

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 147 813

②1 N° d'enregistrement national : **23 03848**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 N 1/20** (2023.01), **C 12 M 1/00**, 1/04, 1/36

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 17.04.23.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 18.10.24 Bulletin 24/42.

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) : **SYNSYM BIOSCIENCES SAS**
Société par actions simplifiée — FR.

⑦2 Inventeur(s) : SYLVESTRE Julien.

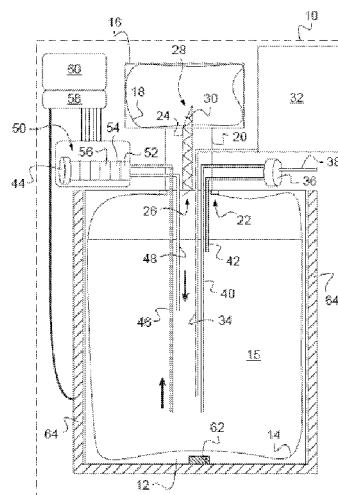
⑦3 Titulaire(s) : **SYNSYM BIOSCIENCES SAS** Société
par actions simplifiée.

⑦4 Mandataire(s) : FEDIT-LORiot.

⑤4 Méthode de production de micro-organismes et installation de mise en œuvre.

⑤7 L'invention concerne une méthode et une installation de production de micro-organismes comprenant les étapes suivantes : on fournit une première enveloppe (18) fermée contenant une souche donnée de micro-organismes en état de dormance, ladite souche donnée de micro-organismes étant adaptée à promouvoir la croissance d'au moins une variété végétale prédéfinie dans un milieu donné ; on fournit une deuxième enveloppe (14) indépendante de ladite première enveloppe ; on fournit un dispositif de raccordement (20) pour pouvoir raccorder ensemble ladite première enveloppe (18) et ladite deuxième enveloppe (14), et pour pouvoir transférer ladite souche de micro-organismes de ladite première enveloppe à ladite deuxième enveloppe ; on introduit des nutriments à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14), de façon à pouvoir provoquer la prolifération des micro-organismes à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe ; et on récupère les micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14).

Figure à publier avec l'abrégié : Fig. 1



FR 3 147 813 - A1



Description

Titre de l'invention : Méthode de production de micro-organismes et installation de mise en œuvre

- [0001] La présente invention se rapporte à une méthode de production de micro-organismes et à une installation de mise en œuvre de ladite méthode.
- [0002] Un domaine d'application envisagé est celui de la production agricole et plus particulièrement des productions végétales.
- [0003] Il est connu d'amender les sols et d'y répandre des engrais pour favoriser la croissance des plantes. Les amendements, minéraux ou organiques visent à améliorer la qualité des sols, tandis que des engrais constituent des nutriments directement mis à profit par les plantes pour favoriser leur croissance.
- [0004] Au surplus, il est connu de mettre en œuvre des produits phytosanitaires pour préserver les productions végétales des agents phytopathogènes et des déprédateurs.
- [0005] Ainsi, l'amélioration continue des rendements agricoles qui en a résulté, a permis de nourrir une population sans cesse croissante à travers le monde.
- [0006] En revanche, l'utilisation à grande échelle d'engrais et de produits phytosanitaires agrochimiques conduit à des émissions importantes de gaz à effet de serre dont le dioxyde de carbone et le protoxyde d'azote ; elle concourt également à la pollution des sols et des sous-sols, des nappes phréatiques, des cours d'eau, des océans et de l'air.
- [0007] En conséquence, il a été imaginé de mettre en œuvre des éléments fertilisants et/ou phytosanitaires plus naturels, et surtout moins polluants.
- [0008] Ainsi, des souches de micro-organismes ont été utilisées pour favoriser la croissance des végétaux. Il a par exemple été imaginé d'introduire dans le sol, des souches d'*Azotobacter*, une bactérie favorisant la fixation de l'azote atmosphérique, précisément dans le but d'apporter aux végétaux alors implantés, de l'azote nécessaire à leur croissance, en permettant ainsi de réduire l'épandage d'engrais azotés de type urée ou nitrate d'ammonium par exemple.
- [0009] Toutefois, les micro-organismes sont des êtres vivants requérant des conditions de production et de stockage très particulières avant de pouvoir être associés vivants, aux végétaux implantés, en comparaison d'engrais conventionnels minéraux ou de synthèse qui peuvent être entreposés aisément sous certaines conditions, pendant de longues périodes. Au surplus, ces engrais conservent leur formule chimique simple et leur activité constante sur une longue durée.
- [0010] Ainsi, un problème qui se pose et que vise à résoudre la présente invention est de fournir une méthode de production de micro-organismes présentant une capacité de survie dans le sol et des bénéfices agronomiques accrus, et une installation pour

pouvoir la mettre en œuvre, permettant de produire les micro-organismes pour pouvoir les associer aisément et efficacement aux cultures végétales, et ce, à des coûts avantageux.

- [0011] Dans le but de résoudre ce problème, et selon un premier objet, il est proposé une méthode de production de micro-organismes comprenant les étapes suivantes : on fournit une première enveloppe fermée contenant une souche donnée de micro-organismes en état de dormance, ladite souche donnée de micro-organismes étant adaptée à promouvoir la croissance d'au moins une variété végétale prédéfinie dans un milieu donné ; on fournit une deuxième enveloppe indépendante de ladite première enveloppe ; on fournit un dispositif de raccordement pour pouvoir raccorder ensemble ladite première enveloppe et ladite deuxième enveloppe, et pour pouvoir transférer ladite souche de micro-organismes de ladite première enveloppe à ladite deuxième enveloppe ; on introduit des nutriments à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe, de façon à pouvoir provoquer la prolifération des micro-organismes à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe ; et on récupère les micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe pour les mettre en contact avec ladite au moins une variété végétale prédéfinie et/ou ledit milieu donné.
- [0012] Ainsi, une caractéristique de l'invention réside dans la mise en œuvre des micro-organismes extemporanément. Autrement dit, les micro-organismes sont produits en grand nombre et mis en œuvre in situ. On multiplie par exemple la population de micro-organismes par plus de 10, par plus de 100, voire par plus de 1000. Pour ce faire, la production doit être simple et efficace. On met alors en œuvre deux enveloppes, indépendantes l'une de l'autre. La première enveloppe est avantageusement étanche et elle renferme les micro-organismes en état de dormance. Autrement dit, les micro-organismes peuvent être stockés vivants à l'intérieur d'une enveloppe aseptisée.
- [0013] Cette première enveloppe présente un volume restreint, par exemple inférieur à 1000 cm³. Elle permet non seulement le stockage des micro-organismes dans des conditions optimales, mais aussi leur transport sur le lieu de mise en œuvre. Par ailleurs, et comme l'expliquera dans la suite de la description, la première enveloppe est à usage unique.
- [0014] Pour certains micro-organismes, le stockage est opéré à basse température, par exemple inférieure à 5 °C, ou même inférieure à -20 °C, de manière à interdire toute croissance et à les maintenir en état de dormance. Pour d'autres micro-organismes, le stockage est opéré à l'état solide, par exemple après une étape de lyophilisation.
- [0015] Ainsi, grâce au dispositif de raccordement qui vient relier de manière étanche la première enveloppe renfermant les micro-organismes et la seconde enveloppe on transfère ces micro-organismes de la première enveloppe, dans la deuxième enveloppe. Le dispositif de raccordement est aseptique et la deuxième enveloppe est également

aseptisée de sorte que le transfert des micro-organismes peut être assuré sans contamination par d'autres micro-organismes.

