

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 135 730**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **22 04751**

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 11/02** (2025.01), C 12 N 1/04, C 12 N 1/2/
C 12 R 1/00

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ Procédé de fabrication d'un support microbien, produit associé et son utilisation.

②② Date de dépôt : 18.05.22.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 24.11.23 Bulletin 23/47.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 11.07.25 Bulletin 25/28.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *AB7 INDUSTRIES SA — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *GARCIA Magali, THOMAS Paul et
MANON Yannick.*

⑦③ Titulaire(s) : *AB7 INDUSTRIES SA.*

⑦④ Mandataire(s) :

FR 3 135 730 - B1



Description

Titre de l'invention : Procédé de fabrication d'un support microbien, produit associé et son utilisation

- [0001] La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un support microbien. L'invention concerne également un produit issu de ce procédé, à savoir le support sur lequel des microorganismes sont immobilisés, ainsi que son utilisation.
- [0002] Le procédé selon l'invention vise à produire des supports sur lesquels sont immobilisés des microorganismes lesdits supports sont destinés à être utilisés dans diverses applications biologiques.
- [0003] De telles applications reposent sur l'emploi de microorganismes notamment dans les domaines de l'agriculture, de l'aérologie, du traitement des eaux, de la dépollution des sols, du traitement des surfaces, ou encore vétérinaire.
- [0004] Plus généralement, il convient de distinguer l'emploi de microorganismes libres ou sous forme planctonique par opposition à l'emploi de microorganismes sous forme non-libres, à savoir fixés ou immobilisés.
- [0005] En effet, il est connu que les formes non-libres de microorganismes peuvent être plus résistantes et plus persistantes au fil du temps pour une même espèce. Parfois, cette agrégation est susceptible de poser problème lorsqu'elle relève de microorganismes pathogènes, mais elle peut toutefois s'avérer être bénéfique avec des microorganismes non pathogènes que l'on décrit comme bénéfiques ou effecteurs.
- [0006] Ce bénéfice prend alors tout son sens dans le cadre de l'agriculture ainsi que dans la mise au point de nouvelles techniques phytosanitaires ou encore dans celle du biocontrôle chez la plante ou chez l'animal dans un contexte de premier plan qu'est celui de l'écologie et du respect de l'environnement.
- [0007] Il y a une nécessité de repenser à une agriculture raisonnée et à des traitements utilisant moins de pesticides et d'engrais de nature chimiques, en limitant les intrants du sol, mais il faut également se repositionner sur le biocontrôle pour limiter l'emploi d'antiparasitaire chimique chez les plantes ou les animaux. On connaît à ce titre, des microorganismes ayant des effets avérés sur des parasites ou qui agissent en tant que véritable agent de croissance ou de protection chez les plantes.
- [0008] Dans le domaine phytosanitaire, on trouve des produits de types bioinoculants ou biofertilisants sous forme de poudre ou de liquides destinés à l'épandage agricole. Ces produits nécessitent toutefois la répétition dans le temps des applications, ce qui entraîne une augmentation des coûts et la mobilisation plus fréquente de ressources. De plus, ces emplois ne donnent pas entièrement satisfaction car la viabilité des microorganismes pose problème et constitue un obstacle majeur avant et après utilisation.

- [0009] En effet, la population de microorganismes a tendance à chuter de manière drastique après emploi, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ceci.
- [0010] Concernant les formes liquides, il existe une certaine compétition entre le microbiote indigène du sol et les microorganismes exogènes, apportés lors du traitement. On peut ajouter à cela le stress subi par ces derniers, qui doivent s'adapter à un nouvel environnement pour survivre sous différentes contraintes telles que l'hygrométrie, les rayons ultraviolets (UV), le pH ou la pollution, on parle alors de la nécessité d'acclimatation.
- [0011] Concernant les formes en poudre des bioinoculants, les microorganismes sont mélangés à des poudres minérales ou inorganiques par exemple à base de talc, argiles ou alumino-silicate. Après avoir été cultivés en milieu humide ou liquide, ces derniers sont souvent soumis à une dessiccation ou une lyophilisation avant le mélange avec des poudres minérales puis épandage. Là encore, la viabilité cellulaire est contestée, les techniques actuelles étant trop agressives pour pouvoir prétendre à un produit biologique économique et stable dans la durée.
- [0012] Le développement de meilleures formulations pour assurer la survie et l'activité sur le terrain d'une part, et la compatibilité avec les traitements chimiques et biologiques d'autre part suscite une attention croissante. Les approches comprennent l'optimisation des conditions de croissance avant la formulation et le développement d'une technologie améliorée de support et d'application. A ce titre, maintenir la stabilité, l'efficacité et la viabilité des souches effectrices est un véritable défi qui doit se faire dans le respect des normes associées aux bioinoculants.
- [0013] Les techniques d'immobilisation sur support des microorganismes peuvent être une réponse dans diverses applications. Ainsi, il est entendu au sens de la présente demande que le procédé selon l'invention n'a pas de caractère limitatif concernant son champ d'application.
- [0014] Le développement de formulations ou produits doit prendre en compte le changement d'échelle, la durée de vie ainsi que la compatibilité avec les pratiques actuelles.
- [0015] Parmi les moyens connus utilisant des microorganismes sur support, on connaît des procédés d'encapsulation ou d'inclusion de microorganismes avec des poudres minérales contenant du milieu nutritif pour le développement des microorganismes après l'épandage. Mais la stabilité dans le temps reste inférieure à 5 mois, ce qui n'est pas satisfaisant.
- [0016] On retrouve également, en agriculture, des moyens visant la préservation des microorganismes de la rhizosphère, avec notamment l'emploi d'alginate sous forme de micro-billes. La matrice d'alginate recouvrant la graine doit assurer la protection et la libération des microbes sur le terrain, à proximité de la graine ou de la rhizosphère de

