



REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SECRETARIAT D'ETAT A LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

INSTITUT SENEGALAIS
DE RECHERCHES AGRICOLES

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES
AGRONOMIQUES
BAMBEY

Collection : **ÉTUDES TECHNIQUES** DU C.N.R.A.

(JW / ID)

DOCUMENT N. 82 / 110

NOVEMBRE 82

CW 0700867
FO 22/P342
WEY

*MISE AU POINT D'UN SYSTEME SIMPLIFIE
DE PRODUCTION D'INOCULUM*

CONCEPTION D'UN ATELIER DE PRODUCTION SEMI-INDUSTRIEL

PAR

J. WEY

INGENIEUR IRAT DETACHE AUPRES DE L'ISRA

COLLABORATION TECHNIQUE : A. DIABAYE - D. TOURE

Le développement des cultures de légumineuses d'introduction récente (cas du soja au Sénégal) ou l'amélioration du système fixateur d'azote des légumineuses traditionnelles, nécessite souvent l'utilisation d'inoculum bactérien contenant du rhizobium.

Il existe sur les marchés internationaux, divers produits de qualités variées, et dont certains donnent satisfaction.

Cependant, en raison des difficultés d'approvisionnement, ainsi que du caractère périssable de l'inoculum, il s'est rapidement avéré préférable de produire l'inoculum dans le pays utilisateur.

Les fermenteurs classiquement utilisés dans les laboratoires, sont fort coûteux, et souvent inadaptés aux conditions techniques précaires des pays en voie de développement.

Dans cette optique, le laboratoire de rhizobiologie de Bambey (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Sénégal) a étudié et mis au point un système simplifié de fermenteurs, qui, utilisés en série, peuvent constituer un petit atelier de production à l'échelle semi-industrielle.

1 - CONCEPTION DU FERMENTEUR

11 - Rappel des principales exigences spécifiques pour la culture du rhizobium

+ Milieu de culture : Il se caractérise par sa richesse en éléments nutritifs ; on préconise, en particulier pour le rhizobium à croissance lente le milieu YEM (J.M. VINCENT, 1970, BURTON, 1967) qui se compose de $K_2 HPO_4$ 0,5 g, $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0,2 g, $CaCO_3$ 0,1 g. Mannitol 10 g, extrait de levure (difco) 1 g ou eau de levure 200 ml, eau distillée qsp 1000 ml, dont le pH est ajusté à 6,8. La source de carbone (Mannitol) peut être remplacé par l'arabinose pour les souches japonicum et lupini (GRAHAM, 1963). Pour une production à grande échelle, il est même préférable d'utiliser le sucrose (DATE *ond al*, 1975).

+ Oxygénation du milieu : Le rhizobium est une bactérie aérobie, qui nécessite une aération continue. Une agitation rotative peut convenir dans le cas d'une quantité réduite de milieu de culture (inférieure 2 l) et si sa surface de contact du milieu de culture avec l'air ambiant est grande. Par contre, pour des volumes plus importants, il est nécessaire d'oxygéner le milieu par un flux d'air stérilisé. SKINNER (1969), préconise jusqu'à 120 litres d'air par litre de milieu et par heure. ROUGHLEY (1970) pense que 5 litres par litre de milieu et par heure seraient suffisants.

+ Température de culture : La température d'incubation du rhizobium n'est pas un facteur limitant déterminant. Maintenir cependant la culture à une température optimale permet de réduire notablement le temps de culture, donc les risques de contamination. On considère que 25 à 30°C est une température convenant à presque toutes les souches de rhizobium. BURTON (1967) propose des températures de l'ordre de 30 à 32° particulièrement pour les souches "Tropicales", à croissance lente.

+ Inoculation du milieu et durée de la culture : Une inoculation massive du milieu de culture permet d'atteindre rapidement la phase exponentielle de la multiplication bactérienne et la concentration maximum de cellules viables. DATE (1975) propose d'utiliser un pied de cuve de 0,1 à 1 % du volume du milieu de culture à inoculer.

