

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 06.01.15.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 08.07.16 Bulletin 16/27.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : MYCAGRO LAB Société à responsa-
bilité limitée — FR.

72 Inventeur(s) : HAIMET MARIE-LINE.

73 Titulaire(s) : MYCAGRO LAB Société à responsabilité
limitée.

74 Mandataire(s) : CABINET CHAILLOT.

54 PROCÉDE DE FABRICATION D'INOCULUMS DE MICROORGANISMES D'INTERET AGRONOMIQUE,
INOCULUMS OBTENUS ET LEUR UTILISATION.

57 La présente invention concerne un procédé de fabri-
cation d'un inoculum (I) d'au moins un microorganisme d'in-
térêt agronomique (M) choisi parmi les champignons et les
bactéries, caractérisé par le fait que l'on cultive sur un sup-
port de culture au moins une plante hôte (P) du ou des mi-
croorganismes (M), ledit support comprenant des grains
d'un gel hydrorétenteur à l'état hydraté, une inoculation
dans ledit support de culture d'au moins un inoculum starter
(Is) du ou des microorganismes (M) étant conduite avant,
pendant ou après la mise en place de la ou des plantes (P)
dans ledit support de culture, ladite culture étant menée jus-
qu'à ce qu'au moins une partie desdits grains de gel hydro-
rétenteur ait été pénétrée et colonisée par ledit ou lesdits
microorganismes (M), les grains de gel ainsi obtenus consti-
tuant l'inoculum (I) recherché.



PROCEDE DE FABRICATION D'INOCULUMS DE MICROORGANISMES
D'INTERET AGRONOMIQUE, INOCULUMS OBTENUS ET LEUR
UTILISATION

5

La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un inoculum d'au moins un microorganisme d'intérêt agronomique, l'inoculum obtenu et son utilisation.

10

Il est connu d'inoculer des plantes terrestres avec des microorganismes, notamment des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (VAM), de la famille des *Glomeraceae*, en particulier des genres *Funneliformis* et *Rhizophagus*, en vue d'améliorer la nutrition minérale, la croissance et la résistance aux stress de ces plantes.

15

Actuellement les inoculums de VAM disponibles sur le marché sont formulés sur des supports minéraux essentiellement sous forme de granulés ou de poudre.

20

L'étude de l'état antérieur de la technique montre l'existence de procédés d'inclusion de microorganismes dans des matrices (brevets FR 2386504, FR 2501229A1, EP 0017565 A2). Ces procédés impliquent notamment la polymérisation d'un monomère hydrophile tel que l'acrylamide en présence d'un agent de réticulation, la polymérisation étant conduite dans un milieu comportant la souche de microorganisme. Ainsi, la souche de microorganisme est soumise aux conditions de polymérisation et peut subir une dégradation.

25

30

La présente invention vise à proposer un procédé dans lequel les microorganismes sont inclus dans une matrice déjà polymérisée et ne sont pas dégradés par le procédé.

Par ailleurs, les gels rétenteurs d'eau sont déjà très largement utilisés en agriculture, en production végétale partout dans le monde et plus particulièrement dans les zones géographiques sèches.

5 La présente invention a pour but de permettre, en un seul apport, d'amender un support de culture avec un gel rétenteur d'eau et d'inoculer les plantes avec des microorganismes d'intérêt agronomique tels que les champignons endomycorhiziens, pour obtenir les avantages
10 suivants :

- augmenter la capacité de rétention en eau du support de culture grâce aux propriétés physiques du gel afin de limiter les stress hydriques ;
- bénéficier des avantages de la symbiose mycorhizienne,
15 à savoir l'augmentation de la nutrition minérale, l'augmentation de la croissance végétale, la résistance accrue aux stress biotiques (pathogènes) et abiotiques (stress hydrique, salinité) ; et
- apporter des composés d'intérêt grâce à la capacité
20 des gels à absorber puis relarguer ces composés.

A cet effet, la Société déposante a mis au point un procédé assurant une multiplication des microorganismes directement dans la matrice de gel sans faire appel à un procédé chimique.

25 Il est apparu qu'un gel rétenteur pouvait être un support de culture compatible avec le développement en son sein de microorganismes tels que des champignons ou bactéries et le maintien de la viabilité de ces microorganismes (propagules fongiques produites, bactéries
30 produites).

Compte tenu du fait que les champignons endomycorhiziens sont des symbiotes obligatoires, une première difficulté est de cultiver en même temps sur le

gel rétenteur d'eau une plante hôte et les champignons mycorhiziens. Le matériel végétal pouvant être une plante entière, des racines transformées (brevet FR-A-2528865) ou des cals rhizogènes (brevet WO 2005000008 A2).

5 En vue de la commercialisation du nouvel inoculum, une seconde difficulté est de conserver sur une durée suffisamment longue les propagules fongiques viables et infectieuses et ceci dans des conditions de conservation non drastiques ne faisant pas intervenir d'appareillage
10 particulier. Ce stockage nécessite une phase de séchage préalable conduit à basse température sachant que les champignons endomycorhiziens sont thermosensibles.

 Il faut également s'assurer que le mycélium émis par les propagules enclavées dans les grains de gel est
15 capable de s'extérioriser des grains pour infecter les racines d'une plante hôte et inversement que les racines de la plante hôte puissent pénétrer les grains de gel pour aller au plus près des propagules fongiques.

 Enfin, dans l'idée d'apporter des molécules
20 d'intérêt dans le milieu de culture, il fallait contrôler la compatibilité des composés avec le bon développement et la viabilité des microorganismes ainsi que la capacité du gel à larguer par osmose, dans le milieu environnant, les molécules stockées.

25 La réversibilité des phases d'hydratation et de dessiccation du gel rétenteur est également un critère important pour le procédé.

 La présente invention répond à toutes ces attentes.

30 La présente invention a donc d'abord pour objet un procédé de fabrication d'un inoculum (I) d'au moins un microorganisme d'intérêt agronomique (M) choisi parmi les champignons et les bactéries, caractérisé par le fait que

l'on cultive sur un support de culture au moins une plante hôte (P) du ou des microorganismes (M), ledit support comprenant des grains d'un gel hydrorétenteur à l'état hydraté, une inoculation dans ledit support de culture d'au moins un inoculum starter (Is) du ou des microorganismes (M) étant conduite avant, pendant ou après la mise en place de la ou des plantes (P) dans ledit support de culture, ladite culture étant menée jusqu'à ce qu'au moins une partie desdits grains de gel hydrorétenteur ait été pénétrée et colonisée par ledit ou lesdits microorganismes (M), les grains de gel ainsi obtenus constituant l'inoculum (I) recherché.

On entend par « microorganisme d'intérêt agronomique » tout microorganisme de type bactérie ou champignon ayant un effet sur la nutrition, la croissance, la résistance à des stress biotiques ou abiotiques, la production, la mise à fruit, la mise à fleur, la précocité des plantes ainsi que sur la dépollution de sol.

On utilise avantageusement des grains d'un gel hydrorétenteur présentant une capacité à retenir l'eau pouvant aller jusqu'à 400 fois son poids initial.

En particulier, on utilise avantageusement des grains d'un gel hydrorétenteur d'origine naturelle ou synthétique choisi parmi les gels polymères d'acrylamide, les gels copolymères d'acrylamide et d'acrylate de sodium ou de potassium, les gommes naturelles ou biosynthétiques à base d'algues telles que les alginates, les carraghénanes et l'agar, les exsudats de plantes tels que la gomme de karaya, la gomme adragante et la gomme arabique, et les exsudats de graines tels que la gomme de guar et la gomme de caroube.

On utilise notamment un ou des microorganismes (M) choisis parmi les champignons, tels que les champignons

mycorhiziens, comme les champignons endomycorhiziens à vésicules ou arbuscules (VAM), de préférence de la famille des *Glomeraceae*, en particulier des genres *Funneliformis* tel que *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus* tel que
 5 *Rhizophagus intraradices*, *Septoglomus*, *Claroideoglomus* et *Glomus*, et les bactéries, telles que les bactéries du genre *Rhizobium*, telle que *Rhizobium leguminosarum*.

Par ailleurs, on utilise avantageusement un support de culture constitué par les grains de gel
 10 hydrorétenteur ou par les grains de gel hydrorétenteur avec une matière minérale chimiquement inerte adaptée à l'établissement de la symbiose entre la ou les plantes hôtes (P) et le ou les microorganismes (M).

Comme matière minérale, on utilise
 15 avantageusement de l'argile ou de la zéolithe.

Egalement, on peut ajouter au support de culture au moins un amendement organique tel que la corne de bovin.

On utilise notamment au moins un inoculum starter (Is) choisi parmi :

- 20 - les inoculums fongiques solides constitués par des grains ou une poudre de matière minérale renfermant des propagules fongiques, viables ;
- les inoculums fongiques liquides constitués par des propagules fongiques, viables en suspension dans l'eau
 25 ;
- les inoculums bactériens liquides constitués par des bactéries viables en suspension dans l'eau ; et
- les inoculums fongiques et/ou bactériens (I).

Selon l'invention, on peut utiliser un inoculum
 30 starter solide, en grains ou pulvérulent, auquel cas l'inoculation est avantageusement conduite avant la mise en place de la ou des plantes hôtes (P) et/ou utiliser un inoculum liquide, auquel cas l'inoculation est

avantageusement conduite après la mise en place de la ou des plantes (P).

On utilise avantageusement, comme plante hôte (P), une plante ligneuse ou herbacée, en particulier le
5 sorgho ou le pois, laquelle est mise en place sous forme de semence.

Conformément à un mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention, on apporte au moins un agent fertilisant au milieu de culture pendant la culture, ledit
10 agent fertilisant étant choisi notamment parmi les engrais solubles (NPK), les acides humiques, les chélates de fer et les acides aminés.

Cet apport est avantageusement réalisé par arrosage, pendant la culture, avec une solution aqueuse
15 d'agent(s) fertilisant(s).

Selon l'invention, à la fin de la culture, on sèche les grains de gel, de préférence à l'obscurité, puis on les tamise pour séparer la ou les matières minérales chimiquement inertes si celles-ci ont été utilisées, en
20 particulier celles qui servaient de support de propagules dans le cas d'inoculum starters fongiques solides, et, le cas échéant, on sectionne les systèmes racinaires pour individualiser les grains de gel constituant l'inoculum (I).

La présente invention a également pour objet un
25 inoculum (I) d'au moins un microorganisme (M) d'intérêt agronomique choisi parmi les champignons et les bactéries, caractérisé par le fait qu'il comprend un gel hydrorétenteur sous forme de grains inoculés avec le ou les
30 microorganismes (M) à l'état vivant, le ou les microorganismes fongiques étant présents au sein des grains de gel sous la forme de propagules telles que le mycélium, les spores ou des fragments de racines de plante hôte

colonisées, et le ou les microorganismes bactériens étant présents sous forme de bactéries isolées libres ou concentrées dans des racines ou fragments de racines de plante hôte colonisées.

5 Selon l'invention, le mycélium fongique, lorsqu'il est présent, peut avantageusement former un réseau dans au moins une partie des grains de gel. Il sera alors possible de différencier par ce réseau les grains de gel selon l'invention vis-à-vis des grains de gel selon les documents-brevets cités ci-dessus dans lequel le mycélium
10 fongique, s'il est présent, l'est exclusivement sous forme de fragments sans aucune liaison entre eux.

De même, selon l'invention, les spores néoformées dans les grains de gel sont toujours liées au mycélium
15 fongique. Il sera alors possible de différencier les grains de gel selon l'invention vis-à-vis des grains de gel selon les documents-brevets cités ci-dessus dans lesquels les spores, si elles sont présentes, le sont exclusivement sous forme individualisée sans aucune liaison entre elles ni
20 avec le mycélium fongique.

