucosaminidase with shaking. The chitosanase was obtained from *Streptomyces* sp. N174 (6) while the  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase and the  $\beta$ -D-glucosaminidase were obtained from *Amycolatopsis orientalis* ssp. *orientalis* ATCC 19795 (32, 33). These three enzymes hydrolyse various links in chitosan chain to finally produce glucosamine and *N*-acetyl glucosamine monomers. The amount of monomers liberated by such an enzymatic soil treatment provides an estimation of its chitosan content. The amount of monomers was monitored by colorimetric determination of *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine after having proceeded to an *N*-acetylation of glucosamine monomers. For this *N*-acetylation step, the soil suspension was centrifuged for 5 min at 3,500 x g and 125  $\mu$ l of a 1.5% acetic anhydride solution in acetone was added to the supernatant

and allowed to react for 10 minutes. The colorimetric determination of *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine residues was then carried out using the Morgan-Elson procedure (37).

**Microbial cell extraction from soil and enumeration of geldanamycin-resistant actinomycetes.** In the microcosm assay, lyophilized beads (100 mg) containing *S. melanosporofaciens* EF-76 spores ( $10^8$  CFU/g) were placed in a cheesecloth bag and introduced into 40 g of sterile or non-sterile potting soil (Fafard et frères Ltée, St-Bonaventure, Canada) maintained at 50% humidity. *S. melanosporofaciens* EF-76 population was estimated throughout the bead degradation process by sampling potting soil periodically. Microbial cells were extracted from microcosm soil as follows. Bacterial suspensions were obtained by shaking the soil (1g) in 10 ml of sterile sodium pyrophosphate 0.1% (w/v) during 30 minutes at room temperature. The mixture was centrifuged 10 minutes at 55 x g. The supernatants were recovered and centrifuged again 15 minutes at 3500 x g. The bacterial pellets were suspended in 1 ml NaCl 0.85% (w/v).

For the field experiment, soil samples were taken before and after treatment application, at the flowering and one week before harvest. Six soil cores (20cm deep and 2cm wide) were randomly removed from each plot to enumerate geldanamycin-resistant actinomycetes and to assess metabolic activities of soil bacterial communities.

Enumeration of *S. melanosporofaciens* EF-76 was carried out by plating serial dilutions of the samples on a semi-selective medium. The semi-selective culture medium consisted of actinomycete isolation agar (Difco, Detroit, Michigan) supplemented with cycloheximide (200  $\mu$ g/ml), nystatin (5.6  $\mu$ g/ml), nalidixic acid (15  $\mu$ g/ml) and geldanamycin (25  $\mu$ g/ml). The plates were incubated for 8 days at 30°C.

**Soil bacterial communities.** The metabolic activities of bacterial soil communities were analyzed using the Biolog EcoPlate™ system (Biolog Inc., Hayward, CA). Microbial cells were extracted from 3 g of field soil using the protocol described above for the microcosm samples. Soil bacteria were dispersed into sterile saline solution (NaCl 0.85%) to obtain a cell suspension of defined optical density ( $OD_{600} = 0.2$ ) (12, 42, 57). These suspensions were used to inoculate the Biolog EcoPlate (150 $\mu$ l per well). These plates were incubated at 25°C in the dark during 72h and the optical densities were measured with Fluorescence plate reader (BIO-TEK® FL600™, Vermont, USA) at 595nm. The optical density (OD) of the control well was subtracted from the OD of the other wells to correct for background activity. Principle component analysis (PCA) was used to evaluate the differences in the carbon source utilization patterns of the bacterial communities from each treatment plot. PCA was done by SAS System Windows (Version 6.12) statistical package.

**Greenhouse assay on potato tubers.** The capacity of the spore-loaded chitosan beads to protect potato against common scab was tested under controlled conditions. Scab-free potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Shepody) were planted in 25-cm diameter pots containing sand and vermiculite (2:1). Pathogenic inoculum was added to each pot except for the negative controls. This inoculum was prepared by growing the pathogenic *Streptomyces scabies* EF-35 (14) for 2 weeks at 30°C, in 50-ml tubes containing vermiculite saturated with Say solution (26). At plantation, 0, 0.05, 0.25 or 0.5 g of EF-76-loaded lyophilized chitosan beads was deposited around each tuber. These EF-76-loaded beads contained 0, 0.5, 2.7 and  $5.4 \times 10^9$  CFU of the antagonist, respectively. Plants were grown in a greenhouse at 22°C with a 14-h day length period supplemented with fluorescent illumination, and pots were

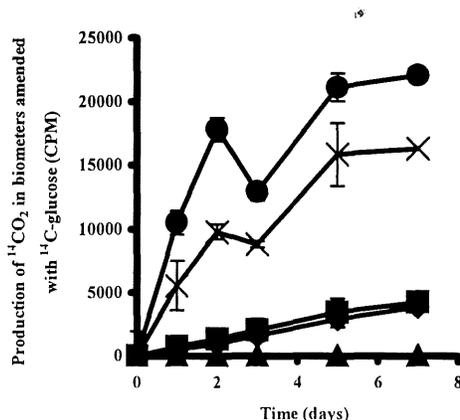
arranged randomly in five replicates. Plants were watered every three days and a soluble fertilizer (20-20-20) was added every two weeks. Progeny tubers were harvested after 16 weeks and examined for common scab symptoms.

**Field trials against common scab of potato.** Field assay was performed for two consecutive years, in 2002 and 2003, in a naturally infested field at l'Assomption (Québec, Canada). At plantation, 0.25g of EF-76 spore-loaded lyophilized chitosan beads was deposited on each tuber (*Solanum tuberosum* cv. Shepody). This treatment was not applied in control plots. The experimental plots were arranged as randomized complete blocks with four replicates and an experimental plot consisted of 4 rows planted with 26 seed tubers (4). Common scab symptoms were estimated visually on 100 tubers harvested from each plot (4). Tubers were considered healthy when less than 5% of their surface was covered by scab lesions.

## RESULTS

**Spore germination estimated from glucose consumption.** Figure 1 illustrates the accumulation of radiolabelled CO<sub>2</sub> resulting from the assimilation of uniformly labelled <sup>14</sup>C-glucose molecules by microorganisms associated with biometer soils. No metabolic activity was detected in soil that has been sterilized and inoculated with dead spores whereas the radioactive count associated with the nonsterilized soil reached 22,000 CPM after 7 days of incubation. This count is significantly higher than that of sterile soils that were supplemented with free *S. melanosporofaciens* spores or with spores entrapped in chitosan beads. However, the metabolic activity was higher for free spores as compared to spores entrapped in

lyophilized or hydrated beads. Glucose catabolism occurred after a 24-h delay following the introduction of free spores or of spore-loaded beads into soil. This phenomenon occurred at similar rates in lyophilized and hydrated beads.



**Figure 1. Microbial production of  $^{14}\text{CO}_2$  in biometers amended with  $^{14}\text{C}$ -glucose. The vertical bars represent the standard deviation. The radioactive counts are the mean of three replications. All soils were sterilized unless otherwise stated. ( $\blacktriangle$ : soil inoculated with free dead spores;  $\blacksquare$ : soil inoculated with hydrated spore-loaded beads;  $\blacklozenge$ : soil inoculated with lyophilized spore-loaded beads;  $\times$ : soil inoculated with free live spores and  $\bullet$ : non-sterilized, non-inoculated soil).**