Les souches de rhizobium à croissance rapide atteignent leur concentration maximum de cellules viables en 36-72 heures (temps de génération 4 heures), et celles à croissance lente en 108-192 heures (temps de génération 6-12 heures). Il convient donc d'interrompre la fermentation dès que ce niveau maximum est atteint, soit une concentration de l'ordre de 2 à 9

12 - Descriptif d'un module de production d'inoculum (schéma n° 1 et 2)

121 - La cuve de production est un cylindre étanche, en acier inoxydable (paroi : 1,5 mm épaisseur) dont le fond est constitué d'un plateau du même matériau, mais d'épaisseur supérieure (4 à 6 mm), de façon à obtenir un fond le plus plat possible. Le couvercle (6 à 6,5 mm épaisseur) est également plat et rendu solidaire de la cuve par un système de colle nette et de vis, l'étanchéité étant assurée par un joint torique.

Les dimensions approximatives de la cuve sont données dans le tableau qui suit :

Volume utile (1)	Diamètre de la cuve (mm)	Profondeur de la cuve (mm)	Volume global (l)
20	280	400	24,6
35	340	450	40,9
50	360	600	61,1

Les dimensions des cuves sont établies en tenant compte des dimensions classiques des autoclaves utilisés dans les laboratoires.

Des cuves de volume plus important (jusqu'à 100 l) se sont montrées de manutention très difficile; à moins d'utiliser des moyens mécaniques conséquents.

122 - L'oxygénation du milieu nutritif est réalisée généralement par agitation pour les volumes de milieu réduit, ou par barbotage d'air pour des volumes plus importants.

Après plusieurs essais de bullage avec et sans agitation simultanée du milieu, on a remarqué que :

- l'agitation trop forte et une aération excessive, conduisent à la formation de mousses abondantes, et augmentent les risques de contamination malgré la présence des filtres d'air.

- une oxygénation insuffisante et sans agitation du milieu ralentit notablement la multiplication des rhizobium.

Nous avons donc retenu une oxygénation modérée (1 à 1,5 l/mn/fermentour) dont on augmente l'efficacité par un microbullage obtenu à l'aide d'un verre fritté (ϕ pores : 150 à 200 μ) dont la partie poreuse est orientée vers le haut, et placé excentriquement par rapport à l'axe

Les bulles d'air ainsi formées sont entraînées par l'agitation circulaire modérée (100-150 tours/mn) induite par un barreau magnétique (Longueur 100 m, \varnothing 28 mm). L'air est stérilisé par passage à travers un filtre Whatman (\varnothing pores : \varnothing pores 0,3 μ) que l'on peut éventuellement doubler par mesure de précaution pour assurer une parfaite stérilisation de l'air .

L'air nécessaire est fourni par un compresseur à sec préférable au compresseur "à l'huile" dont l'air propulsé est facilement pollué.

Mais ces compresseurs ne sont jamais à l'abri d'une panne éventuelle qui immobilise totalement l'atelier, puisqu'il est commun à l'ensemble des modules de production. Nous avons donc cherché à individualiser le fonctionnement de chaque fermenteur en adjoignant un petit compresseur à chaque module.

Différents modèles ont été testés. Notre choix s'est porté sur les compresseurs à membrane de type "pompe d'aquarium", qui d'une part répondent aux qualités requises pour la production d'inoculum, et d'autre part présentent une souplesse d'utilisation incontestable et un faible prix de revient.

123 - La régulation thermique n'est pas indispensable si la température ambiante du fermenteur reste constante et voisine de 25 à 28°C pour les souches dites "tempérées", et de 30°C pour les souches "tropicales".

A température supérieure, une climatisation de la pièce s'impose.

Par contre, si la température ambiante est inférieure à 25°C, même occasionnellement, il est alors indispensable de prévoir la régulation thermique du milieu.

Plusieurs systèmes de régulation ont été testés :

- plonger la cuve dans un bain-marie est un système couramment utilisé, mais présente comme inconvénients majeurs du rendre difficile l'agitation magnétique, et de ne pas être très commode d'utilisation en particulier pour les fermenteurs de gros volume.

- l'agitateur chauffant muni d'une thermosonde permet également de réguler le milieu de culture, mais la précision n'est ni constante ni fiable ; car ce principe de régulation est très sensible à toute variation de tension du réseau électrique.

Le système le plus avantageux semble être la résistance plongeante commandée par une thermomètre à contact. Ces éléments sont introduits dans des gaines prévues à cet effet dans le couvercle, et également excentrées par rapport à l'axe du couvercle.