- [0016] Aussi, le dispositif de raccordement et une pluralité de deuxièmes enveloppes peuvent être stockés in situ à disposition de l'utilisateur.
- [0017] On observera que les nutriments, par exemple à l'état pulvérulent ou dans un milieu aqueux, peuvent être contenus initialement dans la deuxième enveloppe ou bien, qu'ils peuvent être introduits dès le transfert de la souche de micro-organismes à l'intérieur. Ils peuvent par exemple être introduits par le biais du dispositif de raccordement de manière à éviter l'introduction de germes indésirables à l'intérieur de la deuxième enveloppe.
- [0018] La deuxième enveloppe présente un volume supérieur à la première enveloppe, puisque les micro-organismes transférés vont proliférer grâce aux nutriments introduits à l'intérieur de la deuxième enveloppe. Le volume de la deuxième enveloppe peut être supérieur à trois fois le volume de la première enveloppe ou à dix fois, ou encore à cent fois ce volume, en fonction des capacités de prolifération des micro-organismes.
- [0019] Et lorsque la prolifération des micro-organismes a atteint le stade souhaité, on les récupère dans la deuxième enveloppe pour pouvoir les mettre en contact avec le végétal déjà implanté, avec la semence ou bien directement dans le sol préalablement à l'ensemencement.
- [0020] Ainsi, nul besoin de stocker de grandes quantités de micro-organismes pour pouvoir les mettre en œuvre dans le sol ou sur la culture végétale.
- [0021] Selon un mode de mise en œuvre de l'invention, particulièrement avantageux, on mesure la quantité de micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe, et on récupère les micro-organismes ayant proliférés lorsque ladite quantité atteint un seuil prédéterminé.
- [0022] La croissance des micro-organismes à l'intérieur de la deuxième enveloppe suit dans le temps, une courbe sensiblement sigmoïdale. Elle présente deux plateaux, un premier plateau correspondant à une faible croissance et un second plateau correspondant à la fin de la croissance des micro-organismes. Et il est généralement opportun de récupérer les micro-organismes ayant proliféré préférentiellement entre le milieu de la phase de croissance exponentielle, ou phase logarithmique dite « *log phase* » en langue anglaise, et le début du second plateau. En conséquence, la mesure de la quantité de micro-organismes contenus dans la deuxième enveloppe, en fonction du temps, permet de récupérer les micro-organismes ayant proliféré au moment opportun. Comme on l'expliquera plus en détail dans la suite de la description on peut mesurer la quantité de micro-organismes produits en mesurant la turbidité du milieu de la deuxième enveloppe. Cette mesure peut être opérée par spectrophotométrie dans le domaine essentiellement visible, par exemple à 600 nm. On peut également opérer à 850 nm.

Autrement dit, on mesure la densité optique du milieu.

- [0023] Par ailleurs, de façon particulièrement avantageuse, on met en contact les micro-organismes récupérés avec ladite au moins une variété végétale prédéfinie et/ou ledit milieu donné, de préférence moins de 24 heures, et au plus 96 heures après avoir récupéré les micro-organismes. De la sorte, la production de micro-organismes peut non seulement être optimale, mais au surplus, la quantité de celles qui meurent est très faible.
- [0024] Préférentiellement, on porte la température de ladite deuxième enveloppe à une valeur prédéterminée. Cette valeur est généralement comprise entre 10 °C et 60 °C et plus précisément entre 20 °C et 40 °C, par exemple 35 °C. Comme on l'expliquera plus en détail dans la suite de la description, le contrôle de la température peut être opéré grâce à des modules à effet Peltier.
- [0025] De plus, on entraîne avantageusement en mouvement le contenu de ladite deuxième enveloppe. De la sorte, on contribue à l'homogénéisation et à l'aération du contenu de la deuxième enveloppe et partant, on favorise la croissance de ces micro-organismes.
- [0026] Selon un mode de réalisation préférée, on injecte un mélange aqueux à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe. Par exemple, on y injecte de l'eau tamponnée contenant certains sels. Autrement dit, les micro-organismes et les nutriments baignent dans un milieu aqueux.
- [0027] Avantageusement, on maintient le pH à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe entre deux valeurs prédéterminées de pH lorsque les micro-organismes prolifèrent. Les micro-organismes sont en effet sensibles au pH du milieu dans lequel ils prolifèrent. Partant, on mesure le pH du contenu de la deuxième enveloppe et on apporte les corrections nécessaires en injectant un composé acide ou un composé basique à l'intérieur de la deuxième enveloppe.
- [0028] Aussi, on maintient la concentration en oxygène à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe entre deux valeurs prédéterminées de concentration, lorsque les micro-organismes prolifèrent. Certains micro-organismes du sol sont en effet anaérobies obligatoires et doivent donc être cultivés en l'absence d'oxygène. D'autres micro-organismes sont micro-aérobies, ils croissent donc en présence d'une concentration en oxygène réduite entre des valeurs optimales, et il convient de réguler la concentration en oxygène à l'intérieur de la deuxième enveloppe. L'injection d'un gaz neutre, par exemple de l'azote, à l'intérieur de la deuxième enveloppe peut permettre de chasser l'oxygène en trop. L'injection d'oxygène à l'intérieur de la deuxième enveloppe permet d'apporter un complément si nécessaire. Selon les besoins, le contrôle des concentrations de gaz peut être étendu à d'autres gaz tels que le dioxyde de carbone CO₂ ou le diazote N₂.
- [0029] Par ailleurs, et de façon particulièrement avantageuse, toute première enveloppe, en

fonction du type de micro-organismes qu'elle renferme, est associée à des paramètres de mise en œuvre de la prolifération. Ces paramètres de mise en œuvre peuvent en outre être ajustés, pour un type de micro-organismes donné, en fonction de l'usage auquel sont destinés les micro-organismes après leur multiplication, par exemple le type de variété de végétale. Ainsi, de nombreuses « recettes » préalablement validées empiriquement lors d'essais agronomiques peuvent être mises en œuvre simplement afin de créer un produit optimisé.

- [0030] En outre, et selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, lesdites première et deuxième enveloppes sont à usage unique. Ainsi, les premières et deuxièmes enveloppes sont stériles. La deuxième enveloppe est initialement exempte de micro-organismes et elle peut être stockée ainsi sur une longue période. Après sa mise en œuvre, la deuxième enveloppe ne peut être réutilisée. Il en est de même pour la première enveloppe. Partant, il est préférable que le matériau de la première et de la deuxième enveloppe puisse être recyclé et utilisé en tant que polymère dans d'autres applications, ou être biodégradable.
- [0031] Selon un mode particulier de mise en œuvre de l'invention, la première enveloppe est connectée à la deuxième enveloppe et son contenu est déversé à l'intérieur de cette dernière. Une autre première enveloppe contenant les mêmes micro-organismes, ou des micro-organismes différents, est à son tour connectée à la deuxième enveloppe et son contenu y est déversé également, s'ajoutant ainsi aux micro-organismes déjà déversés.
- [0032] En outre, selon une variante de réalisation, une troisième enveloppe contenant un milieu de culture concentré ou non concentré, ou bien un mélange aqueux, peut être connectée à son tour à la deuxième enveloppe, pour y être déversé.
- [0033] Aussi, selon une variante de réalisation particulièrement avantageuse, on fournit ladite première enveloppe fermée contenant en outre, une souche additionnelle donnée de micro-organismes en état de dormance. Dans certaines situations, il peut être opportun d'associer à une même culture végétale deux souches de micro-organismes pour favoriser sa croissance. Aussi, ces deux souches peuvent être contenues initialement dans une même première enveloppe à parts égales par exemple et proliférer ensuite dans une deuxième enveloppe après qu'elles ont été transférées à l'intérieur. Et d'ailleurs, pour certains micro-organismes, une telle co-culture est synergique et elle favorise la croissance des deux souches au-delà de ce que l'on pourrait obtenir en les cultivant indépendamment l'une de l'autre.
- [0034] Par extension, une pluralité de souches de micro-organismes peut initialement être formulée et insérée à l'intérieur d'une première enveloppe. De la sorte, on peut choisir et associer différents types de micro-organisme, permettant d'apporter des éléments différents à la culture végétale. Par exemple, une souche d'*Azotobacter*, favorise la fixation de l'azote atmosphérique, tandis qu'une autre souche produit des substances

permettant de favoriser la solubilisation de composés phosphorés contenus dans le sol et leur utilisation par les racines de la culture végétale. De la sorte, on peut apporter en une seule opération plusieurs propriétés nécessaires à la croissance du végétal.

