



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Département de Biologie

MÉMOIRE

En vue de l'obtention du :

Diplôme de MASTER

Option : Microbiologie Et Contrôle de Qualité

Présenté par :

Mr Abdelkader BENYAMINA

Thème :

Conception d'un bioréacteur pilote pour la production
de *Rhizobium*

Soutenue le 06/07/2026, devant le jury composé de :

Dr.Rahmoun Malika	MCB	Présidente	Université de Tlemcen
Dr.Nas Fatima	MCB	Examinatrice	Université de Tlemcen
Pr.Rebiahi Sid Ahmed	Professeur	Encadreur	Université de Tlemcen

Année universitaire 2025/2026

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus vifs et les plus sincères à Monsieur **Rebiahi Sid Ahmed**, Professeur à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie, Faculté SNV/STU), pour son encadrement judicieux, sa grande disponibilité, ses précieux conseils ainsi que ses encouragements constants tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également à Madame **Rahmoun Malika**, Maître assistante B à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie, Faculté SNV/STU), qui me fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

J'adresse mes vifs remerciements à l'examinatrice de ce travail, Madame **Nas Fatima**, Maître assistante B à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie, Faculté SNV/STU), pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **Aribi Mourad**, Professeur et Directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie à l'Université de Tlemcen, pour avoir aimablement accepté l'accès à son laboratoire afin d'y effectuer la stérilisation par rayonnement ultraviolet (UV).

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à la doctorante, Mademoiselle **Benarradj Houria**, pour m'avoir accompagné et apporté son aide lors de la réalisation de cette manipulation stérilisation par (UV).

J'exprime également ma gratitude envers Monsieur **Tairi Zoheir**, Technicien en usinage, pour son accueil chaleureux au sein de son atelier et pour son aide précieuse lors de la réalisation du volet mécanique de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance la plus sincère à Monsieur **Ounis Bachir**, Ingénieur de développement et Expert SolidWorks, pour son précieux accompagnement et son soutien indéfectible au fil des années. Je lui suis profondément reconnaissant d'avoir généreusement partagé sa vaste expertise technique et de m'avoir constamment guidé pour surmonter les subtilités et les défis complexes liés à l'utilisation du logiciel SolidWorks.

En fin Un grand merci aussi à l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), pour leur accueil, leur disponibilité et les moyens qu'ils ont mis à notre disposition afin de mener à bien notre travail expérimental.

À mes chers parents

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos Personnelles

Liste des Abréviations

Introduction générale..... 1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Rhizobium

1. *Rhizobium*..... 5

1.1 Introduction et définition..... 5

1.2 Classification du *Rhizobium*..... 5

1.3 Caractéristiques morphologiques et structurales..... 7

1.3.1 Structure de la paroi cellulaire..... 8

1.3.2 Membrane externe et lipopolysaccharides (LPS)..... 8

1.3.3 Exopolysaccharides (EPS) 9

1.4 Physiologie de la croissance et exigences nutritionnelles..... 10

2. Les légumineuses 11

2.1 Généralités..... 11

2.2 Classification des légumineuses..... 11

2.3 importance agro-écologique 11

3. La fixation d'azote 12

3.1 La fixation symbiotique de l'azote..... 12

3.2 La symbiose légumineuses-*Rhizobium* 12

3.3 Les gènes Nod 12

3.4 Les facteurs Nod..... 13

3.5 Nodulation..... 13

Chapitre II : Technologie des bioréacteurs

1. Généralités sur les bioréacteurs.....	16
1.1 Aperçu historique et évolution technologique des bioréacteurs.....	16
1.2 Définition générale	17
1.3 Classification des bioréacteurs	17
1.4 Les types de bioréacteur	17
1.4.1 Bioréacteur à cuve agitée.....	17
1.4.2 Bioréacteurs à air-lift.....	18
1.5 Le mode de fonctionnement	19
1.5.1 Le mode discontinu (ou batch).....	20
1.5.2 Le mode continu (ou chemostat).....	20
1.5.3 Le mode semi-continu (ou fedbatch).....	20
2. Bioréacteur pilote.....	21
2.1 Définition, rôle et importance	21
2.2 Aperçu sur les conditions opératoires contrôlées pour <i>Rhizobium</i>	21
2.2.1 Système de contrôle de la température	22
2.2.2 Contrôle de l'acidité.....	22
2.2.3 Apport en oxygène	23
2.2.4 Agitation mécanique.....	23
2.3 Fermentation et mise à l'échelle	23
3. Traitement post-fermentation et conservation : La lyophilisation..	24
3.1 Principe de la lyophilisation	24

Partie 2 : Travaux expérimentaux et Résultats

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1. Essai de réalisation d'un bioréacteur pilote.....	28
1.1 Matériaux et équipements utilisés	28
1.1.1 La cuve	28

1.1.2	Moteur à Courant Continu.....	28
1.1.3	Axe et hélices d'agitation.....	29
1.1.4	Pompe à Air.....	30
2.	Fermentation et production du biomasse	30
2.1	Souche bactérienne et milieux de culture.....	30
2.2	Préparation de l'inoculum.....	31
2.3	Culture en bioréacteur pilote	32
Chapitre IV : Résultat et Discussion		
1.	Suivi et cinétique de la fermentation	35
2.	L'aspect du milieu de production	36
Conclusion.....		
Références bibliographiques		39
ANNEXES.....		45
ANNEXE MILIEUX DE CULTURE.....		46

ملخص

يعد تثبيت البيولوجي للأزوت الجوي بواسطة بكتيريا العقد الجذرية "الريزبيوم" بديلا مستداما للأسمدة الكيميائية عن طريق استعمالها كسماد حيوي, فهي تعيش في علاقة تكافلية مع البقوليات حيث تحول النيتروجين الجوي الى أمونيا يستفيد منها النبات وهذا ما جعلها محل اهتمام دراسات ومع ذلك يفتقر المجال العلمي الى معلومات حول الإنتاج الضخم لهاته البكتيريا على نطاق واسع حيث تظل أغلب التقنيات أسرار تجارية, في هذا الاطار يتمحور هذا العمل حول انجاز مفاعل حيوي تجريبي (بأدوات بسيطة) خصيصا لإنتاج بكتيريا الريزبيوم .

لقد تم تصميم المفاعل الحيوي (التجريبي) على مستوى مخبر ميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية للبيوطي والبيئة (LAMAABE) .

كشف متابعة حركية النمو البكتيري عن ارتفاع تدريجي في الكتلة الحيوية خلال مرحلة التخمير, رفقت بتغير ملحوظ في لون وعكارة الوسط بحيث يجسد نشاطا أيضا فعليا .

لقد أصبح تصميم هذا المفاعل الحيوي التجريبي واقعا ملموسا ,مما يؤكد جدوى التجربة وتشكل هاته النتائج أساسا تجريبيا واعداد لتحسين العملية مستقبلا وبمهد الطريق لنقل هذه العملية الى النطاق الصناعي .

الكلمات المفتاحية: الريزوبيوم (*Rhizobium*)، تثبيت النيتروجين، التخمير، المفاعل الحيوي.

ABSTRACT

The biological fixation of atmospheric nitrogen by the root-nodule bacteria *Rhizobium* is considered a sustainable alternative to chemical fertilisers through its use as a biofertiliser; They live in a symbiotic relationship with legumes, converting atmospheric nitrogen into ammonia that the plant can utilise, which has made them the subject of much research. However, the scientific community lacks information on the large-scale production of these bacteria, as most techniques remain trade secrets. In this context, this work focuses on the development of a pilot bioreactor (using simple equipment) specifically for the production of *Rhizobium* bacteria.

The pilot bioreactor was designed at the Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE).

Monitoring of bacterial growth kinetics revealed a gradual increase in biomass during the fermentation phase, accompanied by a noticeable change in the colour and turbidity of the medium, reflecting actual metabolic activity.

The design of this experimental bioreactor has now become a reality, confirming the feasibility of the experiment. These results provide a promising experimental basis for future process optimisation and pave the way for the scale-up of this process to an industrial scale.

Keywords: *Rhizobium*, Nitrogen fixation, Fermentation, Bioreactor.

RESUME

La fixation biologique de l'azote atmosphérique par les bactéries *Rhizobium* constitue une alternative durable aux engrais chimiques grâce à leur utilisation comme engrais biologique. Elles vivent en symbiose avec les légumineuses, transformant l'azote atmosphérique en ammoniac dont la plante tire profit, ce qui a suscité l'intérêt de nombreuses études. Cependant, le domaine scientifique manque d'informations sur la production à grande échelle de ces bactéries, la plupart des techniques restant des secrets commerciaux. Dans ce contexte, ce travail s'articule autour de la mise au point d'un réacteur biologique expérimental (à l'aide d'outils simples) spécialement destiné à la production de la bactérie *Rhizobium*.

Le réacteur biologique (expérimental) a été conçu au sein du laboratoire de microbiologie appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LA-MAABE).

Le suivi cinétique de la croissance bactérienne a révélé une augmentation progressive de la biomasse au cours de la phase de fermentation, accompagnée d'un changement notable de la couleur et de la turbidité du milieu, ce qui témoigne d'une activité métabolique réelle.

La conception de ce bioréacteur pilote est désormais une réalité, ce qui confirme la pertinence de l'expérience. Ces résultats constituent une base expérimentale prometteuse pour l'amélioration future du procédé et ouvrent la voie à son transfert à l'échelle industrielle.

Mots-clés : *Rhizobium*, Fixation d'azote, Fermentation, Bioréacteur.

Liste des tableaux

Tableau 1 :Liste des genres comprenant des espèces rhizobiennes ayant des noms valides.....	6
--	---

Liste des Figures

Figure 1. Morphologie macroscopique et microscopique de <i>Rhizobium</i> ((A) par microscopie électronique à balayage (MEB), (B) par microscopie électronique à transmission (MET), et (C) aspect de la morphologie coloniale sur milieu solide)	7
Figure 2. Coupe micrographique de bactéroïdes matures entourés de leur membrane péribactéroïdienne (G×6000). L'encadré met en évidence une forme pléomorphe en Y. (Bd : Bactéroïde ; Pm : Membrane péribactéroïdienne).	8
Figure 3. Représentation schématique de la structure du LPS de <i>Rhizobium etli</i> CE3	9
Figure 4. Différents rôles fonctionnels des exopolysaccharides (EPS) produits par <i>Rhizobium</i> spp.	9
Figure 5. Modèle synthétique de la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses par les rhizobia.	14
Figure 6. Conception de base d'un bioréacteur à cuve agitée.	18
Figure 7. Représentation schématique d'un bioréacteur pneumatique de type Air lift.	19
Figure 8. Différents modes d'opération des bioréacteurs : discontinu (batch), semi continu (fed-batch) et continu (chemostat)	19
Figure 9. Les différentes étapes de changement d'échelle (Scale-up) d'un bioréacteur (l'élément encadré en rouge a été ajouté par nos soins)	21
Figure 10. Vue d'ensemble et composants principaux d'un prototype de bioréacteur à cuve agitée. (1. Cuve en verre, 2. Moteur DC, 3. Couvercle en acier inoxydable, 4. Pompe à eau, 5. Bain thermostaté, 6. Unité d'alimentation électrique, 7. Base du bioréacteur, 8. Transmission, 9. Câblage vers l'ordinateur de contrôle)	22
Figure 11. Cinétique de croissance de <i>Rhizobium</i> en bioréacteur à cuve agitée : Évolution de la densité optique (DO ₅₈₀) en fonction du temps.	35

