



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 35582 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/20; C05F 11/08**
- (43) Date de publication : **01.11.2014**

- 
- (21) N° Dépôt : **35803**
- (22) Date de Dépôt : **05.04.2013**
- (71) Demandeur(s) : **VALORHYZE, RIAD ZITOUN E2 APPART 1 MEKNES (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **RAFIK ERRAKHI ; AHMED LEBRIHI**
- (74) Mandataire : **RAFIK ERRAKHI**

---

(54) Titre : **PRODUIT BIOFERTILISANT À BASE DE BACILLUS MUCILAGINOSUS LR5 APPLICABLE POUR LA FERTILISATION AGRICOLE**

(57) Abrégé : Phosphore (P) est l'un des principaux macronutriments essentiels pour la croissance et le développement biologique. Il est présent à des niveaux de 400-1200 mg/kg du sol. Sauf qu'il n'est pas disponible pour les plantes. Les bactéries PGPR jouent un rôle très important dans la solubilisation de cet élément minéral. Bien que, il y'a plusieurs bactéries solubilisant phosphates sont présents dans le sol, leur nombre n'est pas assez élevé pour rivaliser avec d'autres bactéries communément établies dans la rhizosphère. Ainsi, la quantité de P libérée par ces petites communautés n'est généralement pas suffisante pour une augmentation substantielle dans la croissance des plantes in situ. Par conséquent, l'inoculation des plantes par un micro-organisme cible à une grande concentration supérieure à celle normalement trouvée dans le sol est nécessaire pour tirer parti de la propriété de solubilisation du phosphate pour l'amélioration du rendement des plantes. La présente invention concerne l'application d'un produit biofertilisant à base de deux souches à gram positif ayant la capacité de solubiliser le phosphore. Ces dernières sont identifiées sous le nom Bacillus megatherium LR2 et bacillus mucilagenosus LR5. 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 des souches bactériennes. 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**

Phosphore (P) est l'un des principaux macronutriments essentiels pour la croissance et le développement biologique. Il est présent à des niveaux de 400-1200 mg/kg du sol. Sauf qu'il n'est pas disponible pour les plantes. Les bactéries PGPR jouent un rôle très important dans la solubilisation de cet élément minéral. Bien que, il y'a plusieurs bactéries solubilisant phosphates sont présents dans le sol, leur nombre n'est pas assez élevé pour rivaliser avec d'autres bactéries communément établies dans la rhizosphère. Ainsi, la quantité de P libérée par ces petites communautés n'est généralement pas suffisante pour une augmentation substantielle dans la croissance des plantes in situ. Par conséquent, l'inoculation des plantes par un micro-organisme cible à une grande concentration supérieure à celle normalement trouvée dans le sol est nécessaire pour tirer parti de la propriété de solubilisation du phosphate pour l'amélioration du rendement des plantes.

La présente invention concerne l'application d'un produit biofertilisant à base de deux souches à gram positif ayant la capacité de solubiliser le phosphore. Ces dernières sont identifiées sous le nom *Bacillus megatherium LR2* et *bacillus mucilagenosus LR5*. 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 des souches bactériennes. 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

**Titre**

Produit biofertilisant à base de *Bacillus megaterium* LR2 et *Bacillus mucilaginosus* LR5 applicable pour la fertilisation agricole

**Descriptif**

L'accroissement spectaculaire de la production agricole au XXème siècle a été rendu possible grâce à plusieurs évolutions remarquables des pratiques culturales - intensification et mécanisation - développement de l'agrochimie - sélection génétique. Cette évolution des pratiques agricoles productivistes génère cependant de nombreux effets néfastes pour l'environnement (nitrates, phosphates, pesticides...), et le développement dans les prochaines décennies de pratiques plus respectueuses de l'environnement est devenu une obligation.

En accord avec ce constat, la récente prise de conscience dans nos sociétés des effets négatifs engendrés par l'utilisation des produits chimiques en agriculture a entraîné la recherche de nouvelles stratégies, plus respectueuses de l'environnement et préservant la qualité des sols, regroupées communément sous le nom d'Agriculture Durable. Ces stratégies sont maintenant fortement recommandées par la FAO (voir <http://www.fao.org/ag/ca/fr/index.html>) et par l'union européenne à travers des dispositions incitatives (voir par exemple : <http://europa.eu/scadplus/leg/fr/lvb/l28101.htm>, Pistes pour une agriculture durable, synthèse de la législation européenne, 2007).