Par ailleurs, la surface d'au moins une partie des grains de gel peut être traversée par le mycélium du ou des champignons et/ou par au moins un fragment de racine de plante.

25 Le gel hydrorétenteur se présente avantageusement à l'état déshydraté, les grains de gel hydrorétenteur ayant notamment une dimension de 2 à 4 mm à l'état déshydraté.

Le gel hydrorétenteur est notamment un gel présentant une capacité à retenir l'eau pouvant aller
30 jusqu'à 300 fois, voire jusqu'à 400 fois son poids initial.

Le gel est avantageusement choisi parmi les gels d'origine naturelle ou d'origine synthétique dont des exemples sont indiqués ci-dessus.

Comme indiqué ci-dessus, le ou les microorganismes (M) d'intérêt agronomique sont notamment choisis parmi les champignons, tels que les champignons mycorhiziens, comme les champignons endomycorhiziens à vésicules ou arbuscules (VAM), de préférence de la famille des *Glomeraceae*, en particulier des genres *Funneliformis* tel que *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus* tel que *Rhizophagus intraradices*, *Septoglomus*, *Claroideoglomus* et *Glomus*, et les bactéries, telles que les bactéries du genre *Rhizobium*, telle que *Rhizobium leguminosarum*.

Conformément à un mode de réalisation particulier de l'inoculum selon l'invention, celui-ci renferme en outre au moins un agent fertilisant choisi notamment parmi les engrais solubles (NPK), les acides humiques, les chélates de fer et les acides aminés. Le ou les agents fertilisants seront relargués dans le milieu végétal ayant reçu le ou les inoculums (I).

La teneur en eau résiduelle dans les grains de gel hydrorétenteur secs peut être comprise entre 5 et 15 % en masse, de préférence 10% en masse.

La présente invention concerne également un inoculum tel que défini ci-dessus, le cas échéant en mélange avec des grains de gel hydrorétenteur non colonisés par un microorganisme, qui est conditionné en sac de papier kraft ou en sac plastique.

La présente invention a enfin pour objet l'utilisation d'un inoculum tel que défini ci-dessus ou préparé par le procédé tel que défini ci-dessus, pour inoculer des plantes avec des microorganismes d'intérêt agronomique tout en amendant le cas échéant leur support de culture, ledit inoculum étant apporté en application localisée aux trous de plantation, en mélange aux supports de culture ou par pralinage, pour des cultures conduites en

pleine terre ou en conteneurs, en plein champ, sous serre ou tunnel, l'inoculum tel que défini ci-dessus ou préparé par le procédé tel que défini ci-dessus pouvant être utilisé comme inoculum starter pour multiplier les
5 microorganismes d'intérêt agricole.

On peut rappeler ici la possibilité de co-coloniser les gels rétenteurs par :

- des champignons endomycorhiziens pouvant être de genres différents ;
- 10 - des microorganismes différents (champignon endomycorhizien - bactéries par exemple du genre *Rhizobium*).

Le procédé peut donc être utilisé pour des applications agronomiques faisant appel à des bactéries ou
15 des champignons ayant pour objectif l'enrichissement du sol en microorganismes d'intérêt afin de favoriser :

- la flore antagoniste aux pathogènes telluriques ;
- la détoxification des sols ;
- l'oxydation ou la réduction du fer, soufre, etc. ;
- 20 - la fixation d'azote atmosphérique ;
- la minéralisation de l'azote ;
- l'hydrolyse de la cellulose ;
- la solubilisation des phosphates, etc.

25 Les Exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois en limiter la portée. Dans ces exemples, on a utilisé le matériel suivant :

Conteneurs de culture

30

Pot 1 : pot carré en matière plastique noire
(hauteur=20cm, longueur=10cm, largeur=10cm)

Pot 2 : pot carré en matière plastique noire
(hauteur=8cm, longueur=7cm x largeur=7cm) de
400 mL

5 Des plaques alvéolées à 51 alvéoles de 50 mL
chacune, appelée ci-après « Plaques » sont également
utilisées comme conteneurs de culture.

Gel hydrorétenteur : copolymère d'acrylamide et d'acrylate
10 de potassium, de granulométrie 2-
4 mm, commercialisé par la Société
« Horticultural Alliance » sous la
marque « Horta-Sorb®LG », appelé ci-
après « Gel »

15

Plante hôte :

Plante 1 : Sorghum bicolor - variété Friggo, désigné ci-
après « Sorgho »

20

Plante 2 : Pois variété Kayanne, désigné ci-après « Pois »

5 Inoculums starters de champignons endomycorhiziens :

25 Inoculum starter 1 : Inoculum solide de *Funneliformis*
mosseae, formé de grains d'argile d'une granulométrie
inférieure à 3 mm, comportant 40 propagules fongiques
viables et infectieuses par gamme.

On qualifie ici et dans tout le texte
30 d'« infectieuses » des propagules fongiques capables de
coloniser les racines d'une plante pour former la symbiose.

On entend ici et dans tout le texte par
« propagules fongiques », tout organe de dissémination de

l'espèce. Dans le cas des champignons mycorhiziens, il peut s'agir de spores, de mycélium ou de fragments de racines mycorhizées.

- 5 Inoculum starter 2 : Inoculum solide de *Rhizophagus intraradices*, formé de grains d'argile d'une granulométrie inférieure à 3 mm, comportant 40 propagules fongiques viables et infectieuses par gamme.
- 10 Inoculum starter 3 : Inoculum solide de champignons du genre *Glomus*, formé de grains d'argile d'une granulométrie comprise entre 3 et 5 mm, comportant 40 propagules fongiques viables et infectieuses par gamme ; cet inoculum est commercialisé sous la marque Solrize® par la Société
- 15 française « Agrauxine ».

Inoculum starter 4 : Inoculum liquide constitué par des propagules fongiques en suspension dans de l'eau et préparé comme suit :

- 20 Les propagules de 75g d'Inoculum starter 3 sont extraites par voie humide et filtrées sur un tamis de 42µm d'ouverture de maille. Le refus de tamis est repris dans un volume final de 40 ml d'eau osmosée.
- 25 Inoculum starter 5 : Inoculum pulvérulent formé d'une poudre d'argile d'une granulométrie inférieure à 250µm, comportant, par gramme, 500 spores des genres fongiques suivantes, en mélange : *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices*, *Septoglomus deserticola*, *Claroideoglomus*
- 30 *claroïdeum*, *Claroideoglomus etunicatum*, *Glomus microaggregatum* ; cet inoculum est commercialisé sous la marque « ENDOM-M » par la Société espagnole « Bioéra ».

Arrosage :

- eau osmosée
- solution aqueuse fertilisante à 1,5 g/L d'engrais soluble 15/3/25, désignée ci-après « Solution fertilisante »
- solution aqueuse à 0,03 g/L d'acides humiques, commercialisée par la Société « Amagro » sous la dénomination « Lignohumate AM Potassium », appelée ci-après « Solution d'acides humiques » ;
- solution aqueuse à 1 g/L de chélates de fer Fe-EDDHA, commercialisée par la Société « TradeCorp » sous la dénomination « Ultraferro », appelée ci-après « Solution de chélate de fer » ;
- solution aqueuse à 4 ml/L d'acides aminés commercialisée par la Société « TradeCorp » sous la dénomination « Ruter AA », appelée ci-après « Solution d'acides aminés ».

20 Supports de culture utilisés dans les Exemples

- Argile : argile consistant en la matière support des propagules fongiques des inoculums starters solides
- Zéolithe : zéolithe stérile à 20% d'humidité et d'une granulométrie inférieure à 3 mm.

25

Amendement organique utilisé dans les Exemples

- Corne de bovin

30

Légende des Figures

- les Figures 1 et 2 illustrent la grande capacité de rétention en eau du gel utilisé dans les exemples selon l'invention (cf Exemple 1) ;
- la Figure 3 illustre la diffusion vers l'extérieur d'un composé stocké dans les grains de gel rétenteur d'eau (cf Observations II-2) ;
- les Figures 4 à 14 illustrent la présence de champignons dans les grains de gel et les racines de plantes (cf Observations II-6) ;
- les Figures 15 et 16 illustrent la présence de la bactérie *Rhizobium* dans les nodosités de racines de pois et les grains de gel (cf Observations II-7) ;
- la Figure 17 illustre la présence du champignon et de la bactérie dans les racines de pois et les grains de gel (cf Observations II-8).

I. PRESENTATION DES EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Préparation et stockage d'un inoculum (I) de *Funneliformis mosseae*

1 - MISE EN CULTURE

1a - Hydratation du Gel

Dans un récipient en matière plastique propre, 440 g de Gel hydrorétenteur sec sont versés en pluie dans

20 L d'eau osmosée tempérée. Un brassage manuel est effectué à plusieurs reprises au cours de l'hydratation pour homogénéiser les grains de Gel. L'opération dure environ 2 h jusqu'à absorption complète de l'eau. La taille
5 moyenne des grains hydratés est de 2 cm.

Le Gel hydrorétenteur Horta-Sorb®LG est retenu d'une part, pour sa forte capacité de rétention en eau et, d'autre part, pour la taille des grains de gel hydraté.

La grande capacité de rétention en eau du Gel est
10 illustrée par les Figures 1 et 2 montrant, dans des boîtes de Petri d'un diamètre de 9 cm, respectivement un nombre de grains de Gel Horta-Sorb®LG sec et ce même nombre de grains après 2 h d'hydratation.

15 1b - Inoculation du Gel avec l'Inoculum starter

L'Inoculum starter 1 est incorporé uniformément dans le Gel hydraté par brassage manuel, à raison de 1 à 10% (v/v) d'Inoculum starter 1 dans le Gel hydraté, soit un maximum de 200 mL (150g) d'Inoculum starter 1 pour 1800 mL
20 (1450g) de Gel hydraté pour un équivalent de 3 propagules fongiques/mL de Gel hydraté.

 1c - Germination des semences

25 Les semences de Sorgho sont hydratées une nuit à 20°C dans de l'eau osmosée. Les graines sont égouttées et mises à germer 24h, à 25°C à l'obscurité entre deux feuilles de papier absorbant, légèrement humidifié avec de l'eau osmosée.

30

 1d - Mise en culture

Une grille en matière plastique (maille < 5mm) est déposée au fond de chaque Pot 1 pour éviter

l'écoulement du Gel par les trous de drainage. Les Pots 1 sont remplis jusqu'à 1 cm du bord supérieur avec le Gel hydraté inoculé, soit environ 1,5 l de Gel hydraté inoculé/Pot 1.

- 5 Quatre semences germées de Sorgho sont repiquées à 2 cm de profondeur uniformément sur toute la surface du pot.

2 - CULTURE DES PLANTES

10

Les plants de Sorgho sont cultivés en serre pendant 4 mois avec 16 heures de lumière/jour, et à une température moyenne de 22°C.

- 15 Les cultures sont arrosées tous les deux jours avec de l'eau osmosée (100mL/Pot 1) jusqu'à la troisième semaine de culture.

A partir de la troisième semaine, tous les arrosages sont effectués avec la Solution fertilisante à raison de 100mL/pot 1, deux fois par semaine.

20

3 - CONTROLE DE QUALITE EN FIN DE PRODUCTION

- 25 Les prélèvements de Gel + racines sont réalisés sur toute la hauteur des Pots 1.

- 30 Les échantillons sont traités suivant la méthode décrite par Philips, J.M. et Hayman D.S., 1970, « Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection » (Modes opératoires améliorés pour éclaircir les racines et colorer les champignons parasitaires et les champignons mycorrhiziens et à vésicules et arbuscules pour

une évaluation rapide de l'infection), Trans. Br. Mycol. Soc. 55 : 158.161.

Les grains de Gel traités sont observés sous loupe binoculaire au grossissement x 20. Les grains de Gel
5 sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, sporocarpes).