Liste des photos Personnelles

Photo personnelle 1. Cuve en verre	28
Photo personnelle 2. (A) Moteur DC 12v; (B) Variateur de vitesse PWM; (C) Alimentation 12v	29
Photo personnelle 3. (A) Agitateur à débit radial ; (B) turbine a pale droite model rushton.....	29
Photo personnelle 4. Compresseur d'air à membrane	30
Photo personnelle 5. Milieu synthétique YMB (Yeast Mannitol Broth)	31
Photo personnelle 6. les étapes de préparation de l'inoculum	31
Photo personnelle 7. Expérience en bioréacteur (pilote).....	32
Photo personnelle 8. Prélèvement d'un échantillon et mesure de la densité optique (DO_{580})	33
Photo personnelle 9. Conditionnement de l'aliquot de culture dans des tubes Falcon (50 mL)	33
Photo personnelle 10. Évolution de l'aspect macroscopique du milieu de production de Rhizobium au cours du temps : (A) $t=0$ h ; (B) $t=50$ h ; (C) $t=70$ h	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

D	: Taux de dilution ($D = F/V$)
DO	: Densité Optique
Dt	: Diamètre de la cuve
EPS	: Exopolysaccharides
H	: Hauteur de la cuve
k_{La}	: Coefficient volumique de transfert de masse en oxygène
LPS	: Lipopolysaccharides
OD	: Oxygène Dissous
OTR	: Taux de transfert d'oxygène
P/V	: Puissance volumique
pH	: Potentiel Hydrogène
PWM	: Variateur de vitesse (Pulse Width Modulation)
rpm	: Rotations par minute
V	: Volt
YMA	: Yeast Mannitol Agar
YMB	: Yeast Mannitol Broth

Introduction générale

L'agriculture moderne fait face au défi majeur d'accroître la productivité afin de répondre aux besoins d'une population mondiale en constante augmentation, tout en limitant les impacts environnementaux liés à l'utilisation intensive des engrais chimiques. Ces derniers sont notamment responsables de l'acidification des sols, de la contamination des ressources en eau et des émissions de gaz à effet de serre **(Bahuguna et al., 2025)**.

Dans ce contexte, les biofertilisants contenant des micro-organismes vivants, tels que les bactéries du genre *Rhizobium*, apparaissent comme une alternative durable et respectueuse de l'environnement, capable de restaurer la fertilité naturelle des sols et d'améliorer la productivité des cultures **(Suthar et al., 2017; Bahuguna et al., 2025)**.

La production industrielle de ces bactéries repose sur des procédés de fermentation en bioréacteurs. Cette approche implique la sélection de souches performantes et adaptées à la plante hôte, la multiplication de la biomasse dans des milieux de culture optimisés -utilisant fréquemment des substrats à base de mélasse ou de résidus agricole afin de réduire les coûts de production ainsi qu'un contrôle rigoureux des paramètres l'aération, le pH et la température **(Vandana et al., 2017; Bahuguna et al., 2025)**.

Une fois la biomasse produite, celle-ci est incorporée dans des formulations liquides enrichies en protecteurs cellulaires ou fixée sur des supports solides tels que la tourbe, le charbon de bois ou la vermiculite, afin de stabiliser les cellules bactériennes et de garantir leur viabilité pendant le transport et jusqu'à leur inoculation effective **(Aremu et al., 2017)**.

L'utilisation de ces biofertilisants permet non seulement d'augmenter significativement les rendements agricoles, avec des gains pouvant varier de 10 à 35%, mais contribue également à l'amélioration de la qualité nutritionnelle des récoltes. En outre, elle constitue une stratégie prometteuse pour réduire la dépendance aux engrais de synthèse et favoriser la durabilité des systèmes agricoles à long terme **(Bahuguna et al., 2025)**.

Dans ce cadre, le présent travail s'articule autour d'une approche expérimentale dont l'objectif central est la réalisation d'un bioréacteur à l'échelle pilote, spécifiquement dédié à la production de la bactérie symbiotique *Rhizobium* à cet effet, le travail a été structuré en plusieurs étapes successives et complémentaires .

Dans un premier temps, le bioréacteur a été conçu et assemblé à partir de matériaux simples et accessibles, en intégrant un système d'agitation mécanique, un dispositif d'aération .

Une fois la validation mécanique du système assurée, la culture bactérienne a été initiée en milieu YMB dans des conditions optimales de température (28 ± 1 °C) et de pH initial (6,8), avec un suivi cinétique de la croissance par mesure de la densité optique à 580 nm.

Enfin, un aliquot de la culture bactérienne a été prélevé à l'issue de la fermentation et conditionné en vue de sa lyophilisation, dans la perspective d'une conservation et d'une valorisation ultérieure du bio-inoculant produit.

Partie 1 :

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Rhizobium

1. *Rhizobium*

1.1 Introduction et définition

Les *Rhizobia* (singulier Le *Rhizobium*) constituent un ensemble de bactéries du sol à Gram négatif capables d'établir une symbiose avec les plantes légumineuses (famille des *Leguminosae*) , Le Terme *Rhizobia* est utilisé comme un terme collectif pour désigner les bactéries possédant la capacité à noduler les racines des légumineuses Cette association permet la fixation de l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniacque (NH₃),une forme assimilable par les végétaux (**Masson-Boivin et al., 2009**).

Toutefois ,les Rhizobiums ne forment pas un groupe taxonomique homogène ,car ils sont répartis entre plusieurs genres appartenant aux α - et β - Protéobactéries (**Rivas et al., 2009**).

1.2 Classification du *Rhizobium*

Les Rhizobia ont été isolés pour la première fois en 1888 par Beijerinck, qui a nommé cette bactérie *Bacillus radicicola* , avant qu'elle ne soit reclassée ultérieurement sous le nom de *Rhizobium leguminosarum* (**Ferraz Helene et al., 2022**).

Au cours du XXe siècle, leur classification reposait principalement sur le principe de l'inoculation croisée qui regroupait les bactéries selon les espèces de légumineuses qu'elles pouvaient noduler (**Rivas et al., 2009**).

Dans l'édition de 1974 du Manuel de Bergey, seules six espèces de *Rhizobium* ont été reconnues : le *R. leguminosarum* à croissance rapide, le *R. trifolii*, le *R. phaseoli* et le *R. meliloti*, et le *R. lupini* et le *R. japonicum* à croissance lente (**Rivas et al., 2009**),

Cependant, l'introduction du séquençage du gène de l'ARNr 16s dans les années 1990 a profondément modifié cette classification en révélant que les *Rhizobiums* ne forment pas un groupe monophylétique , mais qu'il sont phylogénétiquement dispersés parmi les groupes α - et β -Protéobactéries (**Klepa et Hungria, 2022**).

En 2021, plus de 200 espèces de *rhizobium* sont reconnues au sein de 19 genres répartis entre les α - et β -Proteobactéries (Ferraz Helene *et al.*, 2022). Les familles des α - et β protéobactéries comprennent (Tableau 1) :

Tableau 1 :Liste des genres comprenant des espèces rhizobiennes ayant des noms valides (Ferraz *et al.*, 2022)

α -Proteobacteria Hyphomicrobiales (=Rhizobiales)		
Rhizobiaceae		
<i>Agrobacterium</i>	11 noms valides	2 Rhizobia
<i>Allorhizobium</i>	8 noms valides	2 Rhizobia
<i>Ensifer</i> (= <i>Sinorhizobium</i>)	20 noms valides	20 Rhizobia
<i>Neorhizobium</i>	5 noms valides	4 Rhizobia
<i>Pararhizobium</i>	6 noms valides	2 Rhizobia
<i>Rhizobium</i>	92 noms valides	49 Rhizobia
<i>Shinella</i>	8 noms valides	1 Rhizobia
Phyllobacteriaceae		
<i>Aminobacter</i>	7 noms valides	1 Rhizobia
<i>Phyllobacterium</i>	12 noms valides	4 Rhizobia
<i>Mesorhizobium</i>	59 noms valides	48 Rhizobia
Nitrobacteraceae (=Bradyrhizobiaceae)		
<i>Bradyrhizobium</i>	63 noms valides	58 Rhizobia
Methylobacteriaceae		
<i>Microvirga</i>	18 noms valides	4 Rhizobia
<i>Methylobacterium</i>	47 noms valides	1 Rhizobia
Brucellaceae		
<i>Brucella</i> (= <i>Ochrobactrum</i>)	25 noms valides	2 Rhizobia
Hyphomicrobiaceae		
<i>Devosia</i>	26 noms valides	1 Rhizobia
Xanthobacteraceae		
<i>Azorhizobium</i>	3 noms valides	2 Rhizobia
β -Proteobacteria Burkholderiales		
Burkholderiaceae		
<i>Cupriavidus</i>	18 noms valides	2 Rhizobia
<i>Paraburkholderia</i>	79 noms valides	22 Rhizobia
<i>Trinickia</i>	7 noms valides	1 Rhizobia

1.3 Caractéristiques morphologiques et structurales

Dans leur état libre (**Figure 1**), les cellules de *Rhizobium* sont généralement en forme de bâtonnet (forme de bacille), mesurant environ 1.2-3 μm de longueur (Van Brussel *et al.*, 1977) et 0.5–0.9 μm de largeur

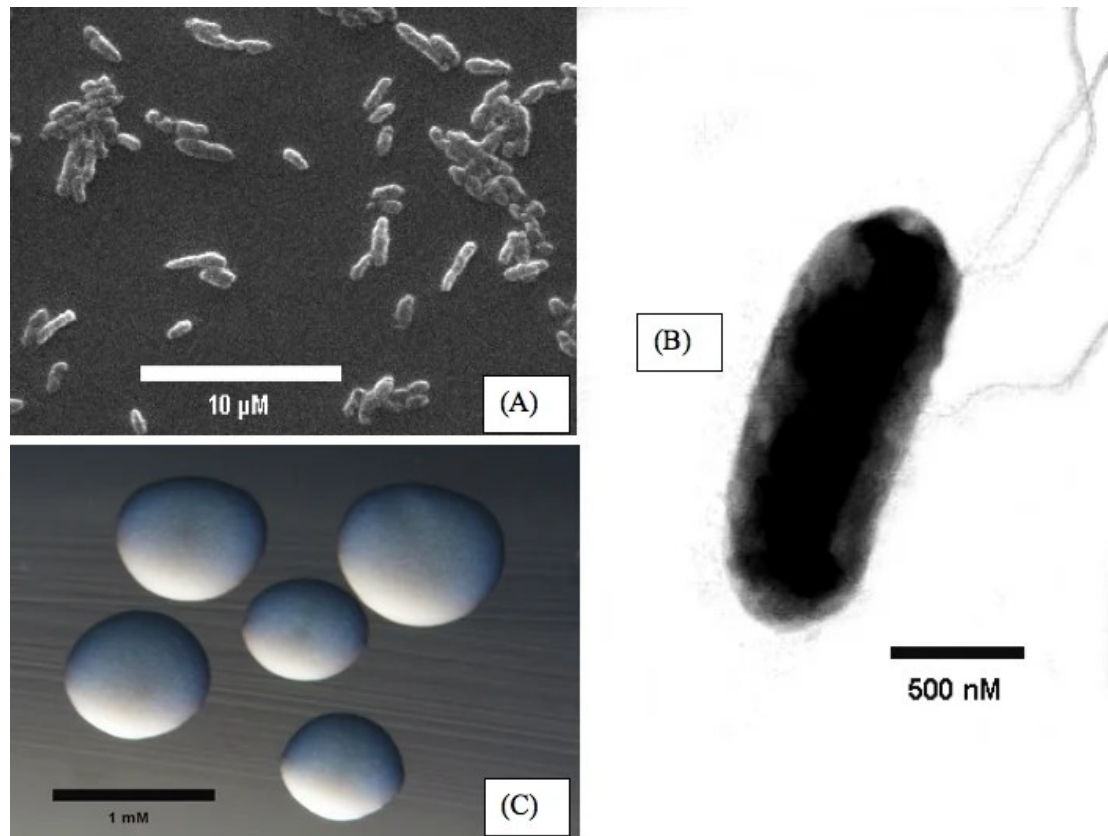


Figure 1. Morphologie macroscopique et microscopique de *Rhizobium* ((A) par microscopie électronique à balayage (MEB), (B) par microscopie électronique à transmission (MET), et (C) aspect de la morphologie coloniale sur milieu solide) (Reeve *et al.*, 2010)

Lorsque *Rhizobium* pénètre dans les cellules de la plante hôte et se différencie en forme fixatrice d'azote (bactéroïde), d'importantes modifications morphologiques sont observées voir (**Figure 2**). Les bactéroïdes présentent sous des formes hypertrophiées et pléomorphes ; ils peuvent être renflés, claviformes, ramifiées (en forme de Y ou de X) ou encore apparaissent sous forme de bâtonnets irrégulièrement gonflés. Dans les nodosités du pois, les bactéroïdes mesurent généralement entre 3,5 et 6,2 μm de longueur, présentent fréquemment une forme en V et peuvent atteindre une taille jusqu'à trois fois supérieure à celle des formes cultivées (forme végétative) (Van Brussel *et al.*, 1977).

