

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Salah BOUBNIDER CONSTANTINE 3



FACULTE : GENIE DES PROCÉDES
DEPARTEMENT : GENIE PHARMACEUTIQUE

N° d'ordre :

Série :

Mémoire de Master

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Contribution à la production de biopesticide bactérien à l'échelle de laboratoire, dans un bioréacteur de 2 litres, en présence de milieux à base de matière lignocellulosique

Dirigé par :

Pr. BENAÏSSA-KACEM CHAOUCHÉ Akila

Présenté par :

BECHIA Racha Anfel

BENKARA ALI Rokia

BOUKELIA Boutheina

Année Universitaire 2022/2023

Session : (juin)

Table des matières

Remerciements.....	<u>I</u>
Dédicaces.....	<u>II</u>
Table des matières	<u>III</u>
Liste des Abréviations	VI
Liste des Figures	VII
Liste des tableaux	IX
Introduction générale	Error! Bookmark not defined.
CHAPITRE I : Aperçu Bibliographique	Error! Bookmark not defined.
1.1. Introduction	Error! Bookmark not defined.
1.2. Biotechnologie	Error! Bookmark not defined.
1.1.2. Domaine d'application de la biotechnologie	Error! Bookmark not defined.
1.3. Bioprocédés.....	Error! Bookmark not defined.
1.3.1. Procédés de fermentation	Error! Bookmark not defined.
1.3.1.1. Définition de la fermentation.....	Error! Bookmark not defined.
1.3.1.2. Métabolites primaires	Error! Bookmark not defined.
1.3.1.3. Métabolites secondaires	Error! Bookmark not defined.
1.3.1.4. Différents types de fermentations.....	Error! Bookmark not defined.
1.3.1.5. Différents modes de fermentation	Error! Bookmark not defined.
1.3.1.6. Facteurs influençant la fermentation	Error! Bookmark not defined.
1.4. Bioréacteur	Error! Bookmark not defined.
1.4.1. Définition	Error! Bookmark not defined.
1.5. Production des biopesticides	Error! Bookmark not defined.
1.5.1. Définition des biopesticides	Error! Bookmark not defined.
1.5.2. Types des biopesticides	Error! Bookmark not defined.
1.5.2.1. Biopesticides microbiens.....	Error! Bookmark not defined.
1.5.2.2. Biopesticides végétaux	Error! Bookmark not defined.
1.5.2.3. Biopesticides animaux	Error! Bookmark not defined.
1.5.3. Caractéristiques des biopesticides	Error! Bookmark not defined.
1.5.3.1. Avantages des biopesticides	Error! Bookmark not defined.
1.5.3.2. Inconvénients des biopesticides	Error! Bookmark not defined.

1.6. Production des biopesticides à base d'une matière lignocellulosique	Error! Bookmark not defined.
1.7. Caractéristiques des ressources lignocellulosiques.....	Error! Bookmark not defined.
1.8. Différentes souches utilisées	Error! Bookmark not defined.
1.8.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	Error! Bookmark not defined.
1.8.2. <i>Bacillus subtilis</i>.....	Error! Bookmark not defined.
1.9. Statistique de production de biopesticide	Error! Bookmark not defined.
1.9.1. Statistique Mondiale	Error! Bookmark not defined.
1.9.2. Statistique Nationale.....	Error! Bookmark not defined.
1.10. Production de métabolites liés aux biopesticides	Error! Bookmark not defined.
1.10.1. Lipopeptides : Fengycine	Error! Bookmark not defined.
1.10.2. Acide Indole 3- Acétique.....	Error! Bookmark not defined.
1.11. Cinétique du procédé de fermentation.....	Error! Bookmark not defined.
1.12. Travaux antérieurs	Error! Bookmark not defined.
CHAPITRE II : Matériel et méthodes.....	Error! Bookmark not defined.
2.1. Introduction.....	Error! Bookmark not defined.
2.2. Inoculum.....	Error! Bookmark not defined.
2.3. Milieu nutritif	Error! Bookmark not defined.
2.4. Matériel et réactifs utilisés	Error! Bookmark not defined.
2.4.1. Verrerie et petit matériel	Error! Bookmark not defined.
2.4.2. Appareillage.....	Error! Bookmark not defined.
2.4.3. Réactifs utilisés	Error! Bookmark not defined.
2.5. Sélection de la souche microbienne	Error! Bookmark not defined.
2.5.1. Coloration de Gram.....	Error! Bookmark not defined.
2.6. Réactivation des souches bactériennes.....	Error! Bookmark not defined.
2.7. Préparation des milieux de cultures.....	Error! Bookmark not defined.
2.7.1. Préparation du Milieu LB	Error! Bookmark not defined.
2.7.2. Préparation du milieu de culture à base de grignons d'olive additionné de peptone	Error! Bookmark not defined.

2.7.3. Préparation du milieu de culture à base de betterave fermentée	Error! Bookmark not defined.
2.7.4. Stérilisation des erlenmeyers contenant les milieux de culture	Error! Bookmark not defined.
2.8. Préparation de l'inoculum	Error! Bookmark not defined.
2.9. Détermination de la concentration cellulaire à l'aide de la cellule de Thomas.....	Error! Bookmark not defined.
2.10. Détection de la phytohormone, Acide Indole 3 Acétique (IAA)	Error! Bookmark not defined.
2.11. Détermination de la quantité de fengycine formée	Error! Bookmark not defined.
2.12. Test anti fongique par la technique de disque gélosée.....	Error! Bookmark not defined.
2.13. Description du bioréacteur.....	Error! Bookmark not defined.
2.13. Mise en marche du bioréacteur	Error! Bookmark not defined.
2.13.1. Stérilisation du fermenteur.....	Error! Bookmark not defined.
2.13.2. Production du biopesticide	Error! Bookmark not defined.
CHAPITRE III : Résultats et discussions.....	Error! Bookmark not defined.
3.1. Introduction.....	Error! Bookmark not defined.
3.2. Application du bioprocédé à l'échelle de laboratoire en mode Batch	Error! Bookmark not defined.
3.2.1. Sélection de la souche	Error! Bookmark not defined.
3.2.2. Suivre de la croissance microbienne	Error! Bookmark not defined.
3.3. Test de production de l'IAA par la souche microbienne	Error! Bookmark not defined.
3.4. Test Anti fongique	Error! Bookmark not defined.
3.5. Application du bioprocédé à l'échelle de bioréacteur de 2 litres	Error! Bookmark not defined.
3.5.1. Test de production de l'IAA par <i>Bacillus sp.</i>	Error! Bookmark not defined.
3.5.2. Test Anti fongique	Error! Bookmark not defined.
Conclusion Générale et Perspectives	Error! Bookmark not defined.
Références	VII
Annexes	VIII
Résumé	IX

Abstract	X
ملخص	XI

Résumé

Le biopesticide produit par la fermentation des déchets organiques présente une source d'énergie idéale, en diminuant le volume immense des déchets agro-alimentaires, abaissant ainsi la pollution de l'environnement. Parmi les objectifs de la production de biopesticides est de fournir des solutions de protection des cultures durables, respectueuses de l'environnement et de la santé humaine, ces produits visent les ravageurs tout en minimisant les effets indésirables sur les organismes non ciblés et en favorisant une agriculture plus respectueuse de la biodiversité et des écosystèmes.

L'objectif de ce travail consiste, dans un premier lieu, à produire de la biomasse de *Bacillus sp* (biopesticide) dans des erlenmeyers de 250 ml, et ensuite dans un fermenteur de 2L, en utilisant, comme substrat nutritif, des milieux différents. Et aussi, l'évaluation du potentiel de métabolites primaire et secondaire, qui sont rassemblés en Acide indole-3-acétique et la fengycine. La production du biopesticide de *Bacillus sp* a été réalisée dans des conditions optimales, présentées par un pH égal à 6, une température de 30 °C et un taux d'aération meilleur provoqué par une vitesse d'agitation égale à 300 rpm et un débit d'aération égal à 2 vvm. Les résultats expérimentaux ont montré que le *Bacillus sp.* peut s'adapter aux trois milieux de cultures étudiés, avec un μ_{\max} égal à 1.16 h⁻¹ en milieu LB, 0.14 h⁻¹ en milieu à base de grignons d'olive et 0.13 h⁻¹ en milieu à base de betterave fermentée, en mode batch. La production d'acide indole acétique a été favorable dans le milieu à base de grignons d'olive avec une quantité de 53.625 µg/ml, 11.625 µg/ml en milieu à base de betterave fermentée et 8.625 µg/ml en milieu LB. Des essais, à une échelle plus importante, de la production de biopesticide, ont été réalisés dans un bioréacteur de 2L, il a été observé une diminution dans la quantité de l'acide indole acétique produite, dont la valeur atteinte a été estimée à 3.375 µg/ml.

Cependant, la quantité de fengycine produite n'a pas été suffisante pour donner un effet antifongique positif contre le *Fusarium oxysporum* et le *Candida albicans*.

Mots clés : biopesticide, bioréacteur, *Bacillus sp.*, insecticides, matière lignocellulosique, milieu LB, grignons d'olive, betterave.

Abstract

The biopesticide produced by the fermentation of organic waste presents an ideal source of energy, by reducing the immense volume of agri-food waste, thus reducing environmental pollution. Among the objectives of the production of biopesticides is to provide sustainable crop protection solutions, respectful of the environment and human health, these products target pests while minimizing adverse effects on non-target organisms and promoting agriculture more respectful of biodiversity and ecosystems.

The objective of this work consists, first of all, in producing *Bacillus* sp biomass (biopesticide) in 250 ml erlenmeyers, and then in a 2 L fermenter, using different media as a nutrient substrate. And also, the evaluation of the potential of primary and secondary metabolites, which are combined into indole-3-acetic acid and fengycin. The production of the *Bacillus* sp biopesticide was carried out under optimal conditions, presented by a pH equal to 6, a temperature of 30 °C. and a better aeration rate caused by a stirring speed equal to 300 rpm and an aeration flow rate equal to 2 vvm. The experimental results have shown that the *Bacillus* sp. can be adapted to the three studied culture media, with a μ_{max} equal to 1.16 h⁻¹ in LB medium, 0.14 h⁻¹ in olive pomace-based medium and 0.13 h⁻¹ in fermented beetroot-based medium, in batch mode. The production of indole acetic acid was favorable in the medium based on olive pomace with an amount of 53.625 µg/ml, 11.625 µg/ml in fermented beetroot-based medium and 8.625 µg/ml in LB medium. Tests, on a larger scale, of the production of biopesticide, were carried out in a 2L bioreactor, a decrease in the amount of indole acetic acid produced was observed, the reached value of which was estimated at 3.375 µg/ml.

However, the amount of fengycin produced was not sufficient to give a positive antifungal effect against *Fusarium oxysporum* and *Candida albicans*.

Key words: biopesticide, bioreactor, *Bacillus* sp., insecticides, lignocellulosic material, LB medium, olive pomace, beetroot.

ملخص

تتمثل المبيدات الحيوية الناتجة عن تخمير النفايات العضوية مصدرا مثاليا للطاقة، عن طريق التقليل من الحجم الهائل من بقايا الأغذية الزراعية، وبالتالي تقليل التلوث البيئي. من بين أهداف إنتاج المبيدات الحيوية توفير حلول مستدامة لحماية المحاصيل، التي تحترم البيئة وصحة الإنسان، وتستهدف هذه المنتجات الآفات مع تقليل الآثار الضارة على الكائنات الغير المستهدفة وتعزيز الزراعة أكثر احتراماً للتنوع البيولوجي والنظم البيئية.

يتمثل الهدف من هذا العمل، أولاً وقبل كل شيء، في إنتاج الكتلة الحيوية العسوية (المبيدات الحيوية) في زجاجيات ذات سعة 250 مل، ثم في مخمر سعة 2 لتر، باستخدام وسائط مختلفة كركيزة مغذية. وأيضاً، تقييم إمكانات المستقبلات الأولية والثانوية، والتي يتم تمثيل في حمض الإندول -3-أسيتيك والفينجيسين. تم إنتاج المبيدات الحيوية العسوية في ظل الظروف المثلى، والتي تتقدمها درجة الحموضة بنسبة 6، ودرجة حرارة 30 ومعدل تهوية أفضل ناتج عن سرعة التحريك تساوي 300 دورة في الدقيقة ومعدل تدفق تهوية يساوي 2vvm في الدقيقة. وقد أظهرت النتائج التجريبية أن عسوية س. يمكن تكييفها مع وسائط الاستزراع الثلاثة المدروسة، مع معدل نمو اقصى يساوي 1.16 ساعة -1 في وسط غني بالببتون، 0.14 ساعة -1 في وسط قائم على بقايا نواة الزيتون و0.13 ساعة -1 في وسط قائم على بقايا قشر الشمندر المخمر، داخل مخمر مغلق. كان إنتاج حمض أسيتيك الإندول مواليا في الوسط على أساس بقايا نواة الزيتون بكمية 53.625 جم / مل، 11.625 جم / مل في وسط بقايا قشر الشمندر المخمر و8.625 جم / مل في وسط بالببتون. أجريت عدة اختبارات، على نطاق أوسع، لإنتاج المبيدات الحيوية، في مفاعل حيوي سعة 2 لتر، ولوحظ انخفاض في كمية حمض أسيتيك الإندول المنتج، وقدرت القيمة التي تم الوصول إليها بـ 3.375 دولار جم/مل. ومع ذلك، فإن كمية الفينجيسين المنتجة لم تكن كافية لإعطاء تأثير إيجابي مضاد للفطريات ضد أوكسيسبوروم الفيوزاريوم وكانديدا البيكان.

الكلمات المفتاحية: مبيد حيوي، مفاعل حيوي، عسوية س.، مبيدات حشرية، مادة ليغنوسيلولوسيك، وسط غني بالببتون، بقايا نواة الزيتون، الشمندر.