Parallèlement, l'évolution actuelle de l'utilisation des intrants chimiques, fertilisants et pesticides, tend vers la baisse. D'après l'Unifa, (2006), les engrais azotés, phosphatés et potassiques ont enregistré, en 2006, une régression relative respectivement de 5,1%, 12,6% et 18,4% par rapport à l'année 2005. Cette tendance à la baisse du coefficient d'intrants dans les systèmes de production conventionnels est liée à l'orientation vers des systèmes de production respectueux de l'environnement.

L'agriculture de demain sera à la fois intensive et écologique. Cette «éco-intensification» nécessite le recours à des pratiques agronomiques nouvelles, biologiques et respectueuses de l'environnement. Notre projet s'inscrit pleinement dans cette perspective stratégique et projette de développer des produits et des services adaptés à cette nouvelle donne.

On estime qu'il faudra, à l'échelle mondiale, doubler la production agricole entre 2000 et 2050. C'est donc un triple défi que le monde agricole doit relever. Il s'agit de produire plus, de produire autre chose, de produire autrement. Les bases de l'agriculture intensive vont donc changer. Des intrants fortement consommateurs d'énergie comme le travail du sol ou l'usage d'engrais azotés, voire potassiques et phosphatés, seront des facteurs de production de plus en plus onéreux. De plus, une deuxième modification importante se dessine, celle d'un manque éventuel de molécules chimiques pour faire face aux maladies et aux ravageurs des cultures, d'où le passage obligé par le renforcement de la santé des plantes grâce à de nouvelles technologies conjuguant efficacité économique et préservation de l'environnement, en accord

avec les objectifs déclarés du programme « ECOPHYTO 2018 - Grenelle de l'Environnement ».

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.

Les biofertilisants sont définis comme des produits contenant des microorganismes vivants qui, quand ils sont appliqués au sol ou sur les plantes occupent la rhizosphère, voire colonisent les tissus végétaux, et stimulent la croissance de la plante en augmentant par exemple l'assimilation des nutriments et la production des phytohormones.

La présente invention vise un produit avec deux types de formulation liquide ou solide ainsi que l'application et le procédé de fabrication d'un produit biofertilisant à base bactéries à gram positif solubilisatrices de phosphore.

D'après les chercheurs la formulation d'un produit à base de microorganismes reste le point le plus important. 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 les bactéries solubilisatrices de phosphore.

Selon les inventeurs 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 du sol marocain selon le procédé suivant :

- Mise en présence d'un échantillon biologique susceptible de contenir la souche solubilisatrice du Phosphore, 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 décrit-en suivant :

Des échantillons de la Rhizosphère de moyen atlas sont obtenus de façon stérile après avoir retiré 15 cm de la racine du sol.

Les échantillons prélevés sont placés dans des sachets stériles en polyéthylène fermés et stockés à 4°C.

Les souches solubilisatrices du P sont en suite isolées sur milieu Rock P Agar après quatre types de traitements successifs : traitement par le broyage, la chaleur, agitation et centrifugation.

Après traitements des échantillons, on isole les souches solubilisatrices de P ayant montré un halot claire (voir figure 1).

Les souches 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 d'efficacité ont été effectués pour montrer le rôle de la souche à solubiliser le phosphore et à promouvoir la croissance des plantes. D'autres tests ont été effectués également à savoir la production de phytohormones.

#### Essai 1 : test de 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>Bacillus megatherium</i> LR2	14,03
<i>Bacillus mucilaginosus</i> LR5	18,22

#### Essai 2 : Test in-vitro de la germination des semences de l'orge

Les résultats des essais sont montrés sur la figure N°2. Les bactéries accélère la germination des graines et augmente le volume de la chevelue racinaire.

#### Essai 3 : essais sur colza sous serre.

Des essais sous conditions contrôlées ont été effectués pour montrer l'efficacité des souches à stimuler les plantes. Les résultats des essais montrent que les souches stimulent de façon importante la croissance des plants de colza. De même elles ont permis d'avoir des racines très importantes.