2 - MISE EN FONCTIONNEMENT D'UN MODULE DE PRODUCTION

21 - Préparation du fermenteur et stérilisation (Schéma 3)

Après introduction du milieu nutritif dans la cuve (jusqu'à 10 cm du bord supérieur maximum, on fixe le couvercle à l'aide des écrous de verrouillage.

Le tube d'entrée d'air est obturé entre le couvercle et la filtra, ce dernier restant ouvert sur l'extérieur ;

La sortie d'air est équipée d'une fiole, connectée à un filtre. La sortie d'air est maintenue ouverte de façon à permettre l'équilibre de pression entre le milieu ambiant et l'intérieur de la cuve ;

La sonde de prélèvement est obturée, ainsi que le tube d'inoculation.

L'ensemble est introduit dans l'autoclave, et stérilisé à la chaleur humide à 120°C. Il est conseillé de procéder systématiquement 4 deux autoclavages espacés d'une période de refroidissement de 6 à 8 heures.

La durée de chaque autoclavage est fonction du volume du milieu nutritif.

2 x 1 heure pour des volumes de 20 litres

2 x 1 heure 30 pour des volumes de 20 à 40 litres

2 x 2 heures pour des volumes de 50 litres.

Après stérilisation on laisse refroidir le fermenteur.

22 - Inoculation du milieu de culture (Schéma 4)

Le fermenteur est placé devant la hotte à flux laminaire, de façon à pouvoir introduire l'extrémité de la sonde d'inoculation dans l'enceinte stérile.

Le pied de cuve est également placé dans cette enceinte stérile. Il est recommandé toutefois, pour faciliter les manipulations de prévoir un tube d'inoculation et une sortie latérale souple du pied de cuve suffisamment long, de façon à permettre leur jonction devant un bec BUNSEN sans avoir à manipuler le pied de cuve, ni à intervenir directement sur le fermenteur. Une personne seule, peut dans ce cas effectuer l'inoculation du milieu de culture.

Opération 1 :

Stériliser à la flamme les extrémités du tube d'inoculation du fermenteur et de la sortie latérale du pied de cuve. Dégager les orifices (4) et (6) et effectuer l'inoculation du milieu de culture.

Opération 2 :

Supprimer les pinces d'obturation (2) et (7).

Opération 3 :

Transvaser le pied de cuve en plaçant le contenant 50 cm au-dessus du fermenteur. L'inoculum s'écoulera progressivement dans le fermenteur.

Opération 4 :

Le transfert terminé, on remplace la pince (2) et on déconnecte le pied de cuve. L'embout placé en aval de la pince (2) est rincé à l'alcool.

Opération 5 :

Introduira stérilement le liquide aseptisant (chlorure mercurique 1‰ ou eau de Javel). Enlever le filtre d'air.

23 - La production d'inoculum

231 - Mise en route

Le fermenteur ainsi préparé, est posé sur l'agitateur magnétique qui est aussitôt mis en action ; le compresseur est connecté sur l'entrée d'air et mis en marche. Ouvrir le circuit d'aération en débrayant la pince (1).

En cas de nécessité de thermo-régulation, on insère la résistance et le thermomètre à contact dans les gaines plongeantes prévues sur le couvercle du fermenteur, puis on ajuste la température souhaitée. La mise en température du milieu doit être progressive.

232 - Prélèvement d'un échantillon de milieu de culture

Il suffit de desserrer la pince (3), et obturer quelques secondes la sortie d'air. Le milieu de culture s'écoule dans l'ampoule de récupération ; fermer ensuite la pince (3) et ouvrir (5), le milieu s'écoule. Il est préférable, après cette opération, de rincer l'ampoule avec de l'alcool à 90°, en l'injectant par le tube d'écoulement à l'aide d'une **piasette**.

233 - Vidange du fermenteur

Tout en laissant le système en fonctionnement (aération, agitation), on procède à la vidange du contenu de la cuve par la sonde de prélèvement, en opérant de la même façon que pour la prise d'échantillon ; il convient cependant de couper préalablement le système de régulation thermique.