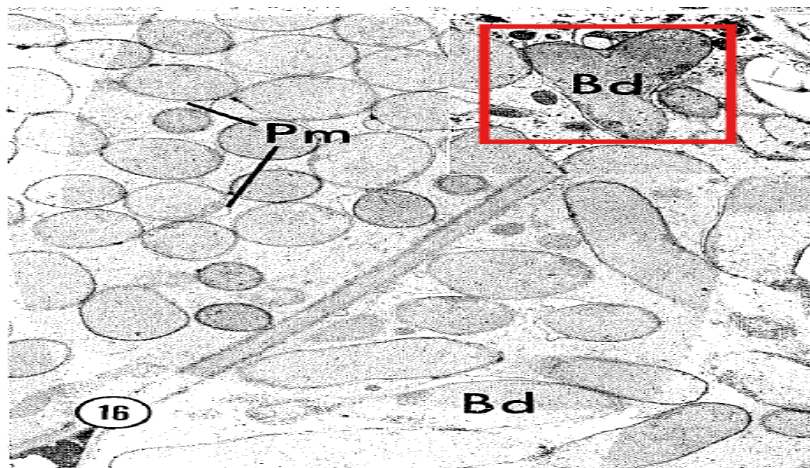


Figure 2. Coupe micrographique de bactéroïdes matures entourés de leur membrane pér bactéroidienne (G×6000). L'encadré met en évidence une forme pléomorphe en Y. (Bd : Bactéroïde ; Pm : Membrane pér bactéroidienne). (Patel et Yang, 1981)

1.3.1 Structure de la paroi cellulaire

A l'instar des autres bactéries à Gram négatif *Rhizobium* présente une architecture de paroi cellulaire pariétale complexe. Celle-ci est constituée d'une membrane externe, d'une mince couche de peptidoglycane (mucopeptide) associée de manière covalente à une lipoprotéine, ainsi que d'une membrane cytoplasmique interne (Van Brussel *et al.*, 1977).

1.3.2 Membrane externe et lipopolysaccharides (LPS)

La membrane externe de *Rhizobium* renferme des lipopolysaccharides (LPS) (Figure 3) impliqués dans la symbiose, la reconnaissance de l'hôte ainsi que dans la survie bactérienne. Le LPS des *rhizobiums* est structuellement distinct de celui des bactéries entériques (Silipo *et al.*, 2014).

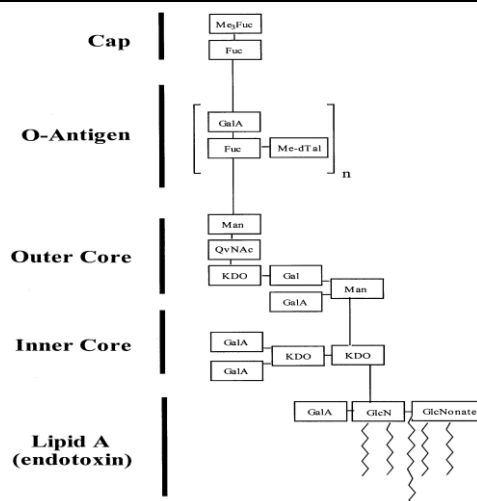


Figure 3.Représentation schématique de la structure du LPS de *Rhizobium etli* CE3 (Price, 1999)

1.3.3 Exopolysaccharides (EPS)

Les *Rhizobiums* produisent de grandes quantités d'exopolysaccharides acides (EPS) formant l'enveloppe la plus externe de la cellule bactérienne. En plus de leur fonction structurale, les EPS participent à la protection cellulaire contre la dessiccation, à la fixation sur les surfaces, à la formation de biofilms ainsi qu'au développement d'une symbiose performante (Figure 4). (Cieřla *et al.*, 2016)

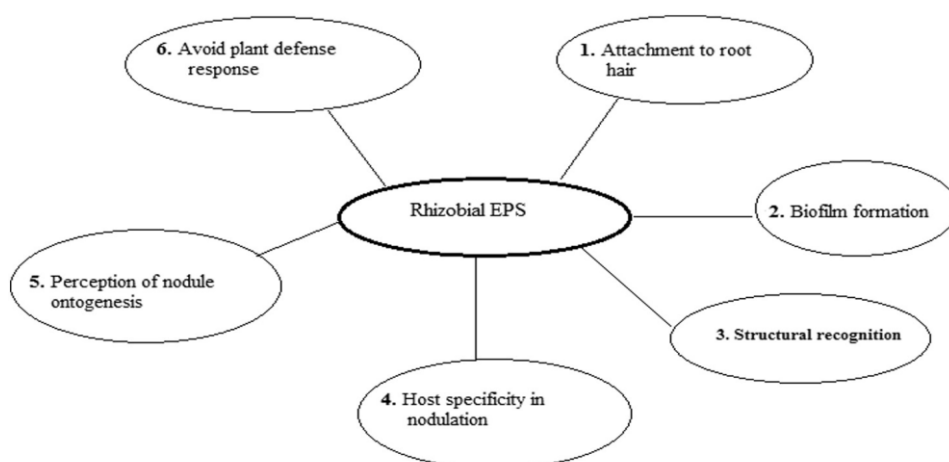


Figure 4.Différents rôles fonctionnels des exopolysaccharides (EPS) produits par *Rhizobium* spp (Ghosh, 2016)

1.4 Physiologie de la croissance et exigences nutritionnelles

Pour leur croissance, les Rhizobia exploitent une grande diversité de composés carbonés. En tant que chimio-organotrophes, ils présentent une variabilité importante dans l'utilisation des sources de carbone selon les espèces et les souches étudiées (**Lee, 1981**).

Le mannitol constitue traditionnellement la principale source de carbone utilisée dans les milieux de culture de laboratoire, notamment dans le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA). Cependant, il ne représente pas toujours le substrat le plus performant. Chez les *Rhizobiums* à croissance lente, le gluconate, le galactose, le glucose, le glycérol et le mannose favorisent une croissance supérieure à celle obtenue avec le mannitol (**Elkan et Kwik, 1968**). En revanche, chez les *Rhizobiums* à croissance rapide le mannitol, le glucose et le glycérol constituent d'excellentes sources de carbone(**Lee, 1981**).

Les besoins en vitamines des espèces rhizobiales varient considérablement, ce qui constitue une caractéristique taxonomique et physiologique importante.

Les *Rhizobiums* à croissance rapide, nécessitent généralement de la biotine, de la thiamine et du pantothénate de calcium pour assurer une croissance optimale, en revanche Les *Rhizobiums* à croissance lente ont parfois répondu à l'apport de biotine, mais généralement pas aux autres vitamines (**Graham, 1963**).

2. Les légumineuses

2.1 Généralités

La famille des légumineuses (*Leguminosae* ou *Fabaceae*) constitue la troisième plus grande famille d'angiospermes, avec environ 765 genres et plus de 19 500 espèces réparties à travers le monde (**The Legume Phylogeny Working Group et al., 2013**).

Elle présente une importance écologique et économique majeure, occupant une place centrale dans l'agriculture durable grâce à sa capacité de fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (**Panpatte et al., 2017**).

2.2 Classification des légumineuses

Historiquement, la famille des légumineuses était divisée en trois sous-familles distinctes, basées principalement sur des caractères floraux :

- ***Caesalpinioideae***: fleurs à préfloraison imbriquée ascendante, symétrie variable
- ***Mimosoideae***: fleurs à préfloraison valvaire, symétrie radiaire
- ***Papilionoideae***: fleurs à préfloraison imbriquée descendante, symétrie bilatérale (zygomorphe). (**The Legume Phylogeny Working Group et al., 2013**)

2.3 importance agro-écologique

L'importance agro-écologique des légumineuses repose sur leur capacité unique à fixer l'azote atmosphérique, fournissant une source d'azote biologique vitale pour une productivité agricole durable et offrant des services écosystémiques essentiels (**Abusaief et Boasoul, 2021**).

Au-delà de ce rôle, les légumineuses (notamment les formes arborées) sont des piliers fondamentaux de l'amélioration des sols, de la restauration des forêts et des systèmes d'agroforesterie tropicale, elles possèdent une importance écologique et économique mondiale majeure, illustrée par la domestication d'une vaste gamme de cultures alimentaires et fourragères indispensables aux sociétés humaines depuis les débuts de l'agriculture (**The Legume Phylogeny Working Group et al., 2013**).

3. La fixation d'azote

3.1 La fixation symbiotique de l'azote

La fixation symbiotique de l'azote (FSN) est un processus biologique essentiel au cours duquel des bactéries diazotrophes, principalement les *rhizobiums*, convertissent l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3) assimilable par les plantes (**Figure 5**).

Ce processus, qui se déroule dans des organes racinaires spécialisés appelés nodosités (ou nodules), fournit environ 40 millions de tonnes d'azote par an aux systèmes agricoles mondiaux (**Lindström et Mousavi, 2020**).

3.2 La symbiose légumineuses-*Rhizobium*

Les *rhizobiums*, répartis au sein des α -protéobactéries et β -protéobactéries, forment des nodules sur les racines, et parfois les tiges des légumineuses. Le dialogue moléculaire commence par l'exsudation de flavonoïdes par la plante hôte. Ces composés sont perçus par les *Rhizobiums*, qui activent alors les gènes *nod*, conduisant à la production des facteurs Nod, indispensable à l'établissement de la symbiose (**Lindström et Mousavi, 2020**).

3.3 Les gènes Nod

Les gènes *nod* (nodulation gènes) sont des composants génétiques bactériens essentiels pour l'initiation de la symbiose fixatrice d'azote entre les rhizobiums et les légumineuses (**Clúa et al., 2018**).

Ce processus débute lorsque les racines des plantes hôtes libèrent des composés phénoliques, principalement des flavonoïdes, reconnus par le régulateur transcriptionnel bactérien NodD (**Basile et Lepek, 2021**).

L'activation de NodD déclenche la transcription des gènes *nod*, qui codent pour les enzymes responsables de la biosynthèse et de la sécrétion des facteurs Nod (NF). (**Lindström et Mousavi, 2020**).

On distingue généralement deux groupes :

Les gènes *nod* communs, notamment *nodA*, *nodB* et *nodC*, présents chez la quasi-totalité des rhizobiums et responsables de la synthèse de la structure de base (le squelette de chitine) du facteur Nod (**Wang et al., 2018**).

Les gènes spécifiques de l'hôte, parmi lesquels Figurent *nod*, *nol*, *noe* codant pour des enzymes qui ajoutent des modifications chimiques spécifiques au squelette de base, déterminant ainsi la spécificité entre la bactérie et la plante hôte (**Wang *et al.*, 2018**).

