



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 35581 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/20; C05F 11/08**
- (43) Date de publication : **01.11.2014**

- 
- (21) N° Dépôt : **35802**
- (22) Date de Dépôt : **05.04.2013**
- (71) Demandeur(s) : **VALORHYZE, UNIVERSITE MY ISMAIL PRESIDENCE MARJANE 2 meknes (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **RAFIK ERRAKHI ; AHMED LEBRIHI**
- (74) Mandataire : **RAFIK ERRAKHI**

- 
- (54) Titre : **PROCÉDÉ DE FORMULATION STABLE D'UN PRODUIT BIOFERTILISANT À BASE D'UNE SOUCHE FIXATRICE D'AZOTE ATMOSPHERIQUE, AZOSPIRILLUM BASILLENCE LR11**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne l'application d'un produit biofertilisant à base d'une souche d'Azospirillum brasillense LR11 ayant la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Cette dernière a été identifiée par son caractère de stimulation de l'assimilation des éléments nutritifs et par l'augmentation du rendement des cultures. De même, l'invention décrite dans ce présent brevet concerne le procédé de formulation qui a été incluse dès le départ dans le procédé de la production en masse de la souche bactérienne. Des essais ont été effectués et sur la stabilité de la souche dans le produit et sur l'efficacité de ce dernier dans l'amélioration des rendements des cultures.

**Abrégé**

La présente invention concerne l'application d'un produit biofertilisant à base d'une souche d'*Azospirillum brasilense* LR1 ayant la capacité de fixer l'azote atmosphérique. Cette dernière a été identifiée par son caractère de stimulation de l'assimilation des éléments nutritifs et par l'augmentation du rendement des cultures. De même, l'invention décrite dans ce présent brevet concerne le procédé de formulation qui a été incluse dès le départ dans le procédé de la production en masse de la souche bactérienne. Des essais ont été effectués et sur la stabilité de la souche dans le produit et sur l'efficacité de ce dernier dans l'amélioration des rendements des cultures.

01 NOV 2014  
35581**Titre :**

Procédé de formulation stable d'un produit biofertilisant à base d'une souche fixatrice d'azote atmosphérique, *Azospirillum brasillense* LR11.

**Descriptif :**

La recherche de nouvelles stratégies, visant à maintenir ou accroître la productivité des systèmes agricoles tout en diminuant les intrants chimiques, peuvent en particulier s'appuyer sur les résultats de recherches récentes, qui ont mis en évidence l'importance cruciale des microorganismes dans le fonctionnement biologique des sols. Ces recherches ont ainsi conduit à l'émergence de la notion de « biofertilisants », définis comme des produits contenant différents types de microorganismes ayant la capacité de favoriser la croissance des plantes par différents mécanismes encore partiellement élucidés (fixation d'azote atmosphérique, solubilisation d'éléments minéraux, synthèse de phytohormones ou précurseurs). Parmi ces microorganismes on trouve des bactéries, regroupées sous le terme Bactéries Favorisant la Croissance des Plantes (BFCP), en anglais Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), ainsi que des champignons, notamment mycorhiziens.

Durant les dernières années, plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les microorganismes libres (non symbiotes) fixateurs d'azote atmosphériques (diazotrophes). *Azospirillum* représente est l'un des meilleurs genres connu pour leur aptitude d'une part à fixer l'azote libre. D'autre part à stimuler la croissance des plantes. Quatre aspects de l'interaction plante-racine *Azospirillum* sont mis en évidence: l'habitat naturel, l'interaction des racines des plantes, fixation de l'azote et de la biosynthèse des hormones de croissance des plantes.

Généralement les espèces d'*Azospirillum*, mais pas toujours, ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes. Ils sont capable de fixer de 1-10 kg N<sub>2</sub> / ha. De plus, l'augmentation du rendement est principalement due à leur capacité de produire des phytohormones qui améliorent la croissance racinaire et par conséquent une augmentation considérable de l'absorption d'eau et de minéraux.

La présente invention vise un produit à base d'une bactérie du genre *Azospirillum* sous forme liquide ainsi que l'application et le procédé de fabrication de ce produit pour l'amélioration des rendements de culture et la fixation de l'azote libre.

D'après les chercheurs, la formulation d'un produit à base de microorganismes reste le point le plus important dans un procédé de fabrication de produits biofertilisants. Tel que, le microorganisme doit rester viable et virulent pour une meilleure efficacité une fois remis en application. Dans ce travail, les inventeurs ont trouvé une technique pour conserver l'*Azospirillum*. Selon les inventeurs de ce brevet, une meilleure formulation commence dès la production des microorganismes. Dans la présente invention, la formulation est incluse dans le procédé de fabrication.