- [0035] Selon encore une autre variante de réalisation, on récupère les micro-organismes ayant proliféré et on les met en œuvre dans une formulation spécifique avant leur mise en contact avec la culture végétale et où le milieu. Par exemple, on formule les micro-organismes dans une matrice liquide permettant de favoriser la fixation desdits micro-organismes sur les graines ou sur les racines des végétaux.
- [0036] Préférentiellement, les micro-organismes ayant proliféré sont dilués avant d'être appliqués, par exemple par pulvérisation sur le sol ou plus précisément dans la tranchée lors de l'enfouissement des semences. Ils peuvent également être appliqués directement sur la semence avant l'enfouissement. Les micro-organismes ayant proliféré peuvent également être pulvérisés sur les cultures, et principalement leurs feuilles, via des dispositifs manuels, des avions ou, préférentiellement, des drones. Les micro-organismes ayant proliféré peuvent également être introduits, immédiatement après leur production dans le circuit d'alimentation de dispositifs de fertigation, qui combinent un apport de fertilisant et d'eau via une irrigation précise. Dans un cas particulier, les micro-organismes ayant proliféré peuvent être introduits dans le milieu de culture de végétaux cultivés en hydroponique. Dans certain cas, une étape de formulation peut être incluse avant l'application des micro-organismes.
- [0037] Selon un autre objet, il est proposé une installation de production de micro-organismes comprenant : un premier logement pour recevoir une première enveloppe fermée contenant une souche donnée de micro-organismes en état de dormance, ladite souche donnée de micro-organismes étant adaptée à promouvoir la croissance d'au moins une variété végétale prédéfinie dans un milieu donné ; un deuxième logement pour recevoir une deuxième enveloppe indépendante de ladite première enveloppe ; un dispositif de raccordement s'étendant entre lesdits premier et deuxième logements pour pouvoir raccorder ensemble ladite première enveloppe et ladite deuxième enveloppe, et pour pouvoir transférer ladite souche de micro-organismes de ladite première enveloppe à ladite deuxième enveloppe ; un dispositif d'introduction pour introduire des nutriments à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe, de façon à pouvoir provoquer la prolifération des micro-organismes à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe ; et, on extrait ladite deuxième enveloppe dudit deuxième logement pour pouvoir récupérer les micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe et pour les mettre en contact avec ladite au moins une variété végétale prédéfinie et/ou ledit milieu donné.
- [0038] Ainsi, l'installation de production conforme à l'invention permet de mettre en œuvre la méthode selon invention précitée.

- [0039] Comme on l'expliquera ci-après plus en détail, l'installation de production permet, à des personnes non spécialisées de la culture des micro-organismes, de pouvoir produire in situ, des micro-organismes utilisables comme biofertilisants, biostimulants ou comme produits biologiques de protection des cultures, de remédiation des sols ou de fixation du carbone, sans contraintes particulières et néanmoins, dans des conditions optimales de prolifération.
- [0040] Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux de l'invention, mais nullement limitatif, l'installation de production comprend un réceptacle adapté à recevoir lesdits nutriments, et ledit réceptacle est relié à ladite deuxième enveloppe pour introduire lesdits nutriments à l'intérieur. Ainsi, la première enveloppe contenant une souche donnée de micro-organismes peut être fournie avec le réceptacle contenant les nutriments adaptés à la croissance de ladite souche donnée. Le réceptacle peut avantageusement renfermer ces nutriments de manière étanche de manière à ne pas pouvoir être contaminé par d'autres micro-organismes ou germes.
- [0041] Par ailleurs, le réceptacle est préférentiellement adapté à être relié au dispositif de raccordement pour assurer de manière étanche, le transfert des nutriments à l'intérieur de la deuxième enveloppe.
- [0042] De plus, le dispositif de raccordement comprend de préférence un sas permettant le raccordement étanche de la deuxième enveloppe, à la première enveloppe pour assurer le transfert de la souche de micro-organismes, mais aussi éventuellement au réceptacle pour introduire les nutriments à l'intérieur de la deuxième enveloppe. Ainsi, le contenu de la deuxième enveloppe ne peut nullement être contaminé par d'autres micro-organismes ou des germes risquant d'affecter la prolifération des micro-organismes de ladite souche.
- [0043] Préférentiellement, l'installation comprend un spectrophotomètre pour mesurer la quantité de micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe. Pour mettre en œuvre un tel spectrophotomètre, la deuxième enveloppe comprend par exemple un conduit transparent installé en boucle et scellé sur la paroi de la deuxième enveloppe. Le conduit transparent vient alors traverser la cellule du spectrophotomètre. Préférentiellement, la longueur d'onde d'absorption optimale des micro-organismes est de 600 nm. Moyennant un étalonnage, le spectrophotomètre fournit une mesure de la turbidité du contenu de la deuxième enveloppe, mesure que l'on peut corrélérer alors à la quantité de micro-organismes générés. Par ailleurs, en procédant à une telle mesure à une fréquence prédéterminée, on peut ainsi mesurer la vitesse de prolifération des micro-organismes.
- [0044] Avantageusement, l'installation comprend un organe de contrôle de la température situé autour dudit deuxième logement pour porter la température de ladite deuxième enveloppe à une valeur prédéterminée. L'organe de contrôle de la température

comporte alors, une sonde pour pouvoir mesurer la température du contenu de la deuxième enveloppe. Il comporte au surplus des éléments permettant de refroidir ou bien de chauffer l'intérieur de la deuxième enveloppe. De tels éléments comprennent avantageusement des modules à effet Peltier, lesquels permettent d'ajuster précisément la température requise, par exemple à 35 °C.

[0045] En outre, le dispositif selon l'invention comprend des organes d'entraînement pour entraîner en mouvement le contenu de ladite deuxième enveloppe. Ces organes d'entraînement comprennent par exemple une pompe péristaltique, permettant d'aspirer à travers un piquage, le contenu de la seconde enveloppe dans une zone donnée et de le refouler dans une zone distincte, de manière à entraîner en mouvement le contenu de la deuxième enveloppe par convection forcée. Grâce à la pompe péristaltique, il n'y a aucun risque de contamination extérieure du contenu de la deuxième enveloppe.

[0046] Selon un autre mode de mise en œuvre, les organes entraînement comprennent une pièce rotative jetable du type hélice, installée à demeure à l'intérieur de la deuxième enveloppe et adaptée à être entraînée en rotation par des moyens externes à l'enveloppe. Selon encore un autre mode de mise en œuvre, la seconde enveloppe est elle-même entraînée en mouvement alternativement pour pouvoir entraîner en mouvement son contenu, et ainsi l'homogénéiser. Par exemple, la seconde enveloppe est entraînée en mouvement avec un dispositif d'agitation par vague, ou « wave bioreactor » en langue anglaise, ou avec un dispositif l'entraînant sur elle-même. Selon encore un autre mode de mise en œuvre, l'injection de bulles d'air ou de gaz dans la deuxième enveloppe suffit à mettre en mouvement le contenu de la deuxième enveloppe (« air lift bioreactor » en langue anglaise).

[0047] Aussi, l'installation conforme à l'invention comprend préférentiellement un organe d'injection pour injecter un mélange aqueux à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe. L'organe d'injection est par exemple couplé au dispositif de raccordement lequel permet d'éviter la contamination de la deuxième enveloppe. L'organe d'injection comprend de préférence une pompe, de préférence une pompe péristaltique plongeant dans un mélange aqueux stérile.

