



## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 38992 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/20; C05F 11/08**
- (43) Date de publication : **31.05.2018**

- 
- (21) N° Dépôt : **38992**
- (22) Date de Dépôt : **27.04.2016**
- (71) Demandeur(s) : **MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED EL JAZOULI, MADINAT AL IRFANE, RABAT, 10100 RABAT 10100 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **BOUHfid Rachid ; QAISS Abou el kacem ; WAHBY Imane ; KADMIRI ISSAM MEFTAH ; EL MERNISSI Najib ; AIT DAHI Mehdi**
- (74) Mandataire : **ABDELHAQ AMMANI**

- 
- (54) Titre : **Nouveau bio-fertilisant à libération progressive et sa méthode de production**
- (57) Abrégé : l'invention concerne un produit de biofertilisant ou bactéries bénéfiques pour la croissance des plantes à libération progressive. Cette libération progressive est possible grâce à l'enrobage des bactéries dans l'argile modifiée et un biopolymère tel que l'alginate. l'invention porte également sur la méthode de préparation du produit en passant par la modification de l'argile, le mélange de la solution bactérienne avec l'argile et l'ajout d'une solution du biopolymère. Après agitation du mélange, le produit est égoutté dans une solution de CaCl<sub>2</sub> qui permet la gélification de l'ensemble. le produit assure une augmentation du nombre des bactéries bénéfiques dans le produit et une augmentation du rendement des plantes de 30% à 100% grâce à la libération progressive.

## Nouveau bio-fertilisant à libération progressive et sa méthode de production

5

### **Abrégé :**

L'invention concerne un produit de biofertilisant ou bactéries bénéfiques pour la croissance des plantes à libération progressive. Cette libération progressive est possible grâce à l'enrobage des bactéries dans l'argile modifiée et un biopolymère tel que l'alginate.

10 L'invention porte également sur la méthode de préparation du produit en passant par la modification de l'argile, le mélange de la solution bactérienne avec l'argile et l'ajout d'une solution du biopolymère. Après agitation du mélange, le produit est égoutté dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  qui permet la gélification de l'ensemble. Le produit assure une augmentation du nombre des bactéries bénéfiques dans le produit et une augmentation du

15 rendement des plantes de 30% à 100% grâce à la libération progressive.

## Nouveau bio-fertilisant à libération progressive et sa méthode de production

### 5 Domaine de l'invention :

La présente invention concerne en général le développement d'un nouveau biofertilisant basé sur l'utilisation des microorganismes isolés de la rhizosphère pour augmenter le rendement des cultures. Plus précisément, l'invention porte sur un matériau pour l'introduction de souches microbiennes bénéfiques à la croissance des plantes dans la rhizosphère des cultures et qui garantit la viabilité, l'efficacité et la libération progressive des dites souches bénéfiques avec pour résultat une augmentation du rendement des cultures.

### Etat de l'invention :

Le terme biofertilisant désigne une substance contenant des microorganismes vivants qui lorsqu'elle est appliquée aux semences, à la surface des plantes ou dans le sol favorise la croissance en remplaçant les nutriments du sol. Le développement des biofertilisants est basé sur la capacité des microorganismes à promouvoir la croissance des plantes. Ces microorganismes colonisent la rhizosphère des plantes, vivent en relation symbiotique avec les plantes ou vivent à l'intérieur des plantes. Contrairement aux engrais chimiques, les biofertilisants sont considérés comme respectueux de l'environnement et leur développement a connu un grand essor les 50 dernières années. Au Maroc et en Afrique, on estime que seuls 40% des besoins en engrais des sols sont appliqués sous forme d'engrais. Pour cette agriculture, la gestion intégrée de la fertilisation reste le modèle économique le plus intéressant par intégration des engrais organiques et de biofertilisants efficaces, simples d'application et bon marché.

Plusieurs brevets et demandes de brevet décrivent le rôle des biofertilisants dans l'amélioration du rendement agricole. Le brevet WO/2014/082167 de Banerjee M.R. décrit une bactérie purifiée de la rhizosphère du colza au Canada. Cette bactérie, identifiée comme étant *Bacillus firmus*, augmente le contenu des plantes en phosphore, augmente le taux de

germination, accélère la germination, la vigueur et la hauteur des plantes ainsi que le rendement grâce à la solubilisation du phosphate. Le brevet US201402565547 de Adinarayana et Lalithakumari décrit des compositions à base de plusieurs souches microbiennes pour l'augmentation du rendement des cultures comprenant des souches symbiotiques du genre *Rhizobium* pour la fixation d'azote, des souches fongiques du genre *Trichoderma* des *Bacillus*, des *Azospirillum* et des *Pseudomonas*. Ces compositions ont montré un effet bénéfique sur plusieurs cultures dont la tomate, le riz et le soja.