Si l'on souhaite aussitôt utiliser la culture liquide (préparation d'inoculum tourbe par exemple), il suffit de connecter une éprouvette jaugée stérile sur le tuyau d'évacuation, et d'effectuer le transfert du fermenteur dans l'éprouvette comme indiqué précédemment, et de cette dernière

24 - Capacité de production d'un module

Si l'on considère que le module est mis en fonctionnement pendant 5 mois consécutifs (viabilité de l'inoculum sur support tourbe de 6 mois à 1 an), et à raison de trois productions par mois, on peut évaluer la production de culture liquide à :

- 300 litres pour un volume de milieu par fermenteur de 20 litres
- 525 litres " " " 35 litres
- 750 litres " " " 50 litres.

3 - MATERIEL NECESSAIRE AU MONTAGE D'UN MODULE DE PRODUCTION D' INOCULUM

31 - Cuve de production

Les dimensions approximatifs de la cuve selon le volume retenu, sont mentionnées dans le paragraphe (221). La schéma n° 2 , précise à titre d'exemple, les caractéristiques détaillées d'une cuve de 50 litres.

32 - Aqitation

Elle est obtenue par un agitateur magnétique classique ; la puissance minimum requise du moteur est de l'ordre de 100 w pour agiter un volume de 20 à 30 litres de milieu, et de 150 w pour un volume de 50 litres. Ce type d'appareil se trouve facilement dans le commerce (ex. magnétique 9 x 9 ou tharmolyne, chez Rioblock) ; on peut également adapter soi-même un aimant sur un moteur d'agitation classique (ex : agitation-moteur à régulation mécanique de la vitesse) ; ce système a l'avantage d'être moins onéreux.

Il est conseillé d'utiliser des barreaux aimantés de grande taille (ex : barreau géant 108 x 26 mm) qui provoquent une agitation énergique à vitesse de rotation réduite.

33 - Thermo-régulation

Il n'est pas nécessaire d'utiliser des résistances chauffantes de forte puissance ; des résistances de 300 w pour les fermenteurs de 20 l, et 500 w pour les 35 et 50 litres sont suffisantes (ex : Thermo-plongeur calorifugé en silice pur).

Cette résistance est reliée à un thermomètre à contact (à double échelle 0° à 60°C) et commandée par un relai électronique.

34 - Circuit d'aération et de prélèvement

Outre les filtres de stérilisation d'air (whatman Ø pores 0,3) et le compresseur à sec (typa pompe d'aquarium) il est nécessaire de prévoir un ensemble de petit matériel destiné aux différents circuits :

- erlenmeyer à sortie latérale de 500 ml (barbotage de sortie d'air) ;
- pinces à lames parallèles ;
- 2 tés en inox de 4 mm de Ø ;
- 3 embouts de tuyau inox de 4 mm de Ø et de 100 mm de long ;
- 1 assortiment de bouchon caoutchouc autoclavable ;
- tuyau silicone Rhodosil de 6 mm, 6 mm et de 8 mm de Ø ;
- 2 tubes de barbotage en verre fritté, de porosité 150 à 200 µm.

RIBLIOGRAPHIE

BURTON, J.C. - 1967.

In microbial technology

H.J. Peppler, Ed. Reinhold, New York pp. 1-33

DATE (R.A.) et ROUGHLEY (R.J.) - 1975.

Preparation of inoculum seed inoculants

4 Treatise on Dinitrogen Fixation selection IV
Agronomy Ecology, eds RWF Hardy and Gibson.

GRAHAM (P.H.) and PARKER (C.A.) - 1964.