la plante.

- [0017] Les formulations encapsulées fournissent une protection physique contre les environnements difficiles ainsi qu'une structure tridimensionnelle sur laquelle les cellules peuvent adhérer mais celles-ci ne durent pas dans le temps. Toutes ces méthodes et procédés sont destinés à l'enrobage des semences. Malheureusement, il subsiste de nombreux inconvénients à cela.
- [0018] En effet, lors de l'application directe sur la graine ou sur les semences, la contrainte phytosanitaire impose un strict respect de certaines normes sanitaires à propos des microorganismes. La manipulation de microorganismes sur des graines concernant les denrées alimentaires doit pouvoir se faire en présence d'un antifongique, ce dernier ne rend pas propice le développement de tous les microorganismes, ce qui peut constituer un frein dans certaines applications.
- [0019] On peut également rajouter que le travail sur graine n'est pas sans risque pour le développement de la plante elle-même, des problèmes de germination sont fréquemment rencontrés parmi les grains enrobés ou traités. Il existe ainsi un besoin d'un moyen de préparation d'un produit à base de microorganisme, capable de répondre aux inconvénients cités, respectueux de l'environnement, qui puisse répondre à une problématique de viabilité et de stabilité dans le temps desdits microorganismes.
- [0020] Un but de l'invention est ainsi de fournir un procédé de fabrication d'un support microbien solide permettant une meilleure stabilité et viabilité des microorganismes au cours du temps. L'invention a aussi pour objet le produit obtenu par ce procédé et son utilisation dans l'amélioration de la survie des microorganismes dans le temps. Le support microbien de l'invention se définit par un support solide, qui après les différentes étapes du procédé, va servir de vecteur microbien.
- [0021] On entend par vecteur microbien, le support solide obtenu à l'issue du procédé de fabrication selon l'invention, qui va permettre l'apport d'une quantité de microorganismes dans diverses applications biologiques, notamment l'agriculture.
- [0022] Le procédé de fabrication du support microbien proposé par la demanderesse permet l'obtention d'un produit qui s'affranchit des obstacles précédents, et dont les applications sont multiples. Il est entendu que l'emploi du produit issu de ce procédé est non-limitatif au domaine agricole.
- [0023] Le procédé de fabrication d'un support microbien solide selon l'invention comprend les étapes suivantes :
- a. Préparation du support solide
 - b. Immobilisation des microorganismes sur le support
 - c. Séchage
- [0024] On entend par immobilisation, une adhérence de microorganismes sur le support, assimilable à un biofilm, et agissant comme un revêtement microbien stable. Il convient

au sens de la présente demande de définir l'immobilisation comme une adsorption ou absorption de microorganismes sur le support qui permet une fixation stable et efficace dans le temps de ces derniers. Par stable, on entend au sens de la présente demande, la capacité d'un microorganisme à se conserver ou à se renouveler dans le temps.