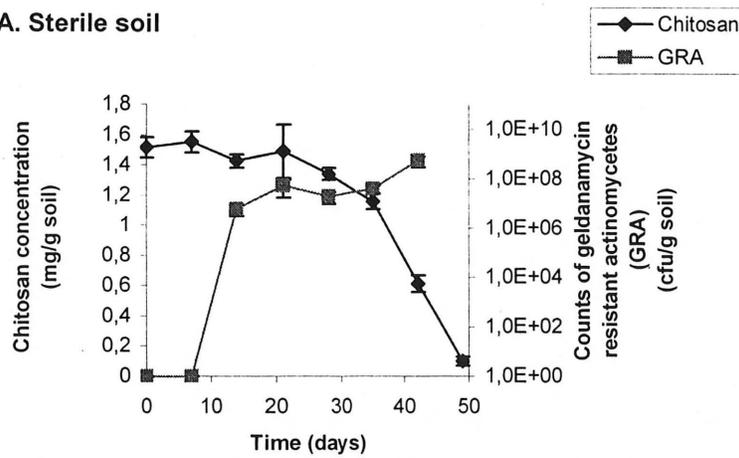
**Degradation of spore-loaded chitosan beads in sterile and nonsterile soil in microcosms.** After their introduction into sterile soil, the time-course of the degradation of spore-loaded chitosan beads was monitored by measuring the amount of residual chitosan in the soil. The consequent increase in the population of *S. melanosporofaciens* EF-76 was also measured. Quantification of the residual chitosan levels was made on a weekly basis for 7 weeks. The chitosan levels remained constant at about 1.550 mg/g of soil throughout the first week. This amount represented more than 90% of the total quantity of chitosan introduced in

soil considering that only 70% of the bead weight consisted of chitosan. The amount of chitosan then progressively diminished to reach 0.101 mg/g of soil after 7 weeks of incubation (Figure 2A). The population of *S. melanosporofaciens* increased between the first and fourth weeks of incubation and then stabilized at  $5.3 \times 10^8$  CFU/g of sterile soil (Figure 2A).

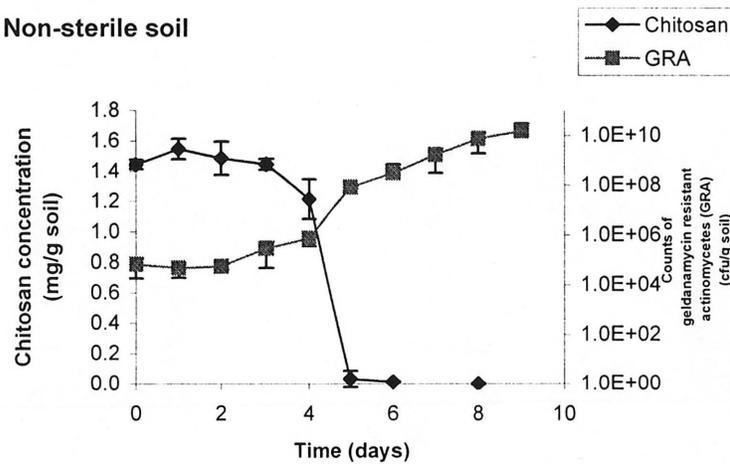
The degradation of chitosan beads was much more rapid in non sterile soil than in sterile soil. In non sterile soil, chitosan levels stayed constant for only 3 days. A progressive reduction of the soil chitosan content was then observed. Chitosan became undetectable 7 days after incubation (Figure 2B). The population of geldanamycin-resistant actinomycetes started to increase 3 days after inoculation until it reached  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/g of non sterile soil after 9 days (Figure 2B).

**Enumeration of geldanamycin-resistant actinomycetes from field soil.** The average population of geldanamycin resistant actinomycetes (GRA) in field plots was estimated at  $3.25 \times 10^5$  CFU/g before treatment application. Twelve days after the introduction of spore-loaded chitosan beads, the population increased from 3.13 to  $4.59 \times 10^5$  CFU/g of soil and the population was significantly higher in treated plots than in control plots (ANOVA test,  $p < 0.05$ ) (Table 1). At the flowering period and one week before harvest, the GRA populations of the treated and control plots were similar (Table 1).

**A. Sterile soil**



**B. Non-sterile soil**



**Figure 2.** Estimation of chitosan content and enumeration of geldanamycin-resistant actinomycete (GRA) numbers in sterile (A) and non sterile (B) soil amended with spores of *S. melanosporofaciens* EF-76 entrapped in chitosan-polyphosphate beads. The data presented are the mean of three replications.

**Table 1. Effect of spore-loaded chitosan beads on the soil population of geldanamycin-resistant actinomycetes and on common scab of potato.**

Treatment	Geldanamycin-resistant actinomycetes (10 <sup>4</sup> x CFU <sup>a</sup> /g of soil)				Healthy tubers (%) <sup>c</sup>	
	Before treatment <sup>b</sup>	12 days after treatment <sup>b</sup>	Flowering period <sup>b</sup>	One week before harvest <sup>b</sup>	Year 2002 <sup>d</sup>	Year 2003 <sup>d</sup>
	Control	34 b	32 b	46 a	4.0 c	8.5 a
Spore-loaded chitosan beads	31 b	46 a	53 a	4.3 c	13.0 b	12.5 b

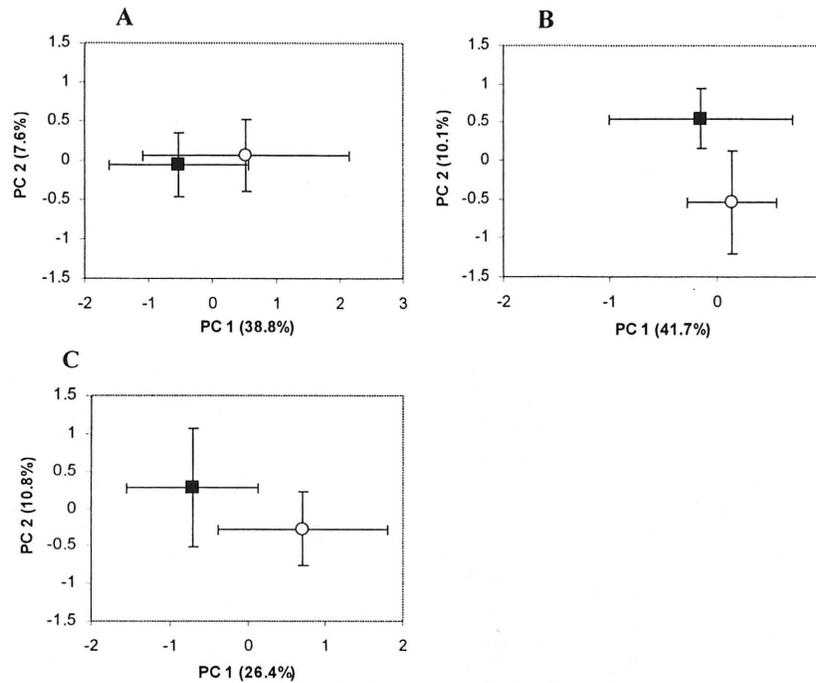
<sup>a</sup> CFU: colony forming unit.

<sup>b</sup> Numbers accompanied by the same letter did not significantly differ ( $p < 0.05$ , ANOVA test).

<sup>c</sup> Tubers were considered healthy when less than 5% of their surface was covered with common scab lesions.

<sup>d</sup> Numbers accompanied by the same letter did not significantly differ ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  test).

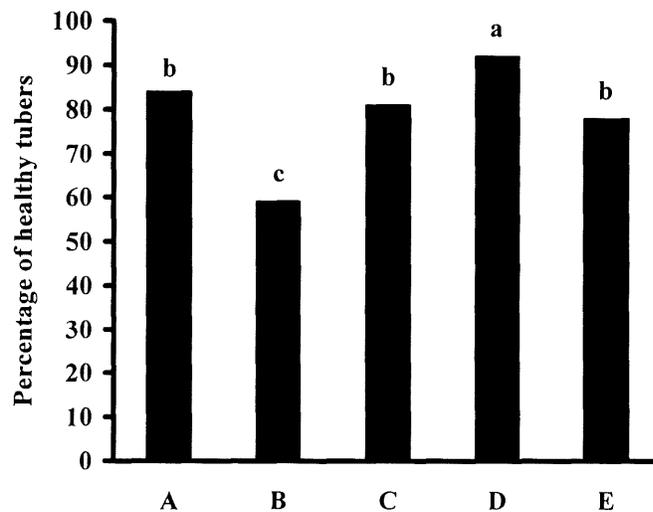
**Metabolic profiles of the field bacterial communities.** The introduction of spore-loaded chitosan beads did not drastically modify the metabolic profiles of the soil bacterial communities. No significant difference was detected between the control and the spore-loaded bead treatments. The PCA analysis of carbon utilization patterns showed that the bacterial communities from control and treated plots were closely clustered (Figure 3). PCA axes 1 and 2 did not, however, accounted for 100% of the variance in the data set. Both axes accounted for 46.4%, 37.2% and 51.8% of the variance in the data set, 12 days after treatment application, at the flowering period and one week before harvest, respectively.