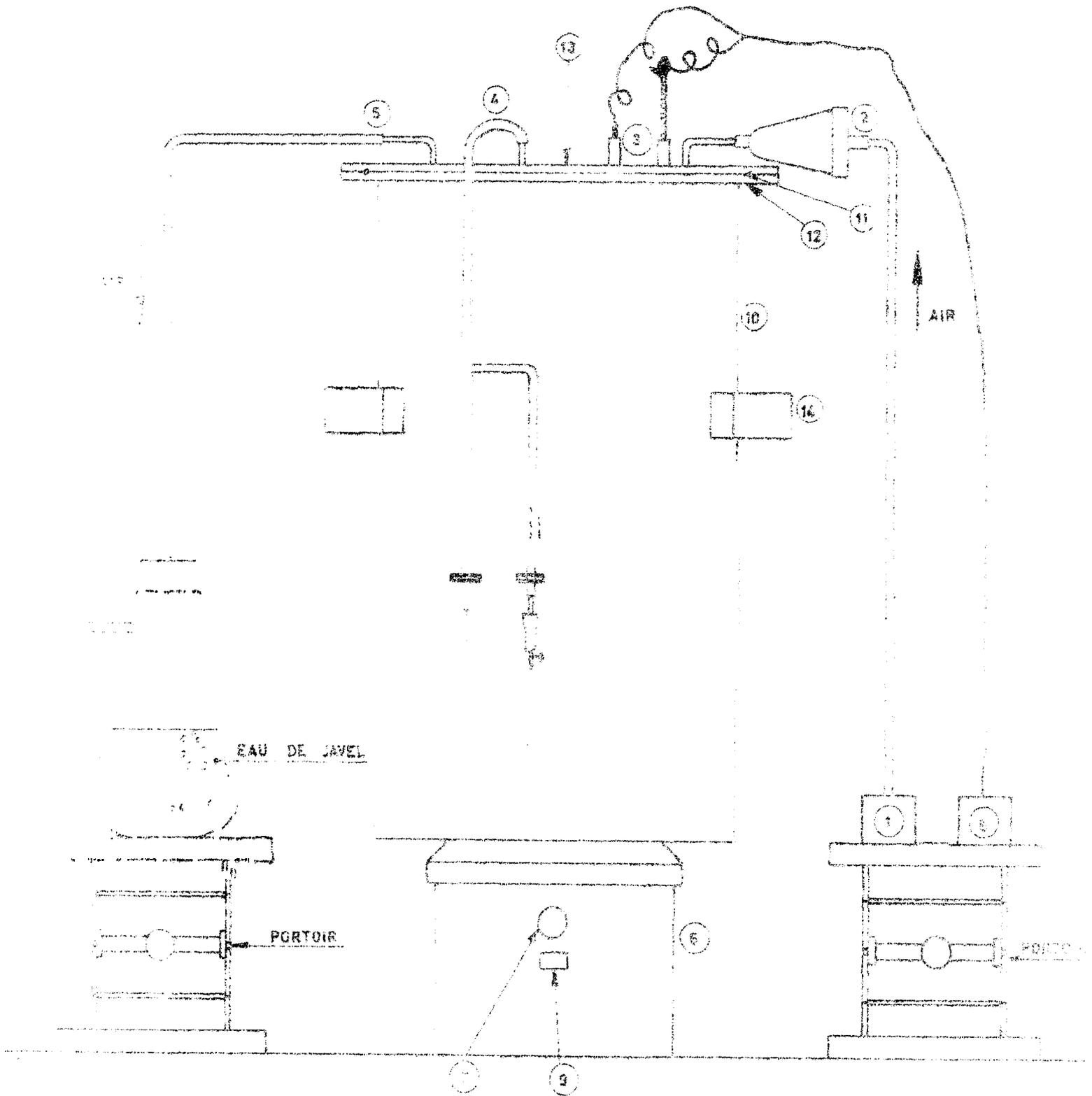
Plant and soil, 20, p. 383.

VINCENT (J.M.) - 1970.

Manual for the practical study of root nodule bacteria - Handbock
n° 15, Blackwell Sci . publication London.

SCHEMA DE PRODUCTION D' INOCULUM

PLAN D' ENSEMBLE



LEGENDE

1. POMPES (D' AQUARIUM)
2. FILTRES

3. RESISTANCE ET THERMOMETRE DE CONTACT
4. BONDRE D' INOCULATION ET DE PRELEVEMENT

5. POMPES D' AIR
6. RELAI DE COMMANDE
7. CONTACTE MAGNETIQUE
8. ELEMENTS D' AGITATION

9. VOYANT DE CONTROLE
10. CUVE

11. JOINT EN CAOUTCHOUC
12. COLLERETTE
13. COUVERCLE

1/100000

BIOREACTEUR DE PRODUCTION D'INOULINE (CAPACITE : 50 LITRES)