4 - SECHAGE

10 Les grains de Gel sont étalés sur des plateaux en matière plastique sur une épaisseur de 2 cm. Les grosses racines sont éliminées manuellement. Les plateaux sont placés à l'obscurité entre 20 et 25°C pendant 10 à 15 jours afin d'obtenir une humidité finale des grains de Gel
15 voisine de 10% (W /W). En cours de séchage, un brassage manuel quotidien des grains est effectué pour homogénéiser la phase de déshydratation des grains de gel. En fin de séchage, les grains de Gel sont criblés sur un tamis de 3 mm d'ouverture de maille de façon à éliminer le maximum de
20 grains d'argile correspondant à l'Inoculum starter 1 et à obtenir un produit fini de granulométrie homogène.

5 - STOCKAGE

25 Les grains de Gel secs sont stockés dans des sacs en papier kraft brun, épaisseur 100g/m², à l'obscurité et à des températures comprises entre 10°C et 20°C (température moyenne : 15-18°C).

30

EXEMPLE 2 : Préparation et stockage d'un inoculum de *Rhizophagus intraradices*

Le mode opératoire est identique à l'Exemple 1, excepté pour l'étape 1b où l'inoculum starter utilisé est l'Inoculum starter 2. Comme à l'Exemple 1, la dose d'inoculation est égale à 3 propagules viables et infectieuses/mL de Gel hydraté.

Le contrôle qualité en fin de production montre que les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, spores).

10 **EXEMPLES 3₁ à 5₁**

Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans l'Exemple 1, excepté qu'à partir de la troisième semaine de culture, les arrosages sont effectués avec les Solutions d'acides humiques (Exemples 3₁), de chélates de fer (Exemples 4₁) et d'acides aminés (Exemples 5₁) à raison de 100mL/Pot 1 deux fois par semaine.

Le contrôle qualité en fin de production montre que les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, sporocarpes).

EXEMPLES 1bis, 3bis, 4bis et 5 bis

Les modes opératoires sont identiques à ceux utilisés dans les Exemples respectivement 1, 3₁ à 5₁, excepté que le stockage des grains de gel secs est effectué dans des sacs en matière plastique munis d'une fermeture à glissière (réf. : Rajagrip Eco - 50 microns). Le stockage est réalisé comme décrit précédemment à l'obscurité et à des températures comprises entre 10°C et 20°C (température moyenne : 15-18°C).

EXEMPLE 6

Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans l'Exemple 1, excepté qu'à l'étape 1a, de la corne de
 5 bovin broyée à raison de 0,2% v/v est apportée au Gel.

Le contrôle qualité en fin de production montre que les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, sporocarpes).

10 **EXEMPLE 7 : Préparation et stockage d'un inoculum de *Glomus Sp* (inoculum starter solide)**

Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans l'Exemple 1 excepté que :

- 15 - l'Inoculum starter 3 est incorporé à raison de 75 g dans 540 mL de Gel hydraté, soit 5 propagules viables et infectieuses/mL de Gel hydraté ;
- pour la MISE EN CULTURE, dix alvéoles d'une Plaque sont remplies chacune avec 50 mL de Gel hydraté inoculé. Deux
 20 semences germées de Shorgo sont repiquées par alvéole ;
 et
- pour la CULTURE DES PLANTES, les plantes sont cultivées en serre pendant 6 semaines avec 16 heures de lumière par jour, et à une température moyenne de 22°C ;
- 25 - les cultures sont arrosées par subirrigation pendant une heure tous les deux jours avec de l'eau osmosée jusqu'à la troisième semaine de culture, et, à partir de la troisième semaine, un apport de la Solution fertilisante est réalisé à la fréquence d'une fois par semaine.

30 Le contrôle qualité en fin de production montre que les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, spores).

EXEMPLE 8 : Préparation et stockage d'un inoculum de *Glomus Sp* (inoculum starter liquide)

Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans l'Exemple 7 excepté que l'inoculation est réalisée avec l'Inoculum starter 4. 540 ml de Gel hydraté sont mélangés manuellement à 60 ml de Zéolithe pour former le support de culture. 40 ml d'Inoculum starter 4 (suspension fongique) sont ajoutés et mélangés manuellement au support de culture, soit un équivalent de 5 propagules viables et infectieuses /mL de support.

Le contrôle qualité en fin de production montre que les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, spores).

15

EXEMPLE 9 : Préparation et stockage d'un inoculum de plusieurs genres fongiques

Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans l'Exemple 7 excepté qu'à l'étape d'Inoculation avec l'Inoculum starter, 540 mL de gel hydraté sont mélangés manuellement à 60 mL de Zéolithe pour former le support de culture. 6g d'Inoculum starter 5 sont ajoutés et mélangés manuellement au support de culture soit l'équivalent de 5 spores/mL de support.

Le contrôle qualité en fin de production montre que les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, spores).

EXEMPLE 10 : Préparation et stockage d'un inoculum fongique avec, comme inoculum starter, un inoculum fongique selon l'invention

1 - MISE EN CULTURE

1a - Hydratation du Gel

L'étape d'hydratation du Gel est identique à
5 celle décrite dans l'Exemple 1.

1b - Inoculum starter

L'Inoculum starter est composé de grains de gel
rétenteur d'eau colonisés par les champignons
10 endomycorhiziens. Les grains sont prélevés en fin de
production de l'Exemple 1, sans séchage et stockage
préalables.

Compte tenu du fait que la méthode de coloration
décrite par Philips et Hayman est destructrice pour les
15 microorganismes, les grains de gel sont sélectionnés sous
loupe binoculaire sans coloration préalable selon le
critère de présence de mycélium fongique et/ou de spores
dans les grains de gel.

20 1c - Germination des semences

Le mode opératoire est identique à celui utilisé
à l'étape 1c de l'Exemple 1.

1d - Mise en culture

25 250 ml de gel hydraté sont mélangés manuellement
à 160 mL de Zéolithe pour former le support de culture. Les
alvéoles d'une Plaque sont remplis avec 50 ml de support
soit 46,5g de support/alvéole.

3 grains de gel hydratés et colonisés formant
30 l'Inoculum starter décrit au paragraphe 1b ci-dessus du
présent exemple sont ajoutés par alvéole (poids moyen de 3
grains hydratés : 1,85g) soit un taux d'inoculation moyen
égale à 4% (W/W).

15 répétitions sont réalisées pour cet essai.

Une semence germée de sorgho est repiquée par alvéole.

5 2 - CULTURE DES PLANTES

Les plantes sont cultivées en serre pendant 3 mois avec 16 heures de lumière /jour, et à une température moyenne de 22°C.

10 Les cultures sont arrosées par subirrigation pendant une heure tous les deux jours avec de l'eau osmosée jusqu'à la troisième semaine de culture.

A partir de la troisième semaine, un apport de la Solution fertilisante est réalisé à raison d'une fois par
15 semaine.

3 - CONTROLE DE QUALITE EN FIN DE PRODUCTION

20 Le contenu de chaque alvéole (gel + racines) est traité suivant la méthode précitée de Philips et Hayman. Les grains de gel traités sont observés sous loupe binoculaire au grossissement x20 : les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, spores).

25

4 - SECHAGE ET STOCKAGE

Le séchage et le stockage sont réalisés comme à l'Exemple 7.

30

EXEMPLE 11 : Préparation d'un inoculum bactérien(I)1 - MISE EN CULTURE

5

1a - Hydratation du Gel

L'étape d'hydratation du Gel est identique à celle décrite dans l'Exemple 1.

10

1b - Inoculum starter bactérien (Is)

L'Inoculum starter bactérien utilisé est un inoculum liquide de *Rhizobium leguminosarum bv viciae*-souche P 221.

La dose d'inoculation est de 2 ml inoculum/Pot 2, à raison de 17×10^7 bactéries/mL soit $3,4 \times 10^8$ bactéries/Pot 2.

L'inoculum bactérien est apporté à la surface des Pots 2 deux semaines après la mise en place.

20

1c - Germination des semences

La plante hôte utilisée est le pois variété Kayanne.

Les semences sont mises à tremper une nuit à température ambiante dans de l'eau osmosée.

25

1d - Mise en culture

250 ml de Gel hydraté sont mélangés manuellement à 160 ml de Zéolithe pour former le support de culture. 400 ml de ~~ee~~ support sont ajoutés par Pot 2, soit 370g de support/Pot 2.

3 semences prégonflées de pois sont semées par Pot 2.

2 - CULTURE DES PLANTES

Les plantes sont cultivées en serre pendant 3 mois avec 16 heures de lumière /jour, et à une température moyenne de 22°C.

Les cultures sont arrosées par subirrigation pendant une heure tous les deux jours avec de l'eau osmosée jusqu'à la troisième semaine de culture.

10 A partir de la troisième semaine, on a apporté la Solution fertilisante une fois par semaine.

3 - CONTROLE DE QUALITE EN FIN DE CULTURE

15 Le contenu de chaque pot (gel + racines) est traité à froid avec une solution à 0,04% (W/V) de bleu de méthylène pour contrôler la présence de bactéries vivantes dans les grains de gel.

Les grains de Gel traités sont observés sous loupe binoculaire au grossissement x20 et sous microscope au grossissement x40 : les grains de Gel sont colonisés par les bactéries.

25 **EXEMPLE 12** : Préparation d'un inoculum mixte de champignons endomycorhiziens et de bactéries

Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans l'Exemple 11 excepté que l'inoculation est effectuée avec deux inoculum starter : l'Inoculum starter 1 pour les champignons endomycorhiziens et l'Inoculum starter bactérien de l'Exemple 11 pour le rhizobium. Les doses et conditions d'inoculation sont les suivantes:

- Dose d'inoculation de l'Inoculum starter bactérien identique à celle de l'Exemple 10. L'Inoculum bactérien est apporté à la surface des Pots 2 deux semaines après la mise en place.
- 5 - Dose d'inoculation de l'Inoculum starter 1 : 15 g inoculum/Pot 2 (4% W/W) à raison de 40 propagules/g, soit environ 600 propagules/Pot 2. L'Inoculum fongique est mélangé au support de culture au moment de la mise en place.
- 10 En fonction du microorganisme recherché, les grains de gel sont traités soit selon la méthode précitée de Philips et Hayman, soit à froid avec du bleu de méthylène comme cité précédemment. Les grains traités sont observés sous loupe binoculaire au grossissement x20 ou
- 15 sous microscope au grossissement x40. Les grains de Gel sont colonisés par les structures fongiques (mycélium, sporocarpes) et par les bactéries.

20 **II. OBSERVATIONS**

II - 1 : Fréquence moyenne de colonisation après 4 mois de culture

25

Pour chaque exemple, trois répétitions de culture sont réalisées.

En fin de culture, les grains de gel sont colorés suivant la technique décrite par Philips et Hayman et

30 observés sous loupe binoculaire. La fréquence moyenne de colonisation des grains par les champignons endomycorhiziens est estimée sur 100 grains de gel pour

chaque répétition, soit au total 300 grains observés par exemple décrit.

Après 4 mois de culture, le procédé de culture a permis d'obtenir une colonisation des grains de Gel par le
5 champignon endomycorhyzien inoculé. 3 grains de gel sur 5 sont colonisés par les microorganismes inoculés.

Les résultats des observations sont rapportés dans le Tableau 1.

Tableau 1

10

Exemple	% de grains de gel colonisés par les champignons
1	80
2	70
3 ₁	95
4 ₁	100
5 ₁	80

En conclusion de ces essais, quelle que soit l'espèce fongique testée (*Funneliformis mosseae* ou
15 *Rhizophagus intraradices*), le procédé permet la multiplication des propagules fongiques dans les grains de gel rétenteur d'eau. Les propagules obtenues sont de natures diverses : spores, mycélium fongiques, racines mycorhizées. Les grains de Gel peuvent être colonisés par
20 les racines de la plante hôte.