**Figure 3. Principal component analysis (PCA) of carbon source utilization patterns of the microbial communities generated with Biolog EcoPlates. PC1, principal component 1; PC2 principal component 2. (A) 12 days after treatment application, (B) at the flowering period, (C) one week before harvest. Vertical and horizontal lines represent the standard error of the mean ( $n=4$ ); Empty circles ( $\circ$ ) represent the control and filled squares ( $\blacksquare$ ) the spore-loaded chitosan beads treatment.**

**Greenhouse assay on potato tubers.** The greenhouse experiment was performed to test the efficiency of spore-loaded chitosan beads to control common potato scab. The proportions of healthy progeny tubers that resulted from the application of different quantities of spore-loaded chitosan beads are presented in Figure 4. The application of 0.25 g of spore-loaded beads per seed tuber resulted in a significantly higher proportion (92%) of healthy progeny tubers than any other treatment, even superior to the one observed in the absence of the pathogenic strain EF-35 (84%). The application of 0.05 or 0.5 g of spore-

loaded beads resulted in proportions of healthy tubers of 81 and 78% respectively, comparable to the 84% obtained in the absence of the pathogenic *S. scabies* strain EF-35 (negative control). The soil application of *S. scabies* strain EF-35 (positive control) yielded the lowest proportion of healthy tubers (59%).



**Figure 4. Effect of different quantities of spore-loaded chitosan beads on common scab of potato. The experiment was conducted under controlled conditions. Treatments are a negative control consisting of soil not inoculated with the pathogenic *S. scabies* EF-35 (A), a positive control consisting of soil inoculated with *S. scabies* EF-35 (B) and treatments consisting of soils inoculated with *S. scabies* EF-35 and amended with 0.5g (C), 0.25g (D) and 0.05g (E) of chitosan beads containing *S. melanosporofaciens* spores. The data presented are the mean of five replications. Treatments designated by the same letter above histogram bars did not significantly differ ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  test).**

**Field trials on potato tubers.** Field assays were performed in 2002 and 2003. The proportion of healthy tubers harvested from plots where *S. melanosporofaciens* strain EF-76 spore-loaded lyophilized chitosan beads were incorporated into soil was compared to that of control plots (Table 1). In both years, the proportion of healthy tubers was significantly higher in treated plots. The proportion of healthy tubers for the *S. melanosporofaciens* EF-76

spore-loaded lyophilized chitosan beads treatment was of 13.5% and 12.5% in 2002 and 2003, respectively while it was of 8.5% and 9.5% for the control treatment ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$  test).

## DISCUSSION

A previous study has shown that the simultaneous application of chitosan flakes and lyophilized *S. melanosporofaciens* EF-76 biomass protected progeny tubers against common potato scab (4). In this study, we proposed to entrap *S. melanosporofaciens* EF-76 spores in chitosan beads to combine both treatments for integration into agricultural practices. We showed that, once introduced into soil, *S. melanosporofaciens* EF-76 spores produced a metabolically active mycelium although they had been entrapped in hydrated or lyophilized chitosan beads. However, the metabolic activity of this mycelium appeared to be reduced when compared to that of free spores. Indeed,  $^{14}\text{C}$ -glucose consumption, as revealed by radioactive counts from  $^{14}\text{CO}_2$ , was higher for mycelium originating from free spores as compared to that produced by entrapped spores despite the use of an inoculum of the same order of magnitude in both cases. Reduced mass transfer phenomena may have caused this reduced metabolic activity. Chitosan may possibly reduce the growth of *S. melanosporofaciens* as it has been shown for other microorganisms (20, 47).

The reduced metabolic activity did not appear to hamper the capacity of the spore-loaded chitosan beads to reduce common scab symptoms. In the greenhouse assay, the proportion of healthy tubers increased from 59% to 92% when a soil infested with *S. scabies* was amended with 0.25 g of spore-loaded chitosan beads per seed tuber. Beauséjour et al. (4) obtained similar results when they amended a soil with a mix of free *S. melanosporofaciens* spores and

chitosan flakes. However, the results indicate that there is probably no dose-response relationship between the quantity of beads and their protective effect. A significantly higher proportion of healthy tubers was obtained with a dose of 0.25 g per seed tuber compared with either 0.05 or 0.5 g treatments. Chitosan may contribute to the establishment and survival of *S. melanosporofaciens* in the rhizosphere and might improve its competitive effectiveness against other microbial species especially since *S. scabies* lacks the chitosanolytic behavior (1, 4). Given the functional diversity found in soil microbial communities, it may be hypothesized that the protection against common scab cannot be attributed to the sole action of *S. melanosporofaciens* strain EF-76, but rather to a consortium involving other microbial species acting through different and complementary mechanisms. This could explain why the protection level conferred by 0.25 g of spore-loaded chitosan beads per seed tuber was superior to that observed in the absence of the plant pathogen, *S. scabies* EF-35 (negative control). On the other hand, the toxicity of chitosan against some beneficial indigenous microbial species may lessen the level of protection when chitosan beads are applied at a higher concentration. The quantity of chitosan applied to each seed tuber must be high enough to insure the establishment and competitiveness of strain EF-76 against pathogenic microbial species but less than a threshold value over which chitosan could become toxic to certain microbial species constituting a protective consortium (34, 36).

In the field, the application of 0.25 g of spore-loaded chitosan beads per seed tuber increased by 38 and 24 % the proportion of healthy tubers in 2002 and 2003, respectively. Beauséjour et al. (4) obtained a better level of protection when they amended a soil with a mix of free *S. melanosporofaciens* EF-76 spores and chitosan flakes. Entrapment of *S.*

*melanosporofaciens* EF-76 spores in chitosan beads facilitates the joint application of these two biocontrol agents and ensures a longer shelf-life for the entrapped microorganism (data not shown) but further studies are necessary to optimize the biocontrol efficiency of the spore-loaded chitosan beads. It would be advantageous to modulate the timing of the germination of the entrapped spores and thus adapt the biocontrol product to fight phytopathogens acting at different stages of plant growth. This could be carried out by varying the chitosan concentration or by coating the beads with a biopolymer membrane of variable thickness.

Hammad and El-Mohandes (16) used alginate-encapsulated cells of *Streptomyces* spp. and *Bacillus mycoides* to control fusarium wilt disease of cucumber plants but these authors did not study the kinetics of the alginate beads degradation once introduced into soil. In this study, we were interested in following the degradation process of chitosan beads in soil. Previously, an enzymatic technique was proposed for the quantification of oligomeric chitin in environmental samples (38), but no such technique was available for chitosan. We developed an enzymatic procedure that estimated the amount of monomers resulting from the complete, highly specific enzymatic degradation of chitosan molecules. The monitoring of the monomers released from enzymatic reactions was performed according to the Morgan-Elson procedure after having carried out the *N*-acetylation step of glucosamine into *N*-acetylglucosamine. Since no free monomeric aminosugars were found in our control soil samples (data not shown), the amount of aminosugars produced by the enzymatic process allowed us to estimate the amount of chitosan in our environmental samples. The method developed for the quantification of chitosan in soil is suitable to other environments as long

as these environments do not inhibit chitosanase,  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase and  $\beta$ -D-glucosaminidase. The technique allowed the comparison of the kinetics of degradation of spore-loaded chitosan beads in both sterile and non sterile soils. Bead degradation appears to be due at least partly to the chitosanolytic ability of *S. melanosporofaciens* EF-76 itself since it occurred in a sterilized soil. However, in a nonsterile soil degradation proceeded faster than in a sterile soil, indicating that some indigenous soil inhabitants could also participate in chitosan hydrolysis. This confirms several reports of the isolation of chitosanolytic microorganisms from soil (7, 28, 40, 41).

