



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 35583 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/20; C05F 11/08**
- (43) Date de publication : **01.11.2014**

-
- (21) N° Dépôt : **35804**
- (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 : **FORMULATION LIQUIDE DE DEUX DE PSEUDOMONAS FLUORESCENCE LR1 SOLUBILISATRICE DE PHOSPHORE APPLICABLE POUR LA FERTILISATION AGRICOLE**
- (57) Abrégé : Les bactéries PGPR jouent un rôle très important dans la solubilisation du phosphore insoluble dans le sol. Cependant,leur nombre n'est pas assez élevé dans la rhizosphère pour rivaliser avec d'autres bactéries présente dans le sol. 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 d'une souche solubilisatrice de phosphore. Cette dernière identifiée sous le nom Pseudomonas fluorescence LR1. De même elle concerne le procédé de formulation qui a été inclut dès le départ dans le procédé de la production en masse de la souche bactéries. Des essais ont été effectué 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

Les bactéries PGPR jouent un rôle très important dans la solubilisation du phosphore insoluble dans le sol. Cependant, leur nombre n'est pas assez élevé dans la rhizosphère pour rivaliser avec d'autres bactéries présente dans le sol. 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 d'une souche solubilisatrice de phosphore. Cette dernière identifiée sous le nom *Pseudomonas fluorescence* LR1. De même elle concerne le procédé de formulation qui a été inclut dès le départ dans le procédé de la production en masse de la souche bactéries. Des essais ont été effectué 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

Formulation liquide de *Pseudomonas fluorescence* LR1 solubilisatrice de phosphore applicable pour la fertilisation agricole

Descriptif

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. Son cycle dans la biosphère peut être décrit comme sédimentaire, parce qu'il n'y a pas d'échange avec l'atmosphère. Les micro-organismes jouent un rôle central dans le cycle du phosphore naturel. Ce cycle se produit au moyen de l'oxydation cyclique et la réduction des composés du phosphore, où réactions de transfert d'électrons entre les étapes d'oxydation vont de phosphine au phosphate. Les mécanismes génétiques et biochimiques de ces transformations ne sont pas encore complètement compris. La concentration de phosphore soluble dans le sol est généralement très faible, normalement au niveau de 1 ppm ou moins. La cellule peut prendre jusqu'à plusieurs formes de phosphore, mais la plus grande partie est absorbée dans les formes de HPO_4^{2-} ou $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$. Les plus grandes réserves de phosphore sont des roches et autres dépôts, comme les apatites primaires et d'autres minéraux primaires formés au cours de l'âge géologique. En dépit de cela, ils constituent les plus grands réservoirs de ce élément dans le sol parce que, dans des conditions appropriées, ils peuvent être solubilisés et devenir disponible pour les plantes et les microorganismes.

Des études *in vitro* de la dynamique de la solubilisation du phosphate de souches bactériennes ont été effectuées sur la base de la mesure de la libération P dans le bouillon de culture, à partir de cultures développées en utilisant un composé insoluble comme le rock P. Le taux de solubilisation P est souvent estimée en soustrayant la concentration finale P (moins celle d'un témoin inoculé) de P théorique initial fourni par le substrat P.

Parmi les bactéries les plus connues par leur aptitude à solubiliser le P se sont les souches de l'espèce *Pseudomonas fluorescence*.

D'autres part, 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.

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.

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 biologiques 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. 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 la formulation et l'application d'un produit à base d'une souche de *Pseudomonas fluorescence* LR1 en tant que biofertilisant pour la solubilisation de phosphore

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.

La présente invention montre un procédé de formulation qui commence dès la production de la souche bactérienne. En effet, 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>Pseudomonas fluorescence</i> LR1	34,51

Essai 1 : essais sur Mais grandeur nature

Les souches ont été appliquées en traitement de semences sur les semences de maïs. Ces derniers semés sur le champ de culture de maïs. Après avoir récolté les cultures. Il s'est avéré que le maïs traité par la souche solubilisatrice de phosphore a eu un effet starter et augmentation du rendement (voir figure 2A).

Egalement après analyse physicochimique des plants de maïs. Les résultats montrent que le traitement du maïs avec la souche a augmenté son teneur en phosphore, potassium, Bore et en surtout en Fer (Figure 2B).