L'apport par arrosage de molécules telles que des acides humiques ou des chélates de fer permet d'optimiser la colonisation des grains de gel par les structures fongiques.

25

II - 2 : Diffusion vers l'extérieur des composés hydrosolubles stockés dans les grains de Gel rétenteur

Les molécules apportées par arrosage et absorbées au cours de la culture par le gel peuvent être libérées par osmose lorsque les grains de gel secs sont réhydratés.

La Figure 3 illustre la diffusion vers l'extérieur d'un chélate de fer stocké, en cours de culture, dans les grains de gel rétenteur d'eau :

- A gauche de la Figure : les grains de gel obtenus selon l'Exemple 4₁ après la phase de séchage en fin de culture. Les grains chargés en chélate de fer sont colorés en rouge foncé ;
- à droite de la Figure : les grains de gel réhydraté (boîte de Petri du haut) après la phase de stockage et la solution d'hydratation résiduelle (boîte de Petri du bas) concentrée en chélate de fer relargué par osmose à partir des grains de gel.

Le chélate de fer a partiellement diffusé par osmose (diffusion passive suivant un gradient de concentration) des grains de gel où il est très concentré vers l'eau où il est peu concentré.

II - 3 : Suivi de la viabilité des champignons endomycorhiziens au cours du stockage

Les champignons endomycorhiziens étant des symbiotes obligatoires, la viabilité des propagules intégrées dans les grains de gel est évaluée par deux tests biologiques sur plantes :

1 - TEST BIOLOGIQUE EN PLAQUE ALVEOLEE

Objectif : contrôler que les propagules fongiques
contenues dans un grain de gel apporté au pied d'une plante
5 sont capables de coloniser les racines de la plante.

Matériel

- Conteneur : plaque alvéolée - 38 alvéoles - 90
mL/alvéole.
- Support de culture : Zéolithe stérile (20% d'humidité,
10 granulométrie <3mm).
- Plante hôte : Sorgho

Méthode

Les alvéoles sont remplies avec 45 mL de support
15 de culture stérile. Un grain de gel sec, pris au hasard et
obtenu selon l'invention, est déposé dans chaque alvéole.
Les alvéoles sont complétées avec 35 ml de support de
culture stérile. Une semence germée de Sorgho est repiquée
dans chaque alvéole. Les cultures sont conduites en chambre
20 climatique pendant 6 semaines en conditions contrôlées : 16
heures de lumière par jour et à une température moyenne de
22°C, avec un arrosage à l'eau osmosée à raison de 20
mL/alvéole. Les plants sont fertilisés une fois après 3
semaines de culture avec la Solution fertilisante à raison
25 de 20 mL/alvéole.

En fin de culture, la colonisation des racines
par le champignon mycorhizien est contrôlée sous loupe
binoculaire après traitement suivant la méthode décrite par
Philips et Hayman.

30 Pour chaque exemple et durée de conservation, 10
grains de gel déshydratés pris au hasard sont mis en
culture.

Le test de conservation est effectué sur les grains de gel issus de la multiplication de *Funneliformis mosseae*, et conservés dans les sacs en papier kraft (obtenus à l'Exemple 1).

5

RESULTATS

Le Tableau 2 synthétise le pourcentage de plantes ayant établi la symbiose avec le champignon dans leurs
10 racines.

Tableau 2

Exemple	Durée de conservation (en mois)						
	2	3	4	5	6	7	13
1	60	50	80	70	40	90	40
3 ₁	100	100	80	60	80	70	60
4 ₁	80	100	100	60	60	100	40
1 bis	70	60	90	70	60	70	60
3 ₁ bis	90	100	70	80	100	100	60
4 ₁ bis	90	100	90	80	80	100	60

15 Après 7 mois de conservation à l'obscurité, à une température moyenne variant de 15 à 18°C, au moins 70% des plantes inoculées avec un grain de gel issu du procédé de l'invention ont leurs racines colonisées par *Funneliformis mosseae*.

20 Pour un exemple donné, les fluctuations de la fréquence observées au cours du temps peuvent s'expliquer par le fait que les grains de gel en sortie du procédé ne contiennent pas le même nombre de propagules et de ce fait ne sont pas impactés de la même façon par le temps de
25 conservation.

Le Tableau 3 synthétise les fréquences moyennes de mycorhization (en %) au cours du temps, à savoir sur

100 racines observées, le nombre de racines hébergeant les champignons.

Tableau 3

5

Exemple	Durée de conservation (en mois)						
	2	3	4	5	6	7	13
1	37	36	34	31	39	31	15
3 ₁	33	45	29	25	40	52	29
4 ₁	39	37	31	35	35	54	13
1 bis	31	21	37	33	37	32	16
3 ₁ bis	37	52	45	37	32	41	38
4 ₁ bis	34	47	39	37	50	40	34

Quel que soit l'exemple considéré et jusqu'à 7 mois de conservation, entre 20 et 50% des racines observées sont colonisés par les champignons endomycorhiziens.

10

2 - TEST BIOLOGIQUE EN BACS

Objectif : contrôler que, lorsque le gel rétenteur d'eau obtenu selon le procédé, est appliqué à la dose préconisée par le fournisseur de gel, les racines des plantes cultivées sont colonisées par le champignon mycorhizien.

Matériel

- Conteneur : bacs plastiques - volume 10 l - surface : 0,084 m².
- Support de culture : Zéolithe stérile (20% d'humidité, granulométrie <3mm).
- Plante hôte : Sorgho.
- Préconisations d'utilisation:
 - Gel hydrorétenteur : 1,18 kg/m³ soit 5,9 g gel sec / 5 litres de support de culture ;
 - Densité de semis du sorgho : 40 grains/m², soit 4 graines/bac.

Méthode

5,9 g de gel obtenu selon le procédé sont mélangés manuellement à 5 litres de support de culture. Les bacs sont remplis avec le mélange « support-gel ». Quatre
 5 graines germées de sorgho sont repiquées uniformément à la surface de chaque bac, à une profondeur de 2 cm. Les cultures sont conduites en chambre climatique pendant 6 semaines en conditions contrôlées (16 heures de lumière par jour, et à une température moyenne de 22°C) avec deux
 10 arrosages hebdomadaires à l'eau osmosée. Les plants sont fertilisés une fois après 3 semaines de culture avec la Solution fertilisante.

Pour chaque exemple, un bac de culture est effectué.

15 En fin de culture, la totalité des plantes est contrôlée et la colonisation des racines par le champignon mycorhizien observée sous loupe binoculaire après traitement suivant la méthode décrite par Philips et Hayman.

20 Le test de conservation est effectué sur les grains de gel issus de la multiplication de *Funneliformis mosseae* et conservés dans les sacs en papier kraft.

Résultats

25 Le Tableau 4 synthétise le pourcentage de plantes ayant établi la symbiose endomycorhizienne après 6 semaines de culture en bac :

Tableau 4

Exemple	Durée de conservation (en mois)	
	2	7
1	100	100
3 ₁	100	100
4 ₁	100	100
1 bis	100	100

3 ₁ bis	100	100
4 ₁ bis	100	100

Après 7 mois de conservation à l'obscurité, à une température moyenne variant de 15 à 18°C, quel que soit l'exemple considéré, 100% des plantes cultivées, en présence de grains de gel issus du procédé et appliqués à la dose préconisée par le fournisseur de gel hydrorétenteur, ont leurs racines colonisées par le champignon endomycorhizien.

Le Tableau 5 synthétise les fréquences moyennes de mycorhization (en %) observées au cours du temps.

Tableau 5

Exemple	Durée de conservation (en mois)	
	2	7
1	50	44
3 ₁	49	51
4 ₁	24	60
1 bis	45	45
3 ₁ bis	59	40
4 ₁ bis	50	49

Quel que soit l'exemple considéré, après 7 mois de conservation des grains de gel obtenus selon le procédé, les plantes mycorhizées présentent entre 25 et 60% de leurs racines colonisées par le champignon.

Conclusion

Après 7 mois de conservation, en sac papier kraft, à l'obscurité, à une température moyenne variant de 15 à 18°C, le procédé permet de conserver viables et infectieuses les propagules de champignons endomycorhiziens formées dans les grains de gel. Le produit obtenu après

séchage se prête à une manipulation aisée ne nécessitant pas de protection individuelle particulière ainsi qu'à un bon conditionnement.

Sept mois est la durée de conservation optimale à
5 préconiser pour le maintien de la viabilité et du pouvoir infectieux des propagules fongiques produites dans les grains de Gel.

Il n'y a pas d'influence des traitements chimiques sur la viabilité des champignons pendant le
10 stockage.

II - 4 : Effet de l'emballage sur la durée de stockage du produit

15 Dans cet essai, les sacs en papier kraft sont remplacés par des sacs en matière plastique avec fermeture à glissière de façon à voir si l'utilisation d'un emballage a priori moins favorable aux échanges gazeux avec l'extérieur influe sur la durée de conservation du produit
20 en limitant par exemple les fluctuations du taux d'humidité des grains de gel au cours du temps.

Pour chaque exemple et à chaque durée de conservation, le taux d'humidité des grains de gel est déterminé après passage à l'étuve à 100°C pendant 17 heures
25 d'un échantillon de 10g de gel sec en cours de conservation.

Le Tableau 6 synthétise les taux d'humidité (en %) enregistrés au cours du temps.

Les Exemples 1 à 4₁ correspondent à un stockage
30 en sac papier kraft.

Les Exemples 1 bis à 4₁ bis correspondent à un stockage en sac plastique.

Tableau 6

Exemple	Durée de conservation (en mois)						
	2	3	4	5	6	7	13
1	12,2	6,39	7,9	11,33	11,71	9,59	7,58
3 ₁	10,12	5,44	6,6	9,95	8,4	9,9	7,91
4 ₁	11,95	6,69	8,2	11,48	9,14	11,26	7,56
1 bis	11,35	6,59	5	11,27	10,11	9,45	7,73
3 ₁ bis	8,93	4,57	6,5	9,41	9,06	10	6,54
4 ₁ bis	14,74	9,6	10,1	12,1	10,54	12,56	7,73

5 Des fluctuations du taux d'humidité des grains de gel sont observées avec les deux types de sac au cours de la conservation. Les échanges gazeux entre l'intérieur du sac et l'extérieur sont donc possibles avec les deux emballages sélectionnés.

10 Pour un exemple donné, les fluctuations du taux d'humidité sont comparables que le sac soit en papier ou en matière plastique.

Sur les treize mois de conservation, le taux moyen d'humidité des grains de gel reste proche de la
15 valeur recherchée au moment du séchage, c'est-à-dire 10%.

II - 5: Effet de la nature de l'inoculum starter

Pour chaque exemple (Exemples 7 à 9), dix
20 répétitions de culture sont réalisées.

Après traitement et coloration des grains de gel selon la méthode de Philips et Hayman, la colonisation des grains par les champignons endomycorhiziens est déterminée sous loupe binoculaire sur 30 grains de gel/exemple.

25 Sont comptabilisés comme positifs les grains de gel colonisés par au moins un fragment de mycélium et/ou une spore de champignon endomycorhizien.

Le Tableau 7 présente, pour chaque exemple, le pourcentage moyen de grains de gel colonisés par les champignons endomycorhiziens après 8 semaines de culture.

5

Tableau 7

Exemple	% moyen de grains de gel colonisés par les champignons
7	57%
8	60%
9	23%

Après huit semaines de culture, quel que soit l'exemple considéré, des grains de gel rétenteur d'eau sont colonisés par des champignons endomycorhiziens, le pourcentage de grains colonisés variant de 23% à 60%.

Pour un même inoculum initial, il n'y a pas d'influence de la formulation de l'inoculum starter (solide ou liquide) sur le développement des champignons dans le Gel.