[0048] Au surplus, de façon non limitative, l'installation de production conforme à l'invention comprend un organe de mesure du pH pour pouvoir maintenir le pH à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe lorsque les micro-organismes prolifèrent, entre deux valeurs prédéterminées de pH. L'organe de mesure du pH comporte de préférence un pH-mètre. Ce dernier comporte une sonde mise en contact avec le contenu de la deuxième enveloppe pour pouvoir mesurer son acidité. On prévoit des ajouts automatiques d'un acide ou bien d'une base pour ajuster la valeur du pH entre deux valeurs prédéterminées.

- [0049] Aussi, de façon non limitative, l'installation de production comprend avantageusement une sonde à oxygène pour maintenir, à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe, la concentration en oxygène entre deux valeurs prédéterminées de concentration, lorsque les micro-organismes prolifèrent. La sonde à oxygène comprend par exemple une cellule recevant une cathode et une anode reliée électriquement par un électrolyte. L'électrolyte est alors séparé, d'une fraction du contenu de la deuxième enveloppe par une membrane perméable à l'oxygène gazeux dissous. L'oxygène peut alors traverser la membrane pour venir se réduire à la cathode en produisant un courant électrique révélateur de la concentration en oxygène.
- [0050] De préférence, l'installation de production comprend un moyen permettant, à la deuxième enveloppe, d'échanger de l'air avec l'extérieur ou avec un réservoir extérieur. De préférence, la connexion comprend un filtre pour éviter toute contamination.
- [0051] Ces informations sont alors traitées dans un microcontrôleur monté sur l'installation. En outre, le microcontrôleur est relié à un écran d'affichage également monté sur l'installation.
- [0052] Aussi, tous les autres organes de mesures et de contrôle sont reliés au microcontrôleur de manière à pouvoir les commander automatiquement et de pouvoir afficher les valeurs qu'ils mesurent.
- [0053] D'autres particularités et avantages de l'invention ressortiront à la lecture de la description faite ci-après de modes de réalisation particuliers de l'invention, donnés à titre indicatif mais non limitatif, en référence aux dessins annexés sur lesquels :
- [0054] [Fig.1] est une vue schématique d'une installation de production de micro-organismes selon invention ; et,
- [0055] [Fig.2] est un logigramme de la méthode de production de micro-organismes conformément à l'invention.
- [0056] On décrira tout d'abord l'installation 10 telle qu'illustrée sur la [Fig.1] avant de décrire plus précisément en référence à la [Fig.2], la méthode de production de micro-organismes qu'elle permet de mettre en œuvre.
- [0057] L'installation de production de micro-organismes 10 conforme à l'invention comporte un grand logement 12, à l'intérieur duquel est installée une enveloppe de culture 14. Cette enveloppe de culture 14 définit un espace intérieur 15 dont le volume est adapté au besoin. Cet espace intérieur peut être supérieur à un litre, dix litres ou 100 litres.
- [0058] L'enveloppe 14 est réalisée dans un matériau polymère flexible et recyclable ou biodégradable. Son épaisseur est inférieure à 0,5 mm. De surcroît, le polymère mis en œuvre est imperméable au gaz dans une certaine mesure. Les principaux polymères recyclables adaptés sont le Polypropylène, le Polyéthylène Téréphtalate, le Polyéthylène

Haute Densité ou encore le Polyéthylène Basse Densité. S'agissant des polymères biodégradables, le poly(alcool vinylique) ou la polycaprolactone peuvent être envisagés.

- [0059] L'installation 10 comporte également un petit logement 16 dans lequel est installée une enveloppe de stockage 18. L'enveloppe de stockage 18 est réalisée dans un matériau polymère recyclable du type décrit ci-dessus. Aussi, elle doit être étanche et peu fragile pour pouvoir assurer le stockage et le transport de micro-organismes à l'état de dormance.
- [0060] Le petit logement 16 surmonte le grand logement 12 et ils sont reliés ensemble de manière étanche par l'intermédiaire d'un dispositif de raccordement 20 sensiblement cylindrique à courbe directrice circulaire.
- [0061] Aussi, l'enveloppe de culture 14 présente un col 22, joint de manière étanche au dispositif de raccordement 20. Le dispositif de raccordement 20 comprend, à l'intérieur, un organe tubulaire 24 présentant une extrémité inférieure 26 débouchant, dans le col 22 de l'enveloppe de culture 14, et une extrémité supérieure 28 en pointe débouchant dans le petit logement 16.
- [0062] Comme on l'expliquera plus en détail dans la suite de la description, l'extrémité supérieure 28 vient s'étendre à l'intérieur de l'enveloppe de stockage 18 de manière à pouvoir la mettre en communication avec l'enveloppe de culture 14. De surcroît, l'organe tubulaire 24 comporte à l'intérieur, une vis sans fin 30 permettant de transférer le contenu de l'enveloppe de stockage 18 à l'intérieur de l'enveloppe de culture 14.
- [0063] L'ensemble est prévu pour que le transfert du contenu de l'enveloppe de stockage 18 vers l'enveloppe de culture 14 s'opère de manière stérile.
- [0064] L'installation 10 comprend un réceptacle 32 contenant des nutriments adaptés à la prolifération des micro-organismes que l'on entend produire.
- [0065] Aussi, l'installation 10 comprend un premier conduit 34 s'étendant du réceptacle 32 au dispositif de raccordement 20 qu'il joint de manière étanche, et il se prolonge à travers le col 22 et à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14.
- [0066] En outre, l'installation 10 est équipée d'une pompe d'alimentation non représentée pour pouvoir acheminer des nutriments 32 dans l'enveloppe de culture 14.
- [0067] De plus, l'installation 10 comporte une première pompe péristaltique 36 raccordée à une arrivée d'un mélange aqueux 38, comportant essentiellement de l'eau et dépourvu de germes.
- [0068] Aussi, la pompe péristaltique 36 comporte, un premier conduit long 40 traversant de manière étanche le dispositif de raccordement 20 et s'étendant à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14 jusqu'au fond, et un premier conduit court 42 traversant également de manière étanche le dispositif de raccordement 20 pour venir s'étendre à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14 au voisinage du col 22.
- [0069] Ainsi, la première pompe péristaltique 36 a deux fonctions. Elle permet d'une part

d'alimenter l'enveloppe de culture 14 avec un mélange aqueux, et d'autre part d'assurer l'homogénéisation du contenu de l'enveloppe de culture 14 en l'aspirant par l'intermédiaire du conduit long 40 et en le refoulant par le conduit court 42 comme on l'expliquera ci-après.