ENTREE D'AIR

SONDE D'INOCULATION

T

DE PRELEVEMENT

SONDES DE TEMPERATURE

Ø 410

ENTREE D'AIR

JOINT EN CAOUTCHOUC

190

40

500

370

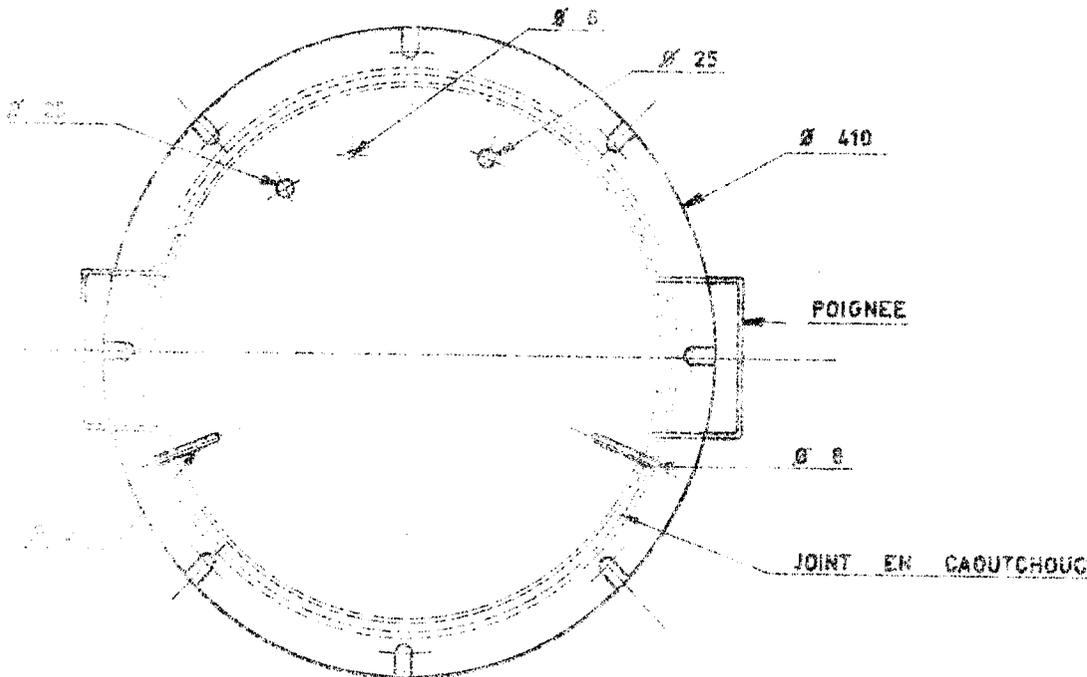