Les résultats sont montrés sur la figure 3.

#### Essai 4 : essais sur Mais grandeur nature

Les souches ont été appliquées en traitement de semences sur les semences de maïs. Ces dernier semés sur le champ de culture de maïs. Après avoir récolté les cultures. Il s'est avéré que le maïs traité par les souches solubilisatrices de phosphore a eu un effet starter et augmentation du rendement (voir figure 4a).

Egalement après analyse physicochimique des plants de maïs. Les résultats montrent que le maïs traité par les souches contient plus de phosphore et plus riche en fer que le maïs témoin (Figure 4b)

### 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 5.

### Les Revendications

- 1- Produit biofertilisant de solubilisation de phosphore à base de bactéries à gram positif caractériser soit par la formulation liquide constitué de:
  - *Bacillus megaterium* LR2
  - *Bacillus mucilaginosus* LR5
  - 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

Soit par la formulation solide constitué de

  - *Bacillus megaterium* LR2
  - *Bacillus mucilaginosus* LR5
  - La vinasse de betterave à sucre de 0.01% à 0.5%
  - Agent de conservation et de stabilisation avec une quantité qui varie de 2% à 5%
  - Argile comme support de charge

- 2- Produit, selon la revendication 2, fabriqué selon un procédé caractériser 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 solubilisation de Phosphore et la stimulation de la croissance de plantes
- 4- Application du produit, selon les revendications 1, 2 et 3, pour la fertilisation agricole caractériser 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, caractériser par son efficacité sur la solubilisation de phosphore insoluble dans le sol et le rendre disponible pour les plantes d'agriculture.

Figure 1

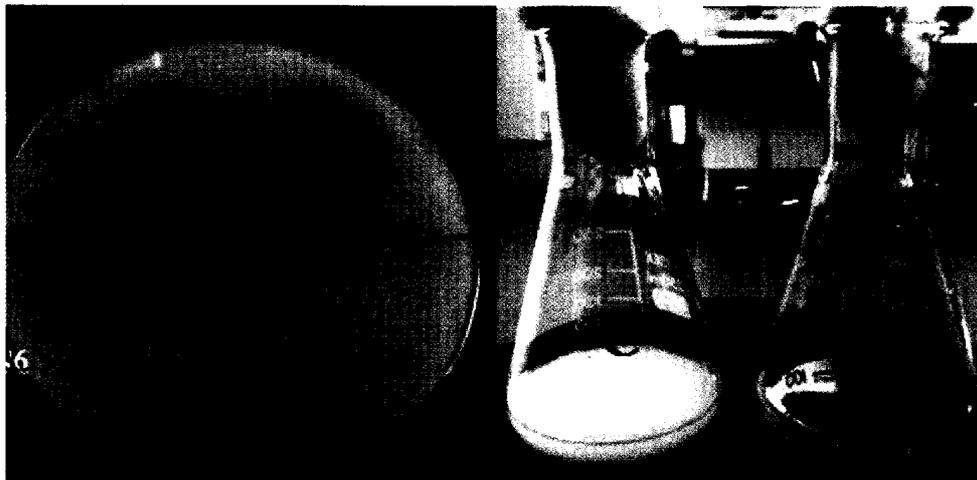


Figure 2

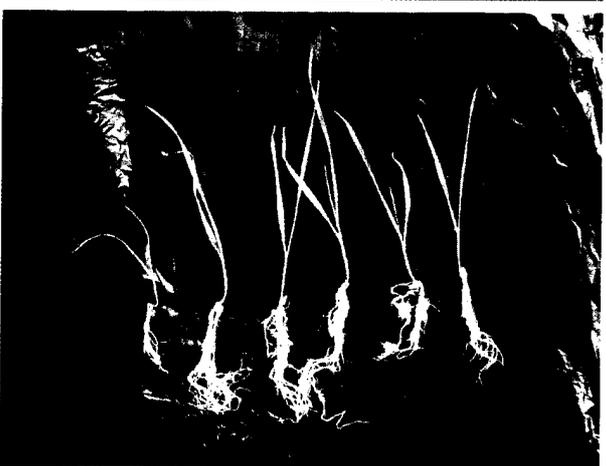


Figure 3