La perception de ces facteurs Nod par des récepteurs végétaux déclenche une cascade de signalisation aboutissant à des réponses morphologiques majeures, comme le recourbement des poils absorbants et le début de la division cellulaire corticale pour former le nodule (**Gage, 2004**)

3.4 Les facteurs Nod

Les facteurs Nod sont des molécules de signalisation synthétisées et sécrétées par les rhizobiums en réponse aux flavonoïdes produits par les racines des plantes légumineuses. Structuellement, ils consistent en un squelette d'oligosaccharide de chitine lié à une chaîne acyle grasse à l'extrémité non réductrice, agrémenté de diverses modifications chimiques spécifiques à la souche. Ces molécules sont perçues par des récepteurs végétaux spécialisés déclenchant ainsi les premières réponses morphologiques de la symbiose, comme le recourbement des poils absorbants et la division des cellules corticales pour former le nodule. En plus de déterminer la spécificité d'hôte, les facteurs Nod jouent également un rôle dans l'équilibre entre la symbiose et les réponses de défense de la plante. (**Lindström et Mousavi, 2020**).

3.5 Nodulation

La nodulation est un processus symbiotique complexe et hautement régulé entre les rhizobiums et les racines des légumineuses, aboutissant à la formation d'organes racinaires spécialisés appelés nodosités. Ce processus repose sur deux programmes développementaux distincts mais coordonnés : l'infection bactérienne et l'organogenèse du nodule. Les étapes se déroulent comme suit :

En réponse à une carence en azote, la plante sécrète des flavonoïdes qui activent la protéine bactérienne NodD, déclenchant la synthèse des facteurs Nod. La perception de ces facteurs induit le recourbement du poil absorbant pour emprisonner les bactéries. S'ensuit la formation du cordon d'infection à travers lequel les bactéries progressent vers le cortex où se forme le primordium du nodule. Enfin, les bactéries sont libérées dans les cellules nodulaires pour former des symbiosomes et se différencier en bactéroïdes, capables de convertir le diazote atmosphérique (N_2) en ammoniac (NH_3) grâce à la nitrogénase (Clúa *et al.*, 2018).

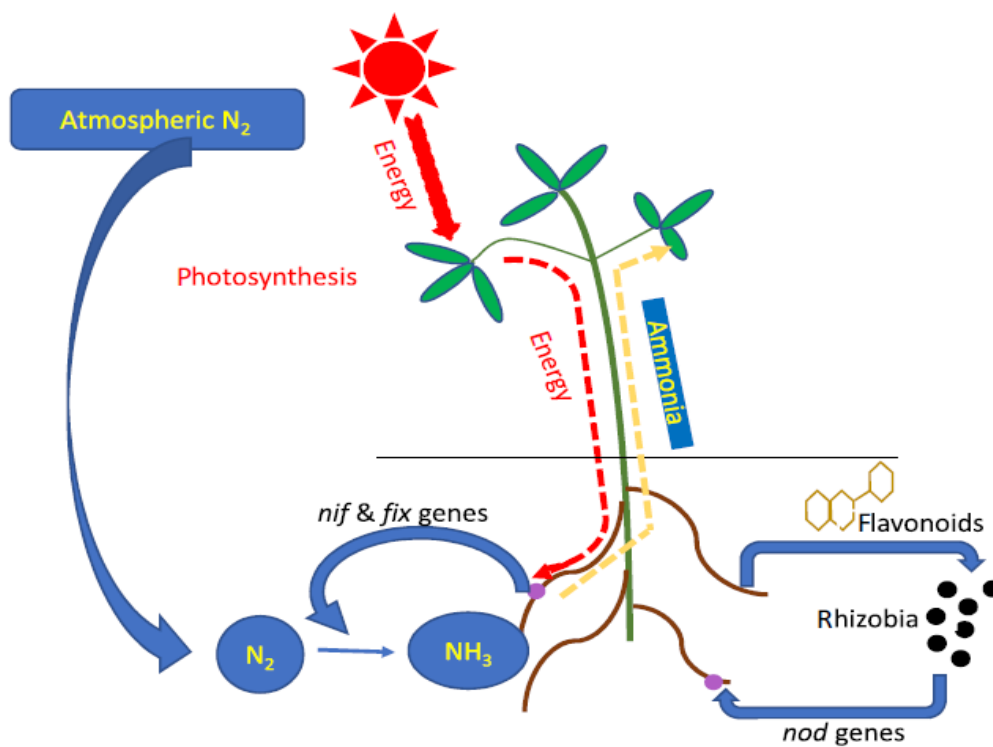


Figure 5. Modèle synthétique de la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses par les rhizobies. (Lindström et Mousavi, 2020)

Chapitre II :

Technologie des bioréacteurs

1. Généralités sur les bioréacteurs

1.1 Aperçu historique et évolution technologique des bioréacteurs

L'évolution des bioréacteurs s'est faite par étapes technologiques marquantes, débutant par les fondements scientifiques (XVIIe-XIXe siècles) où la découverte des micro-organismes par Van Leeuwenhoek en 1676 fut liée à la fermentation près de deux siècles plus tard, avant que Pasteur (1857) ne démontre qu'il s'agit d'un processus biologique spécifique et non d'une simple réaction chimique¹ (Ulber et Soyez, 2004).

Au début du XXe siècle, l'urgence de la Première Guerre mondiale a propulsé la « fermentation profonde » pour la production de métabolites primaires (Ulber et Soyez, 2004), renforcée par la découverte en 1917 de la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*, posant ainsi les bases théoriques de l'ingénierie des bioprocédés. Les années 1940 ont marqué la révolution de la pénicilline, où les exigences de production de masse ont conduit au développement industriel du bioréacteur à cuve agitée (STR), devenu le pilier de la technologie moderne (Bud, 2011).

Durant l'âge d'or (1950-1970), la maîtrise de la fermentation submergée aérobie stérile (stérilisation à la vapeur, filtration de l'air) (Rehm, 1970) et la formalisation des cinétiques cellulaires (modèles de Monod et Luedeking-Piret) (Pinto *et al.*, 2022) ont permis la diversification des produits à grande échelle (Rehm, 1970).

Par la suite, les années 1970 à 2000 ont vu l'avènement de bioréacteurs spécialisés adaptés aux contraintes spécifiques des substrats (réacteurs à lit fixe/fluidisé, à membrane, photobioréacteurs et à biofilm) (Murshid *et al.*, 2023; De Mello *et al.*, 2024).

Enfin, l'ère moderne (2000-présent) consacre l'Industrie 4.0 à travers l'intégration de la modélisation génomique, du machine learning (Pinto *et al.*, 2022), des critères rigoureux de changement d'échelle ($k_{La}, P/V$) (De Mello *et al.*, 2024).

1.2 Définition générale

Un bioréacteur (ou fermenteur) est une enceinte fermée conçue pour assurer la croissance contrôlée de microorganismes dans des conditions optimales de pH, de température et oxygénation, tout en garantissant l'absence de contamination, afin de maximiser la production du métabolite d'intérêt. Bien que deux modes de fermentation existent submergée et en état solide le procédé submergé demeure le plus utilisé à l'échelle industrielle en raison de sa compacité et d'une meilleure maîtrise des paramètres opératoire. Les bioréacteurs couvrent une large gamme de volumes, allant de quelques litre en laboratoire jusqu'à plusieurs centaines de milliers de litres en production industrielle, avec une étape intermédiaire de mise à l'échelle pilote. Toutefois, seulement 75 % du volume total est généralement exploité pour la fermentation. (*Modern Industrial Microbiology and Biotechnology, Second Edition, 2017*)

1.3 Classification des bioréacteurs

Les bioréacteurs peuvent être classés selon plusieurs critères fondamentaux (Ferencik *et al.*, 2021) :

- Selon la phase : liquide uniquement, ou également gaz et particules.
- Selon la conception technique : systèmes ouverts, fermés, ou à membrane.
- Selon la méthode de mélange : mélangés, non mélangés, ou mélangés Hydrauliquement.
- Selon la méthode de culture : pour un seul remplissage, ou avec ajout graduel de nutriments

1.4 Les types de bioréacteur

1.4.1 Bioréacteur à cuve agitée

Le bioréacteur à cuve agitée voir (**Figure 6**) est constituée d'une cuve équipée d'un système d'agitation mécanique (turbines , pales) ainsi que d'un dispositif d'aération par barbotage d'air. Ce type de fermenter permet un contrôle précis des principaux paramètres de culture, notamment la température, le pH , l'oxygène dissous et la vitesse d'agitation.(Gulati, 1980)

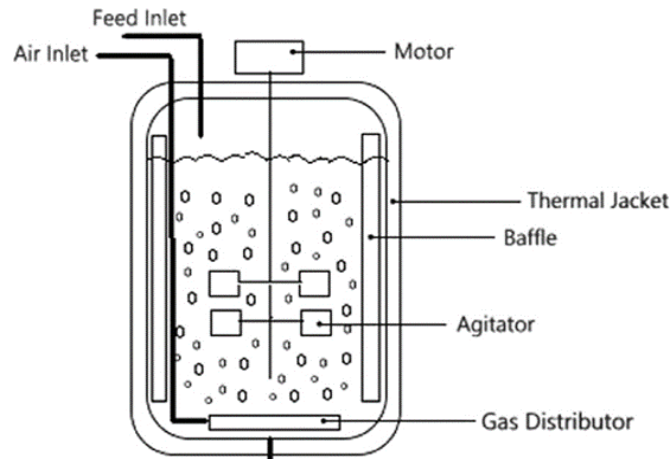


Figure 6. Conception de base d'un bioréacteur à cuve agitée (Bakratsas *et al.*, 2021)

1.4.2 Bioréacteurs à air-lift

Les bioréacteurs à air-lift (Airlift Bioreactors) (**Figure 7**) sont des systèmes de fermentation pneumatiques dans lesquels la circulation du fluide est assurée exclusivement par l'injection d'un gaz, éliminant ainsi le recours à des dispositifs d'agitation mécanique.

Structurellement, ils se composent de deux sections distinctes : le compartiment ascendant (riser), où le gaz est introduit, et le compartiment descendant (downcomer). Cette configuration permet une distribution homogène de la biomasse et des nutriments dans l'ensemble du volume du fermenteur, tout en favorisant un transfert optimal de l'oxygène. L'absence d'organes mécaniques rotatifs crée un environnement de culture plus doux, limitant les effets des forces de cisaillement sur les micro-organismes sensibles. De plus, ces systèmes sont particulièrement adaptés au traitement de milieux de culture Complexes présentant une viscosité élevée. (Gavrilescu et Roman, 1998)

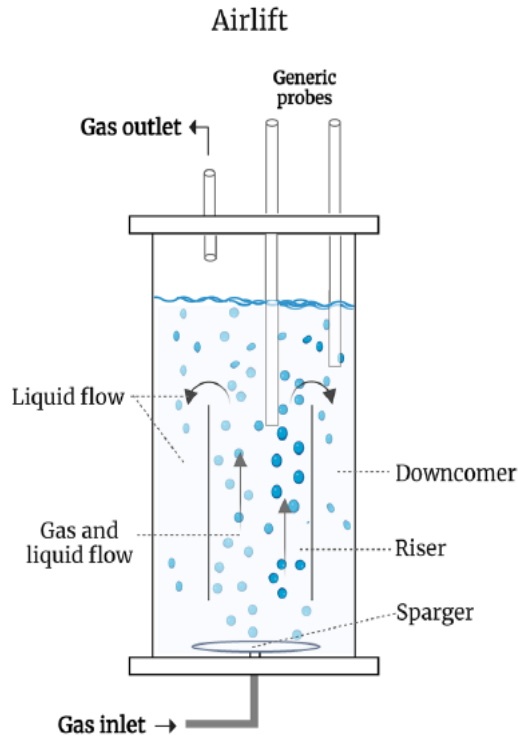


Figure 7.Représentation schématique d'un bioréacteur pneumatique de type Air lift(De Mello *et al.*, 2024c)

1.5 Le mode de fonctionnement

Dans la pratique, les modes opératoires se définissent par la manière dont le substrat est introduit dans le bioréacteur. On distingue trois modes principaux : le mode batch (discontinu), le mode semi-continu et le mode continu(**Figure 8**).