- [0025] Les supports solides selon l'invention peuvent être des matériaux poreux, susceptibles d'augmenter en volume lorsqu'ils sont mis en contact avec un liquide et qui ont une bonne tolérance à la dessiccation. Ces derniers doivent être facilement accessibles, physiquement et chimiquement stables, non toxiques à l'emploi, non toxiques pour les microorganismes, exempts de polluants, faciles à traiter, et éventuellement avoir une forte capacité de rétention d'humidité. Dans certaines applications selon l'invention, le support est choisi pour sa capacité à retenir l'eau. Avantageusement, les supports solides de l'invention ont une capacité de rétention d'eau supérieure ou égale à 0,8 fois leur poids.
- [0026] Les supports solides peuvent être choisis parmi les matériaux organiques, les matériaux fibreux, les polymères biodégradables ainsi que les matériaux d'origine végétale, et tout autre matériaux biosourcés ayant une bonne surface spécifique.
- [0027] Par bonne surface spécifique, on entend un rapport de la superficie de la surface réelle du matériau et du volume apparent de l'objet, suffisant pour permettre les phénomènes de surface tels que l'adsorption ou l'absorption des microorganismes. Idéalement, le support détient une bonne rugosité de surface pouvant se définir comme la capacité du matériau à être un support de microorganismes tout en étant poreux.
- [0028] Dans un mode de réalisation, les supports solides utilisés dans le procédé selon l'invention sont donc préférentiellement sous forme de granulés ou de copeaux dont la granulométrie est comprise entre 1500 μm et 5000 μm , préférentiellement entre 2000 μm et 4500 μm et encore plus préférentiellement entre 2500 μm et 3800 μm .
- [0029] Dans une variante, les supports peuvent également être des matériaux de type membrane notamment dans un contexte de support immergés dans un liquide ou encore des matériaux issus de l'impression en trois dimensions, lesdits matériaux pouvant être biosourcés.
- [0030] Dans un autre mode de réalisation, les supports solides ont une masse volumique comprise entre 100 kg/m^3 et 1200 kg/m^3 , ou encore entre 300 kg/m^3 et 500 kg/m^3 , préférentiellement entre 360 kg/m^3 et 460 kg/m^3 .
- [0031] Dans un mode de réalisation préféré, le support solide est un matériau biosourcé et biodégradable.
- [0032] Dans un mode de réalisation préféré de tous, le support solide est de la rafle de maïs.
- [0033] On entend par microorganismes, les organismes appartenant à la catégorie des bactéries, des champignons, des microalgues ou encore à celle des levures. Les supports selon l'invention peuvent ainsi servir à l'immobilisation de ces catégories de

microorganismes prises isolément ou sous forme de consortium. Ainsi le procédé selon l'invention peut permettre l'immobilisation de plusieurs espèces, ou catégories, sur un même support.

- [0034] Les bactéries susceptibles d'être immobilisées selon l'invention sont choisies parmi les genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Arthrospira*, *Limnospira*, *Aphanizomenon* ou leur mélange. Les bactéries préférées selon l'invention sont choisies parmi, *Bacillus Thuringiensis*, *Oenococcus oeni*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* ou leur mélange.
- [0035] Les champignons susceptibles d'être immobilisés selon l'invention sont choisis parmi les genres *Aspergillus* ou *Trichoderma*, préférentiellement *Aspergillus brasiliensis* et *Trichoderma harzianum* ou leur mélange.
- [0036] Les microalgues susceptibles d'être immobilisées selon l'invention sont choisies parmi les genres *Chlorella*, *Dunaliella*, *Odontella*, *Haematococcus*, *Scenedesmus*, *Porphyridium*, préférentiellement *Chlorella vulgaris* et *Haematococcus pluvialis* ou leur mélange.
- [0037] Les levures susceptibles d'être immobilisées selon le procédé de l'invention sont choisies parmi les levures, telles que le genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Candida* préférentiellement *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* ou leur mélange.
- [0038] Outre les microorganismes précédemment cités, le procédé selon l'invention n'exclut pas l'emploi de souches de probiotiques connues de l'homme du métier.
- [0039] Un mode de réalisation de l'invention a pour objet un procédé de fabrication d'un support microbien sur lequel peuvent être immobilisés des bactéries, des champignons, des levures, des microalgues ou un mélange de ceux-ci. Le support étant un support solide, préférentiellement de la rafle de maïs.
- [0040] Dans une variante préférée, l'invention concerne un tel procédé impliquant des bactéries ou des champignons sur de la rafle de maïs.
- [0041] La première étape du procédé selon l'invention est celle de la préparation du support. En effet, il est possible que des spores de microorganismes indésirables soient encore présents sur les supports. Or cette forme sporulante est plus résistante et par conséquent plus difficile à éliminer. Afin de garantir l'élimination de ces spores, la demanderesse a inclus dans cette première étape de préparation des supports, une étape de germination. On définit par germination le fait pour un microorganisme potentiellement présent sous forme de spore sur le support de départ, de sortir de son état de sporulation.
- [0042] Ladite étape de germination consiste, après rinçage des supports avec de l'eau et une première aseptisation, à la mise en place des supports humides pendant 6 h à 24 h à une

température comprise entre 20 °C et 40 °C dans un contenant fermé adéquat, que l'homme du métier saura choisir et adapter. Cette germination a pour but de faire germer les éventuelles spores de microorganismes indésirables qui seront alors à même d'être éliminés lors de l'aseptisation.