BULLEUR EN VERRE FRITTE

80

Ø 340

BARREAU MAGNETIQUE

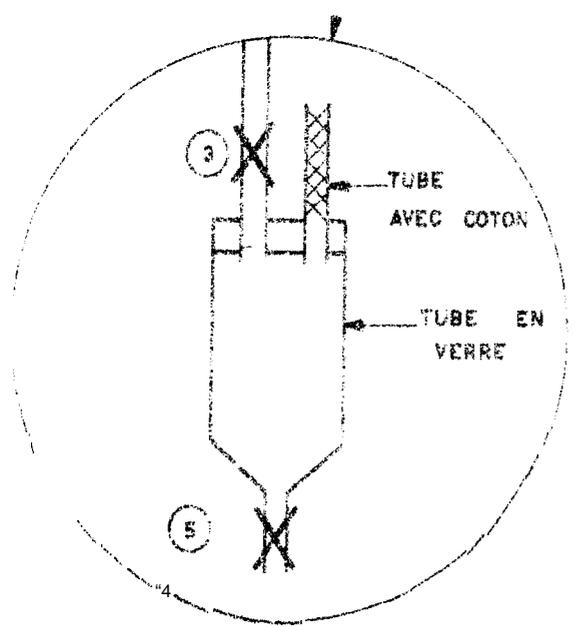
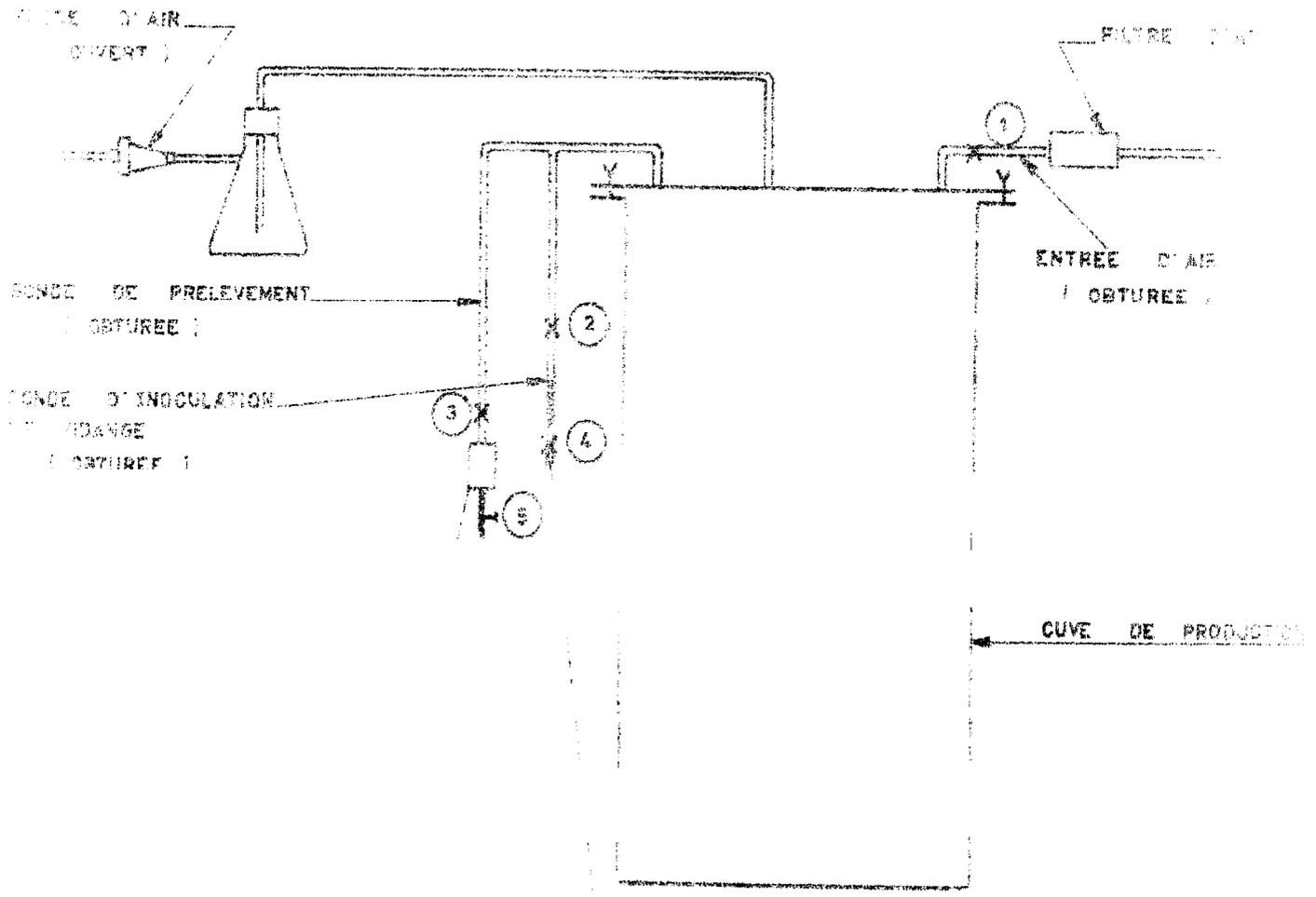
VUE DE FACE