La bactérie présentée dans cette invention a été isolé de la rhizosphère de l'orge d'un sol agricole marocain. La technique utilisée pour avoir ce genre de bactérie est la suivante :

Mise en présence d'un échantillon biologique (racines + sol) susceptible de contenir la souche en question, avec un milieu approprié pour la sélection de souches ayant cette fonctionnalité,

- Traitement dudit échantillon pour isoler les souches
- L'isolement de la souche selon l'invention peut être effectué à partir d'échantillons d'une de la rhizosphère du sol de Maroc.

Le protocole de traitement décrit-en suivant :

Des échantillons de la Rhizosphère obtenus de façon stérile après avoir retiré 10 cm de la racine du sol.

Les échantillons prélevés sont placés dans des sachets stériles en polyéthylènes fermés et stockés à 4°C. à l'abri du soleil.

Les souches fixatrices de N<sub>2</sub> libre sont en suite isolées sur milieu bien précis sans source d'azote et avec du mannitol comme source de Carbone. Mais avant l'échantillon a subit quatre types de traitements successifs : traitement par le broyage à sec, la chaleur 50°C pendant 10 min, agitation 240rpm/min et centrifugation.

Les souches obtenues sont transférées sur le milieu riche. Les isolats purs sont maintenus à 4°C pendant 2 mois. Alternativement, les cultures sont resuspendues et conservées dans le glycérol à -20°C

Par la suite des essais de criblage et d'efficacité ont été effectués pour caractériser et montrer le rôle de la souche à fixer l'azote libre et à promouvoir la croissance des plantes.

#### Essai 1 : test de fixation d'azote libre

La souche a été sous mise à un test de production de NH<sub>3</sub> dans un milieu de culture sans source d'azote. En cas de production de NH<sub>3</sub> le milieu change de couleur comme le montre la figure 1.

#### Essai 2 : production de phytohormones

Le tableau suivant montre la capacité des deux souches à produire l'auxine

Code de Souche	Quantité d'auxine produite µg/ml
<i>Azospirillum brasillense</i> LR11	13,03

#### Essai 3 : Le gène NiF

La dernière technologie de biologie moléculaire a montré la présence d'un gène chez les bactéries responsable de la fixation de l'azote libre. L'extraction de l'ADN de la souche *Azospirillum* ainsi que son amplification via les techniques de PCR a révélé la présence du Gène nif comme le montre la figure 2.

Essai 4 : essais sur colza sous serre.

Des essais sous conditions contrôlées ont été effectués pour montrer l'efficacité de la souche à stimuler les plantes. Les résultats de cet essai montrent que la souche stimule de façon importante la croissance des plants de colza (Figure 3A). De plus, elle a permis une bonne assimilation d'éléments minéraux avec une meilleure fixation d'azote (Figure 3B). De même elles ont permis d'avoir des racines très importantes.

Essai 5: stabilité du produit dans la formulation

Plusieurs formulations ont été testées pour avoir une longue stabilité des souches pendant la durée du stockage. La façon de conserver les souches était finalement d'inclure le procédé de formulation dans le procédé de production des souches.

En effet, production des souches dans leur milieu de culture industriel adapté dans la phase stationnaire de la production et avant d'arriver à la fin de la phase exponentielle on ajoute un agent de stabilisation et de conservation des deux souches. Les résultats sont montrés sur la figure 4.

### La liste des figures avec leur légende

**Figure 1** : teste de production de NH<sub>3</sub> montrant la fixation de l'azote atmosphérique

**Figure 2** : amplification du gène nif chez la souche *Azospirillum brasilense* LR11 . La bande du gène nif est indiqué par la petite flèche à gauche

**Figure 3** : effet de traitement des semences de colza par la souche *Azospirillum brasilense* LR11 sur la croissance et l'assimilation des nutriments.

**Figure 4** : stabilité de la souche *Azospirillum brasilense* LR11 dans les deux types de formulation liquide et solide