- [0043] Il est entendu au sens de l'invention que les moyens d'aseptisation des supports sont des moyens classiques et communément employés par l'homme du métier tels que l'utilisation de moyens de stérilisation thermique sèche ou humide, tel qu'un autoclave ou encore tout autre moyen équivalent connu de l'homme du métier.
- [0044] L'étape de préparation du procédé selon l'invention comporte au moins une étape d'aseptisation après germination. Dans une variante, il existe une étape d'aseptisation pré-germination et une étape d'aseptisation post-germination, ladite germination étant une étape intermédiaire entre deux phases d'aseptisation.
- [0045] La deuxième étape du procédé selon l'invention, est une étape d'immobilisation des microorganismes sur support solide. Cette étape d'immobilisation se décline en deux phases successives et complémentaires que sont l'inoculation, et l'incubation des supports dans une solution d'ensemencement. L'incubation permet en outre la croissance et la fixation des cellules sur le support.
- [0046] On entend par inoculation au sens de l'invention, l'action qui consiste à mettre en contact une solution d'ensemencement préalablement préparée, avec les supports obtenus au cours de la première étape du procédé, à savoir celle de la préparation du support.
- [0047] Par mise en contact, on entend l'immersion du support dans un volume adéquat d'une solution d'ensemencement.
- [0048] Afin d'assurer l'immobilisation optimale des microorganismes, la demanderesse a trouvé qu'un ratio préférentiel de 2,5 : 10, soit 2,5 g de supports pour 10 ml de solution d'ensemencement permettait une immobilisation durable des microorganismes sur lesdits supports.
- [0049] Ladite solution d'ensemencement est constituée d'un mélange d'une suspension de microorganisme et d'un milieu minimum appauvri. Cette solution d'ensemencement peut être définie et comprise comme servant à l'immobilisation selon le procédé de l'invention.
- [0050] La solution d'ensemencement peut ainsi être constituée par un mélange d'un milieu minimum appauvri avec une suspension de microorganisme. Dans une variante, la solution d'ensemencement peut également être constituée par un mélange d'un milieu minimum appauvri avec une culture de microorganisme.
- [0051] Par suspension de microorganisme, on entend un mélange de microorganismes avec un diluant aqueux isotonique connu de l'homme du métier tel qu'un diluant de type tryptone-sel, ou encore un mélange de microorganismes avec un milieu de culture ou

tout autre diluant équivalent connu de l'homme du métier.

- [0052] On entend par milieu minimum appauvri un milieu minimum connu de l'homme du métier, dans lequel la demanderesse a diminué la quantité totale de carbone et possiblement la quantité d'oligo-éléments. Il s'agit d'un milieu minimum appauvri en nutriments.
- [0053] Avantageusement, l'emploi de ce milieu permet de provoquer un stress bénéfique parmi les microorganismes employés dans le présent procédé, ces derniers vont en effet avoir tendance à modifier leur comportement et leur métabolisme pour survivre.
- [0054] Ces variantes, non limitatives, permettent la déclinaison du procédé selon l'invention à une large diversité de microorganismes.
- [0055] Les microorganismes étant sensibles aux conditions de l'environnement, la demanderesse a pu constater que le pH avait tendance à diminuer avec l'ajout d'un support biosourcée, notamment la rafle de maïs. Pour contrecarrer l'acidité relative à l'emploi de tels supports solides, la demanderesse propose donc une inoculation desdits supports avec une solution d'ensemencement contenant du carbonate ou des espèces carbonatées dans une concentration préférentiellement comprise entre 4 et 15 mmol/L.
- [0056] Les carbonates et les espèces carbonatées utilisable dans l'invention peuvent être choisis parmi les ions carbonates (CO_3^{2-}), les ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-), l'acide carbonique (H_2CO_3) ou leur mélange.
- [0057] L'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) ou le carbonate de calcium (CaCO_3) sont les carbonates alcalins préférés au sens de l'invention.
- [0058] Dans un mode de réalisation préférentiel, l'immobilisation des microorganismes sur les supports s'effectue avec une solution d'ensemencement constituée d'un mélange contenant une suspension de microorganismes, un milieu minimum appauvri dans un ratio équivalent en volume respectif de 5 : 95 (v/v) ainsi que l'ajout de 0.067 % en poids de ce mélange de carbonate de sodium (NaHCO_3). Il est entendu au sens de l'invention que ce ratio est modulable en fonction de la quantité et de la nature du support.
- [0059] Afin de finaliser l'étape d'immobilisation, il convient d'incuber le mélange constitué par les supports et la solution d'ensemencement. Cette étape va permettre l'adhésion des microorganismes sur le support par adsorption et/ou absorption ainsi que leurs croissances.
- [0060] Par incubation, on entend le maintien des microorganismes dans des conditions favorables de croissance. Les conditions d'incubation au sens de l'invention comprennent une température d'incubation comprise entre 20 °C et 37 °C, une durée d'incubation comprise entre 8 h et 10 j avec agitation ou recirculation, s'il y a lieu.
- [0061] Les durées d'incubation peuvent être comprises entre 8 h et 240 h, entre 8 h et 216 h,