Compte tenu du fait que le nombre de propagules inoculées pour chaque exemple est comparable et que l'arrosage est effectué par subirrigation afin de limiter les pertes d'inoculum starter par lessivage, la fréquence de colonisation plus faible observée pour l'Exemple 9 peut s'expliquer, d'une part, par la nature des propagules fongiques inoculées (spores pour l'Exemple 9, propagules variées (spores, mycélium, fragments racinaires mycorhizés) pour les Exemples 7 et 8) et, d'autre part, par la viabilité des propagules apportées.

En conclusion, le procédé selon l'invention de multiplication de champignons endomycorhiziens sur le Gel rétenteur est applicable à des inoculums de champignons endomycorhiziens solides (granulés, poudre) ou liquide.

Le procédé est applicable à un inoculum contenant une ou plusieurs espèces de champignons endomycorhiziens.

II - 6: Multiplication avec les grains de Gel
 5 obtenus selon l'invention et utilisés comme inoculum
starter

Après traitement et coloration des grains de gel selon la méthode de Philips et Hayman, la colonisation des
 10 grains par les champignons endomycorhiziens est déterminée sous loupe binoculaire sur 20 grains de gel/exemple.

Sont comptabilisés comme positifs les grains de gel colonisés par au moins un fragment de mycélium et/ou une spore de champignons endomycorhiziens.

15 Après 3 mois de culture, sur 15 répétitions effectuées, 1/3 des répétitions (34%) présentent en moyenne 30% de grains de gel nouvellement colonisés par du mycélium et des spores de champignons endomycorhiziens. Du mycélium est également observé à l'extérieur des grains de gel.

20 En conclusion de cet essai, après 3 mois de culture sur un support majoritairement composé par le gel (60% v/v), la colonisation de nouveaux grains de gel rétenteur d'eau par des champignons endomycorhiziens est possible en utilisant comme inoculum starter des grains de
 25 gel au préalable colonisés par les microorganismes.

Descriptif séquentiel du développement fongique et
illustration par les Figures 4 à 14

Les étapes c à f peuvent se dérouler
 30 simultanément

- (a) inoculum starter apporté au gel
- (b) phase de germination des propagules (spores, mycélium)
- (c) phase de croissance du mycélium fongique

- (d) phase de colonisation des grains de gel par le mycélium fongique et par les racines
- (e) pénétration du champignon dans les racines des plantes à l'extérieur ou à l'intérieur du grain de gel
- 5 (f) fructification des champignons : formation de nouvelles spores

Figure 4 : phases (b) et (d)

10 La photographie 4 illustre la germination, sur un grain de gel, d'un sporocarque de *Funneliformis mosseae* apporté par l'Inoculum starter 1. Environ 10 spores de forme sphérique à ovoïde, de couleur dorée, sont regroupées dans un manchon mycélien pour former le sporocarque (amas
15 sombre situé au centre de l'image). De fins filaments de mycélium issus de la germination des spores et colonisant le gel sont également observés.

Figure 5 et 6 : phase (f)

20

Dans le cas de l'inoculation avec *Funneliformis mosseae*, il y a formation à l'intérieur des grains de gel de nouveaux sporocarques par ramification intense du mycélium fongique (zones diffuses).

25

Figure 7 : phase (f)

Dans le cas de l'inoculation avec *Rhizophagus intraradices*, formation de grappes de spores
30 individualisées (petites sphères) dans les grains de gel.

Figure 8 : phase (d)

La photographie 8 illustre la colonisation des grains de gel par les racines (gros cordons) et par du
5 mycélium (très fins filaments).

Figures 9 à 14

Ces photographies illustrent le développement des
10 racines et des champignons à l'intérieur et/ou à l'extérieur des grains de gel.

Les grains de gel peuvent être colonisés par les racines des plantes. Le mycélium fongique est capable de sortir du grain pour infecter une racine située à
15 proximité.

Figure 9

Cette photographie illustre l'infection des
20 racines à l'intérieur du gel. Au centre, nous observons les racines de la plante hôte (gros cordons), et le mycélium fongique (fins filaments) qui rentrent en contact avec la surface racinaire à plusieurs endroits (appressoria ou points de pénétration du champignon dans la racine
25 visualisés par de petites zones de coloration plus foncées sur la racine).

Dans la partie basse gauche, nous observons la présence d'une spore fongique (petite sphère) nouvellement formée et liée au mycélium fongique situé juste au-dessus.

Figure 10

Cette photographie illustre la colonisation des racines par le champignon à l'intérieur des grains de gel.

5 Dans la partie médiane basse, nous observons une racine mycorhizée de sorgho avec présence de vésicules fongiques (vésicules sphériques) au niveau du parenchyme cortical de la racine.

10 Dans la partie médiane haute, nous observons une grappe de spores fongiques (petites sphères) nouvellement formées dans le gel.

Figure 11

15 Cette photographie illustre la capacité du mycélium à poursuivre sa croissance hors du gel et à infecter une racine située à l'extérieur du gel.

20 Nous observons une racine (gros cordon) accolée à la surface d'un grain de gel et du mycélium fongique (fin filament situé à gauche de la racine) sortant du grain de gel. Le mycélium entre en contact de la racine et pénètre dans la racine (appressorium : point plus épais sur la racine). Le mycélium (fin filament) se développe à l'intérieur de la racine.

25

Figure 12

30 Cette photographie illustre la présence d'une racine de pois avec une nodosité (cordon avec sphère) à l'intérieur d'un grain de gel. Présence de mycélium (fins filaments) et spores fongiques (petites sphères) à l'intérieur du grain de gel.

Figure 13

Cette photographie illustre un grain de gel entièrement colonisé par les structures fongiques (mycélium et spores). L'ensemble des structures fongiques sont connectées entre elles.

Figure 14

Cette photographie illustre une racine nodulée de pois située à l'extérieur du grain de gel colonisé par les structures fongiques (mycélium et sporocarpes de *Funneliformis mosseae*).

15

II - 7: Essai sur les grains de gel obtenus à l'Exemple 11

En fin d'expérimentation, 100% des plantes présentent des nodosités. Les nodosités se forment préférentiellement à l'extérieur des racines mais également à l'intérieur.

Après coloration des racines de pois et des grains de gel au bleu de méthylène, la surface des grains colorés est rincée à l'eau osmosée stérile et de fines lamelles sont découpées dans des grains de gel et écrasées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau stérile. Des bactéries *Rhizobium* sont observées à la périphérie des structures gélifiées sous microscope grossissement X40.

La photographie 15 illustre une nodosité colorée au bleu de méthylène et écrasée entre lame et lamelle. Des bactéries viables de *Rhizobium* en suspension dans l'eau autour du nodule sont visibles sous microscope.

La photographie 16 illustre une coupe fine d'un grain de gel coloré au bleu de méthylène et écrasée entre lame et lamelle. Des bactéries viables de *Rhizobium* en suspension dans l'eau autour de la structure gélifiée sont observées sous microscope.

En conclusion de cet essai, les grains de Gel peuvent être colonisés par les bactéries du genre *Rhizobium*.

10 **II - 8: Essai sur les grains de gel obtenus à l'Exemple 12**

En fin d'expérimentation, après coloration au bleu trypan et observation des racines de pois et des grains de gel sous loupe binoculaire, 100% des plantes présentent des nodosités et sont mycorhizées. Après 3 mois de culture, le pourcentage de grains colonisés par du mycélium fongique et des spores est égale à 93%.

Comparativement aux essais précédents effectués avec un inoculum de *Funneliformis mosseae* seul (Exemple 1), la coculture du *rhizobium leguminosarum bv viciae* et de *Funneliformis mosseae* (Exemple 12) permet d'optimiser la colonisation des grains de gel par les structures fongiques (mycélium, spores). La fréquence de grains colonisés est augmentée avec une dose d'inoculation plus faible et un temps de culture plus court. Ces variations ne sont probablement pas liées à la nature des plantes hôtes utilisées (sorghos ou pois) connues toutes les deux pour leur bonne aptitude à être mycorhizées mais à une synergie, déjà décrite dans la littérature, établie entre les deux microorganismes.

Le Tableau 8 présente une synthèse des données pour les cultures avec *Funneliformis mosseae* seul et de

Funneliformis mosseae couplé à *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*.

Tableau 8

5

Exemple	Microorganismes inoculés	Doses d'inoculation	Temps de culture	Pourcentage de grains de gel colonisé par le champignon
1	<i>Funneliformis mosseae</i>	9% w/w	4 mois	80%
12	<i>Funneliformis mosseae</i> + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	4% w/w 3,4 10 ⁸ /Pot 2	3 mois	93%

La coculture des deux microorganismes symbiotiques (*Funneliformis mosseae* et *Rhizobium leguminosarum*) sur un support composé majoritairement par le gel rétenteur d'eau est possible et conduit à des symbioses bien établies (symbiose mycorhizienne pour les champignons endomycorhiziens et formation de nodosités pour les *Rhizobium*).

La photographie 17 illustre la colonisation des racines de pois par *Funneliformis mosseae* et *Rhizobium leguminosarum*, et montre plus particulièrement une racine située à l'extérieur du gel avec 2 nodosités (racine en bas de l'image) et une racine mycorhizée (en haut à gauche de l'image) avec un point de pénétration du mycélium fongique en liaison entre la racine mycorhizée et le grain de gel. Le grain de gel est colonisé par le mycélium (filaments), les spores (sphères) et les racines de pois (gros filaments).

REVENDICATIONS

1 - Procédé de fabrication d'un inoculum (I) d'au moins un microorganisme d'intérêt agronomique (M) 5 choisi parmi les champignons et les bactéries, caractérisé par le fait que l'on cultive sur un support de culture au moins une plante hôte (P) du ou des microorganismes (M), ledit support comprenant des grains d'un gel hydrorétenteur à l'état hydraté, une inoculation dans ledit support de 10 culture d'au moins un inoculum starter (Is) du ou des microorganismes (M) étant conduite avant, pendant ou après la mise en place de la ou des plantes (P) dans ledit support de culture, ladite culture étant menée jusqu'à ce qu'au moins une partie desdits grains de gel hydrorétenteur 15 ait été pénétrée et colonisée par ledit ou lesdits microorganismes (M), les grains de gel ainsi obtenus constituant l'inoculum (I) recherché.

2 - Procédé selon la revendication 1, 20 caractérisé par le fait que l'on utilise des grains d'un gel hydrorétenteur présentant une capacité à retenir l'eau pouvant aller jusqu'à 400 fois son poids initial.

3 - Procédé selon l'une des revendications 1 et 25 2, caractérisé par le fait que l'on utilise des grains d'un gel hydrorétenteur d'origine naturelle ou synthétique choisi parmi les gels polymères d'acrylamide, les gels copolymères d'acrylamide et d'acrylate de sodium ou de potassium, les gommes naturelles ou biosynthétiques à base 30 d'algues telles que les alginates, les carraghénanes et l'agar, les exsudats de plantes tels que la gomme de karaya, la gomme adragante et la gomme arabique, et les

exsudats de graines tels que la gomme de guar et la gomme de caroube.

4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que l'on utilise un ou des microorganismes (M) choisis parmi les champignons, tels que les champignons mycorhiziens, comme les champignons endomycorhiziens à vésicules ou arbuscules (VAM), de la famille des *Glomeraceae*, en particulier des genres *Funneliformis* tel que *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus* tel que *Rhizophagus intraradices*, *Septoglomus*, *Claroideoglomus* et *Glomus*, et les bactéries, telles que les bactéries du genre *Rhizobium*, telle que *Rhizobium leguminosarum*.

15

5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'on utilise un support de culture constitué par les grains de gel hydrorétenteur ou par les grains de gel hydrorétenteur avec une matière minérale chimiquement inerte adaptée à l'établissement de la symbiose entre la ou les plantes hôtes (P) et le ou les microorganismes (M).