- [0070] L'installation 10 comprend une deuxième pompe péristaltique 44, reliée à un deuxième conduit de pompage 46 et à un deuxième conduit de refoulement 48. Le conduit de pompage 46 traverse une pluralité 50 de cellules de mesure qu'il alimente et que l'on va détailler ci-après. Les conduits de pompage 46 et de refoulement 48 traversent de manière étanche le dispositif de raccordement 20 et se prolongent à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14 jusqu'au fond.
- [0071] Ainsi, le deuxième conduit de pompage 46 alimente une première cellule 52 d'un spectrophotomètre. Cette première cellule 52 permet de mesurer l'absorbance du liquide qui la traverse à une longueur d'onde de 600 nm. Cette mesure est corrélée à une concentration en micro-organismes dudit liquide traversant.
- [0072] En outre, le deuxième conduit de pompage 46 alimente une deuxième cellule 54 permettant de mesurer le pH du liquide qui la traverse. La deuxième cellule 54 est équipée d'une électrode de verre et d'une électrode de référence au calomel. La différence de potentiel entre les deux électrodes permet d'accéder à la valeur du pH du liquide.
- [0073] Aussi, le deuxième conduit de pompage 46 alimente une troisième cellule 56 incluant une sonde à oxygène. Elle permet ainsi de mesurer la concentration en oxygène du liquide. La cellule comporte deux électrodes baignant dans un électrolyte lequel électrolyte est séparé du liquide du conduit de pompage 46 par une membrane perméable à l'oxygène. On accède ainsi à une mesure de la concentration en oxygène par l'intermédiaire d'une mesure de différence de potentiel entre deux électrodes.
- [0074] La pluralité 50 de cellules de mesure est commandée par un microcontrôleur 58. Et les résultats des mesures opérées par les cellules 52, 54, 56 sont alors traités dans le microcontrôleur 58 et peuvent être affichés sur un écran d'affichage 60.
- [0075] Au surplus, l'installation 10 comporte une sonde de température 62 située sous l'enveloppe de culture 14 pour pouvoir en mesurer la température. De surcroît, le grand logement 12 est équipé de modules à effet Peltier 64 permettant de maintenir la température de l'enveloppe de culture 14 entre des valeurs prédéterminées. Ces valeurs de température sont comprises avantageusement entre 30 °C et 40 °C.
- [0076] On décrira à présent en regard du logigramme représenté sur la [Fig.2] et au vu de l'installation 10 de la [Fig.1], la méthode de production de micro-organismes conformément à l'invention.
- [0077] Ainsi, dans une première étape 66, on choisit une souche d'un type de micro-organismes adaptée à favoriser la croissance d'une variété végétale prédéfinie par

exemple, une variété de riz.

- [0078] Par exemple, on choisit des bactéries du genre *Pseudomonas* et en particulier de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, en tant que micro-organismes. Ces bactéries sont impliquées notamment dans le cycle du phosphore et elles favorisent l'absorption du phosphate sous forme ionique par la plante.
- [0079] Ainsi, dans une deuxième étape 68 on fournit une souche de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, conditionnée à l'intérieur d'une enveloppe du type de l'enveloppe de stockage 18 telle que représentée sur la [Fig.1]. L'enveloppe de stockage 18 délimite un volume compris par exemple entre 10 cm³ et 500 cm³. Elle est ici d'un volume de 300 cm³ lequel est entièrement garnie d'une souche de l'espèce bactérienne *Pseudomonas fluorescens* en milieu liquide.
- [0080] Ainsi, cette souche peut être conservée, stockée et acheminée jusqu'à son lieu d'utilisation, maintenue réfrigérée à 4 °C, au voisinage d'un champ de la variété végétale précitée, sans être contaminé par d'autres germes.
- [0081] À cette souche bactérienne en particulier, est associé un protocole de prolifération optimale uniquement en termes de température du milieu dans lequel elle peut se développer et de nutriments nécessaires à sa croissance.
- [0082] Ces informations sont alors enregistrées dans le microcontrôleur 58 de l'installation 10, dans une troisième étape 70, une étape d'enregistrement.
- [0083] Selon une quatrième étape 72, on installe l'enveloppe de culture 14, contenant initialement le milieu de culture, à l'intérieur du grand logement 12 et on la raccorde de manière étanche et aseptique au dispositif de raccordement 20. L'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14 est bien évidemment stérile. Il contient un litre d'un milieu de culture adaptée à la culture de *Pseudomonas fluorescens*. Ici, on choisit du milieu LB, pour « Lurya broth » anglaise, tamponné à pH 7.
- [0084] Ensuite, selon une cinquième étape 74, on procède tout d'abord au chargement de l'enveloppe de stockage 18 contenant la souche bactérienne à l'intérieur du deuxième réceptacle 16.
- [0085] Le deuxième réceptacle 16 délimite une cavité étanche et après que l'enveloppe de stockage 18 a été insérée à l'intérieur, elle est refermée. Et ce n'est qu'ensuite, que l'enveloppe de stockage 18 est perforée par l'intermédiaire de l'extrémité supérieure 28 en pointe de l'organe tubulaire 24, de manière à éviter toute contamination de la souche bactérienne.
- [0086] La perforation de l'enveloppe de stockage 18 permet de libérer les micro-organismes à l'intérieur du deuxième réceptacle et de pouvoir les acheminer à l'intérieur de l'enveloppe de culture 14, notamment par l'intermédiaire de la vis sans fin 30.
- [0087] Et de surcroît, on commande les modules à effet Peltier 64 pour porter la température à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14, entre 28 °C et 32 °C.

- [0088] Par ailleurs, lorsque le chargement en eau de l'enveloppe de culture 14 a permis d'atteindre le volume désiré, l'arrivée du mélange aqueux 38 est coupée, tandis que la pompe péristaltique 36 aspire le liquide de l'enveloppe de culture 14 à travers le premier conduit long 40 et le rejette à travers le premier conduit court 42 pour provoquer l'agitation du milieu. De la sorte, on homogénéise le contenu de l'enveloppe de culture 14 et on favorise l'accès des bactéries à leurs nutriments.
- [0089] Conséquemment, les bactéries de la souche vont sortir de leur état de dormance et vont tout d'abord croître indépendamment les unes des autres avant de se multiplier. Ainsi, plusieurs phases apparaissent dans la croissance des bactéries, une phase de latence, dans lesquels les bactéries sortent précisément de leur état de dormance, une phase d'accélération où les bactéries commencent à se diviser, une phase exponentielle, ou logarithmique, une phase de décélération puis une phase stationnaire.
- [0090] On obtient ainsi en fonction du temps une croissance suivant une courbe sensiblement sigmoïdale. Et il convient d'utiliser les bactéries ayant ainsi proliférées au moment opportun et selon un mode avantageux de mise en œuvre, entre le lieu de leur phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire.
- [0091] Le cas échéant, et non limitativement, dans le but d'optimiser la prolifération des micro-organismes contenus dans l'enveloppe de culture 14, on procède simultanément, grâce à la pluralité 50 de cellules, aux contrôles suivants.
- [0092] Ainsi, grâce à la deuxième pompe péristaltique 44 on aspire le liquide contenu à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14, dans lequel prolifèrent les micro-organismes, et on l'achemine au droit de la première cellule 52 permettant de mesurer la concentration en micro-organismes. On procède à cette mesure de manière séquentielle et à intervalles de temps réguliers, selon une première sixième étape parallèle 76, de manière à pouvoir établir la courbe de croissance des micro-organismes à l'intérieur 15 de l'enveloppe de culture 14.
- [0093] Aussi, le liquide aspiré s'achemine au droit de la deuxième cellule 54 permettant, selon une première sixième étape 78, de mesurer le pH. Pour obtenir une prolifération optimale des bactéries en présence, le pH doit être compris entre 5,5 et 8,5.
- [0094] Si la deuxième cellule 54 enregistre une valeur située en dehors de ces limites, un dispositif non représenté, permet d'injecter automatiquement un tampon acide lorsque le pH est supérieur à 7,5 ou un tampon basique lorsqu'il est inférieur à 6,5.
- [0095] Et au droit de la troisième cellule 56, est contrôlée, dans une troisième sixième étape parallèle 80, la concentration en oxygène du liquide aspiré. L'espèce *Pseudomonas fluorescens* est une bactérie aérobie et elle peut se développer lorsque la concentration en oxygène est par exemple comprise entre 5 g par litre et 10 g par litre.
- [0096] La troisième cellule 56 qui permet de fournir une mesure de cette concentration, permet de savoir si le liquide de l'enveloppe de culture 14 est à la concentration

optimale.