entre 8 h et 192 h, entre 8 h et 168 h, entre 8 h et 144 h, entre 8 h et 120 h, entre 8 h et 96 h, entre 8 h et 72 h, préférentiellement entre 8 h et 48 h. et encore plus préférentiellement entre 24 h et 48 h.

- [0062] Il est entendu que ces conditions s'appliquent à des microorganismes vivants, et qu'il s'agira de moduler celles-ci en fonction du microorganisme concerné.
- [0063] Au sens de l'invention, il est défini de manière indifférenciée, que les supports immobilisés sont considérés comme étant des supports obtenus à la fin de l'incubation.
- [0064] La troisième étape du procédé selon l'invention concerne le séchage. Les supports immobilisés doivent être séchés pour être conditionnés. C'est une étape critique qui s'affranchit de la lyophilisation et autre procédé délétère pour la survie des microorganismes. En effet, la lyophilisation et les procédés connus posent problème quant à la survie des microorganismes. Dans le cadre de la lyophilisation, on observe une baisse conséquente du pourcentage de survie des microorganismes lors du séchage et du stockage sous forme lyophilisée qui est un moyen classiquement utilisé pour préserver ces derniers avant leur emploi.
- [0065] Avantagusement, le procédé selon l'invention permet de maintenir un pourcentage de survie moyen au moins deux fois supérieur à celui obtenu avec des microorganismes lyophilisés au bout d'un an.
- [0066] Le séchage peut se faire à l'aide d'une étuve sous vide ou tout autre moyen de séchage équivalent et adapté que l'homme du métier saura employer.
- [0067] Ainsi, la demanderesse a pu mettre au point des conditions de séchage permettant l'obtention d'un support solide ayant une teneur en eau résiduelle comprise entre 7 % et 25 % en poids total de support, préférentiellement entre 15 et 23 %. De manière surprenante, la demanderesse a trouvé qu'une humidité résiduelle était nécessaire pour assurer la viabilité cellulaire.
- [0068] Cette teneur en eau résiduelle assure un bon maintien de l'adhérence des microorganismes sur le support et leur survie durant les périodes de stockage.
- [0069] Il est entendu au sens de l'invention que les paramètres de séchage sont dépendants de l'appareillage et des souches employés.
- [0070] De bons résultats ont été obtenus lorsque les conditions de séchage comprenaient une température comprise entre 0 °C et 45 °C, une durée de séchage comprise entre 2 h et 12 h, ainsi qu'une pression allant de 15 mbar à 100 mbar.
- [0071] La demanderesse a pu mettre en évidence que les meilleurs résultats étaient obtenus lorsque les conditions de séchage réunissaient cumulativement les paramètres suivants : une température de 35 °C, une durée de séchage de 4 h et une pression de 30 mbar. La teneur en eau résiduelle moyenne obtenue après séchage sous ces conditions est de 21 %.
- [0072] La mesure de la teneur en eau résiduelle s'effectue après l'obtention des supports

selon le procédé, en séchant lesdits supports à 105 °C jusqu'à obtention d'une masse stable.