In microcosms, the reduction in chitosan content coincided with an increase in the population of geldanamycin resistant actinomycetes. As *S. melanosporofaciens* EF-76 produced geldanamycin (46) and exhibited resistance against this metabolite (1), one could presume that chitosan catabolism by *S. melanosporofaciens* EF-76 contributed to the increase in the count of geldanamycin resistant actinomycetes. An increase of the soil GRA population was also observed after bead application into potato field. The increase of the GRA population appears, however, to be only transient since the GRA populations were similar in control and treatment plots from flowering to harvest. Transient change in the bacterial community was also reported by Nacamulli et al. (31) who introduced the biocontrol agent *Burkholderia cepacia* into soil to control soilborne fungal pathogens of maize. The introduction of spore-loaded chitosan beads did not appear to drastically change the bacterial communities of potato field. The use of Biolog plates to assess temporal differences between microbial communities in soils did not reveal differences between the spore-loaded chitosan beads and the control treatments at any time of the potato growing

season. Nevertheless, our field data showed that modifications in bacterial populations did occur at least for the GRA and the common scab-inducing actinomycetes. The Biolog system remains a valuable and rapid tool for the analysis of microbial communities (53, 57) but has some limitations (11).

In this work, we developed a biocontrol product that allowed a progressive release of chitosan oligomers and an antagonistic microbial agent. We also proposed methods to follow the gradual degradation of this new biocontrol tool in the environment. These methods will be useful to predict the behavior of chitosan beads under different environmental conditions.

### ***ACKNOWLEDGEMENTS***

This work was supported by a grant from Conseil de Recherches en Pêches et en Agroalimentaire du Québec (CORPAQ) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Chitosan was kindly donated by Marinard Biotech Inc. (Rivière-au-Renard, Canada). We thank J. Beauséjour and N. Clermont for their technical assistance and B. Talbot for a critical review of the manuscript.

### **REFERENCES**

1. **Agbessi, S., J. Beauséjour, C. Déry, and C. Beaulieu.** 2003. Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 233-238.
2. **Arshady, R.** 1990. Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques. Part II: coacervation. *Polym. Eng. Sci.* **30**:905-914.

3. **Bartha, R., and D. Pramer.** 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science* **100**:68-70.
4. **Beauséjour, J., N. Clermont, and C. Beaulieu.** 2003. Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant Soil* **256**:463-468.
5. **Berg, G., P. Marten, A. Minkwitz, and S. Brückner.** 2001. Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **108**:1-10.
6. **Boucher, I., A. Dupuy, P. Vidal, W. A. Neugebauer, and R. Brzezinski.** 1992. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:188-193.
7. **Cheng, C. Y., and Y.-K. Li.** 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **32**:197-205.
8. **Doumbou, Cyr-Lézin, M. K. Hamby Salove, D. L. Crawford, and C. Beaulieu.** 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* **82**:85-102.
9. **Dulieu, C., D. Poncelet, and R. J. Neufeld.** 1999. Encapsulation and immobilization techniques. In W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza, and W. L. Chick (Ed.) *Cell encapsulation technology and therapeutics.* Birkhäuser. Boston.

10. **Eckwall, E. C. and J. L. Schottel.** 1997. Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **19**:220-225.
11. **Elsas van, J.D., G.F. Duarte, A.S. Rosado, and K. Smalla.** 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. J Microbiol. Methods **32**:133-154.
12. **Garland, J.L.** 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol. Ecol. **24**:289-300.
13. **Gomes, R. C., L. T. A. S. Semêdo, R. M. A. Soares, L. F. Alviano, C. S. Linhares, and R. R. R. Coelho.** 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Letters Appl. Microbiol. **30**:146-150.
14. **Goyer, C., J. Vachon, and C. Beaulieu.** 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin production. Phytopathology **88**:442-445.
15. **Hadwiger, L. A., T. Ogawa, and H. Kuyama.** 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. Mol. Plant Microbe Interact. **7**:531-533.
16. **Hammad, A. M. M., and A. O. El-Mohandes.** 1999. Controlling Fusarium wilt disease of cucumber plants via antagonistic microorganisms in free and immobilized states. Microbiol. Res. **154**:113-117.
17. **Helander, I. M., E.-L. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, and S. Roller.** 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Int. J. Food Microbiol. **71**:235-244.

18. **Hiltunen, L. H., C. A. Linfield, and J. G. White.** 1995. The potential for the biological control of basal rot of *Narcissus* by *Streptomyces* sp. *Crop Protect.* **14**:539-542.
19. **Igarashi, Y., T. Iida, R. Yoshida, and T. Furumai.** 2002. Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451. *J. Antibiot.* **55**:764-767.
20. **Jeon, Y.-J., P.-J. Park, and S.-K. Kim.** 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym.* **44**:71-76.
21. **Kaş, H.S.** 1997. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsulation* **14**: 689-711.
22. **Kim, K. D., S. Nemeč, and G. Musson.** 1997. Effects of composts and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper. *Crop Protect.* **16**:165-172.
23. **Kolomiets, E. I., N. A. Zdor, T. V. Romanovskaya, and A. G. Lobanok.** 1997. Certain aspects of the phytoprotective activity of *Streptomyces flavescens*, an antagonist of phytopathogenic fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* **33**:451-454.
24. **Kortemaa, H., H. Rita, K. Haahtela, and A. Smolander.** 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil* **163**:77-83.
25. **Kortemaa, H., T. Pennanen, A. Smolander, and K. Haahtela.** 1997. Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and non-rhizosphere sand. *J. Phytopathology* **145**:137-143.

26. **Labruyère, R. E.** 1971. Common scab and its control in seed potato crops. Agricultural Research Reports 767. Centre for agricultural publishing and documentation. Wageningen. The Netherlands.
27. **Liu, D., N. A. Anderson, and L. L. Kinkel.** 1996. Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. Can. J. Microbiol. **42**:487-502.
28. **Masson, J.-Y., I. Boucher, W. A. Neugebauer, D. Ramotar, and R. Brzezinski.** 1995. A new chitosanase gene from a *Nocardioides* sp. is a third member of glycosyl hydrolase family 46. Microbiology **141**:2629-2637.
29. **Mi, F.-L., S.-S. Shyu, C.-Y. Kuan, S.-T. Lee, K.-T. Lu, and S.-F. Jang.** 1999. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anti-cancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. J. Appl. Polym. Sci. **74**:1868-1879.
30. **Mi, F.-L., S.-S. Shyu, T.-B. Wong, S.-F. Jang, S.-T. Lee, and K.-T. Lu.** 1999. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anti-cancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. J. Appl. Polym. Sci. **74**:1093-1107.
31. **Nacamulli, C., A. Bevivino, C. Dalmastri, S. Tabacchioni, and L. Chiarini.** 1997. Perturbation of maize microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. FEMS Microbiol. Ecol. **23**: 183-193.

32. **Nanjo, F., M. Ishikawa, R. Katsumi, and K. Sakai.** 1990. Purification, properties, and transglycosylation reaction of  $\beta$ -N-acetylhexoaminidase from *Nocardia orientalis*. *Agric. Biol. Chem.* **54**:899-906.
33. **Nanjo, F., R. Katsumi, and K. Sakai.** 1990. Purification and characterization of an exo- $\beta$ -D-glucosaminidase, a novel type of enzyme, from *Nocardia orientalis*. *J. Biol. Chem.* **265**:10088-10094.
34. **No, H. K., N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Myers.** 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* **74**:65-72.
35. **Pridham, T. G., P. Anderson, C. Foley, L. A. Lindenfelser, C. W. Hesseltine, and R. G. Benedict.** 1956-57. A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiot. Annu.* 947-953.
36. **Reddy, M. V. Bhaskara, J. Arul, E. Ait-Barka, P. Angers, C. Richard, and F. Castaigne.** 1998. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Sci. Technol.* **8**:33-43.
37. **Reissig, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir.** 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-Acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* **217**:959-966.
38. **Roy, S., P. Leclerc, F. Auger, G. Soucy, C. Moresoli, L. Côté, D. Potvin, C. Beaulieu, and R. Brzezinski.** 1997. A novel two-phase composting process using shrimp shells as an amendment to partly composted biomass. *Compost Sci. Util.* **5**:52-64.