Les bactéries fertilisantes décrites dans ces brevets sont souvent associées à un support d'inoculation qui permet la préservation de leur survie et de leur activité une fois appliqué au sol. Un support d'inoculum est défini comme le moyen qui permet le passage de microorganismes vivants du laboratoire au champ. Cependant aucun support universel n'est disponible à ce jour pour la libération des microorganismes dans le sol. Un support d'inoculum constitue la portion majeure par volume et poids de l'inoculum et doit répondre à la condition essentielle suivante : la capacité de libérer le bon nombre de cellules viables dans de bonnes conditions physiologiques et au bon moment.

Les supports d'inoculation les plus décrits sont à base de composés organiques tels que la tourbe, les déchets des plantes, les sols, les matériaux inertes et l'utilisation de cultures microbiennes lyophilisées. Dans une revue récente, Bashan et al. Plant Soil (2014) 378:1–33 listent des exemples de supports d'inoculation utilisés pour la production des biofertilisants de 1998 à 2014. La liste de ces supports est confirmée dans plusieurs brevets depuis 1990. Cependant, ces supports d'inoculation présentent l'inconvénient de libérer la totalité des biofertilisants au moment de l'application et ne garantissent pas une libération progressive pour fournir à la plante les bactéries fertilisantes tout au long de sa croissance. De même la viabilité des microorganismes dans les supports cités régresse tout au long de la durée de conservation.

### **Description de l'invention :**

L'invention porte sur un produit à base de bactéries fertilisantes dites « Biofertilisants » enrobées dans un matériau basé sur une argile marocaine et un biopolymère tel que l'alginate, le produit assure une augmentation du nombre des bactéries bénéfiques pendant sa conservation, la libération progressive des bactéries fertilisantes pour une meilleure efficacité et donc un meilleur rendement des cultures. L'invention porte également sur une

méthode de préparation du produit qui implique un nombre minimum d'étape et une absence de stérilisation du matériau d'enrobage.

### **Brève description des figures**

5 L'invention sera mieux comprise en se basant sur les figures suivantes qui constituent un mode de réalisation non limitatif.

Figure 1. Bactérie enrobée en solution

Figure 2. Bactérie enrobée en absence d'argile

Figure 3: Suivi de la survie des souches fertilisantes Ms-03 et Ms-04 enrobées dans l'argile et l'alginate

10 Figure 4: Effet des bactéries fertilisantes enrobées dans l'argile et l'alginate sur la hauteur des plantes de blé

Figure 5: Effet des bactéries fertilisantes enrobées dans l'argile et l'alginate sur la biomasse des plantes de blé

Figure 6: Image des plantes de blé traité par le biofertilisant objet de l'invention

15

### **Description détaillée**

Le produit selon l'invention est formé d'une argile marocaine purifiée. Cette argile a subi un traitement dans une solution saturée de NaCl pour préparer une argile sodique. Les avantages de l'utilisation de cette argile gonflante sont :

- 20
- Le pouvoir absorbant de l'eau qui assurera la viabilité des bactéries.
  - La grande surface spécifique permettra la bonne dispersion des bactéries dans la matrice bio polymérique.
  - L'immobilisation des bactéries dans la structure lamellaire et le maintien de la forme dans la matrice sous forme sphérique après séchage.

25 Le biopolymère est une substance gélifiante qui assure l'enrobage de l'argile et les solutions bactériennes. Dans un mode de réalisation préférée de l'invention le biopolymère est l'alginate.

Les bactéries fertilisantes sont isolées de la rhizosphère des plantes, elles sont caractérisées par plusieurs traits de promotion de la croissance des plantes comme la solubilisation des phosphates, la fixation d'azote, la production des phytohormones, la production des sidérophores. Une fois appliquées aux plantes, ces bactéries favorisent la croissance et augmentent le rendement. Pour une meilleure application de ces bactéries aux plantes et une meilleure efficacité, l'invention préconise d'enrober une culture de bactéries fertilisantes ayant une concentration de  $10^6$  -  $10^8$  UFC/ml avec l'argile marocaine modifiée et l'alginate.

Dans certains modes de réalisation la proportion des solutions bactériennes est comprise entre 12,5% et 25%. Dans un autre mode de réalisation la solution d'alginate de sodium est comprise entre 5% et 15% sous une agitation mécanique.

Dans un certain mode de réalisation, l'argile sodique est ajoutée à des proportions comprises entre 10 à 30%.

Dans un mode de réalisation, le mélange bactérie – argile – alginate déposé goutte à goutte à l'aide d'un dispositif d'égouttage dans la solution de gélification contenant 3% de chlorure de calcium où se fera la gélification.

Dans un mode de réalisation, le produit obtenu est ensuite récupéré en filtrant la solution dans un tamis puis séché sous une hotte. Après séchage, le produit se présente sous une forme granulé prêt à l'emploi.

Dans certains modes de réalisation le nombre des bactéries enrobées dans le produit augmente après plusieurs jours de conservation dans la température ambiante. En effet, le nombre de bactéries introduites augmente significativement et atteint  $10^{12}$  UFC/g.

Dans un autre mode de réalisation, l'application des biofertilisants enrobés dans l'argile et l'alginate ont amélioré le rendement en hauteur des plantes et en biomasse de 30% à 100%.