- [0073] Grâce à ce procédé, la demanderesse a pu mettre au point un moyen efficace pour préserver la viabilité cellulaire des microorganismes, et cela tout particulièrement en ce qui concerne les bactéries inoculées sur de la rafle de maïs.
- [0074] Le procédé selon l'invention permet une immobilisation homogène et durable qui se traduit par un maintien d'au moins 50 % de la survie des microorganismes après stockage pendant 12 mois.
- [0075] Le procédé de fabrication de support microbien ainsi que ledit support microbien seront mieux compris à travers les exemples et les figures.
- [0076] Exemple 1 : Déroulement du procédé selon l'invention avec la souche *P.fluorescens* sur de la rafle de maïs
- [0077] 1.Préparation des supports
- [0078] Le support solide utilisé pour cet essai est de la rafle de maïs commercialisée sous le nom Eu-Grits 6/8 par Eurocob®.
- [0079] Une bouteille en verre de 500 ml est remplie à 1/3 de son volume avec la rafle rincée à l'eau avant autoclavage pendant 25 min à 121 °C. Cette bouteille est ensuite fermée et incubée pendant 12 h à 30 °C, pour faire germer les spores indésirables potentiellement contenus sur le support.
- [0080] Des erlenmeyers de 250 ml sont remplis avec 25 g de rafle de maïs et autoclavés une nouvelle fois. Les erlenmeyers avec supports sont ensuite laissés ouverts sous poste de sécurité microbiologique pendant 15 min.
- [0081] Avant de procéder à l'immobilisation, une solution d'ensemencement de *P.fluorescens* est ensuite préparée par repiquage de la souche sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé TSA et incubé 24 h à 30 °C. Les colonies sont ensuite prélevées et suspendues dans 20 ml de bouillon Tryptone-Sel.
- [0082] 2. Inoculation et incubation des supports
- [0083] Les supports sont mis en contact avec un mélange contenant 95 ml de milieu minimum appauvri, 0.067 % de carbonate de sodium (NaHCO₃) et 5 ml de la suspension bactérienne de *P.fluorescens* préalablement préparée, ce mélange constituant la solution d'ensemencement.
- [0084] Le tout est ensuite incubé pendant 48 h à 30 °C avec une agitation de 150 tour/min et une excentration de 5 cm.
- [0085] 3.Séchage
- [0086] 1 g de support inoculé est prélevé dans les erlenmeyers, puis les supports sont disposés dans une boîte de pétri de diamètre de 55 mm. Ces dernières sont mises à sécher en étuve sous vide 4 h à 35 °C sous une pression de 30 mbar.
- [0087] Exemple 2 : Etude comparative de la survie des microorganismes issus de la lyophi-

lisation et ceux issus du procédé selon l'invention

- [0088] Afin de comparer l'efficacité du procédé de l'invention dans le maintien de la survie des microorganismes au cours du temps, une souche de bactéries *Pseudomonas fluorescens* immobilisée selon le procédé de l'invention a été comparée avec cette même souche commercialisée sous forme lyophilisée.
- [0089] Après séchage, chaque prélèvement de 1 g séché est stocké dans un flacon en polypropylène (PP) stérile placé à l'obscurité. A chaque temps de stabilité, deux prélèvements de 1 g sont analysés. Ces prélèvements sont ensuite placés dans 9 ml de tryptone-sel puis soumis à un vortex pendant 1 min avant d'être mis au bain ultrason pendant 10 min. La suspension obtenue est diluée en cascade et les dilutions sont dénombrées en surface sur milieu gélosé TSA, puis incubées à une température comprise entre 30 et 32 °C pendant 24 h.
- [0090] Après l'incubation, les colonies sont comptées afin de déduire le pourcentage de survie. Pour finir, la moyenne des concentrations bactériennes des deux prélèvements analysés est effectuée.
- [0091] Ces résultats montrent que, lorsque les bactéries sont lyophilisées, le taux de survie chute drastiquement au cours des 10 premières semaines, avec une perte à plus de 50 % de survie bactérienne. En revanche, lorsque les bactéries sont immobilisées, la perte de 50 % de survie bactérienne apparaît seulement au bout de 30 semaines.
- [0092] Sur une année complète, soit environ 52 semaines, ces résultats sont d'autant plus probants sur l'efficacité du procédé de la demanderesse dans le maintien de la survie des bactéries.
- [0093] En effet, la survie moyenne reste aux alentours des 50 % après un an pour l'immobilisation alors qu'elle ne cesse de décroître pour la lyophilisation pour atteindre 10 % après un an.
- [0094] Ces résultats montrent ainsi que le procédé de la demanderesse permet le maintien de la survie dans le temps des microorganismes.
- [0095] [Fig.1] montre un comparatif du pourcentage de la survie de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* immobilisée sur la rafle de maïs selon le procédé de fabrication du support microbien de l'invention et de cette même souche sous forme lyophilisée.
- [0096] L'invention concerne un procédé de fabrication d'un support microbien solide comprenant les étapes suivantes :
- [0097] - Préparation d'un support solide, dans laquelle on effectue une étape de germination et qui comprend au moins une phase d'aseptisation ;
- [0098] - Immobilisation des microorganismes par inoculation puis incubation du support à l'aide d'une solution d'ensemencement comprenant un milieu minimum appauvri ;
- [0099] - Séchage, dans laquelle la température est comprise entre 0 °C et 45 °C, la durée de séchage comprise entre 2 h et 12 h et dans laquelle la pression est comprise entre

15 mbar et 100 mbar.