39. **Sanglier, J.J., H. Haag, T.A. Huck, and T. Fehr.** 1993. Novel biactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* **144**:633-642.
40. **Shimosaka, M., M. Nogawa, M. Ohno, and M. Okasaki.** 1993. Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* purification and some properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**:231-235.
41. **Shimosaka, M., M. Nogawa, X.-Y. Wang, K. Masanori, and M. Okasaki.** 1995. Production of two chitosanases from chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:438-443.
42. **Staddon, W.J., L.C. Duchesne, and J.T. Trevors.** 1997. Microbial Diversity and Community Structure of Postdisturbance Forest Soils as Determined by Sole-Carbon-Source Utilization Patterns. *Microb. Ecol.* **34**:125-130.
43. **Steel, R. G. D., and J. H. Torrie.** 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2<sup>nd</sup> edition. McGraw-Hill. New York.
44. **Tada, Y., S. Hata, Y. Takata, H. Nakayashiki, Y. Tosa, and S. Mayama.** 2001. Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**:477-486.
45. **Terbojevich, M., and A. Cosani.** 1997. Molecular weight determination of chitin and chitosan. p. 87-101. In *Chitin Handbook*. R. A. A. Muzzarelli and M. G. Peter (Ed.) European Chitin Society. Atec. Grottammatare, Italy.
46. **Toussaint, V., D. Valois, M. Dodier, E. Faucher, C. Déry, R. Brzezinski, L. Ruest, and C. Beaulieu.** 1997. Characterization of actinomycetes antagonistic to

- Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Phytoprotection **78**:43-51.
47. **Tsai, G.-J. and W.-H Su.** 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. J. Food Protect. **62**:239-243.
48. **Tsigos, I, A, Martinou, D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis.** 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Tibtech **18**:305-312.
49. **Tuomi, T., S. Laakso, and H. Rosenqvist.** 1994. Indole-3-acetic acid (IAA) production by a biofungicide *Streptomyces griseoviridis* strain. Ann. Bot. Fenn. **31**:59-63.
50. **Valois, D., K. Fayad, T. Barasubiye, M. Garon, C. Déry, R. Brzezinski, and C. Beaulieu.** 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol. **62**:1630-1635.
51. **Vorlop, K.-D., and J. Klein.** 1981. Formation of spherical chitosan biocatalysts by ionotropic gelation. Biotechnol. Lett. **3**:9-14.
52. **Vorlop, K.-D., and J. Klein.** 1987. Entrapment of microbial cells in chitosan. Methods Enzymol. **135**:259-268.
53. **Wünsche, L., L. Brüggemann and W. Babel.** 1995. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiol. Ecol. **17**:295-306.
54. **Young, R. J., and P. A. Lovell.** 1991. Introduction to polymers. 2<sup>nd</sup> Edition. Chapman and Hall. London. England.

55. **Youssef, Y. A., K. A. El-Tarabily, and A. M. Hussein.** 2001. *Plectosporium tabacinum* root rot disease of white lupine (*Lupinus termis* Forsk.) and its biological control by *Streptomyces* species. J. Phytopathology **149**:29-33.
56. **Yuan, W. M., and D. L. Crawford.** 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. **61** 3119-3128.
57. **Zak, J.C., M.R. Willig, D.L. Moorhead, and H.G. Wildman.** 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biol. Biochem. **26**:1101-11.

## CONCLUSION

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de travaux visant à développer des outils de lutte biologique appelés à remplacer les produits chimiques traditionnellement utilisés pour combattre les pathogènes des végétaux et remis de plus en plus en question en raison de leur action délétère. Un nouvel outil de lutte biologique a été mis au point afin de faciliter l'application conjointe des deux meilleurs agents naturels pour combattre la gale commune de la pomme de terre: des spores d'une souche antagoniste de streptomycète et du chitosane. Nous avons ainsi démontré la faisabilité technique de l'immobilisation de spores d'une souche antagoniste, *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76, dans des billes de chitosane et de polyphosphate.

Par ailleurs, les oligomères de chitosane sont reconnus comme des agents éliciteurs des mécanismes de défense des plantes (El-Ghaouth *et al.*, 1994; Hadwiger *et al.*, 1994; Doares *et al.*, 1995; Lafontaine et Benhamou, 1996; Benhamou et Picard, 1997; Tada *et al.*, 2001). Ces mécanismes de défense se caractérisent par une production accrue dans les tissus foliaires et racinaires de protéines reliées à la pathogénèse (Stintzi *et al.*, 1993; Agrios, 1997). Nous proposons donc de doser ces protéines dans les tissus de plantes soumises à l'influence de diverses quantités de billes afin de vérifier l'influence de leur chitosane constitutif sur les mécanismes de défense des plantes (Meena *et al.*, 2000). Les oligomères de chitosane peuvent aussi être nocifs pour les microorganismes phytopathogènes et il y aurait donc avantage à réaliser un test de toxicité d'oligomères de divers degrés de polymérisation envers l'agent causal de la gale commune de la pomme de terre.

Des cellules végétatives de *Streptomyces* sp. et de *Bacillus mycoides* avaient déjà été immobilisées dans des billes d'alginate en vue de construire un outil de lutte biologique (Hammad et El-Mohandes, 1999). Cette étude ne fournissait cependant aucune preuve directe de la biodégradabilité des billes d'alginate. Nous avons comblé cette lacune en dosant dans le sol les monomères constitutifs du chitosane issus de la dégradation de billes de chitosane

lyophilisées. L'usage de terreau stérile et fertile (non stérilisé) a permis de confirmer la participation à la fois de la souche antagoniste et de la microflore résidente dans la dégradation des billes de chitosane. Donc, le potentiel chitosanolytique de la souche antagoniste et de certaines espèces microbiennes du terreau explique au moins partiellement la biodégradabilité des billes de chitosane. Toutefois, cette dégradation peut aussi s'expliquer par l'action de polyphosphatases, des enzymes ubiquistes dans le monde microbien (Bonting *et al.*, 1995; Andreeva *et al.*, 2000) qui sont impliquées dans le métabolisme du polyphosphate (Kornberg, 1999; Kulaev *et al.*, 1999). Il serait donc opportun de réaliser un essai de digestion de billes hydratées dans une solution de polyphosphatase.

L'examen en microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface des billes de chitosane lyophilisées a révélé la présence de fractures et de pores constituant des portes d'entrée potentielles pour la solution de sol qui à son tour sert d'amorce à la germination des spores immobilisées. Un examen semblable en MEB de la structure interne des billes lyophilisées montre avec plus de détails le réseau de microfibrilles qui est constitué de feuilletés entremêlés. Des billes de chitosane et de polyphosphate ont aussi servi à immobiliser un vaccin (Mi *et al.*, 1999a), un médicament anti-cancer (Mi *et al.*, 1999b) et des cellules de colibacille (Vorlop et Klein, 1981; Vorlop et Klein, 1987). La structure interne de ces billes était semblable à celle décrite plus haut. Il semble donc que la nature de l'objet immobilisé dans les billes de chitosane n'influence pas leur structure interne.

Cet outil de lutte biologique peut toutefois être amélioré de diverses façons. Ainsi, le taux de survie à l'immobilisation est plutôt faible en raison de l'environnement relativement acide ( $\text{pH} \cong 5,7-5,8$ ) supporté par les spores durant la fabrication des billes. L'addition d'une faible quantité d'argile à la solution de chitosane procurerait une couche protectrice autour des spores et préviendrait leur attaque directe par les ions  $\text{H}^+$  (Cassidy *et al.*, 1996). Outre l'ajout d'argile dans le mélange de solution de chitosane et de suspension de spores, on pourrait augmenter la concentration en polyphosphate de 2 à 3-4% afin d'accélérer la cinétique réactionnelle du procédé de coacervation complexe. Il serait alors possible de réduire le

temps de fabrication des billes et diminuer d'autant la durée d'exposition des spores à un pH sous-optimal.