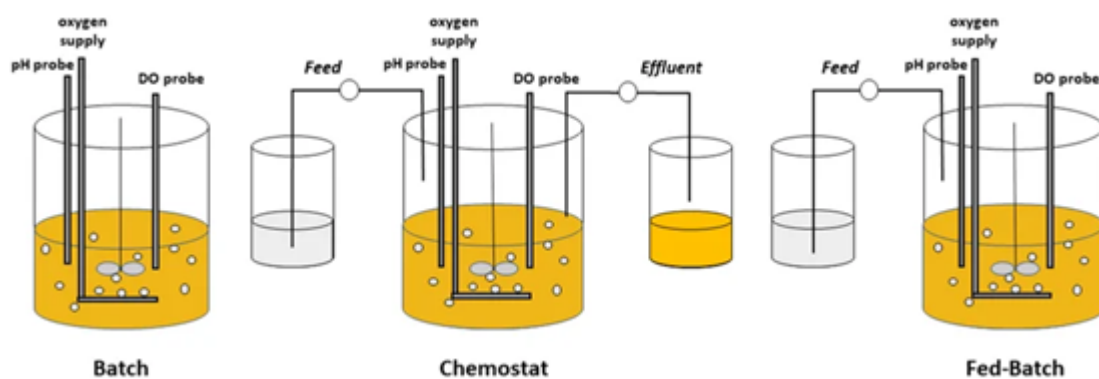


Figure 8.Différents modes d'opération des bioréacteurs : discontinu (batch), semi continu (fed-batch) et continu (chemostat)
(Rajpurohit, 2022)

1.5.1 Le mode discontinu (ou batch)

Dans ce mode, l'ensemble des nutriments, à l'exception des agents destinés au contrôle du pH et de l'oxygène dans les cultures aérobies, est introduit dans le bioréacteur avant l'inoculation. Aucun apport supplémentaire ni retrait de milieu n'est effectué au cours de la culture. Le volume du milieu reste donc constant jusqu'à l'épuisement du substrat ou jusqu'à l'obtention de la concentration de produit souhaitée. À la fin du cycle de production, le bioréacteur est vidé, nettoyé, stérilisé puis préparé pour un nouveau lot de culture. **(Minihane et Brown, 1986)**

1.5.2 Le mode continu (ou chemostat)

Le mode continu, également appelé chémostat, se caractérise par l'introduction continue d'un milieu stérile et le retrait simultané d'un volume équivalent de culture, ce qui permet de maintenir un volume de travail constant **(Pinto *et al.*, 2022)**. En régime stationnaire (steady-state), le taux de croissance spécifique (μ) devient égal au taux de dilution ($D=F/V$) **(Fitzpatrick, 2019)**.

1.5.3 Le mode semi-continu (ou fedbatch)

Dans le mode semi-continu (fed-batch), un ou plusieurs nutriments sont ajoutés au bioréacteurs au cours de la culture, sans qu'il y ait de sortie continue du bouillon de culture **(Minihane et Brown, 1986)**. Par conséquent, le volume de culture augmente progressivement au cours du temps **(Heijnen *et al.*, 1992)**.

L'alimentation peut suivre des profils préprogrammés (par exemple, constants ou exponentiels) ou être contrôlée par rétroaction (feedback) à partir de paramètres mesurables tels que l'oxygène dissous (OD), le pH, le quotient respiratoire (RQ) ou la concentration de substrat **(Minihane et Brown, 1986)**.

2. Bioréacteur pilote

2.1 Définition, rôle et importance

Un bioréacteur pilote est un système de culture constituant une étape intermédiaire essentielle entre les études de laboratoire et la production industrielle (De Mello *et al.*, 2024) (Figure 9). Il permet de valider la viabilité technique et économique d'un bioprocédé avant son passage à l'échelle commerciale, en reproduisant les conditions optimales déterminées au laboratoire tout en identifiant les paramètres critiques qui ne peuvent être correctement évalués qu'à une échelle plus grande (De Mello *et al.*, 2024).

La conception d'un tel système repose sur l'intégration harmonieuse de multiples fonctions : mélange (macro- et micro-mélange), transfert de matière (notamment l'oxygène), échange thermique, contrôle des paramètres et stérilité



Figure 9. Les différentes étapes de changement d'échelle (Scale-up) d'un bioréacteur (Delvigne, 2010) (l'élément encadré en rouge a été ajouté par nos soins)

2.2 Aperçu sur les conditions opératoires contrôlées pour *Rhizobium*

Les bioréacteurs à cuve agitée (Figure 10) mécaniquement sont les plus utilisés à l'échelle pilote. Ils sont principalement composés d'une cuve équipée d'un système d'agitation comprenant un ou plusieurs mobiles d'agitation montés sur un arbre, ainsi que de chicanes, de capteurs et de systèmes d'alimentation (De Mello *et al.*, 2024).



Figure 10. Vue d'ensemble et composants principaux d'un prototype de bioréacteur à cuve agitée. (1. Cuve en verre, 2. Moteur DC, 3. Couvercle en acier inoxydable, 4. Pompe à eau, 5. Bain thermostaté, 6. Unité d'alimentation électrique, 7. Base du bioréacteur, 8. Transmission, 9. Câblage vers l'ordinateur de contrôle) (Gueguim *et al.*, 2003)

2.2.1 Système de contrôle de la température

Le système de refroidissement et de chauffage constitue un élément fondamental de la conception des bioréacteurs, car la régulation thermique est impérative pour maintenir des conditions de croissance optimales. Ces dispositifs utilisent généralement des chemises de refroidissement (jackets) ou des serpentins internes où circule un fluide caloporteur, tel que l'eau ou le glycol, pour assurer le transfert de chaleur et stabiliser la température du milieu de culture. (Anupama, 2023). Pour le genre *Rhizobium*, ce la impose un maintien strict de la température du milieu entre 28 et 30 °C (Ekundayo *et al.*, 2019)

2.2.2 Contrôle de l'acidité

Le métabolisme de *Rhizobium* entraîne la production d'acides organiques et de CO₂, ce qui tend à acidifier le milieu de culture. En l'absence de régulation, le pH peut écarter de la plage optimale (généralement entre 6 et 7), provoquant ainsi une inhibition de la croissance bactérienne (Ekundayo *et al.*, 2019). Afin de maintenir le pH dans une plage favorable, une sonde pH assure une mesure en temps réel et déclenche l'ajout contrôlé d'acide ou de base lorsque cela est nécessaire (Pereira Duta *et al.*, 2006).

2.2.3 Apport en oxygène

Rhizobium est une bactérie strictement aérobie dont les besoins en oxygène peuvent atteindre 135–360 mL O₂/L/h, Cette exigence nécessite un taux de transfert d'oxygène (OTR) au moins 1,4 à 2,0 fois supérieur à cette demande (**Balatti et al., 1987**). L'air stérile est introduit à l'aide d'un tube perforé (sparger) placé sous les turbines afin d'optimiser le coefficient de transfert de masse (k_{La}) (**Gueguim et al., 2003**).

2.2.4 Agitation mécanique

Afin d'assurer l'homogénéité du milieu, le bioréacteur est équipé de turbines de type Rushton à six pales, reconnues pour leur efficacité dans la dispersion des gaz. Deux turbines sont généralement installées pour favoriser un mélange radial optimal, tandis que quatre chicanes (baffles) fixées perpendiculairement à la paroi limitent la formation de vortex. La vitesse d'agitation recommandée varie entre 250 et 450 rpm (**Gueguim et al., 2003**).

2.3 Fermentation et mise à l'échelle

La multiplication du *Rhizobium* repose sur des techniques de fermentation avancées, indispensables pour atteindre la densité bactérienne requise à une fixation efficace de l'azote (**Suthar et al., 2017; Arnol et al., 2025**). Cette production peut être réalisée selon deux principaux modes de fermentation : la fermentation discontinue (Batch), où les nutriments sont fournis en une seule fois au début du cycle, et la fermentation continue, où l'apport de nutriments et le retrait du produit se font à un taux fixe. Cette dernière approche est souvent privilégiée pour améliorer le rendement, puisqu'elle maintient les micro-organismes en phase de croissance exponentielle (**Suthar et al., 2017**).

Le procédé comprend également une étape de mise à l'échelle (scale-up), permettant le transfert des cultures du laboratoire vers des fermenteurs industriels de grande capacité afin d'atteindre une concentration cellulaire optimale, souvent supérieure à 10⁹ cellules/mL (**Gatabazi et al., 2024; Bahuguna et al., 2025**).

3. Traitement post-fermentation et conservation : La lyophilisation

La lyophilisation (ou cryodessiccation) Représente une méthode de référence pour la préservation durable des micro-organismes dans les collections de cultures. Cette technique revêt une importance particulière pour les bactéries diazotrophes, capables d'assurer la fixation biologique de l'azote atmosphérique (N₂), en raison de leur contribution majeure à la fertilisation biologique des sols et aux cycles biogéochimiques. Toutefois, leur lyophilisation reste complexe du fait de leur forte sensibilité à la dessiccation, de leur grande taille cellulaire et de la présence de systèmes enzymatiques élaborés, susceptibles d'être affectés par ce procédé de conservation (**Prakash et al., 2013**).

3.1 Principe de la lyophilisation

Le principe de la lyophilisation, également appelée séchage par congélation, repose sur l'élimination de l'eau contenue dans une suspension bactérienne préalablement congelée grâce au phénomène de sublimation sous pression réduite (**Malik, 1988a, 1988b; Prakash et al., 2013**).

La sublimation est définie comme le passage direct de l'eau de l'état solide (glace) à l'état gazeux (vapeur) sans passer par la phase liquide, ce qui minimise les dommages structurels causés aux cellules (**Malik, 1988a**).

Ce procédé induit un état de dormance microbiologique caractérisé par l'arrêt quasi complet de l'activité métabolique cellulaire, permettant ainsi de préserver la viabilité et la stabilité génétique des souches pendant de longues périodes de conservation (**Prakash et al., 2013**).

L'efficacité de cette technique repose sur plusieurs paramètres essentiels, notamment : (**Malik, 1988a, 1988b ; Rojas-Tapias et al., 2013**)

- **Lyoprotection :**

Avant la congélation, les micro-organismes sont suspendus dans un milieu protecteur (ex: lait écrémé, glutamate, méso-inositol). Ces agents protègent les membranes cellulaires contre la formation de cristaux de glace intracellulaires et préviennent la dénaturation de l'ADN et des protéines lors de la dessiccation

- **Congélation contrôlée :**

Chez les bactéries sensibles, une vitesse de refroidissement progressive, d'environ 1 C° par minute jusqu'à -30 C°, est généralement recommandée afin de limiter les dommages liés aux chocs thermiques et de préserver l'intégrité cellulaire

- **Dessiccation primaire (Sublimation) :**

Sous l'effet d'un vide poussé, la glace est éliminée progressivement par sublimation. Cette étape, dont la durée varie généralement entre 12 et 16 heures, permet de retirer la majeure partie de l'eau tout en préservant les systèmes enzymatiques complexes des cellules

- **Dessiccation secondaire :**

Cette étape finale vise à éliminer l'humidité résiduelle fortement liée aux molécules biologiques sous un vide encore plus élevé

- **Conditionnement sous vide :**

Afin d'assurer une conservation durable, les ampoules sont scellées hermétiquement sous vide, empêchant toute pénétration d'oxygène ou d'humidité susceptible de provoquer des phénomènes d'oxydation et une perte de viabilité cellulaire.