- [0097] Dans la négative, on procède soit à l'injection d'oxygène directement dans l'enveloppe de culture 14, lorsque l'oxygène fait défaut, soit à l'injection d'un gaz neutre, par exemple de l'azote, précisément pour chasser l'oxygène en trop dans le milieu.
- [0098] De la sorte, en contrôlant ces trois paramètres à intervalles réguliers, tout en maintenant la température entre 34 °C et 36 °C, et en procédant à l'agitation du milieu, on obtient une croissance optimale de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*.
- [0099] Grâce au suivi de sa concentration à travers la première cellule 52, on vérifie selon une septième étape de contrôle 82, la vitesse de croissance bactérienne, et si elle a atteint la phase stationnaire précitée, on retire alors l'enveloppe de culture 14 du premier réceptacle 12, et on récupère son contenu selon une huitième étape de récupération 84 de manière à pouvoir mettre en œuvre son contenu, soit directement sur les végétaux, ou avantageusement sur le sol où ils seront cultivés.
- [0100] Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux, l'enveloppe de stockage comprend initialement les micro-organismes mais aussi, leurs nutriments sous forme concentrée. L'enveloppe de stockage est alors conservée à une température inférieure à 4 °C pour interdire la prolifération des micro-organismes. En outre, l'enveloppe de culture contient initialement de l'eau. Ainsi, les deux enveloppes peuvent être initialement produites en série et scellées afin d'éviter toute contamination, pour pouvoir être mises en œuvre in situ sans apport supplémentaire de nutriments ou d'un milieu aqueux quelconque.
- [0101] L'exemple de dispositif décrit ci-dessus permet de mettre en œuvre la méthode selon l'invention. D'autres exemples de dispositifs, plus simples, permettant de contrôler la quantité de micro-organismes et d'agiter l'enveloppe de culture peuvent être mis en œuvre.
- [0102] Aussi, parmi les micro-organismes, les bactéries favorisant la croissance des plantes, ou PGPB acronyme anglais de « *Plant Growth Promoting Bacteria* », peuvent jouer un rôle de biofertilisant en fixant par exemple l'azote ou en favorisant la solubilisation de composés contenant du phosphore. Elles peuvent également avoir un rôle de biostimulant, par exemple en sécrétant des composants, tel que l'acide indole 3-acétique, jouant le rôle de facteurs de croissance pour certaines plantes. Elles peuvent aussi avoir un rôle de protection des cultures en tant que pesticide par exemple.
- [0103] Dans un mode de réalisation particulier, les microorganismes peuvent être utilisés, seuls ou en combinaison avec d'autres organismes vivants tels que des champignons et avec divers apports minéraux, par exemple de la poussière de roche dans le cadre d'une opération de remédiation par altération forcée ou organiques, par exemple le biochar, pour favoriser la fixation de carbone au sein des sols.

- [0104] Ces microorganismes peuvent être aérobies, anaérobies strictes, anaérobies facultatives, aérobies facultatives ou encore micro-aérobies. Ils peuvent être des bactéries gram- positives ou gram- négatives. Ils peuvent être des bactéries capables de former des spores ou qui ne forment pas de spores.
- [0105] Le procédé selon l'invention permet, sans que cette liste soit considérée comme exhaustive, la multiplication de bactéries du genre *Azotobacter*, telles qu'*Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* ; de bactéries du genre *Bacillus*, telles que *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus Megaterium* ; de bactéries du genre *Pseudomonas*, telles que *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas megaterium*, *Pseudomonas bilaiae* ; de bactéries du genre *Azospirillum*, telles que *Azospirillum brasilense* ; de *Gluconacetobacter diazotrophicus* ; de *Kosakonia sacchari* ; de *Klebsiella variicola* ou *Klebsiella pneumoniae* ; de *Xanthobacter autotrophicus* ; de bactéries hétérotrophiques pigmentées, notamment de bactéries roses méthanotrophes facultatives ; de bactéries du genre *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*, par exemple *Bradyrhizobium japonicum*.
- [0106] Le procédé selon l'invention permet également la multiplication de champignons tels qu'*Aspergillus* ou *Trichoderma*, par exemple *Trichoderma harzianum*.
- [0107] Il permet également la multiplication de levures telles que *Saccharomyces* ou *Penicillium*.
- [0108] Le procédé selon l'invention permet également la multiplication d'algues unicellulaires, par exemple *Chlorella*, ou de cyanobactéries, par exemple *Arthrospira*, *Nostoc*, ou *Plectonema*. Dans ce cas, une source de lumière naturelle ou artificielle peut être apportée en continu ou par intermittence, à la culture de ces microorganismes photosynthétiques.
- [0109] En outre, des souches sauvages de ces micro-organismes peuvent être utilisées. Des souches modifiées par mutagenèse aléatoire peuvent également être utilisées.
- [0110] Aussi, des souches modifiées par génie génétique peuvent être utilisées. Le génie génétique peut impliquer le transfert de gène(s) issu(s) de micro-organismes d'un genre différent du micro-organisme modifié (transgénèse) ou l'édition du génome du micro-organisme modifié sans transfert inter-générique de gène(s), par exemple via des méthodes dérivant de CRISPR ou utilisant des transposons ou qualifiée, en langue anglaise de « *prime editing* ».
- [0111] Typiquement, après multiplication de micro-organismes par le procédé selon l'invention, des concentrations de micro-organismes dans le milieu allant de 1×10^6 à 1×10^{10} CFU/mL préférentiellement 1×10^7 à 1×10^9 CFU/mL sont obtenues ; « CFU » signifiant « Unité Formant Colonie ».
- [0112] Ainsi, une quantité de 1×10^8 à 1×10^{13} CFU/ha, préférentiellement 1×10^{11} à 1×10^{13} CFU/ha est typiquement utilisée pour l'application agronomique subséquente.

- [0113] Grâce à la méthode selon l'invention, les conditions de culture sont mieux contrôlées et par conséquent, la quantité de micro-organismes vivant produit l'est également.
- [0114] Au surplus, les micro-organismes sont mis en œuvre dans leur phase de multiplication maximale et par conséquent, leur possibilité de survie dans le sol est accrue. Cet avantage est susceptible de conduire à des bénéfices agronomiques significatifs par rapport aux modes de mise en œuvre des micro-organismes utilisés en agriculture selon l'état de l'art.
- [0115] Aussi, grâce à la méthode selon invention il est possible d'ajuster les conditions de culture pour préparer les microorganismes au stress qu'ils vont rencontrer dans le sol. Autrement dit, les micro-organismes sont conditionnés et leur possibilité de survie dans le sol en est d'autant augmentée.
- [0116] En outre, le procédé selon l'invention, ou la production de micro-organismes in situ, permet de réduire les productions de micro-organismes en amont, typiquement par un facteur supérieur à 10 ou supérieur à 100, voire supérieur à 1000.
- [0117] Ceci réduit le coût global du procédé, et permet de réduire les dépenses d'investissement de l'unité de production de micro-organismes destinés à la première enveloppe et permet, pour un même investissement, de produire après multiplication dans la deuxième enveloppe, 10 fois ou 100 fois plus de micro-organismes permettant de traiter une surface agricole 10 fois ou 100 fois plus élevée que si les micro-organismes avaient été produits dans une unité de production comparable et directement mis en œuvre conventionnellement sans multiplication par le procédé selon invention.
- [0118] Il en résulte une réduction de l'empreinte logistique, puisque des quantités bien moindres de micro-organismes sont transportées.
- [0119] De surcroît, les conditions de maintien en vie des micro-organismes, par exemple entre -20 °C et 4 °C, étant relativement coûteuses et complexes d'un point de vue logistique, il est avantageux de pouvoir en transporter des quantités 10 fois ou 100 fois inférieures aux quantités nécessaires à mettre en œuvre in situ.
- [0120] Une dose très réduite de micro-organismes permettant, après multiplication par le procédé selon l'invention, de traiter une relativement grande surface agricole, il est acceptable, du point de vue du coup, de mettre en œuvre des méthodes physiques et/ou chimiques relativement onéreuses pour protéger ou optimiser ces micro-organismes.
- [0121] Aussi, grâce au procédé selon invention, on peut contrôler la vitesse de prolifération des micro-organismes. Et par conséquent, pour certains micro-organismes, la croissance dans l'enveloppe de culture a été opérée de manière relativement lente.
- [0122] Dans ces conditions, il est apparu que les micro-organismes en résultant, étaient bien plus résistants dans le sol face à un environnement physico-chimique pouvant être stressant et faces à la compétition à laquelle ils sont confrontés avec les micro-organismes déjà présents dans le sol.