Le délai de germination des spores immobilisées dans le sol aurait avantage à être modulé. Ce délai dépend directement de la porosité des billes et cette porosité est directement proportionnelle à la longueur des molécules de chitosane et du polymère anionique et indirectement proportionnelle à leur concentration. Il y aurait donc avantage à fabriquer des billes avec des polymères anioniques ayant des molécules plus longues que le polyphosphate; nous pensons entre autres à l'alginate et au xanthane. Les spores d'un agent antagoniste immobilisées dans des billes plus poreuses pourraient germer beaucoup plus rapidement et prévenir l'action de microorganismes phytopathogènes agissant aux stades de germination des semences et de semis, comme par exemple les espèces microbiennes responsables de la fonte des semis.

Il y aurait aussi avantage à utiliser d'autres mécanismes d'extrusion de la solution de chitosane permettant de produire des billes de plus petit diamètre que celles produites au moyen d'une seringue (Dulieu *et al.*, 1999). Comme le rapport surface-volume d'une bille sphérique est indirectement proportionnel à son rayon, les billes de plus petit diamètre absorberaient plus rapidement la solution de sol. D'une façon plus sûre et directe, le délai de germination des spores serait allongé en enrobant les billes d'une couche de biopolymère d'épaisseur variable.

Nous savons que la lyophilisation des billes de chitosane entraîne une perte supplémentaire de spores. Il y aurait moyen de minimiser cette perte en introduisant dans la solution de chitosane certains agents de cryoprotection comme le lait écrémé ou le polyvinylpyrrolidone (Barbaree *et al.*, 1982). La durée de la lyophilisation a aussi avantage à être minimisée afin de diminuer cette perte.

Nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un consortium protecteur composé de plusieurs espèces microbiennes agissant par des moyens différents et complémentaires. Dans cette optique, il serait logique d'immobiliser deux agents antagonistes mutuellement compatibles et ayant des mécanismes de suppression des maladies différents et efficaces sous des conditions environnementales variables afin de maximiser l'efficacité des billes ainsi produites. Ce concept a été utilisé avec succès dans la lutte contre le dépérissement du framboisier causé par *Botrytis cinerea* (Guetsky *et al.*, 2002). Les espèces candidates pour une telle expérience devraient non seulement être efficaces contre l'agent pathogène ciblé mais aussi posséder une capacité chitosanolytique pour qu'elles soient en mesure de supporter la toxicité potentielle du chitosane et de se libérer facilement des billes.

Dans le présent projet, l'efficacité phytosanitaire des billes de chitosane a été testée avec le système *Streptomyces scabiei* – *Solanum tuberosum*. Dans ce cas, les tubercules descendants ciblés par l'agent pathogène sont formés entre cinq et huit semaines après l'introduction des billes dans le sol. L'agent antagoniste immobilisé dans les billes dispose ainsi de suffisamment de temps pour coloniser le sol et réduire la population des streptomycètes responsables de la maladie. Il y aurait donc avantage à fabriquer des billes de plus grande porosité qui seraient aptes à permettre une libération très rapide de l'agent antagoniste. De telles billes pourraient lutter efficacement contre des agents pathogènes qui s'attaquent aux semences et/ou aux semis.

Comme les conditions environnementales varient d'une saison de croissance à l'autre et que celles-ci influencent l'efficacité de l'agent antagoniste et la nocivité de l'agent pathogène, il conviendrait de tester le nouvel outil de lutte biologique pendant au moins trois à cinq années consécutives. Cette expérience faciliterait son homologation auprès des autorités compétentes dans le cas d'un succès obtenu sur une longue durée.

## BIBLIOGRAPHIE

Açikgöz, M., Kaş, H.S. and Hincal, A.A. (1992). Chitosan microspheres of diclofenac sodium: I. Formulation and release kinetics. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress on pharmaceutical Technology. Malabry, France. pp. 232-242.

Açikgöz, M., Kaş, H.S., Orman, M. and Hincal, A.A. (1996). Chitosan microspheres of diclofenac sodium: I. Application of factorial design and evaluation of release kinetics. *J. Microencapsulation* 13, 141-160.

Agbessi, S., Beauséjour, J., Déry, C. and Beaulieu, C. (2003). Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 233-238.

Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*. 4<sup>th</sup> Edition. (New York: Academic Press).

Aiedeh, K., Gianasi, E., Orienti, I. and Zecchi, V. (1997). Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. *J. Microencapsulation* 14, 567-576.

Akbuğa, J. and Durmaz, G. (1994). Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. *Int. J. Pharm.* 111, 217-222.

Al-Helw, A.A., Al-Angary, A.A., Mahrous, G.M., and Al-Dardari, M.M. (1998). Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone. *J. Microencapsulation* 15, 373-382.

Allan, C.R. and Hadwiger, L.A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.* 3, 285-287.

Andreeva, N.A., Kulakovskaya, T.V., and Kulaev, I.S. (2000). Purification and characterization of polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cytosol. *Biochemistry (Moscow)*, 61, 1213-1220.

Arshady, R. (1989). Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques. Part I: suspension cross-linking. *Polym. Eng. Sci.* 29, 1746-1758.

Atlas, R.M. and Bartha, R. (1993). *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*. 3<sup>rd</sup> Edition. (New York: The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc).

Aydin, Z. and Akbuğa, J. (1996). Chitosan beads for the delivery for salmon calcitonin: preparation and release characteristics. *Int. J. Pharm.* 131, 101-103.

Barbaree, J. M., Thompson, S.A., and Smith, S.J. (1982). Use of thermal stability studies to compare *Bacteroides fragilis* lyophilized in skim milk and polyvinylpyrrolidone solutions. *Cryobiology* 19: 92-98.

Bayomi, M.A., Al-Suwayeh, S.A., El-Helw, A.M., and Mesnad, A.F. (1998). Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. *Pharm. Acta Helv.* 73, 187-192.

Beauséjour, J., Clermont, N., and Beaulieu, C. (2002). Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant Soil* 256, 463-468.

Bell, A.A., Hubbard, J.C., and Liu, L. (1998). Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of *Fusarium* yellows of celery. *Plant Dis.* 82, 322-328.

Benhamou, N. (1995). Elicitor-induced resistance in tomato plants against fungal pathogens: ultrastructure and cytochemistry of the induced response. *Scan. Microsc.* 9, 861-880.

Benhamou, N. et Picard, K. (1999). La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection* 80, 137-168.

Benhamou, N., Lafontaine, P.J., and Nicole, M. (1994). Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84, 1432-1444.

Benhamou, N., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. (1998). Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204, 153-168.

Berthold, A., and Kreuter, J. (1996). Chitosan microspheres – Improved acid stability and change in physicochemical properties by cross-linking. *Proceedings International Symposium Controlled Released Bioactive Material* 23, 369-370.

Bodmeier, R. and Paeratakul, O. (1989). Spherical agglomerates of water-insoluble drugs. *J. Pharm. Sci.* 78, 964-967.

Bodmeier, R., Oh, K.-H., and Pramart, Y. (1989). Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, 1475-1494.

Bonting, C.F.C., Kortstee, G.J.J., and Zehnder, A.J.B. (1993). Properties of polyphosphatases of *Acinetobacter johnsonii* 210A. *Antonie Leeuwenhoek.* 64, 75-81.

Bormann, C., Baier, D., Hörr, I., Raps, C., Berger, J., Jung, G., and Schwarz, H. (1999). Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. *J. Bacteriol.* 181, 7421-7429.

Broadbent, P., Baker, K.F., and Waterworth, Y. (1971). Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24, 925-944.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (1994). *Biology of microorganisms.* 7<sup>th</sup> Edition. (New Jersey: Prentice Hall).

Bugamelli, F., Raggi, M.A., Orienti, I., and Zecchi, V. (1998). Controlled insulin release from chitosan microparticles. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 331, 133-138.

Carreño-Gomez, B., and Duncan, R. (1997). Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* 148, 231-240.