Partie 2 : Travaux expérimentaux et Résultats

Chapitre III :

Matériel et Méthodes

1. Essai de réalisation d'un bioréacteur pilote

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen, sur une période allant de début mars à fin mai.

1.1 Matériaux et équipements utilisés

1.1.1 La cuve

Cuve de culture constitue le cœur du bioréacteur. Pour cette construction, une jarre en verre d'une capacité d'environ 10 L, présente un diamètre (D_t) de 23cm et une hauteur (H) de 34 cm , a été utilisée. Sa transparence totale facilite l'observation visuelle du procédé.



Photo personnelle 1.Cuve en verre

1.1.2 Moteur à Courant Continu

Le moteur à courant continu a été retenu pour l'entraînement du système d'agitation en raison de sa robustesse, de sa disponibilité et de ses caractéristiques mécaniques . Fonctionnant sous une tension de 12 V, il délivre une vitesse nominale largement suffisante pour couvrir la plage d'agitation requise par la culture de *Rhizobium* (250–450 tr/min), la vitesse étant ajustée et à l'aide d'un variateur de vitesse PWM . Ce dispositif permet un contrôle précis de la vitesse d'agitation, paramètre essentiel pour

l'optimisation du transfert d'oxygène et la rééducation des contraintes de cisaillement exercées sur les cellules bactériennes.

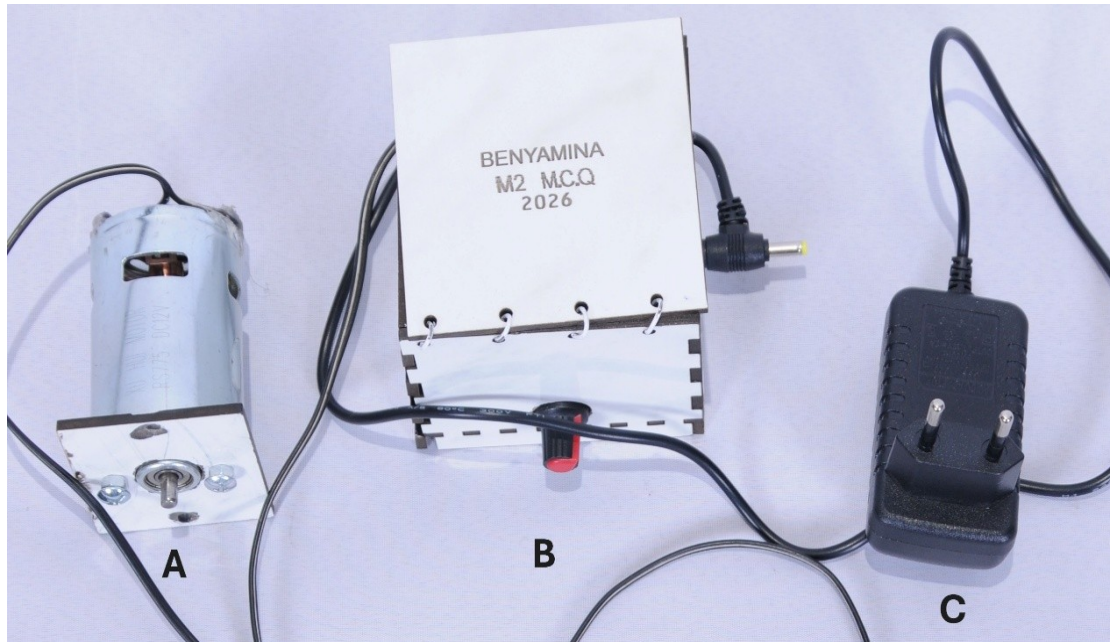


Photo personnelle 2.(A) Moteur DC 12v;(B) Variateur de vitesse PWM;(C) Alimentation 12v

1.1.3 Axe et hélices d'agitation

L'axe d'agitation constitue l'élément de transmission mécanique reliant le moteur aux turbines immergées dans le milieu de culture. Il doit présenter une rigidité suffisante afin d'assurer la stabilité de rotation et de prévenir toute vibration ou déformation sous charge.

Les turbines sont fixées sur l'axe à l'aide de vis de serrage, garantissant leur maintien en position sous les sollicitations mécaniques de la fermentation.

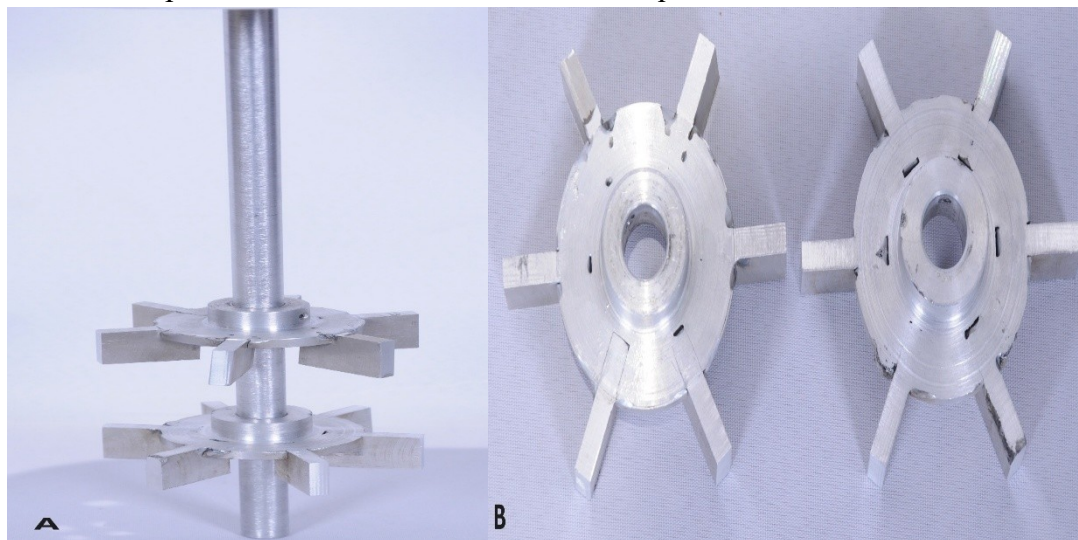


Photo personnelle 3.(A) Agitateur à débit radial ;(B) turbine a pale droite model rushton

1.1.4 Pompe à Air

L'alimentation en air du bioréacteur est assurée par un compresseur à membrane, retenu pour sa compacité et son adéquation à l'échelle pilote. Disposant de deux sorties d'aération indépendantes avec régulateur de débit intégré, il permet un contrôle ajustable du flux d'air introduit dans la cuve, paramètre critique pour le maintien de l'oxygène dissous à un niveau suffisant pour la croissance de *Rhizobium*. Le débit total disponible 6 L/min.



Photo personnelle 4.Compresseur d'air à membrane

2. Fermentation et production du biomasse

2.1 Souche bactérienne et milieux de culture

Le micro-organisme employé est *Rhizobium* (souche SAAA). Sur la base d'études antérieures menées au sein de notre laboratoire, cette souche hautement compétitive a été sélectionnée pour cette étude. Elle provient de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou Bakr Belkaïd – Tlemcen où elle a été initialement isolée par l'équipe du Dr. RAHMOUN Malika.

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'enrichissement des bactéries sont stérilisés à 121 °C pendant 15 min après que leur pH soit ajusté à 6.8. Les bactéries sont cultivées sur une gélose à base de mannitol et d'extrait de levure YMA (Annexe) qui est incubée dans une étuve à une température de 28 °C pendant 2 jours.

- Préparation de bouillon à base de mannitol et d'extrait de levure Yeast Mannitol Broth (YMB) (Annexe) :

Le milieu YMB a été préparé en grand volume, soit environ 6.5 L , conformément à la formulation standard. Avant l'étape de stérilisation, l'ensemble du volume a été réparti dans plusieurs flacons. Parmi ceux-ci, un flacon contenant 150 mL a été réservé à la préparation de l'inoculum, tandis que les autres flacons ont été destinés à alimenter le bioréacteur.



Photo personnelle 5.Milieu synthétique YMB (Yeast Mannitol Broth)

2.2 Préparation de l'inoculum

Les inocula sont préparés dans un flacon contenant 150 mL de bouillon YMB. Ces bouillons sont stérilisés à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 15 min.

Après un refroidissement, ils sont ensemencés avec une colonie bactérienne cultivée sur une gélose YMA avec l'aide d'un fil à boucle et incubés pendant 24h à une température de 28 °C.



Photo personnelle 6.les étapes de préparation de l'inoculum

2.3 Culture en bioréacteur pilote

Une fois le bioréacteur (pilote) validé sur le plan mécanique, l'étape de la culture bactérienne a été initiée.

Le milieu YMB, préalablement stérilisé en flacons, a été introduit de manière rigoureusement aseptique dans la cuve du bioréacteur. L'étape d'inoculation a été réalisée en injectant le flacon de 150 mL d'inoculum.

Dès le lancement du processus, La culture a été menée à température ambiante à $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, tandis que le pH initial a été ajusté 6.8 . Le système d'agitation et la pompe d'aération ont été activés en continu.



Photo personnelle 7. Expérience en bioréacteur (pilote)

- Échantillonnage

Durant toute la durée de la fermentation, des prélèvements périodiques ont été réalisés via le tube d'échantillonnage pour suivre la cinétique de croissance par mesure de la densité optique à 580 nm (DO_{580}).



Photo personnelle 8. Prélèvement d'un échantillon et mesure de la densité optique (DO_{580})

À l'issue de la fermentation, un aliquot de la culture bactérienne a été prélevé du bioréacteur, puis conditionné en vue de sa lyophilisation.



Photo personnelle 9. Conditionnement de l'aliquot de culture dans des tubes Falcon (50 mL)

Chapitre IV :

Résultat et Discussion

1. Suivi et cinétique de la fermentation

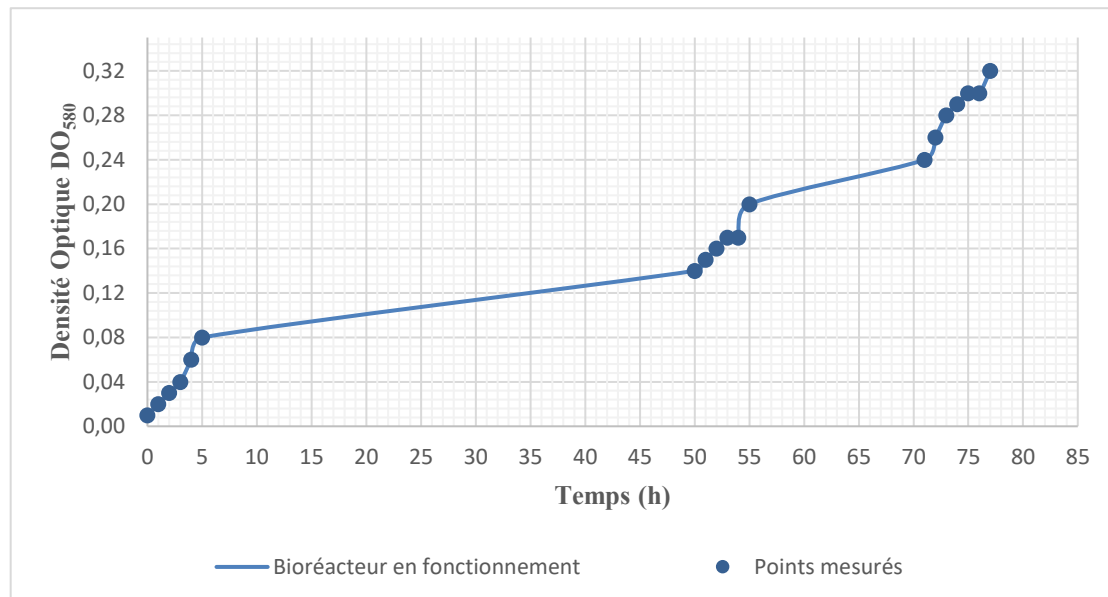


Figure 11. Cinétique de croissance de *Rhizobium* en bioréacteur à cuve agitée :
Évolution de la densité optique (DO₅₈₀) en fonction du temps

Le suivi de la croissance bactérienne (**Figure 11**) dans notre bioréacteur a mis en évidence une prolifération significative des souches étudiées. L'utilisation du milieu YMB (Yeast Mannitol Broth) a favorisé une multiplication efficace de la biomasse bactérienne, en accord avec les observations de **Begom *et al.* (2021)**, qui décrivent ce milieu comme une méthode adaptée à la production de bactéries à forte densité.