Revendications

- [Revendication 1] Méthode de production de micro-organismes caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :
- on fournit une première enveloppe fermée (18) contenant une souche donnée de micro-organismes en état de dormance, ladite souche donnée de micro-organismes étant adaptée à promouvoir la croissance d'au moins une variété végétale prédéfinie dans un milieu donné ;
 - on fournit une deuxième enveloppe (14) indépendante de ladite première enveloppe (18) ;
 - on fournit un dispositif de raccordement (20) pour pouvoir raccorder ensemble ladite première enveloppe (18) et ladite deuxième enveloppe (14), et pour pouvoir transférer ladite souche de micro-organismes de ladite première enveloppe à ladite deuxième enveloppe ;
 - on introduit des nutriments à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14), de façon à pouvoir provoquer la prolifération des micro-organismes à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe ;
- et on récupère les micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14) pour les mettre en contact avec ladite au moins une variété végétale prédéfinie et/ou ledit milieu donné.
- [Revendication 2] Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on mesure la quantité de micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14), et en ce qu'on récupère les micro-organismes ayant proliférés lorsque ladite quantité atteint un seuil prédéterminé.
- [Revendication 3] Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'on met en contact les micro-organismes récupérés avec ladite au moins une variété végétale prédéfinie et/ou ledit milieu donné, au plus 96 heures après avoir récupéré les micro-organismes.
- [Revendication 4] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'on porte la température de ladite deuxième enveloppe (14) à une valeur prédéterminée.
- [Revendication 5] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'on entraîne en mouvement le contenu de ladite deuxième enveloppe (14).
- [Revendication 6] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'on injecte un mélange aqueux à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14).
- [Revendication 7] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée

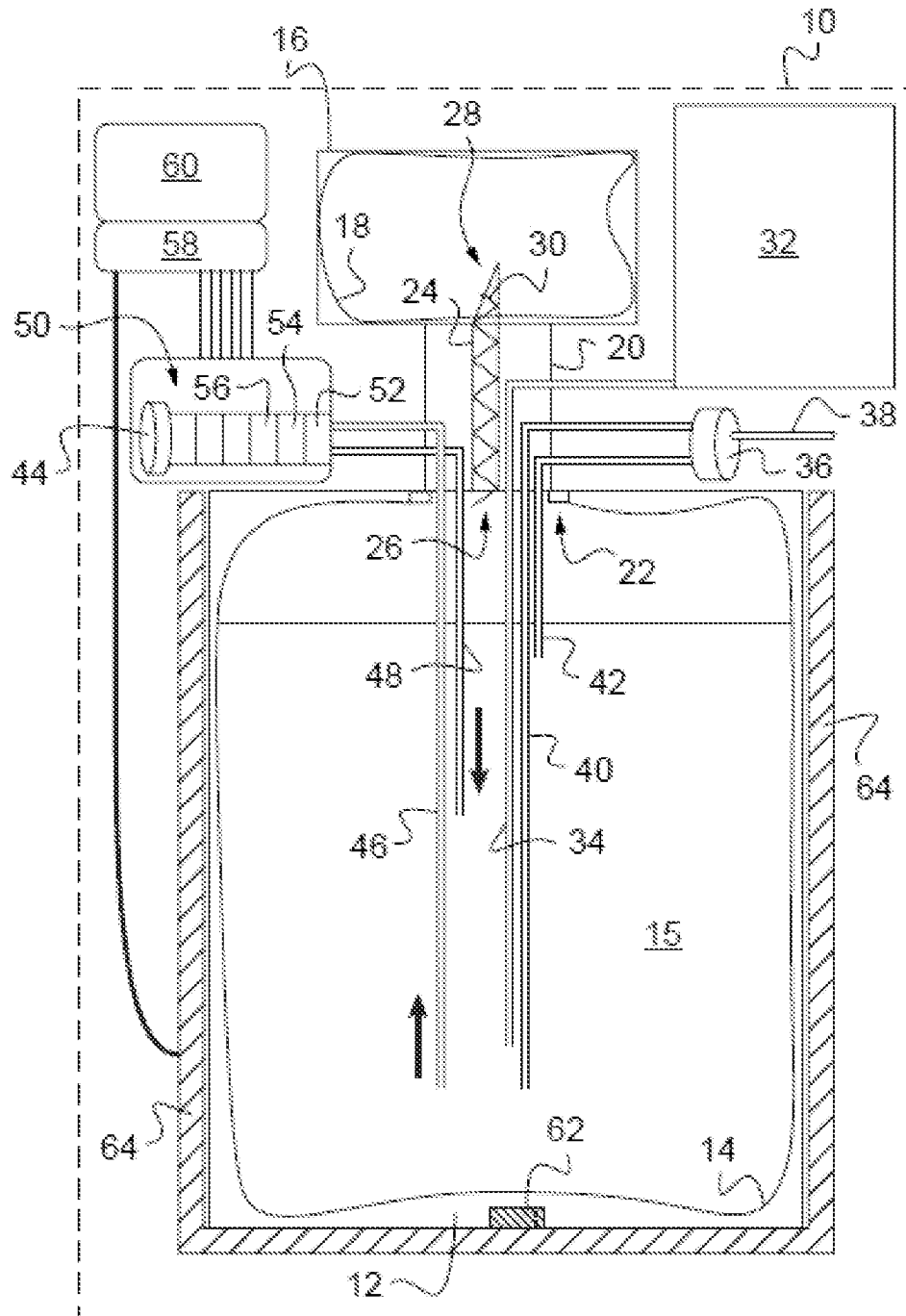
- en ce qu'on maintient le pH à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14) entre deux valeurs prédéterminées de pH lorsque les micro-organismes prolifèrent.
- [Revendication 8] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'on maintient la concentration en oxygène à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14) entre deux valeurs prédéterminées de concentration, lorsque les micro-organismes prolifèrent.
- [Revendication 9] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que lesdites première et deuxième enveloppes (14, 18) sont à usage unique.
- [Revendication 10] Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'on on fournit ladite première enveloppe (18) fermée contenant en outre, une souche additionnelle donnée de micro-organismes en état de dormance.
- [Revendication 11] Installation de production de micro-organismes (10) caractérisé en ce qu'elle comprend :
- un premier logement (16) pour recevoir une première enveloppe fermée (18) contenant une souche donnée de micro-organismes en état de dormance, ladite souche donnée de micro-organismes étant adaptée à promouvoir la croissance d'au moins une variété végétale prédéfinie dans un milieu donné ;
 - un deuxième logement (12) pour recevoir une deuxième enveloppe (14) indépendante de ladite première enveloppe (18) ;
 - un dispositif de raccordement (20) s'étendant entre lesdits premier (16) et deuxième (12) logements pour pouvoir raccorder ensemble ladite première enveloppe (18) et ladite deuxième enveloppe (14), et pour pouvoir transférer ladite souche de micro-organismes de ladite première enveloppe (18) à ladite deuxième enveloppe (14) ;
 - un dispositif d'introduction (32, 34) pour introduire des nutriments à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14), de façon à pouvoir provoquer la prolifération des micro-organismes à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe ; et,
 - on extrait ladite deuxième enveloppe (14) dudit deuxième logement (12) pour pouvoir récupérer les micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe et pour les mettre en contact avec ladite au moins une variété végétale prédéfinie et/ou ledit milieu donné.
- [Revendication 12] Installation de production selon la revendication 11, caractérisé en ce

que ledit dispositif d'introduction comprend un réceptacle (32) adapté à recevoir lesdits nutriments, et en ce que ledit réceptacle (32) est relié à ladite deuxième enveloppe (14) pour introduire lesdits nutriments à l'intérieur (15).