Cassidy, M.B., Lee, H., and Trevors, J.T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16, 79-101.

Chamberlain, K., and Crawford, D.L. (1999). In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 641-646.

Chandy, T., and Sharma, C.P. (1993a). Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin. *Biomaterials* 14, 939-944.

Chandy, T., and Sharma, C.P. (1993b). Preparation and performance of chitosan encapsulated activated charcoal (ACCB) adsorbents for small molecules. *J. Microencapsulation* 10, 475-486.

Chandy, T., and Sharma, C.P. (1996). Effect of liposome-albumin coatings on ferric ion retention and release from chitosan beads. *Biomaterials* 17, 61-65.

Cheah, L.H., Page, B.B.C., and Sherpherd, R. (1997). Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *New Zealand J. Crop Hortic. Sci.* 25, 89-92.

Chen, R., and Tsaih, M. (1997). Effect of preparation method and characteristics of chitosan on the mechanical and release properties of the prepared capsules. *J. Appl. Polym. Sci.* 66, 161-169.

Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., and Ousley, M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3899-3905.

Cuero, R. G. (1999). Antimicrobial action of exogenous chitosan. In *Chitin and chitinases*. P. Jollès and H.A.A. Muzarelli, eds. (Basel: Birkhäuser Verlag), pp. 315-333.

Denkbaş, E.B., and Odabaşı, M. (2000). Chitosan microspheres and sponges: preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 76, 1637-1643.

Diagne, O. (1998). Optimisation de la solubilisation du chitosane dans un objectif de traitement des eaux potables et usées. Thèse de Maîtrise. Université de Sherbrooke. Sherbrooke.

Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E., and Ryan, C.A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4095-4098.

Domard, A., and Domard, M. (2002). Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications. In *Polymeric Biomaterials*. 2<sup>nd</sup> Edition. Revised and expanded. S., Dumitriu, ed. (New York: Marcel Dekker Inc), pp. 187-212.

Doumbou, C.L., Akimov, V., and Beaulieu, C. (1998). Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4313-4316.

Dulieu, C., Poncelet, D., and Neufeld, R.J. (1999). Encapsulation and immobilization techniques. In *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics*. W.M., Kühtreiber, R.P., Lanza, and W.L. Chick, eds. (Boston: Birkhäuser), pp. 3-17.

Dumitriu, S., and Chornet, E. (1997). Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels. *Biotechnol. Prog.* 13, 539-545.

Dumitriu, S., and Chornet, E. (1998). Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Adv. Drug Del. Rev.* 31, 223-246.

Dumitriu, S., Magny, P., Montané, D., Vidal, P.F., and Chornet, E. (1994). Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: their properties as support for enzyme immobilization. *J. Bioact. Compat. Polym.* 9, 184-209.

Dumitriu, S., Chornet, E., Vidal, P.F., and Moresoli, C. (1995). Polyionic hydrogels as support for immobilization of lipase. *Biotechnol. Tech.* 9, 833-836.

Eckwall, E.C., and Schottel, J.L. (1997). Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *19*, 220-225.

Elçin, Y.M., Dixit, V., and Gitnick, G. (1996). Controlled release of endothelial cell growth factor from chitosan-albumin microspheres for localized angiogenesis: in vitro and in vivo studies. *Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech.* *24*, 257-271.

El Ghaouth, A., Aarul, J., Grenier, J., and Asselin, A. (1992). Effect of chitosan and other polyions on chitin deacetylase in *Rhizopus stolonifer*. *Exp. Mycol.* *16*, 173-177.

El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Aasselin, A., and Bélanger, R. (1994). Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology* *84*, 313-320.

El-Tarabily, K.A., St. J. Hardy, G.E., Sivasithamparam, K., HUSSEIN, A.M. and, Ipek Kurtböke, D. (1997). The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol.* *137*, 495-507.

Garland, J.L. (1996). Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol. Biochem.* *28*, 213-221.

Garland, J.L. (1997). Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* *24*, 289-300.

Garland, J.L., and Mills, A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Env. Microbiology* *57*, 2351-2359.

Genta, I., Perugini, P., and Pavanetto, F. (1998). Different Molecular Weight Chitosan Microspheres: Influence on Drug Loading and Drug Release. *Drug Dev. Ind. Pharm.* *24*, 779-784.

Groboillot, A.F., Champagne, C.P., Darling, G.D., Poncelet, D., and Neufeld, R.J. (1993). Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of Chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.* *42*, 1157-1163.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., and Dinooor, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* *92*, 976-985.

Hadwiger, L. A., Ogawa, T., and Kuyama, H. (1994). Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol. Plant Microbe Interact.* *7*, 531-533.

Hammad, A.M.M., and El-Mohandes, A.O. (1999). Controlling Fusarium wilt disease of cucumber plants via antagonistic microorganisms in free and immobilized states. *Microbiol. Res.* *154*, 113-117.

Hartmeier, W. (1988). Immobilized biocatalysts. An Introduction. (Berlin: Springer-Verlag).

Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* *71*, 235-244.

Huguet, M.L., and E. Dellacherie. (1996). Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochem.* *31*, 745-751.

Huguet, M.L., Neufeld, R.J., and E. Dellacherie. (1996). Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE-dextran. *Process Biochem.* *31*, 347-353.

Jeon, Y.-J., and Kim, S.-K. (2000). Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* *41*, 133-141.

Jeon, Y.-J., and Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by a bioreactor. *Carbohydr. Polym.* 44, 71-76.

Kaş, H.S. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsulation* 14, 689-711.

Kawamura, Y., Yoshida, H., Asai, S., Kurahashi, I., and Tanibe, H. (1997). Effects of chitosan concentration and precipitation bath concentrations on the material properties of porous crosslinked chitosan beads. *Sep. Sci. Technol.* 32, 1959-1974.

Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S.Y., and Ando, Y. (1985). Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate – chitosan. *J. Pharm. Sci.* 74, 264-268.

Kendra, D.F., and Hadwiger, L.A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8, 276-281.

Kim, K.D., Nemeč, S., and Musson, G. (1997). Effects of composts and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper. *Crop Protect.* 16, 165-172.

Kolomiets, E.I., Zdor, N.A., Romanovskaya, T.V., and Lobanok, A.G. (1997). Certain aspects of the phytoprotective activity of *Streptomyces flavescens*, an antagonist of phytopathogenic fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* 33, 451-454.

Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphates: a molecule of many functions. In *Inorganic Polyphosphates. Biochemistry. Biology. Biotechnology.* H.C. Schröder and W.E.G. Müller, eds. (Berlin: Springer), pp. 1-18.

Kortemaa, H., Rita, H., Haahtela, K., and Smolander, A. (1994). Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil* 163, 77-83.

Kortemaa, H., Pennanen, T., Smolander, A., and Haahtela, K. (1997). Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and non-rhizosphere sand. *J. Phytopathol.* 145, 137-143.

Kulaev, I.S., Kulakovskaya, T.V., Andreeva, N.A., and Lichko, L.P. (1999). Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. In *Inorganic polyphosphates. Biochemistry. Biology. Biotechnology.* H.C. Schröder and W.E.G. Müller, eds. (Berlin: Springer), pp. 27-43.

Laflamme, P., Benhamou, N., Bussi eres, G., and Dessureault, M. (1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot.* 77, 1460-1468.

Laflamme, P., and Benhamou, N. (1996). Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol Sci. Technol.* 6, 111-124.

Lahdenper a, M.-L., Simon, V, and Uoti, J. (1991). Mycostop – a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. In *Biotic interactions and soil-borne diseases. Proceedings of the 1st Conference of the European foundation for plant pathology.* A.B.R. Beemster, G.J. Bollen, M. Gerlach, M.A. Ruissen, B. Schippers, and R.A. Tempel, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 258-263.

Lafontaine, P.J., and Benhamou, N. (1996). Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol Sci. Technol.* 6, 111-124.

Li, T., Brzezinski, R., and Beaulieu, C. (1995). Enzymatic production of chitosan oligomers. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 599-603.