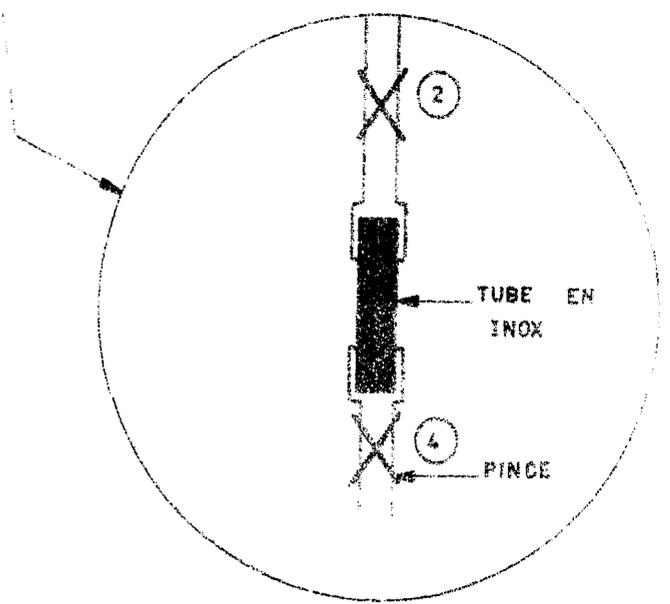
VUE DE DESSUS

FERMENTEUR EQUIPE POUR L'AUTOCLAVAGE

VAG 3



BAMPOULE DE RECUPERATION



EXTREMITE DE LA SONDE D'INOCULATION

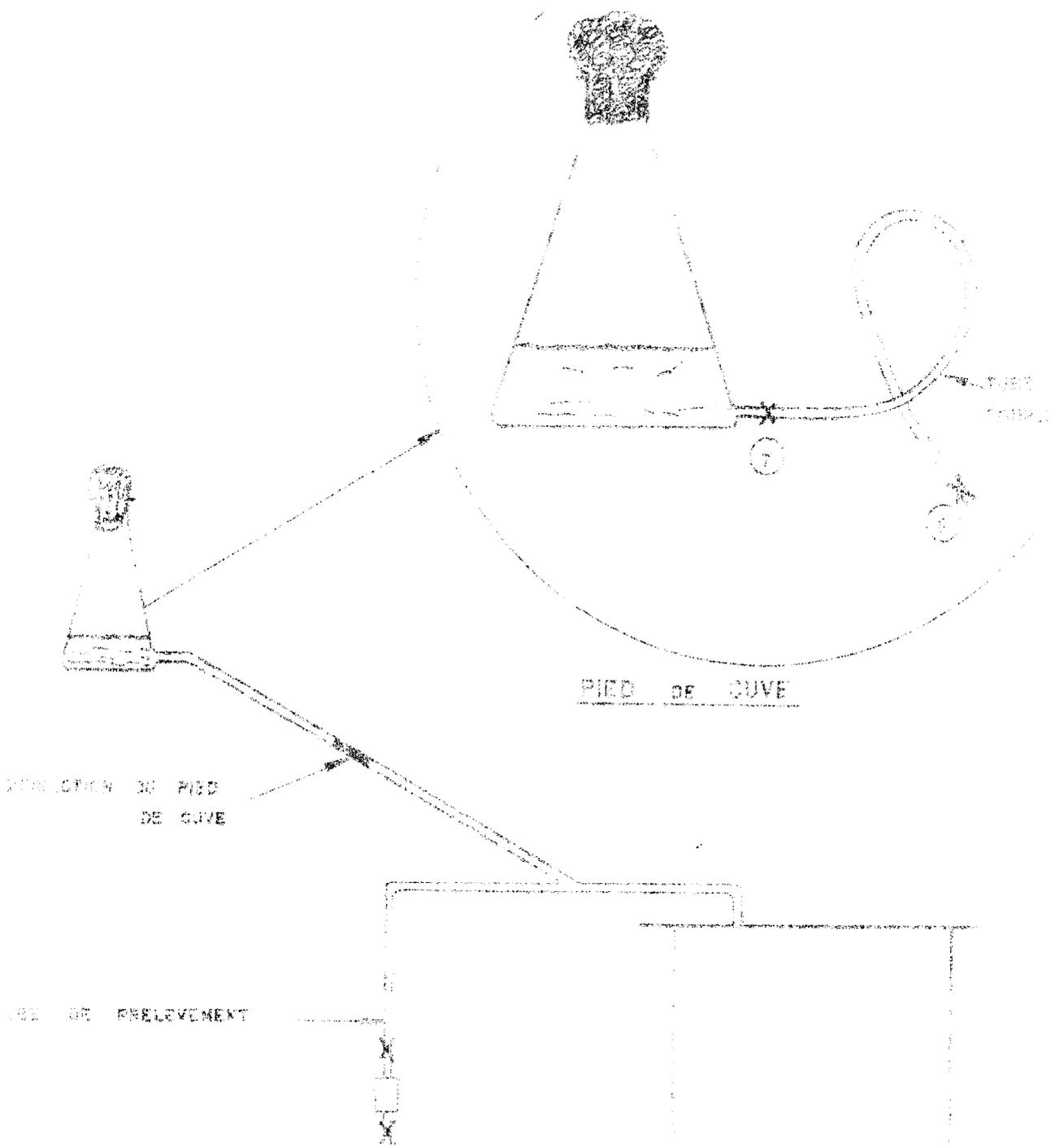


FIG. 10. - Schéma d'un système de caves.

CUVE DE PRODUCTION