Par ailleurs, les travaux de **Begom *et al.* (2021)** soulignent l'importance de l'aération de culture. Selon ces auteurs, l'apport en oxygène constitue un facteur essentiel de croissance, permettant d'assurer une distribution homogène des nutriments dans le milieu et de limiter l'agrégation cellulaire.

2. L'aspect du milieu de production

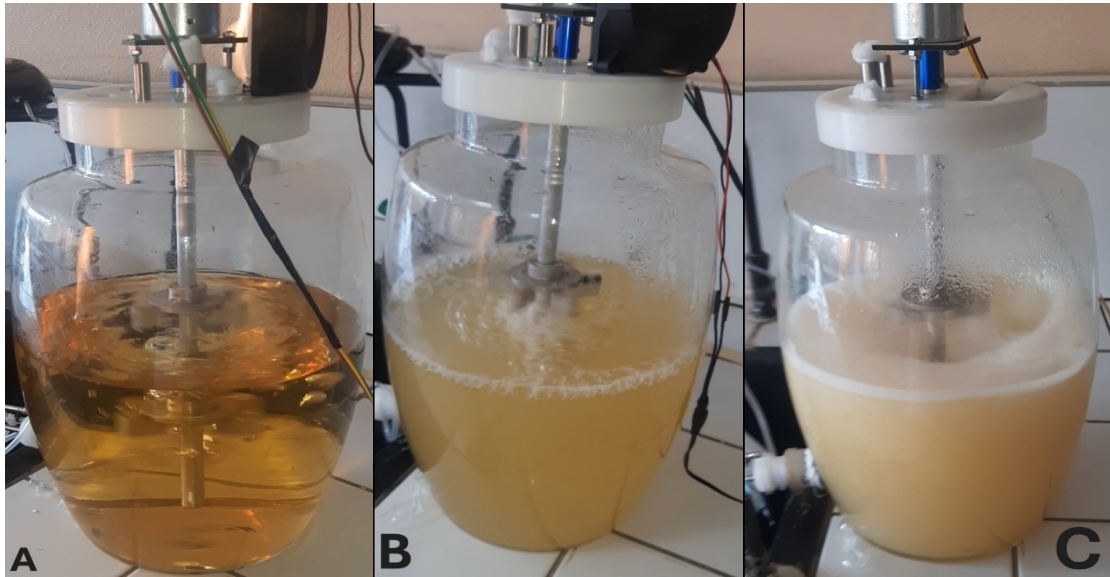


Photo personnelle 10.Évolution de l'aspect macroscopique du milieu de production de *Rhizobium* au cours du temps : (A) $t=0$ h ; (B) $t=50$ h ; (C) $t=70$ h

Les résultats obtenus au cours de la fermentation ont mis en évidence une augmentation progressive de la turbidité du milieu de culture, qui est devenu de plus en plus opaque au fil de l'incubation. Cette observation concorde avec les travaux de **Begom *et al.* (2021)** et **Kothur *et al.* (2025)**. La mesure de la turbidité constitue un indicateur physique essentiel pour le suivi de la croissance microbienne et l'évaluation de l'efficacité du procédé fermentaire.

Déterminée par la densité optique, elle permet d'estimer la concentration cellulaire dans le bouillon de culture. L'augmentation de l'opacité du milieu traduit ainsi multiplication active des cellules bactériennes au cours de la fermentation.

Conclusion

Ce travail s'inscrit dans une démarche visant le développement d'alternatives biologiques durables aux engrais chimiques, à travers la conception et la réalisation d'un bioréacteur pilote dédié à la production de *Rhizobium*. à partir de matériaux simples et accessibles. Cette démarche a permis d'articuler les connaissances théoriques relatives à la physiologie du *Rhizobium* et à la biochimie de ses composés de surface avec les aspects pratiques liés au génie des bioprocédés et à la conception des systèmes de fermentation

Sur le plan des résultats on était capable de produire dans un bioréacteur pilote. La productivité de la souche choisie était réalisée avec succès, le bioréacteur conçu a démontré sa capacité à fournir les conditions essentielles à la croissance bactérienne. Le suivi de la densité optique a révélé une augmentation progressive de la biomasse tout au long de la fermentation, accompagnée d'un changement de coloration et d'une turbidité croissante du milieu, constituant des indicateurs tangibles d'une activité métabolique effective de *Rhizobium*.

Grâce à ces réalisations, les résultats obtenus représentent une base expérimentale encourageante et ouvrent des perspectives de recherche prometteuses. À cet égard, plusieurs recommandations peuvent être formulées pour améliorer encore plus le procédé :

- Améliorer le système d'étanchéité et de stérilisation afin de garantir des conditions aseptiques tout au long de la fermentation.
- Mettre en place un système automatisé de mesure et de régulation des paramètres physicochimiques (pH, température, oxygène dissous) en temps réel.
- Quantifier la concentration cellulaire par des méthodes plus précises telles que le dénombrement sur boîtes.

La réalisation de ce travail, malgré les défis rencontrés, confirme la faisabilité de la production de *Rhizobium* dans un bioréacteur de fabrication artisanale et contribue à promouvoir une agriculture plus durable, fondée sur la valorisation des ressources biologiques locales.

Références bibliographiques

1. Abusaief, H.M.A.-A. et Boasoul, S.H. (2021) « A taxonomic study of twelve wild forage species of Fabaceae », *Heliyon*, 7(2), p. e06077. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06077>.
2. Anupama, P.M. (2024) « Bioreactors – A critical review on construction, considerations and applications », in *Futuristic Trends in Biotechnology Volume 3 Book 17. Iterative International Publishers (IIP)*, p. 50-76. <https://doi.org/10.58532/V3BJBT17P1CH5>.
3. Aremu, B.R., Alori, E.T., Kutu, R.F. et Babalola, O.O. (2017) « Potentials of microbial inoculants in soil productivity: an outlook on African legumes », in D.G. Panpatte et al. (éd.) *Microorganisms for Green Revolution*. Singapore: Springer Singapore (Microorganisms for Sustainability, vol. 6), p. 53-75. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4_3.
4. Arnol, A.J. *et al.* (2025) « Production of biofertilizers using Rhizobium isolated from Phaseolus vulgaris root nodules », *African Journal of Biology and Medical Research*, 8(1), p. 71-85. <https://doi.org/10.52589/AJBMR-KUKVFYSX>.
5. Bahuguna, V. *et al.* (2025) « Rhizobium as a potential biofertilizer and its quality control analysis for sustainable agriculture », *Journal of Applied Biology & Biotechnology* [Preprint]. <https://doi.org/10.7324/JABB.2025.197428>.
6. Bakratsas, G. *et al.* (2021) « Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives », *Future Foods*, 4, p. 100086. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086>.
7. Balatti, A.P., Mazza, L.A. et Moretti, E. (1987) « Aeration requirements of Rhizobium cultures », *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 3(3), p. 227-234. <https://doi.org/10.1007/BF00933576>.
8. Basile, L.A. et Lepek, V.C. (2021) « Legume–rhizobium dance: an agricultural tool that could be improved? », *Microbial Biotechnology*, 14(5), p. 1897-1917. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13906>.
9. Begom, Most.F. *et al.* (2021) « Culture Optimization for Mass Production of Rhizobium Using Bioreactor Made of Readily Available Materials and Agitated by Air Flow », *Agricultural Sciences*, 12(6), p. 620-629. <https://doi.org/10.4236/as.2021.126040>.
10. Behl, M. *et al.* (2023) « Fundamentals of fermentation technology », *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*. Elsevier, p. 313-328. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00021-0>.
11. Bud, R. (2011) « Innovators, deep fermentation and antibiotics: promoting applied science before and after the Second World War », *Dynamis*, 31(2), p. 323-341. <https://doi.org/10.4321/S0211-95362011000200004>.
12. Cieřla, J. *et al.* (2016) « Surface Properties of Wild-Type Rhizobium leguminosarum bv. trifolii Strain 24.2 and Its Derivatives with Different Extracellular Polysaccharide

- Content », *PLOS ONE*. Édité par F. Martinez-Abarca, 11(10), p. e0165080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165080>.
13. Clúa, J. *et al.* (2018) « Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis », *Genes*, 9(3), p. 125. <https://doi.org/10.3390/genes9030125>.
 14. De Mello, A.F.M. *et al.* (2024) « Strategies and engineering aspects on the scale-up of bioreactors for different bioprocesses », *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 4(2), p. 365-385. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00205-z>.
 15. Delvigne, F. (2010) *Cycle de séminaires « Bioprocédés et biotechnologie »*. <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/seminaire/10.pdf>.
 16. Ekundayo, F. *et al.* (2019) « Effect of some environmental conditions on the growth of rhizobium species », *Journal of Bio-Science*, 26, p. 15-24. <https://doi.org/10.3329/jbs.v26i0.44660>.
 17. Elkan, G.H. et Kwik, I. (1968) « Nitrogen, Energy and Vitamin Nutrition of *Rhizobium japonicum* », *Journal of Applied Bacteriology*, 31(4), p. 399-404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1968.tb00386.x>.
 18. Ferencik, N. *et al.* (2021) « Overview article: bioreactors designed for 3D bioprinted tissue and process parameters », *2021 IEEE 19th World Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics (SAMI)*. *2021 IEEE 19th World Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics (SAMI)*, Herl'any, Slovakia: IEEE, p. 000131-000134. <https://doi.org/10.1109/SAMI50585.2021.9378697>.
 19. Ferraz Helene, L.C., Klepa, M.S. et Hungria, M. (2022) « New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia », *International Journal of Microbiology*. Édité par Z. Li, 2022, p. 1-19. <https://doi.org/10.1155/2022/4623713>.
 20. Fitzpatrick, J.J. (2019) « Insights from Mathematical Modelling into Energy Requirement and Process Design of Continuous and Batch Stirred Tank Aerobic Bioreactors », *ChemEngineering*, 3(3), p. 65. <https://doi.org/10.3390/chemengineering3030065>.
 21. Gage, D.J. (2004) « Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), p. 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>.
 22. Gatabazi, A. *et al.* (2024) Effectiveness of *Rhizobium tropici* sp. strain UD5 peat bio-fertilizer inoculant on growth, yield, and nitrogen concentration of common bean », *Nitrogen*, 5(1), p. 79-90. <https://doi.org/10.3390/nitrogen5010006>.
 23. Gavrilescu, M. et Roman, R.V. (1998) « Performance of airlift bioreactors in the cultivation of some antibiotic producing microorganisms », *Acta Biotechnologica*, 18(3), p. 201-229. <https://doi.org/10.1002/abio.370180304>.
 24. Ghosh, P.K. et Maiti, T.K. (2016) « Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis: — A

- Review », *Achievements in the Life Sciences*, 10(2), p. 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.003>.
25. Graham, P.H. (1963) « Vitamin Requirements of Root Nodule Bacteria », *Journal of General Microbiology*, 30(2), p. 245-248. <https://doi.org/10.1099/00221287-30-2-245>.
 26. Gueguim, K. *et al.* (2003) « Constructional features of a 15-litre home-made bioreactor for fed-batch fermentations », *African Journal of Biotechnology*, 2(8), p. 233-236. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1047>.
 27. Gulati, S.L. (1980) « A simple Device of an Improvised Fermentor for Production of Rhizobial Culture », *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 135(4), p. 302-307. [https://doi.org/10.1016/S0323-6056\(80\)80004-8](https://doi.org/10.1016/S0323-6056(80)80004-8).
 28. Heijnen, J.J., Terwisscha Van Scheltinga, A.H. et Straathof, A.J. (1992) « Fundamental bottlenecks in the application of continuous bioprocesses », *Journal of Biotechnology*, 22(1-2), p. 3-20. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90128-V](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90128-V).
 29. Jordan, D.C. et Coulter, W.H. (1965) « ON THE CYTOLOGY AND SYNTHETIC CAPACITIES OF NATURAL AND ARTIFICIALLY PRODUCED BACTERIODS OF RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM », *Canadian Journal of Microbiology*, 11(4), p. 709-720. <https://doi.org/10.1139/m65-094>.
 30. Junker, B.H. (2004) « Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(6), p. 347-364. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70218-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70218-2).
 31. Kothur, S.K., Jeevan Chandra, S., Simhachalam, B.L. et Pindi, P.K. (2026) « Enhanced biomass production and liquid bio inoculant optimization for Bradyrhizobium sp. PSK through statistical methods in batch fermentation at laboratory scale », *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 28(1-2), p. 18-29. <https://doi.org/10.53550/AJMBES.2026.v28.i01-02.003>.
 32. Lee, M.S. (1981) « Diversity in the nutritional requirements of strains of various Rhizobium species », *Soil Biology and Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(81\)90075-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(81)90075-4).
 33. Lindström, K. et Mousavi, S.A. (2020) « Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia », *Microbial Biotechnology*, 13(5), p. 1314-1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>.
 34. Malik, K.A. (1988) « A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria », *Journal of Microbiological Methods*, 8(5), p. 259-271. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(88\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0167-7012(88)90008-5).
 35. Masson-Boivin, C. *et al.* (2009) « Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? », *Trends in Microbiology*, 17(10), p. 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>.

36. Minihane, B.J. et Brown, D.E. (1986) « Fed-batch culture technology », *Biotechnology Advances*, 4(2), p. 207-218. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(86\)90309-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(86)90309-5).
37. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology, Second Edition* (2017). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b22421>.
38. Murshid, S. *et al.* (2023) « A review on biofilm-based reactors for wastewater treatment: Recent advancements in biofilm carriers, kinetics, reactors, economics, and future perspectives », *Science of The Total Environment*, 892, p. 164796. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164796>.
39. Oldroyd, G.E.D. *et al.* (2011) « The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis », *Annual Review of Genetics*, 45(1), p. 119-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>.
40. Panpatte, D.G. *et al.* (éd.) (2017) *Microorganisms for Green Revolution*. Singapore: Springer Singapore (Microorganisms for Sustainability). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4>.
41. Patel, J.J. et Yang, A.F. (1981) « Light and electron microscopic studies of nodule structure of alfalfa », *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), p. 36-43. <https://doi.org/10.1139/m81-006>.
42. Pereira Duta, F., Pessoa De Franca, F. et De Almeida Lopes, L.M. (2006) « Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method », *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), p. 0-0. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue4-fulltext-7>.
43. Pinto, J. *et al.* (2022) « Modeling and optimization of bioreactor processes », *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, p. 89-115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91167-2.00016-2>.
44. Prakash, O., Nimonkar, Y. et Shouche, Y.S. (2013) « Practice and prospects of microbial preservation », *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), p. 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>.
45. Price, N.P.J. (1999) « Carbohydrate determinants of *Rhizobium*–legume symbioses », *Carbohydrate Research*, 317(1-4), p. 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00075-0).
46. Prokop, A. (1981) « Bioreactor design fundamentals: Hydrodynamics, mass transfer, heat exchange, control and scale-up », *Acta Biotechnologica*, 1(3), p. 269-278. <https://doi.org/10.1002/abio.370010305>.
47. Rajpurohit, H. et Eiteman, M.A. (2022) « Nutrient-Limited Operational Strategies for the Microbial Production of Biochemicals », *Microorganisms*, 10(11), p. 2226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112226>.
48. Rehm, H. -J. (1970) « Modern Industrial Microbiological Fermentations and Their Effects on Technical Developments », *Angewandte Chemie International Edition in English*, 9(12), p. 936-945. <https://doi.org/10.1002/anie.197009361>.

49. Rivas, R., García-Fraile, P. et Velázquez, E. (2009) « Taxonomy of bacteria nodulating legumes », *Microbiology Insights*, 2, p. MBI.S3137. <https://doi.org/10.4137/MBI.S3137>.
50. Silipo, A. *et al.* (2014) « Covalently linked hopanoid-lipid A improves outer-membrane resistance of a Bradyrhizobium symbiont of legumes », *Nature Communications*, 5(1), p. 5106. <https://doi.org/10.1038/ncomms6106>.
51. Somasegaran, P. et Hoben, H.J. (1994) *Handbook for Rhizobia*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>.
52. Suthar, H. *et al.* (2017) « Fermentation: A Process for Biofertilizer Production », in D.G. Panpatte *et al.* (éd.) *Microorganisms for Green Revolution*. Singapore: Springer Singapore (Microorganisms for Sustainability). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4>.
53. The Legume Phylogeny Working Group (2013) « Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades », *TAXON*, 62(2), p. 217-248. <https://doi.org/10.12705/622.8>.
54. Ulber, R. et Soye, K. (2004) « 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin », *Chemie in unserer Zeit*, 38(3), p. 172-180. <https://doi.org/10.1002/ciuz.200400295>.
55. Van Brussel, A.A.N., Planque, K. et Quispel, A. (1977) « The Wall of Rhizobium leguminosarum in Bacteroid and Free-living Forms », *Journal of General Microbiology*, 101(1), p. 51-56. <https://doi.org/10.1099/00221287-101-1-51>.
56. Vandana, U.K. *et al.* (2017) « Microbial biofertilizer: a potential tool for sustainable agriculture », in D.G. Panpatte *et al.* (éd.) *Microorganisms for Green Revolution*. Singapore: Springer Singapore (Microorganisms for Sustainability). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4>.
57. Wang, Q., Liu, J. et Zhu, H. (2018) « Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-Rhizobium interactions », *Frontiers in Plant Science*, 9, p. 313. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>.

ANNEXES

ANNEXE MILIEUX DE CULTURE

Composition du milieu Yeast Mannitol Broth (YMB) (Somasegaran et Hoben, 1994)

Composants	Quantités
Mannitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
Na Cl	0.1 g
Extrait de levure	0.5 g
Eau distillée	1000 mL

Le milieu est ajusté à pH 6.8 et stérilisé pendant 15 min. à 121°C

Composition du milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) (Somasegaran et Hoben, 1994)

Composants	Quantités
YMB	1000 mL
Agar	15 g

Le milieu est ajusté à pH 6.8 et stérilisé pendant 15 min. à 121°C

ملخص

يعد تثبيت البايولوجي للأزوت الجوي بواسطة بكتيريا العقد الجذرية "الريزوبوم" بديلا مستداما للأسمدة الكيميائية عن طريق استعمالها كسماد حيوي. فهي تعيش في علاقة تكافلية مع البقوليات حيث تحول النيتروجين الجوي إلى أمونيا يستفيد منها النبات وهذا ما جعلها محل اهتمام دراسات ومع ذلك يفتقر المجال العلمي إلى معلومات حول الإنتاج الضخم لهاته البكتيريا على نطاق واسع حيث تظل أغلب التقنيات أسرار تجارية. في هذا الإطار يتمحور هذا العمل حول انجاز مفاعل حيوي تجريبي (بأدوات بسيطة) خصيصا لإنتاج بكتيريا الريزوبوم. لقد تم تصميم المفاعل الحيوي (التجريبي) على مستوى مخبر ميكروبيولوجيا التطبيقية للأغذية للبيوطي والبيئة (LAMAABE). كشف متابعة حركة النمو البكتيري عن ارتفاع تدريجي في الكتلة الحيوية خلال مرحلة التخمير، رفقت بتغير ملحوظ في لون وعكارة الوسط بحيث يجسد نشاطا أيضا فعليا. لقد أصبح تصميم هذا المفاعل الحيوي التجريبي واقعا ملموسا، مما يؤكد جدوى التجربة وتشكل هاته النتائج أساسا تجريبيا واعداد لتحسين العملية مستقبلا ويمهد الطريق لنقل هذه العملية إلى النطاق الصناعي. الكلمات المفتاحية: الريزوبوم (*Rhizobium*)، تثبيت النيتروجين، التخمير، المفاعل الحيوي.

ABSTRACT

The biological fixation of atmospheric nitrogen by the root-nodule bacteria *Rhizobium* is considered a sustainable alternative to chemical fertilisers through its use as a biofertiliser; They live in a symbiotic relationship with legumes, converting atmospheric nitrogen into ammonia that the plant can utilise, which has made them the subject of much research. However, the scientific community lacks information on the large-scale production of these bacteria, as most techniques remain trade secrets. In this context, this work focuses on the development of a pilot bioreactor (using simple equipment) specifically for the production of *Rhizobium* bacteria.

The pilot bioreactor was designed at the Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE).

Monitoring of bacterial growth kinetics revealed a gradual increase in biomass during the fermentation phase, accompanied by a noticeable change in the colour and turbidity of the medium, reflecting actual metabolic activity.

The design of this experimental bioreactor has now become a reality, confirming the feasibility of the experiment. These results provide a promising experimental basis for future process optimisation and pave the way for the scale-up of this process to an industrial scale.

Keywords: *Rhizobium*, Nitrogen fixation, Fermentation, Bioreactor.

RESUME

La fixation biologique de l'azote atmosphérique par les bactéries *Rhizobium* constitue une alternative durable aux engrais chimiques grâce à leur utilisation comme engrais biologique. Elles vivent en symbiose avec les légumineuses, transformant l'azote atmosphérique en ammoniac dont la plante tire profit, ce qui a suscité l'intérêt de nombreuses études. Cependant, le domaine scientifique manque d'informations sur la production à grande échelle de ces bactéries, la plupart des techniques restant des secrets commerciaux. Dans ce contexte, ce travail s'articule autour de la mise au point d'un réacteur biologique expérimental (à l'aide d'outils simples) spécialement destiné à la production de la bactérie *Rhizobium*.

Le réacteur biologique (expérimental) a été conçu au sein du laboratoire de microbiologie appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).

Le suivi cinétique de la croissance bactérienne a révélé une augmentation progressive de la biomasse au cours de la phase de fermentation, accompagnée d'un changement notable de la couleur et de la turbidité du milieu, ce qui témoigne d'une activité métabolique réelle.

La conception de ce bioréacteur pilote est désormais une réalité, ce qui confirme la pertinence de l'expérience. Ces résultats constituent une base expérimentale prometteuse pour l'amélioration future du procédé et ouvrent la voie à son transfert à l'échelle industrielle.

Mots-clés : *Rhizobium*, Fixation d'azote, Fermentation, Bioréacteur.