Lim, L.Y., and WAN, L.S.C. (1998). Effect of magnesium stearate on chitosan microspheres prepared by an emulsification-coacervation technique. *J. Microencapsulation* 15, 319-333.

Lim, L.Y., Wan, L.S.C., and Thai, P.Y. (1997). Chitosan Microspheres Prepared by Emulsification and Ionotropic Gelation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23, 981-985.

Liu, D., Anderson, N.A., and Kinkel, L.L. (1995). Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 85, 827-831.

Liu, D., Anderson, N.A., and Kinkel, L.L. (1996). Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Can. J. Microbiol.* 42, 487-502.

Meena, B., Radhajeyalakshmi, R., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P. and Doraiswamy, S. (2000). Induction of pathogenesis-related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia-lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 107, 514-527.

Mi, F.-L., Wong, T.-B., and Shyu, S.-S. (1997). Sustained-release of oxytetracycline from chitosan microspheres prepared by interfacial acylation and spray hardening methods. *J. Microencapsulation.* 14, 577-591.

Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Chen, C.-T., and Schoung, J.-Y. (1999a). Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. *Biomaterials* 20, 1603-1612.

Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Wong, T.-B., Jang, S.-F., Lee, S.-T., and Lu, K.-T. (1999b). Chitosan-Polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anti-cancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *J. Appl. Polym. Sci.* 74, 1093-1107.

Nishimura, K., Nishimura, S.-I., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I. (1986). Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J. Biomed. Mater. Res.* 20, 1359-1372.

No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., and Myers, S.P. (2002a). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 65-72.

No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., and Myers, S.P. (2002b). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. *J. Food Sci.* 67, 1511-1514.

Ohya, Y., Shiratani, M., Kobayashi, H. and Ouchi, T. (1994). Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity. *J.M.S.—Pure Appl. Chem.* *431*, 629-642.

Pandya, Y., and Knorr, D. (1991). Diffusion characteristics and properties of chitosan coacervate capsules. *Process Biochem.* *26*, 75-81.

Patashnik, S., Rabinovitch, L., and Golomb, G. (1997). Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing bisphosphonates. *J. Drug Target.* *4*, 371-380.

Pelmont, J. (1993). *Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques.* (Grenoble: Presses universitaires de Grenoble).

Polk, A., Amsden, B., Yao, K.-D., Peng, T., and Goosen, M.F.A. (1994). Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J. Pharm. Sci.* *83*, 178-185.

Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J., and Vorlop, K.-D. (1998a). The jet cutting method as a new immobilization technique. *Biotechnology Techniques* *12*, 105-108.

Prüße, U., Bruske, F., Breford, J., and Vorlop, K.-D. (1998b). Improvement of the jet cutting method for the preparation of spherical particles from viscous polymer solutions. *Chem Eng Technol.* *21*, 153-157.

Prüße, U., Dalluhn, J., Breford, J., and Vorlop, K.-D. (2000). Production of spherical beads by jet cutting. *Chem Eng Technol.* *23*, 1105-1110.

Reddy, M.V., Bhaskara, J., Arul, E., Ait-Barka, P., Angers, C., Richard, A., and Castaigne, F. (1998). Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Sci. Technol.* *8*, 33-43.

Reddy, M.V., Bhaskara, J., Arul, E., Angers, C., and Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem.* *47*, 1208-1216.

Rinaudo, M., Pavlov, G., and Desbrières, J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* 40, 7029-7032.

Rothock, C.S., and Gottlieb, D. (1984). Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30, 1440-1447.

Roy, S., Leclerc, P., Auger, F., Soucy, G., Moresoli, C., Côté, L., Potvin, D., Beaulieu, C., and Brzezinski, R. (1997). A novel two-phase composting process using shrimp shells as an amendment to partly composted biomass. *Compost Sci. Util.* 5, 52-64.

Sanglier, J.J., Haag, H., Huck, T.A., and Fehr, T. (1993). Novel biactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* 144, 633-642.

Sezer, A. D., and Akbuğa, J. (1995). Controlled release of piroxicam from chitosan beads. *Int. J. Pharm.* 121, 113-116.

Shinonaga, M.-A., Kawamura, Y., and Yamane, T. (1992). Immobilization of yeast cells with cross-linked chitosan beads. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 90-94.

Shiraishi, S., Imai, T., and Otagiri, M. (1993). Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vitro/in vivo evaluation. *J. Control. Release* 25, 217-225.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., and Chung, Y.R. (1999). Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89, 92-99.

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75, 687-706.

Stolberg, J., Laranjeira, M.C.M., Sanchez, M.N.M., Klug, M., and Fávère, V.T. (1999). Microspheres of chitosan/poly(vinylalcohol) incorporating tetrasulphonated copper (II) phthalocyanine: preparation and characterization. *J. Microencapsulation* 16, 431-438.

Stössel, P., and LEUBA, J.L. (1984). Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. *Phytopath. Z.* *111*, 82-90.

Stratmann, J.W., and Ryan, C.A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 11085-11089.

Stratmann, J.W., Scheer, J., and Ryan, C.A. (2000). Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a  $\beta$ -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 8862-8867.

Sutherland, E.D., and Papavizas, G.C. (1991). Evaluation of oospores hyperparasites for the control of *Phytophthora* crown rot of pepper. *J. Phytopathol.* *131*, 33-39.

Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. (2001). Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors. *Mol. Plant Microbe Interact.* *14*, 477-486.

Tay, L.-F., Khoh, L.-K., Loh, C.-S., and Knorr, E. (1993). Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. *Biotechnol. Bioeng.* *42*, 449-454.

Terbojevich, M., and Cosani, A. (1997). Molecular weight determination of chitin and chitosan. In *Chitin Handbook*, R.A.A. Muzzarelli and M.G. Peter, eds. (Grottammare: Atec,) pp.87-101.

Thilo, E. (1962). Condensed phosphates and arsenates. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* *4*, 1-75.

Toussaint, V., Valois, D., Dodier, M., Faucher, E., Déry, C., Brzezinski, R., Ruest, L., and Beaulieu, C. (1997). Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Phytoprotection* *78*, 43-51.

Trejo-Estrada, S.R., Rivas Sepulveda, I., and Crawford, D.L. (1998). *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 865-872.

Tsai, M.L., and Chen, R.H. (1997). Effect of molecular weight and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* *20*, 233-240.

Tsai, G.J., and Su, W.H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* *62*, 239-243.

Tsai, G.J., Wu, Z.Y., and Su, W.H. (2000). Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J. Food Protect.* *63*, 747-752.

Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R., and Beaulieu, C. (1996). Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 1630-1635.

Vander, P., Vårum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E., and Moerschbacher, B.M. (1998). Comparison of the ability of partially N-Acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.* *118*, 1353-1359.

Vorlop, K.-D., and Klein, J. (1981). Formation of spherical chitosan biocatalysts by ionotropic gelation. *Biotechnol. Lett.* *3*, 9-14.

Vorlop, K.-D., and Klein, J. (1987). Entrapment of microbial cells in chitosan. In: *Methods Enzymol.* *135*, 259-268.

Vruggink, H. (1979). The effect of chitin amendment on actinomycetes in soil and on the infection of potato tubers by *Streptomyces scabies*. *Neth. J. Plant Pathol.* *76*, 293-295.

Weller, D.M. (1988). Biological control of soilborne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* *26*, 379-407.

Xie, W., XU, P., Wang, W., and Liu, Q. (2002). Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydr. Polym.* 50, 35-40.

Yao, K.-D., Peng, T., Yin, Y.-J., and Xu, M.-X. (1995). Microcapsules / Microspheres related to chitosan. *J.M.S. -Rev. Macromol. Chem. Phys.* C35, 155-180.

Yin, S.Y., Chang, J.K., and Xun, P.C. (1965). Studies in the mechanisms of antagonistic fertilizer "5406". IV. The distribution of the antagonist in soil and its influence on the rhizosphere. *Acta Microbiol. Sin.* 11, 259-288.

Yuan, W.M., and Crawford, D.L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3119-3128.

Zielinski, B.A., and Aebischer, P. (1994). Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials* 15, 1049-1056.