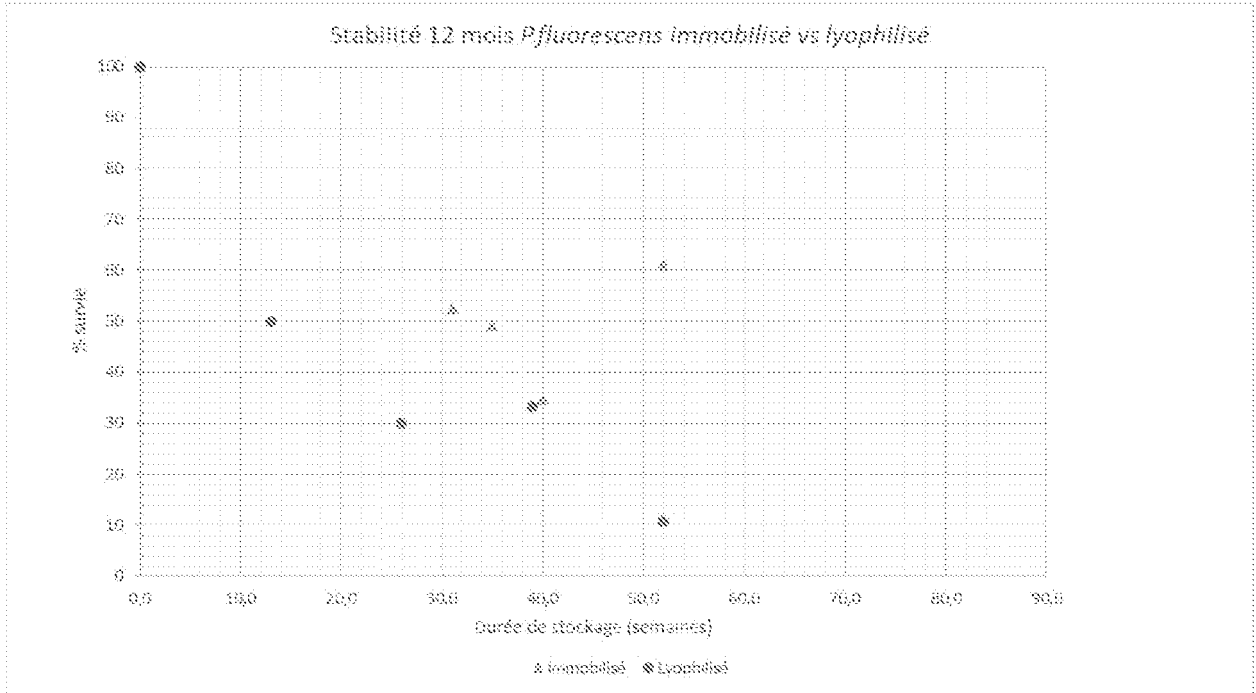
- [0100] Dans une variante, au cours de l'étape de préparation du support, la germination s'effectue à une température de 30 °C pendant 12 h à 24 h, ladite germination étant une étape intermédiaire entre deux phases d'aseptisation.
- [0101] Dans l'étape d'immobilisation, la solution d'ensemencement est constituée par un mélange d'un milieu minimum appauvri et d'une suspension de microorganisme. Dans une variante de cette étape, la solution d'ensemencement est constituée par un mélange d'un milieu minimum appauvri et d'une culture de microorganisme.
- [0102] Dans un mode de réalisation du procédé, les supports sont inoculés avec la solution d'ensemencement dans un volume proportionnel au poids de supports équivalent à un ratio respectif de 2,5 : 10 (p/v).
- [0103] Dans une variante de ce mode de réalisation, la solution d'ensemencement de l'étape de d'inoculation comporte en outre des carbonates ou des espèces carbonatées.
- [0104] Dans un autre mode de réalisation, la solution d'ensemencement est un mélange contenant une suspension de microorganismes, un milieu minimum appauvri dans un ratio équivalent en volume respectif de 5 : 95 (v/v) ainsi que 0.067 % en poids total dudit mélange (p/v) en carbonate alcalin.
- [0105] Dans une variante de réalisation, l'incubation de l'étape d'immobilisation a lieu après l'inoculation et s'effectue à une température comprise entre 20 °C et 37 °C, sur une durée comprise entre 8 h et 240 h.
- [0106] Dans une autre variante du procédé, l'étape de séchage est effectuée à une température de 35 °C, pour une durée de séchage de 4 h et à une pression de 30 mbar.
- [0107] Selon un mode de réalisation, le support solide est un matériau biosourcé et biodégradable de granulométrie moyenne comprise entre 1500 µm et 5000 µm.
- [0108] Dans une variante, le support solide est de la rafle de maïs.
- [0109] Les microorganismes susceptibles d'être utilisés dans le procédé de l'invention sont choisis parmi les bactéries, les champignons, les levures, les microalgues, les probiotiques ou leur mélange.
- [0110] L'invention concerne également les supports solides obtenus au cours du procédé, et leur utilisation pour améliorer la survie des microorganismes dans le temps.