6 - Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme matière minérale, de l'argile ou de la zéolithe.

7 - Procédé selon l'un des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que l'on ajoute au support de culture au moins un amendement organique tel que la corne de bovin.

8 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que l'on utilise au moins un inoculum starter (Is) choisi parmi :

- 5 - les inoculums fongiques solides constitués par des grains ou une poudre de matière minérale renfermant des propagules fongiques, viables ;
- les inoculums fongiques liquides constitués par des propagules fongiques, viables en suspension dans l'eau ;
- 10 - les inoculums bactériens liquides constitués par des bactéries viables en suspension dans l'eau ; et
- les inoculums fongiques et/ou bactériens (I).

9 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 15 8, caractérisé par le fait que l'on utilise, comme plante hôte (P), une plante ligneuse ou herbacée, en particulier le sorgho ou le pois, laquelle est mise en place sous forme de semence.

20 10 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que l'on apporte au moins un agent fertilisant au milieu de culture pendant la culture, ledit agent fertilisant étant choisi notamment parmi les engrais solubles (NPK), les acides humiques, les chélates
25 de fer et les acides aminés.

11 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé par le fait qu'à la fin de la culture, on sèche les grains de gel, de préférence à l'obscurité, puis
30 on les tamise pour séparer la ou les matières minérales chimiquement inertes si celles-ci ont été utilisées, en particulier celles qui servaient de support de propagules dans le cas d'inoculums starters fongiques solides, et, le

cas échéant, on sectionne les systèmes racinaires pour individualiser les grains de gel constituant l'inoculum (I).

5 12 - Inoculum (I) d'au moins un microorganisme (M) d'intérêt agronomique choisi parmi les champignons et les bactéries, caractérisé par le fait qu'il comprend un gel hydrorétenteur sous forme de grains inoculés avec le ou les microorganismes (M) à l'état vivant, le ou les
10 microorganismes fongiques étant présents au sein des grains de gel sous la forme de propagules telles que le mycélium, les spores ou des fragments de racines de plante hôte colonisées, et le ou les microorganismes bactériens étant présents sous forme de bactéries isolées libres ou
15 concentrées dans des racines ou fragments de racines de plante hôte colonisées.

 13 - Inoculum (I) selon la revendication 12, caractérisé par le fait que le mycélium fongique, lorsqu'il
20 est présent, forme un réseau dans au moins une partie des grains de gel et que les spores néoformées dans les grains de gel sont liées au mycélium fongique.

 14 - Inoculum (I) selon l'une des revendications
25 12 et 13, caractérisé par le fait que la surface d'au moins une partie des grains de gel est traversée par le mycélium du ou des champignons et/ou par au moins un fragment de racine de plante.

30 15 - Inoculum (I) selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé par le fait que le gel hydrorétenteur est à l'état déshydraté, les grains de gel hydrorétenteur

ayant notamment une dimension de 2 à 4 mm à l'état déshydraté.

16 - Inoculum (I) selon l'une des revendications
5 12 à 15, caractérisé par le fait que le gel hydrorétenteur est un gel présentant une capacité à retenir l'eau pouvant aller jusqu'à 400 fois son poids initial.

17 - Inoculum (I) selon l'une des revendications
10 12 à 16, caractérisé par le fait que le gel hydrorétenteur est choisi parmi les gels d'origine naturelle ou d'origine synthétique tels que les gels polymères d'acrylamide, les gels copolymères d'acrylamide et d'acrylate de sodium ou de potassium, les gommes naturelles ou biosynthétiques à base
15 d'algues telles que les alginates, les carraghénanes et l'agar, les exsudats de plantes tels que la gomme de karaya, la gomme adragante et la gomme arabique, et les exsudats de graines tels que la gomme de guar et la gomme de caroube.

20

18 - Inoculum (I) selon l'une des revendications
12 à 17, caractérisé par le fait que le ou les microorganismes (M) d'intérêt agronomique sont choisis parmi les champignons, tels que les champignons
25 mycorhiziens, comme les champignons endomycorhiziens à vésicules ou arbuscules (VAM), de la famille des *Glomeraceae*, en particulier des genres *Funneliformis* tel que *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus* tel que *Rhizophagus intraradices*, *Septoglomus*, *Claroideoglomus* et *Glomus*, et
30 les bactéries, telles que les bactéries du genre *Rhizobium*, telle que *Rhizobium leguminosarum*.

19 - Inoculum (I) selon l'une des revendications 12 à 18, caractérisé par le fait qu'il renferme en outre au moins un agent fertilisant choisi notamment parmi les engrais solubles (NPK), les acides humiques, les chélates
5 de fer et les acides aminés.

20 - Inoculum (I) selon l'une des revendications 12 à 19, caractérisé par le fait que la teneur en eau résiduelle dans les grains de gel hydrorétenteur secs est
10 comprise entre 5 et 15% en masse, de préférence 10% en masse.

21 - Inoculum (I) selon l'une des revendications 12 à 20, le cas échéant en mélange avec des grains de gel
15 hydrorétenteur non colonisés par un microorganisme, qui est conditionné en sac de papier kraft ou en sac plastique.

22 - Utilisation d'un inoculum (I) tel que défini à l'une des revendications 12 à 21 ou préparé par le
20 procédé tel que défini à l'une des revendications 1 à 11, pour inoculer des plantes avec des microorganismes d'intérêt agronomique tout en amendant le cas échéant leur support de culture, ledit inoculum étant apporté en application localisée aux trous de plantation, en mélange
25 aux supports de culture ou par pralinage, pour des cultures conduites en pleine terre ou en conteneurs, en plein champ, sous serre ou tunnel, l'inoculum tel que défini ci-dessus ou préparé par le procédé tel que défini ci-dessus pouvant être utilisé comme inoculum starter pour multiplier les
30 microorganismes d'intérêt agricole.