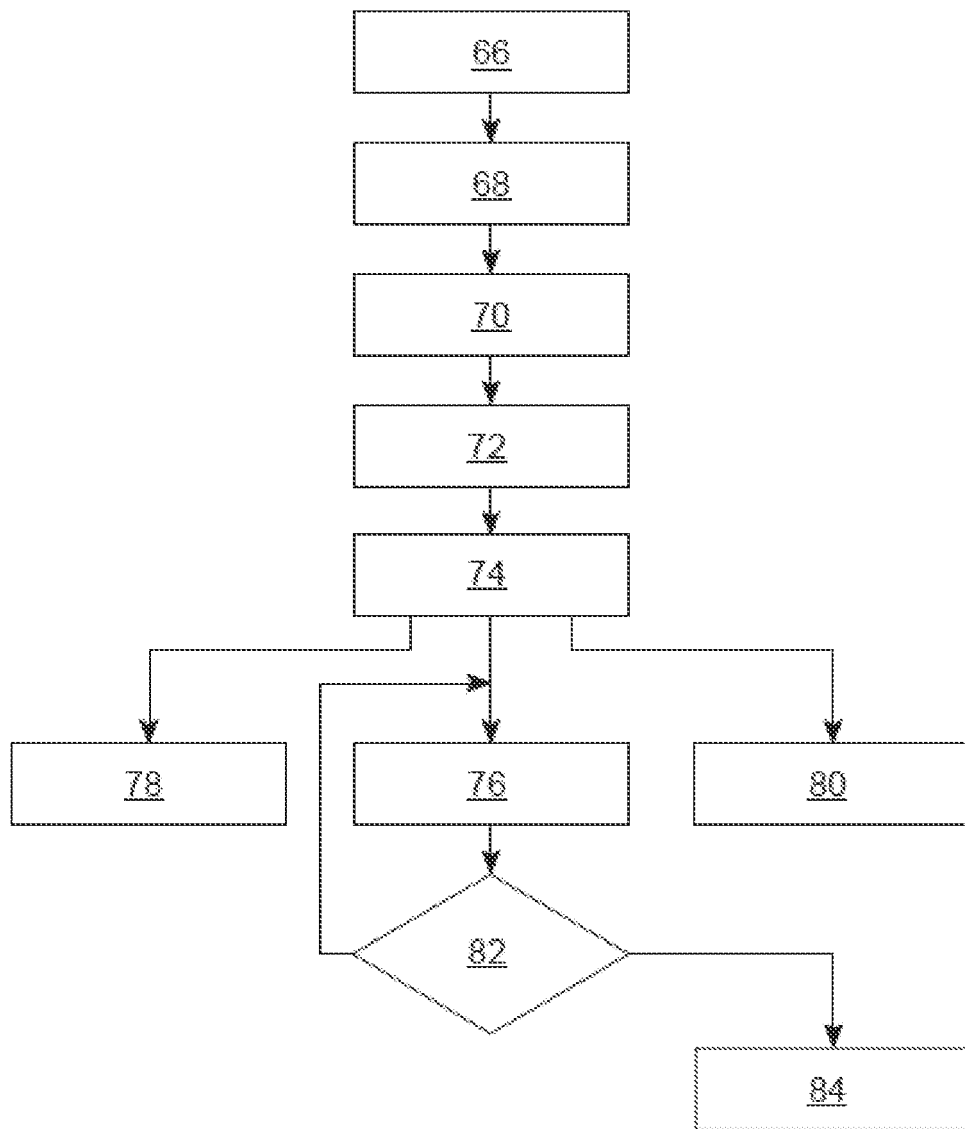
- [Revendication 13] Installation de production selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il comprend un spectrophotomètre (52) pour mesurer la quantité de micro-organismes ayant proliférés à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14).
- [Revendication 14] Installation de production selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend un organe de contrôle de la température (62, 64) situé autour dudit deuxième logement (14) pour porter la température de ladite deuxième enveloppe (14) à une valeur prédéterminée.
- [Revendication 15] Installation de production selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend des organes d'entraînement (36) pour entraîner en mouvement le contenu de ladite deuxième enveloppe (14).
- [Revendication 16] Installation de production selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend un organe d'injection (36, 38, 42) pour injecter un mélange aqueux à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14).
- [Revendication 17] Installation de production selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend un organe de mesure du pH (54) pour pouvoir maintenir le pH à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14) lorsque les micro-organismes prolifèrent, entre deux valeurs prédéterminées de pH.
- [Revendication 18] Installation de production selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend une sonde à oxygène (56) pour maintenir, à l'intérieur de ladite deuxième enveloppe (14), la concentration en oxygène entre deux valeurs prédéterminées de concentration, lorsque les micro-organismes prolifèrent.

[Fig. 1]

Fig.1



[Fig. 2]

Fig.2

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 920585
FR 2303848

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		
Y	WO 2019/003240 A1 (THE ENERGY AND RESOURCES INST TERI [IN]) 3 janvier 2019 (2019-01-03) * voir opinion *	1-18	C12M 1/00 C12M 1/04 C12M 1/36 C12N 1/20
Y	EP 0 124 193 A1 (OXOID LTD [GB]) 7 novembre 1984 (1984-11-07) * voir opinion *	1-18	
Y	YUAN YUAN ET AL: "Ecofriendly conversion of algal waste into valuable plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) biomass", WASTE MANAGEMENT, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 120, 29 octobre 2020 (2020-10-29), pages 576-584, XP086422000, ISSN: 0956-053X, DOI: 10.1016/J.WASMAN.2020.10.020 [extrait le 2020-10-29] * le document en entier *	1-18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	WO 2016/054222 A1 (UNIV AUBURN [US]; LILES MARK R [US]; KLOEPPER JOSEPH [US]) 7 avril 2016 (2016-04-07) * le document en entier *	1-18	C05F C05G C12M C12R C12N
Y	US 2019/300837 A1 (KIYAMA MASAHARU [JP] ET AL) 3 octobre 2019 (2019-10-03) * le document en entier *	1-18	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 décembre 2023		Landré, Julien	
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 2303848 FA 920585**

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 **07-12-2023**
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
WO 2019003240	A1	03-01-2019	AUCUN	

EP 0124193	A1	07-11-1984	AU 581841 B2	09-03-1989
			AU 618771 B2	09-01-1992
			CA 1220702 A	21-04-1987
			EP 0124193 A1	07-11-1984
			ES 8600387 A1	01-10-1985
			FI 840406 A	05-08-1984
			JP H0558718 B2	27-08-1993
			JP S59146599 A	22-08-1984
			US 5047331 A	10-09-1991

WO 2016054222	A1	07-04-2016	BR 112017006629 A2	03-07-2018
			CA 3000621 A1	07-04-2016
			CN 107205403 A	26-09-2017
			EP 3200590 A1	09-08-2017
			ES 2835731 T3	23-06-2021
			US 2017202888 A1	20-07-2017
			US 2020009200 A1	09-01-2020
			US 2022095628 A1	31-03-2022
			WO 2016054222 A1	07-04-2016

US 2019300837	A1	03-10-2019	CN 109563458 A	02-04-2019
			JP 6890389 B2	18-06-2021
			JP 2018033322 A	08-03-2018
			US 2019300837 A1	03-10-2019
			WO 2018042710 A1	08-03-2018