### Les Revendications

- 1- Produit biofertilisant à base de bactérie fixatrice d'azote libre non symbiotique caractérisé par ce qu'il est constitué de :
  - *Azospirillum brasillense* LR11
  - CMC avec une quantité qui varie de 0.01% à 0.5%
  - Agent de conservation et de stabilisation avec une quantité qui varie de 2% à 5%
  - Eau stérile
- 2- Produit, selon la revendication 2, fabriqué selon un procédé caractérisé par ce qu'il est constitué d'une étape incluant le procédé de formulation par l'ajout de l'agent stabilisant avant la phase stationnaire et un peu avant la fin de la phase exponentiel de la croissance des deux souches bactériennes.
- 3- Produit, selon les revendications 1 et 2, caractérisé par ce qu'il est appliqué pour la fixation de l'azote atmosphérique et la stimulation de la croissance de plantes.
- 4- Application du produit, selon les revendications 1, 2 et 3, pour la fertilisation agricole caractérisé par les différents types d'application à savoir traitement de semences, traitement localisé, traitement par pulvérisation sur le sol.
- 5- Le produit biofertilisant, selon les revendications précédentes, caractérisé par son efficacité de fertilisation agricole le sol et par le procédé de fabrication permet une bonne stabilité de la souche bactérienne pendant longtemps.

Figure 1





Figure 2



Figure 3

A



B

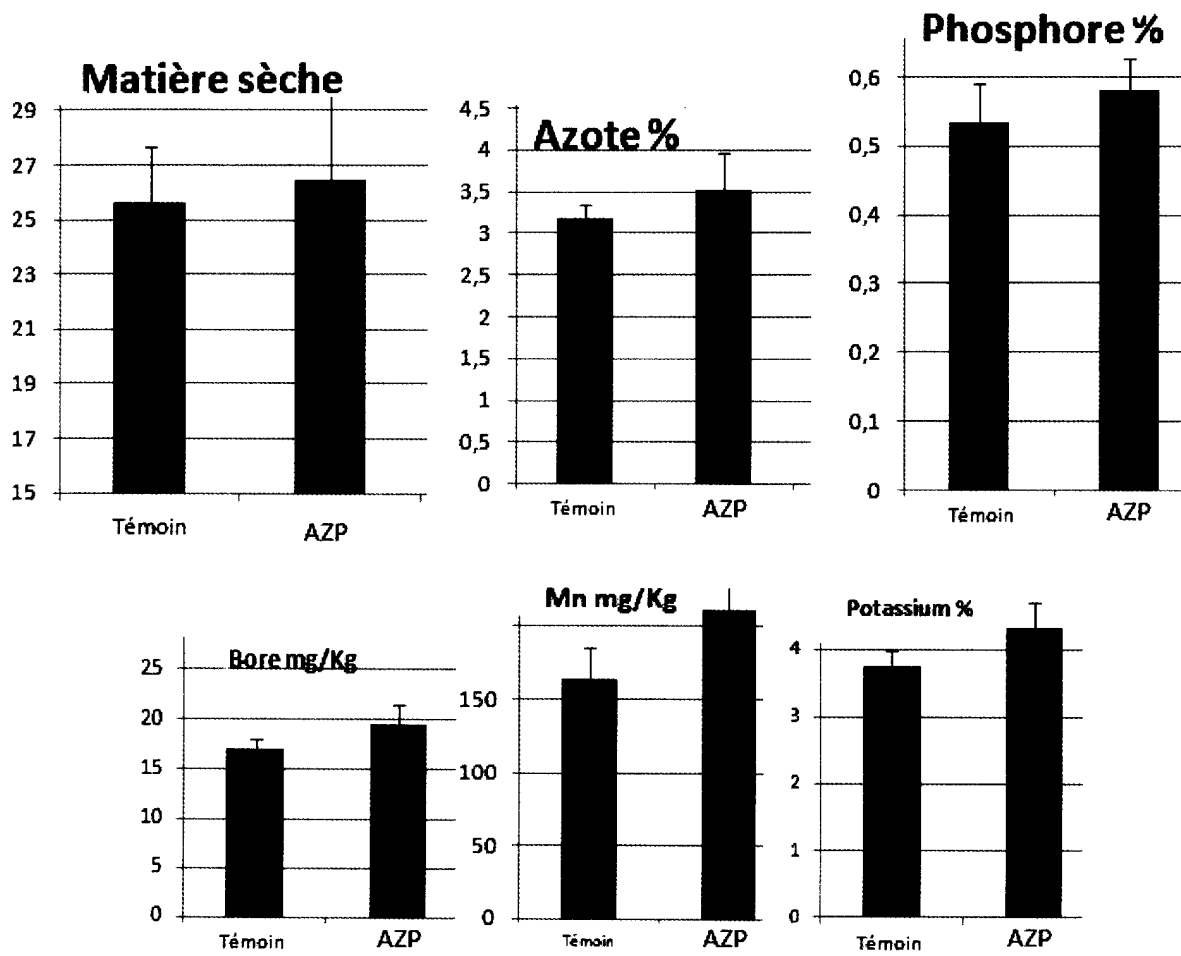


Figure 4