Revendications

- [Revendication 1] Procédé de fabrication d'un support microbien solide comprenant les étapes suivantes :
- Préparation d'un support solide, dans laquelle on effectue une étape de germination des spores de microorganismes indésirables comprenant au moins une phase d'aseptisation ;
 - Immobilisation des microorganismes par inoculation puis incubation du support à l'aide d'une solution d'ensemencement constituée par un mélange d'un milieu minimum appauvri et d'une suspension de microorganisme, l'inoculation consistant en l'immersion dudit support avec ladite solution d'ensemencement ;
 - Séchage, dans laquelle la température est comprise entre 0 °C et 45 °C, la durée de séchage comprise entre 2 h et 12 h et dans laquelle la pression est comprise entre 15 mbar et 100 mbar.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, dans lequel au cours de l'étape de préparation du support, la germination s'effectue à une température de 30 °C pendant 12 h à 24 h, ladite germination étant une étape intermédiaire entre deux phases d'aseptisation.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel au cours de l'étape d'immobilisation, la solution d'ensemencement est constituée par un mélange d'un milieu minimum appauvri et d'une culture de microorganisme.
- [Revendication 4] Procédé selon la revendication 1 ou 3, dans lequel on inocule les supports avec la solution d'ensemencement avec un volume proportionnel au poids de supports équivalent à un ratio respectif de 2,5 : 10 (p/v).
- [Revendication 5] Procédé selon la revendication 4, dans lequel la solution d'ensemencement de l'étape d'inoculation comporte en outre des carbonates ou des espèces carbonatées.
- [Revendication 6] Procédé selon les revendications 1 à 5, dans lequel la solution d'ensemencement est un mélange contenant une suspension de microorganismes et un milieu minimum appauvri dans un ratio équivalent en volume respectif de 5 : 95 (v/v) ainsi que 0.067 % en poids total dudit

- mélange (p/v) en carbonate alcalin.
- [Revendication 7] Procédé selon les revendications 1 à 6, dans lequel l'incubation de l'étape d'immobilisation s'effectue à une température comprise entre 20 °C et 37 °C, sur une durée comprise entre 8 h et 240 h.
- [Revendication 8] Procédé selon les revendications 1 à 7, dans lequel au cours de l'étape de séchage, la température est de 35 °C, la durée de séchage de 4 h et la pression de 30 mbar.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le support solide est un matériau biosourcé et biodégradable de granulométrie moyenne comprise entre 1500 µm et 5000 µm.
- [Revendication 10] Procédé selon la revendication 9, dans lequel le support solide est de la rafle de maïs.
- [Revendication 11] Procédé selon les revendications 1, 9 ou 10, dans lequel les microorganismes sont choisis parmi les bactéries, les champignons, les levures, les microalgues, les probiotiques ou leur mélange.

[Fig. 1]



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

SISO M ET AL: "Kluyveromyces lactis immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis",
ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US,
vol. 16, no. 4, 1 avril 1994 (1994-04-01),
pages 303-310, XP023670117,
ISSN: 0141-0229, DOI:
10.1016/0141-0229(94)90171-6
[extrait le 1994-04-01]

WO 2020/043959 A1 (AB7 INNOVATION [FR])
5 mars 2020 (2020-03-05)

WO 2019/089730 A1 (LOCUS IP CO LLC [US])
9 mai 2019 (2019-05-09)

BASHAN YOAV ET AL: "Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)",
PLANT AND SOIL, SPRINGER INTERNATIONAL PUBLISHING, CHAM,
vol. 378, no. 1,
19 novembre 2013 (2013-11-19), pages 1-33,
XP035333643,
ISSN: 0032-079X, DOI:
10.1007/S11104-013-1956-X
[extrait le 2013-11-19]

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT