



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 33389 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/20**
(43) Date de publication : **03.07.2012**

-
- (21) N° Dépôt : **33409**
(22) Date de Dépôt : **10.12.2010**
(71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE CADI AYYAD, BOULEVARD PRINCE MY ABDELLAH, B.P. 511 MARRAKECH 40000 (MA)**
(72) Inventeur(s) : **OUHDOUCH YEDIR ; MARIE-JOELIE VIOROLLE ; ROBIN DUPONNOIS ; MOHAMED HAFIDI ; HANANAE HAMDALI**
(74) Mandataire : **BENCHANAA M'BAREK**

-
- (54) Titre : **NOUVELLES SOUCHES D'ACTINOBACTERIES SOLUBLISATRICES DU PHOSPHATE MINERAL, FORMULATION D'INOCULA DE CES BACTERIES COMME BIOFERTILISANT ET LEUR UTILISATION POUR LA NUTRITION ET SANTE DES PLANTES**
(57) Abrégé : CETTE INVENTION DÉCRIT L'OBTENTION DE SOUCHE D'ACTINOBACTÉRIES SOLUBLISATRICES DU PHOSPHATE NATUREL (ASPN) EN CONDITION DIFFICILE (PH ALCALIN). ELLE DÉCRIT ÉGALEMENT UNE NOUVELLE FORMULATION D'INOCULUM BACTÉRIEN BASÉE SUR L'OPTIMISATION DE CERTAINES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES CHEZ LES CES ACTINOBACTÉRIES (ASPN) À SAVOIR LEUR CAPACITÉ À SOLUBILISER ET À MOBILISER DU PHOSPHORE BIODISPONIBLE POUR LA PLANTE À PARTIR DE FORMES PHOSPHATÉES INORGANIQUES ET ORGANIQUES COMPLEXES QUI NE SONT PAS ACCESSIBLES À LA PLANTE SANS SON PARTENAIRE MICROBIEN. EN INCLUANT ENSEMBLE DES SPORES D'ACTINOBACTÉRIES ET UNE SOURCE DE PHOSPHATE MINÉRALE DANS UNE MATRICE D'ALGINATE DE CALCIUM, LA CAPACITÉ DES (ASPN) À SOLUBILISER DU PHOSPHORE ET LE RENDRE ACCESSIBLE À LA PLANTE SERA ACCURÉ. DE CE FAIT, LE RÔLE DU PARTENARIAT (ASPN- PLANTE) SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE HÔTE SERA OPTIMISÉ EN COMBINANT INTIMEMENT L'IMPACT DE CES ACTINOBACTÉRIES SUR LA PLANTE DIRECTEMENT (EFFET HORMONAL, MINÉRAL, ETC) ET INDIRECTEMENT (ALTÉRATION DU PHOSPHATE INORGANIQUE ET PROTECTION)

RESUME

Cette invention décrit l'obtention de souche d'actinobactéries solubilisatrices du phosphate naturel (ASPN) en condition difficile (pH alcalin). Elle décrit également une nouvelle formulation d'inoculum bactérien basée sur l'optimisation de certaines propriétés biologiques chez les ces actinobactéries (ASPN) à savoir leur capacité à solubiliser et à mobiliser du phosphore biodisponible pour la plante à partir de formes phosphatées inorganiques et organiques complexes qui ne sont pas accessibles à la plante sans son partenaire microbien. En incluant ensemble des spores d'actinobactéries et une source de phosphate minérale dans une matrice d'alginate de calcium, la capacité des (ASPN) à solubiliser du phosphore et le rendre accessible à la plante sera accrue. De ce fait, le rôle du partenariat (ASPN- Plante) sur le développement de la plante hôte sera optimisé en combinant intimement l'impact de ces actinobactéries sur la plante directement (effet hormonal, minéral, etc) et indirectement (altération du phosphate inorganique et protection)

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Nouvelles Souches d'actinobactéries solubilisatrices du phosphate minéral, formulations d'inocula de ces bactéries comme bio fertilisants et leur utilisation pour la nutrition et santé des plantes

Cette invention décrit l'obtention de six actinobactéries solubilisatrices du phosphate naturel (ASPN) en condition difficile (pH alcalin ou/et sols calcaires). Elle décrit également une nouvelle formulation d'inoculum bactérien basée sur l'optimisation de certaines propriétés biologiques chez les ces actinobactéries (ASPN) à savoir leur capacité à solubiliser et à mobiliser du phosphore biodisponible pour la plante à partir de formes phosphatées inorganiques et organiques complexes qui ne sont pas accessibles à la plante sans son partenaire microbien. En incluant ensemble des spores d'actinobactéries et une source de phosphate minérale dans une matrice d'alginate de calcium, la capacité des (ASPN) à solubiliser du phosphore et le rendre accessible à la plante sera accrue. De ce fait, le rôle du partenariat (ASPN- Plante) sur le développement de la plante hôte sera optimisé en combinant intimement l'impact de ces actinobactéries sur la plante directement (effet hormonal, minéral, etc) et indirectement (altération du phosphate inorganique et protection).

Des (ASPN) sont cultivés sur milieu nutritif liquides. Après une durée de culture dépendant des caractéristiques physiologiques de la souche fongique retenue, le mycélium est récupéré par filtration, lavé à l'eau courante pour éliminer toutes traces chimiques issues du milieu nutritif utilisé puis broyé au Waring Blender et conservé à 4°C. Des granules de phosphate naturel (5 µm diamètre) sont immergés dans une solution composée (i) d'alginate de sodium (20 g l⁻¹), (ii) de tourbe préalablement stérilisée (50 g.l⁻¹) et (iii) de mycélium (1 g poids sec par litre de mélange). Après 1 heure d'immersion sous agitation, les granules imprégnés par l'alginate, la tourbe et les actinobactéries sont plongées dans une solution de chlorure de calcium (CaCl₂, 100 g.l⁻¹) pour assurer la polymérisation de l'alginate sous forme d'alginate de calcium. Les granules ainsi conditionnés sont ensuite lavés à l'eau courante pour éliminer les traces de chlorure de calcium et conservés à 4°C..

Pour la définition de l'invention, il s'agit de :

Un nouveau procédé de fabrication, Une nouvelle biotechnologie et d'un un nouvel usage d'un produit existant

Pour le Problème(s) technique(s) que l'invention permettrait de résoudre :

- 1) Optimisation de l'effet actinobacétries (ASPN) sur la nutrition minérale (phosphatée) de la plante hôte et sa santé en contritions difficiles
- 2) Evite le recours à des engrais chimiques pour améliorer la fertilité du substrat
- 3) Augmentation de la qualité des plants produits (meilleure croissance et meilleure résistance à la crise de transplantation et)

Pour mieux décrire cet Exemple :

Obtention des actinobacétries (ASPN)

L'isolement d'Actinomycètes solubilisateurs du PN à partir des tubes digestifs des tortues mauresques consommatrices des particules phosphate apatitiques des trois principaux gisements de phosphates marocains. Parmi les 300 isolats retenus, 55 se sont révélés capables de pousser sur un milieu minimum synthétique (SMM) contenant le PN comme seule source de P. Parmi ces isolats, 8 souches ont été sélectionnées du fait de leur activité antifongique contre *Pythium ultimum* (agent de la fonte de semis) et de leur capacité à produire des chitinases et de l'Acide Indole Acétique, hormones capables stimuler la croissance des plantes. Par la suite, la capacité de ces souches à relarguer dans le milieu de culture (SMM liquide) du P soluble à partir du PN, le rendant ainsi disponible pour la plante, a ensuite été déterminée. Les résultats montrent que les souches sélectionnées sont en effet capables de solubiliser le PN et ceci vraisemblablement par excrétion de substances chélatrices et sans changement significatif du pH.

Dans la deuxième étape, les souches solubilisatrices les plus performantes ont été caractérisées sur le plan physiologique (croissance ; excrétion du P ; consommation du glucose, du phosphate, évolution du pH et dosage du contenu en polyphosphates et en glycogène) lors de leur croissance en milieu SMM en présence de P soluble (K_2HPO_4) ou insoluble (PN). La physiologie de ces souches a été comparée à des souches de référence : *Streptomyces lividans* et *S. griseus* M1323. Le séquençage de l'ARN 16S de ces souches a révélé qu'elles appartenaient aux genres *Streptomyces* ou *Micromonospora*.

Dans la troisième étape de cette invention, il a été démontré que le processus de solubilisation, de la souche BH₇ apparentée à *Streptomyces griseus*, qui présentait la meilleure capacité solubilisatrice du PN, est lié à l'excrétion d'une molécule chélatrice du calcium et/ou du fer. Le processus de solubilisation implique vraisemblablement la destruction des liaisons ioniques fortes existant entre le calcium (ou autre ion constitutif du PN) et le phosphate du

PN. Ce chélateur a également une activité antifongique. Sa structure chimique a été déterminée et identifiée comme étant un nouveau produit nommé 'la Viridomycin G'.

Dans la dernière partie de cette invention, les différentes aptitudes des souches sélectionnées ont été testées, sous serre, dans un modèle rhizosphérique constitué d'un sol riche en PN / souche solubilisatrice / plante de grande culture (*Triticum durum*, blé dur) en présence ou non de l'agent phytopathogène (*Pythium ultimum*). Il a été montré que les 4 souches retenues étaient capables de solubiliser le PN et donc de promouvoir une bonne croissance de la plantule du blé. Certaines de ces souches (*Streptomyces griseus* et *Micromonospora aurantiaca*) étaient également capables de stimuler la croissance du blé (10% moins par rapport à l'addition d'engrais phosphatés solubles) et d'inhiber la croissance de *Pythium ultimum* de façon aussi efficace que le Mycostop®, un biofongicide commercialisé, dans un sol pauvre en phosphate. De plus, nous avons montré que les souches retenues avaient d'intéressantes compétences rhizosphériques se manifestant par une bonne aptitude à la colonisation racinaire (aptitude endophytique) de *Triticum durum*.

REVENDEICATIONS

1. Souches d'actinobactéries déposées au LMG sous N° P-24613, P-24624, P-24615, P-24616, P24617 et P24618, caractérisée par les séquences de l'ADNr 16S SEQ n°1,2,3,4,5 et 6
2. Utilisation des souches selon la revendication 1 ou des souches mutantes, pour inoculer les particules de la roche phosphatée u toute sources de phosphate minéral et l'obtention des bio fertilisants bios pesticides.
3. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des particules de la roches phosphatée inoculée obtenues selon la revendication 2, pour la solubilisation du phosphate minéral et la nutrition des plantes.
4. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, pour l'obtention de composés actifs par fermentation dans un milieu liquide des lesdites souches, centrifugation, filtration et purification.
5. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, ou d'un filtrat des cultures obtenues selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 4.
6. Utilisation des souches de la revendication 1, ou d'un filtrat des cultures ou composés actifs obtenus selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 5
7. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, ou d'un filtrat des cultures obtenues selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 6, pour stimuler la croissance des plantes.
8. Utilisation des souches de la revendication 1 ou des souches mutantes, ou d'un filtrat des cultures obtenues selon la revendication 4 ou d'un composé actif obtenu selon la revendication 6, protéger les plantes vis-à-vis des agents phytopathogènes