GEL HYDRORÉTENTEUR Horta-Sorb®LG DÉSHYDRATÉ

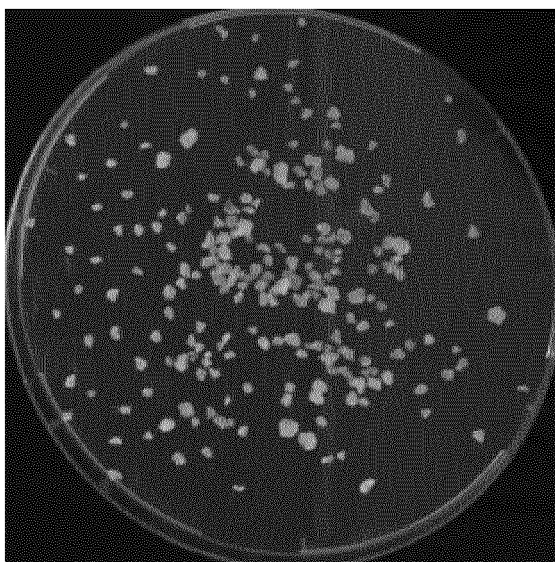


Fig. 1

GEL HYDRORÉTENTEUR Horta-Sorb®LG HYDRATÉ

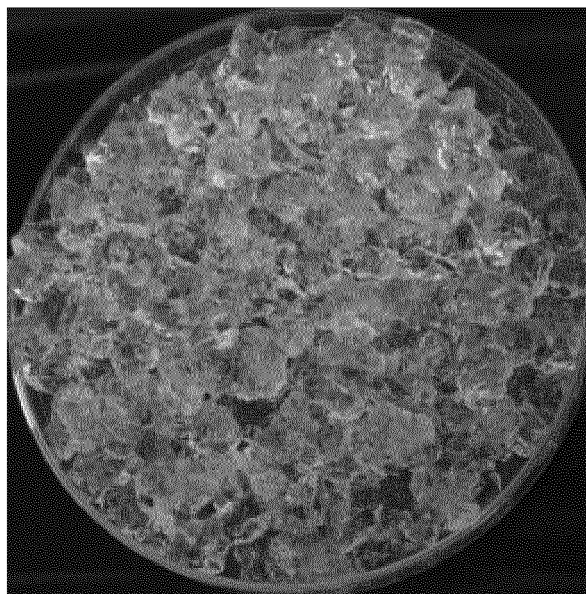


Fig. 2

ILLUSTRATION DE LA DIFFUSION PAR OSMOSE DE COMPOSÉS HYDROSOLUBLES STOCKÉS
DANS LES GRAINS DE GEL HYDRORÉTENTEUR

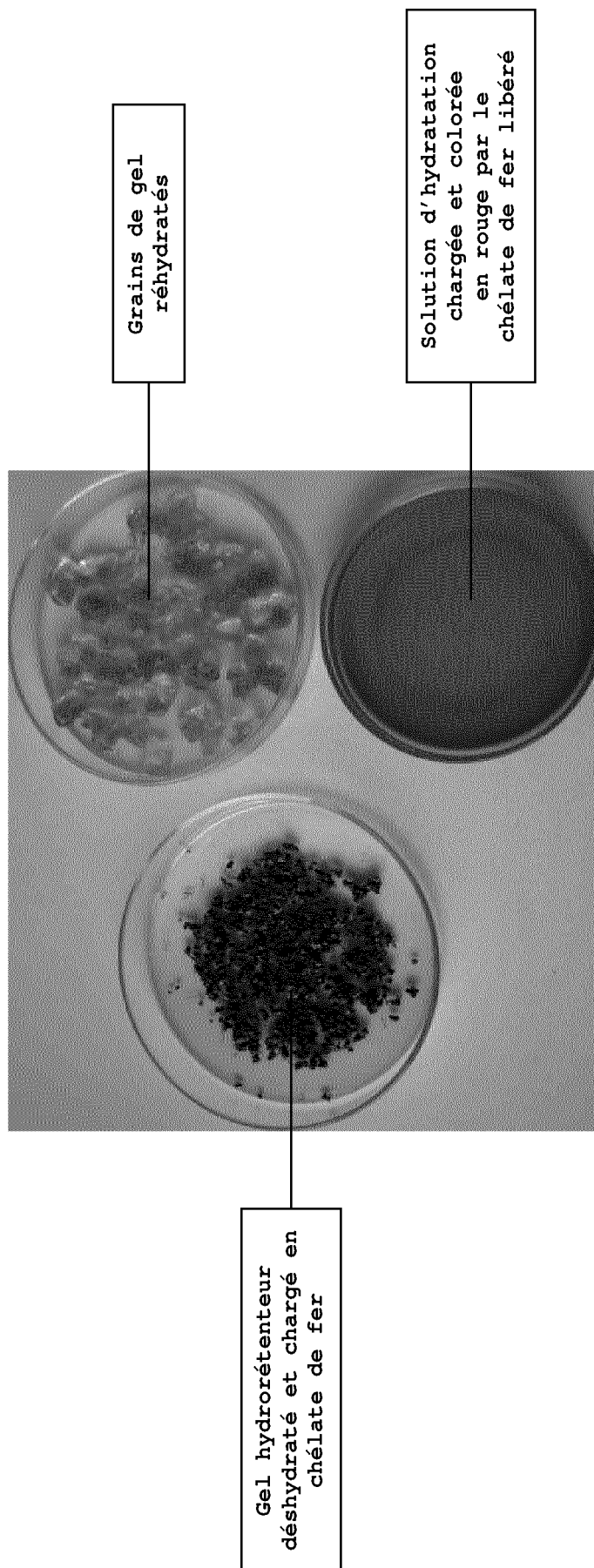


Fig. 3

ILLUSTRATION DE LA COLONISATION DU GEL HYDRORÉTENTEUR PAR LE MYCÉLIUM FONGIQUE

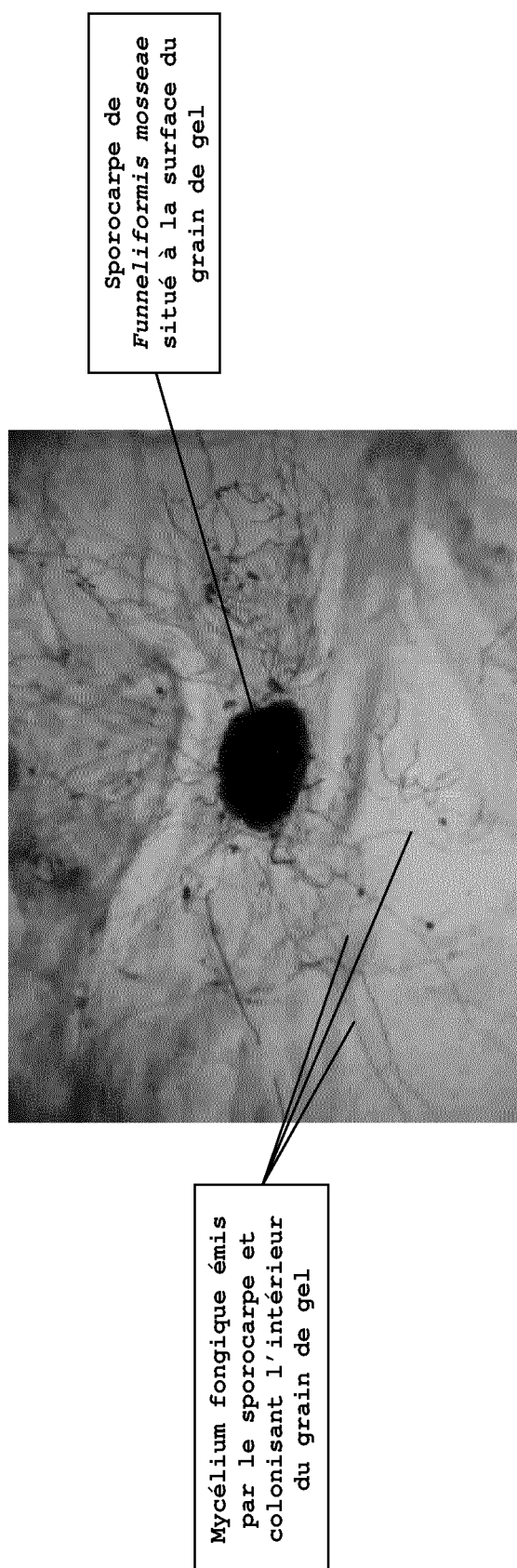


Fig. 4

ILLUSTRATION DE LA MULTIPLICATION DE *Funneliformis mosseae* DANS LE GEL HYDRORÉTENTEUR



Fig. 5

ILLUSTRATION DE LA MULTIPLICATION DE *Funneliformis mosseae* DANS LE GEL HYDRORÉTENTEUR



Fig. 6

ILLUSTRATION DE LA MULTIPLICATION DE *Rhizophagus intraradices* DANS LE GEL HYDRORÉTENTEUR

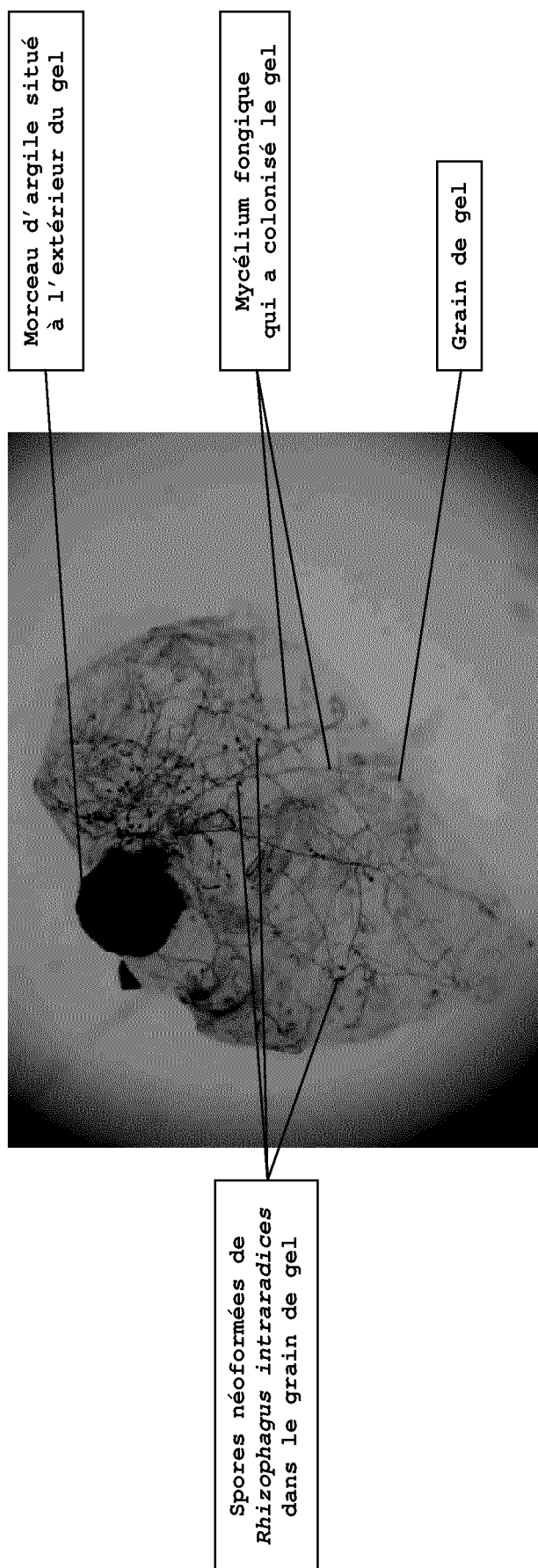


Fig. 7

ILLUSTRATION DE LA COLONISATION DU GEL HYDRORÉTENTEUR PAR LES RACINES

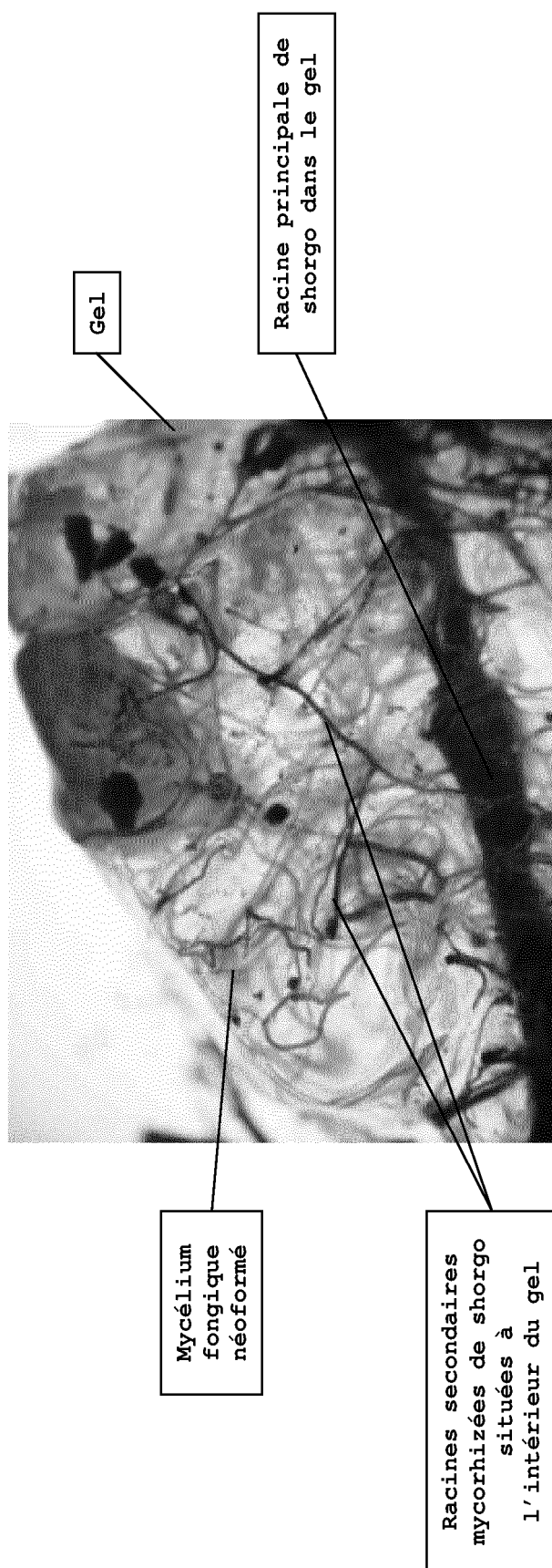


Fig. 8

9/17

ILLUSTRATION DE LA MYCORHIZATION DES RACINES À L'INTÉRIEUR DU GEL HYDRORÉTENTEUR

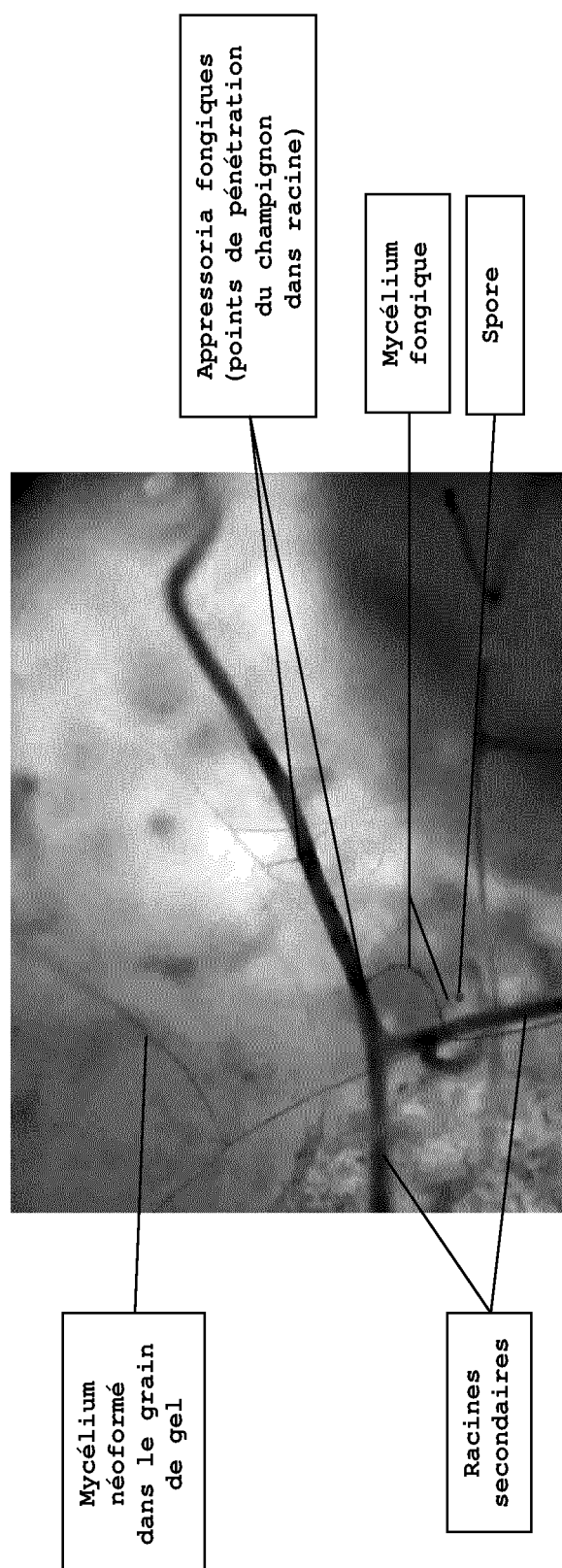


Fig. 9

ILLUSTRATION DE LA MYCORHIZATION DES RACINES À L'INTÉRIEUR DU GEL HYDRORÉTENTEUR



Fig. 10

ILLUSTRATION DE L'EXTÉRIORISATION DU MYCÉLIUM DU GEL HYDRORÉTENTEUR
ET INFECTION D'UNE RACINE EXTERNE AU GEL

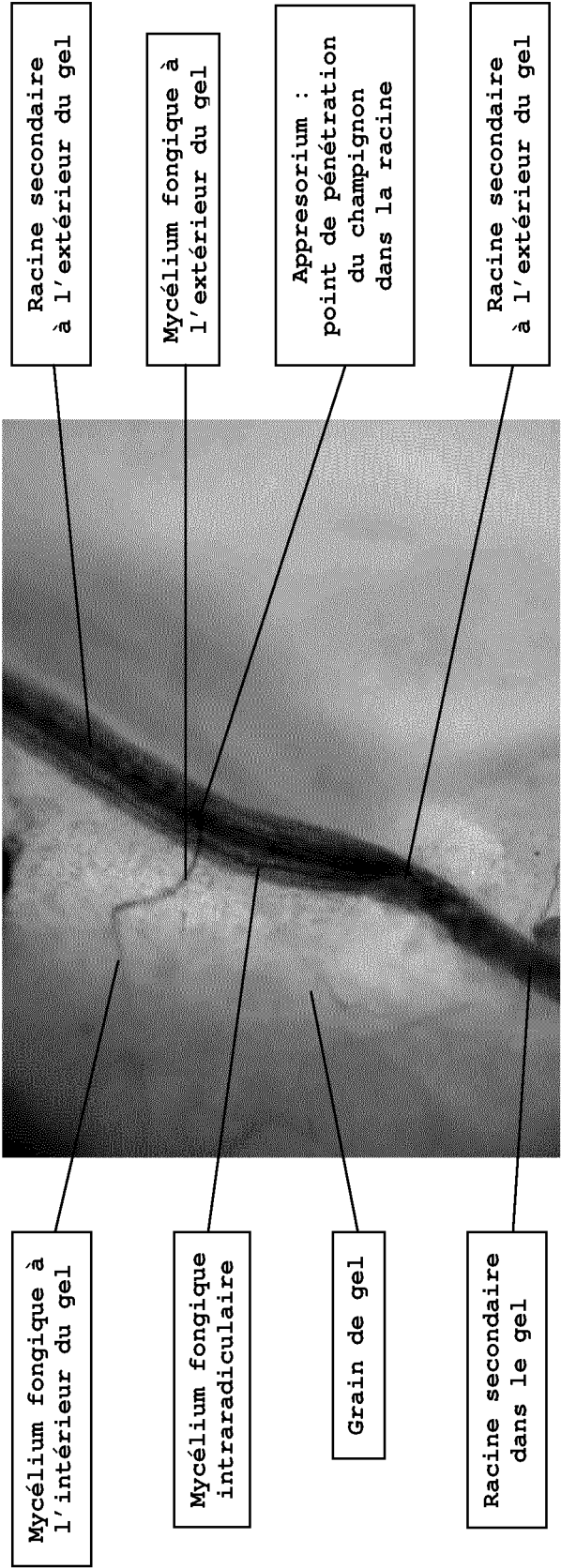


Fig. 11

ILLUSTRATION DE LA PRÉSENCE DE NODOSITÉS À L'INTÉRIEUR DU GEL HYDRORÉTENTEUR



Fig. 12

ILLUSTRATION DE LA COLONISATION DU GEL HYDRORÉTENTEUR PAR LES STRUCTURES FONGIQUES

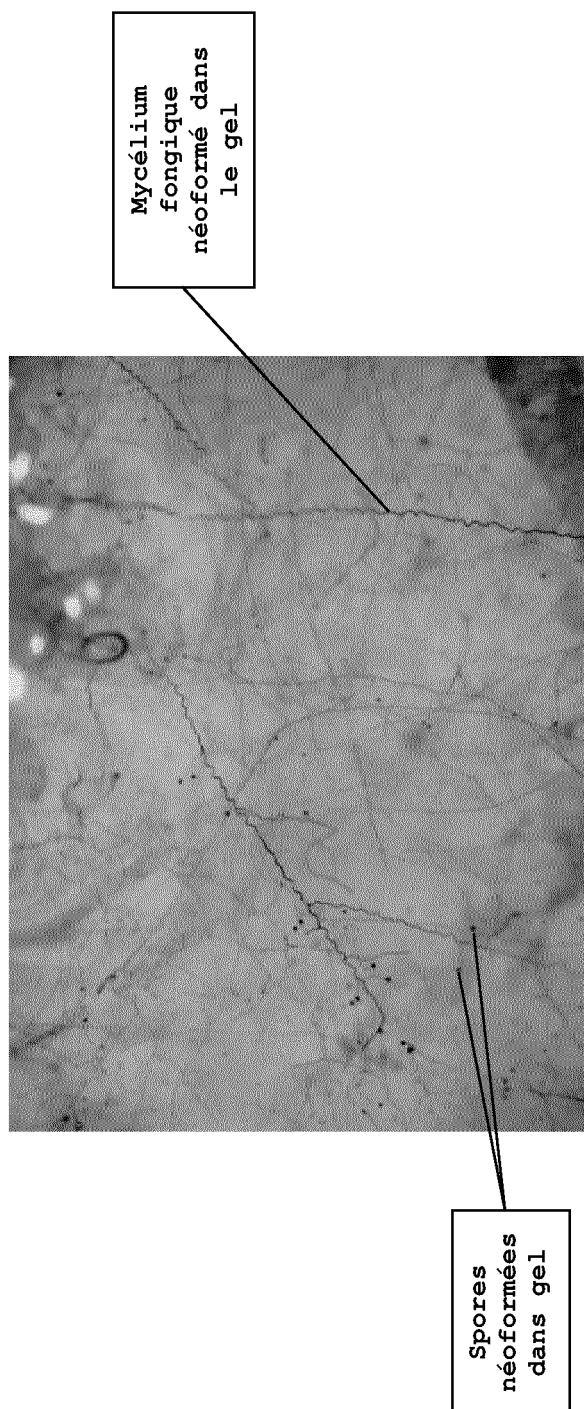


Fig. 13

ILLUSTRATION DE LA COLONISATION DU GEL HYDRORÉTENTEUR PAR LES STRUCTURES FONGIQUES



Fig. 14

ILLUSTRATION DE LA PRÉSENCE DE BACTÉRIE RHIZOBIUM DANS LES NODOSITÉS



Fig. 15

ILLUSTRATION DE LA PRÉSENCE DE BACTÉRIE RHIZOBIUM DANS LES GRAINS DE GEL

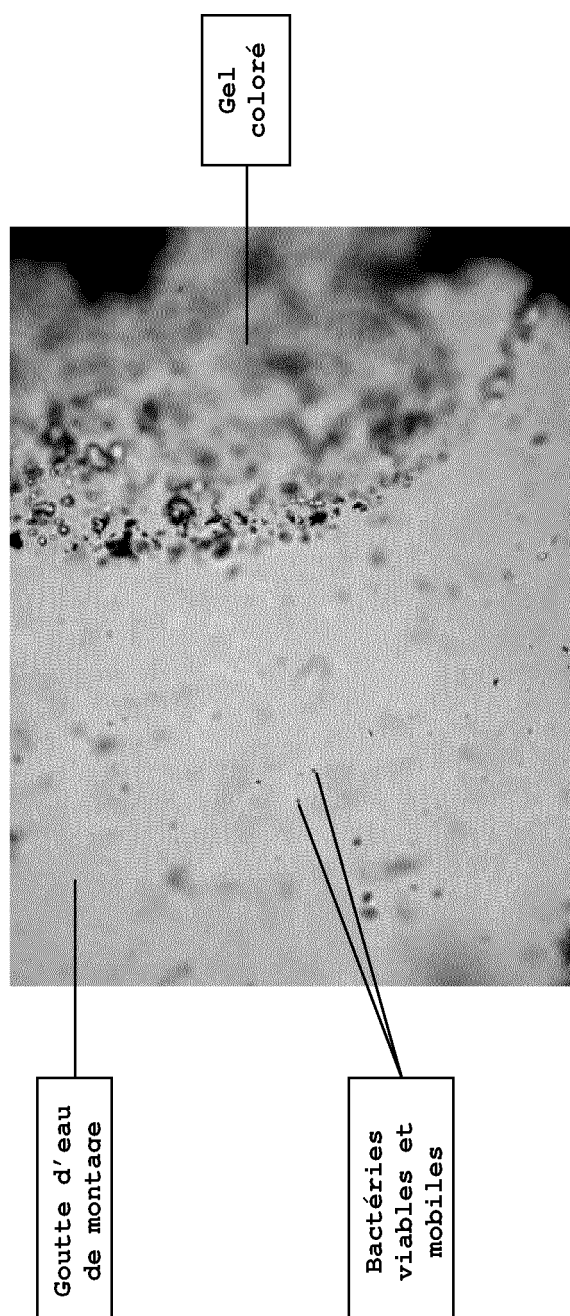


Fig. 16

ILLUSTRATION DE LA COLONISATION DES RACINES DE POIS PAR
Funneliformis mosseae ET *Rhizobium leguminosarum*



Fig. 17



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 806054
FR 1550061

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 262 381 A (TUSE DANIEL [US] ET AL) 16 novembre 1993 (1993-11-16)	12, 14-18, 20,22	C12N11/04 C12N11/16 C12N1/14
Y	* colonne 6, alinéa * * exemples 1, 2 *	1-22	C12N1/20 A01N63/00 C05F11/08
X	HUNG L-L L ET AL: "USE OF HYDROGEL AS A STICKING AGENT AND CARRIER FOR VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI", MYCOLOGICAL RESEARCH, vol. 95, no. 4, 1991, pages 427-429, XP002739936, ISSN: 0953-7562	12, 14-16, 18,22	
Y	* alinéa [materialsandmethods] *	1-22	
X	FRIEL MARY T ET AL: "Immobilisation as a strategy to increase the ecological competence of liquid cultures of Agaricus bisporus in pasteurised compost", FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, vol. 30, no. 1, septembre 1999 (1999-09), pages 39-46, XP002739937, ISSN: 0168-6496	12, 15-18,22	
Y	* page 40, colonne 2, alinéa 2 *	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C05F C12N
X	KUEK C ET AL: "HYDROGEL BEAD INOCULA FOR THE PRODUCTION OF ECTOMYCORRHIZAL EUCALYPTS FOR PLANTATIONS", MYCOLOGICAL RESEARCH, vol. 96, no. 4, 1992, pages 273-277, XP002739938, ISSN: 0953-7562	12-18,22	
Y	* page 275 *	1-22	
X,D	FR 2 501 229 A1 (RHONE POULENC IND [FR]) 10 septembre 1982 (1982-09-10)	12, 14-18, 20,22	
Y	* revendications 1-21 *	1-22	
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 mai 2015		Mabit, Hélène	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 806054
FR 1550061

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	VASSILEV N ET AL: "Polymer-based Preparation of Soil Inoculants: Applications to Arbuscular Mycorrhizal Fungi", RE/VIEWS IN ENVIRONMENTAL SCIENCE & BIO/TECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 4, no. 4, 1 novembre 2005 (2005-11-01), pages 235-243, XP019265800, ISSN: 1572-9826 -----	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 mai 2015		Mabit, Hélène	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1550061 FA 806054

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **22-05-2015**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5262381	A	16-11-1993	AUCUN	

FR 2501229	A1	10-09-1982	AU 551717 B2	08-05-1986
			AU 8115382 A	09-09-1982
			BR 8201151 A	11-01-1983
			CA 1179618 A1	18-12-1984
			ES 8303523 A1	01-05-1983
			FI 820572 A	07-09-1982
			FR 2501229 A1	10-09-1982
			NO 820675 A	07-09-1982
			OA 7021 A	31-08-1983
			US 5021350 A	04-06-1991