Essai 2 : 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.

La légende de figures

Figure 1 : solubilisation de P insoluble dans un milieu de culture, apparition d'un halot claire transparent.

Figure 2 : essais sur Mais grandeur nature

La légende de figures

Figure 1 : solubilisation de P insoluble dans un milieu de culture, apparition d'un halot claire transparent.

Figure 2 : essais sur Mais grandeur nature

Les Revendications

- 1- Produit biofertilisant de solubilisation de phosphore caractériser par la formulation liquide constitué de:
 - *Pseudomonas fluorescence* LR1
 - CMC avec une quantité qui varie de 0.01% à 1%
 - Agent de conservation et de stabilisation avec une quantité qui varie de 5% à 10%
 - Eau stérile
- 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

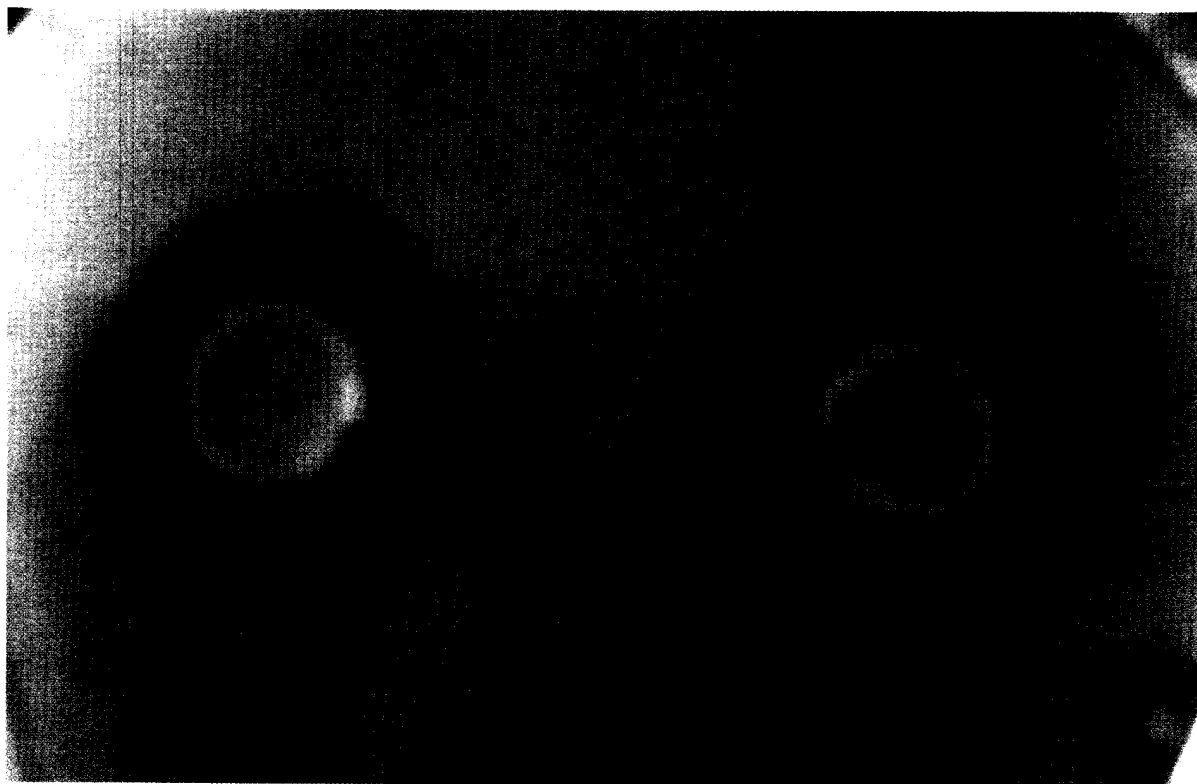


Figure 1

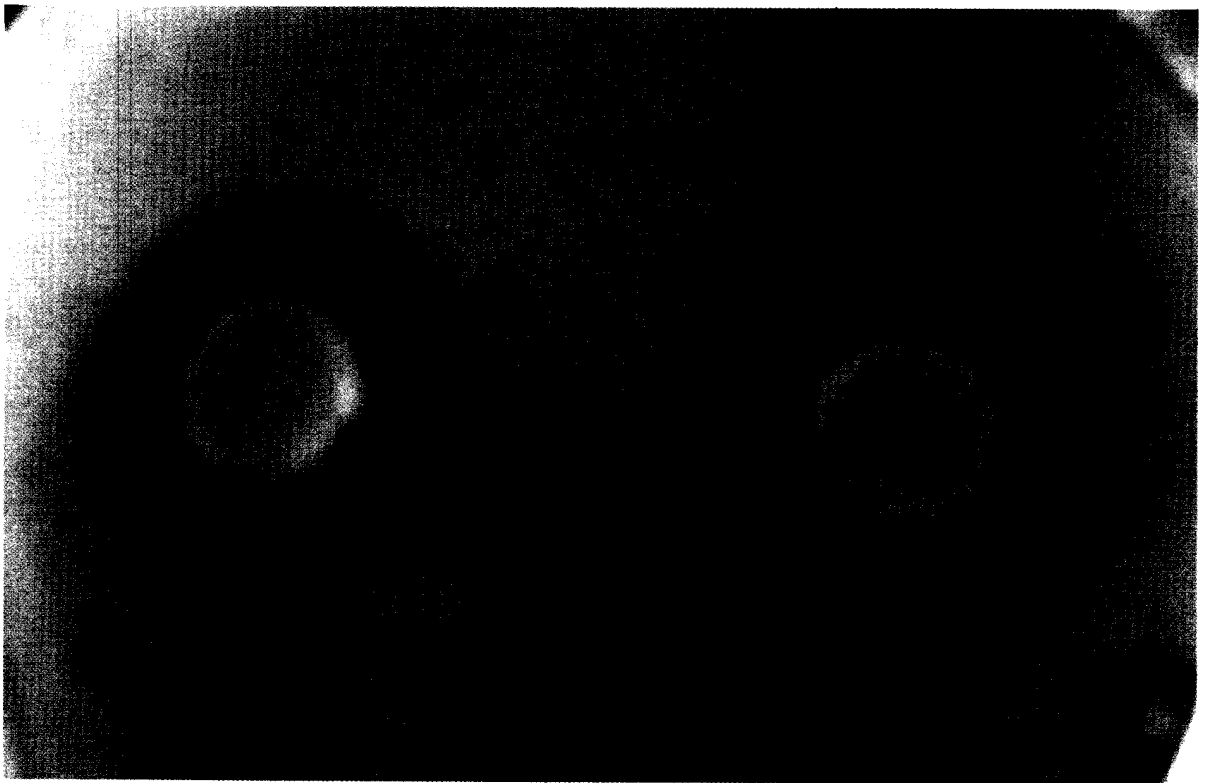
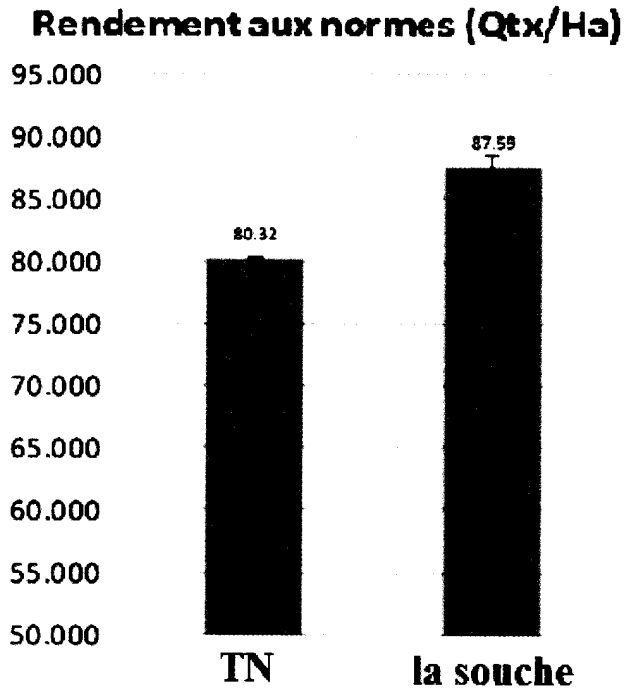


Figure 4

A



B