Dans un autre mode de réalisation, la libération progressive des biofertilisants dans une solution aqueuse s'est faite sur une durée de 6 à 12 heures.

**Exemple1 : Préparation de l'argile pour la matrice enrobante des biofertilisants :**

A une solution d'alginate de sodium comprise entre 5 à 15% sous agitation mécanique (20g/L), on ajoute une suspension contenant entre 10 à 30% d'argile sodique dans l'eau

préparée au préalable. Le mélange est agité pendant 4 heures. Une solution bactérienne de 12.5 à 25% est ensuite ajoutée. Le mélange est agité mécaniquement pendant 1 heure.

Une solution liquide contenant l'alginate, l'argile et des bactéries est déposée goutte-à-goutte à l'aide d'une seringue et d'une aiguille dans la solution de gélification contenant 3% de chlorure de calcium à se fera la gélification (Figure 1).

La figure 2 montre qu'en absence d'argile, la forme du produit en absence d'argile et indique le rôle de celui-ci dans la mise en forme final du produit.

### **Exemple2 : Suivi de la survie des bactéries fertilisantes dans le produit :**

Afin de démontrer l'efficacité de l'enrobage dans le maintien de la survie des bactéries fertilisantes et de leur libération progressive, un test de suivi de la survie et de la croissance des deux bactéries biofertilisantes *Azotobacter chroococcum Ms-03* et *Bacillus subtilis Ms-04* inoculées dans le produit est mené. La fréquence de suivi de la viabilité est d'une fois par semaine en testant deux types d'argile et un bio polymère qui est l'alginate. La survie des bactéries et la forme du produit ont été comparées avec un contrôle sans l'ajout d'argile. Cette comparaison permet de démontrer l'effet de l'argile modifiée sur la croissance des deux bactéries biofertilisantes et sur la forme et la taille du produit fini.

Pour la mesure de la viabilité, le produit enrobé granulé est dilué dans l'eau physiologique 0,85%, la suspension obtenue est bien homogénéisée par un vortex, puisensemencée dans le milieu nutritif agar. Les boites contenant les échantillons à analyser sont ensuite incubées dans une température de 32°C pendant 24 à 48H. Le nombre des bactéries est calculé en unité formant colonie à partir du nombre des colonies.

Les résultats de cet exemple montrent que le nombre des bactéries fertilisantes augmente après 30 jours de conservation. Aussi bien l'argile type 1 que l'argile type 2 assurent l'augmentation du nombre des deux bactéries fertilisantes Ms-03 et Ms-04. Ainsi que leur concentration passe de  $10^7$  UFC/g à  $10^{12}$  UFC/g de produit (figure 3).

### **Exemple 3 : Effet des souches enrobées sur la croissance des plantes de blé :**

Dans cet exemple, deux bactéries fertilisantes ont été enrobées par l'argile et l'alginate. Il s'agit la souche *Azotobacter chroococcum Ms-03* et la souche *Bacillus subtilis Ms-04* isolées à partir de la rhizosphère des plantes. Les deux souches ont démontré plusieurs traits de

promotion de croissance des plantes comme la fixation d'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphate et la production de sidérophore.

Les produits de ces deux souches ont été appliqués sur les plantes de blé et la croissance est comparée avec le témoin.

- 5 Les résultats ont démontré que l'enrobage des bactéries fertilisantes selon la présente invention a augmenté leur efficacité sur les plantes de Blé. Les plantes de blé traité par le produit sont 30% plus haute que les plantes témoin (**figure 4**). L'effet du produit est plus significatif sur la biomasse avec 100% d'augmentation du poids des tiges (**Figure 5**). La **figure 6** montre des images des plantes de blé traité par le produit et les plantes témoin. L'effet de stimulation de la croissance des plantes est du au nombre élevé des bactéries fertilisantes
- 10 présentes dans le support (exemple 2) à la libération progressive des bactéries dans le sol ainsi qu'aux produits constituant le matériau d'enrobage : l'argile et l'alginate.



**Revendications :**

1. Biofertilisant à libération contrôlée pour l'amélioration de la croissance des plantes **caractérisé en ce que** des bactéries fertilisantes sont enrobées dans une matrice constituée d'une argile sodique gonflante ayant une concentration comprise entre 10% et 30%, et d'un bio-polymère pour gélifier l'argile ayant une concentration comprise entre 5% à 15%.
2. Biofertilisant selon la revendication 1 **caractérisé en ce que** l'argile utilisée est une argile purifiée et traitée dans une solution saturée de NaCl pour préparer une argile sodique.
3. Biofertilisant selon les revendications 1 **caractérisé en ce que** le bio-polymère est de l'alginate.
4. Biofertilisant selon les revendications 1, 2 et 3 **caractérisé en ce que** les sphères permettent une augmentation du nombre des bactéries fertilisantes qui passe de  $10^6$  -  $10^8$  UFC/g à  $10^{12}$ UFC/g.
5. Biofertilisant selon les revendications 1,2, 3 et 4 **caractérisé en ce que** son application dans les racines des plantes de blé entraîne une augmentation significative en rendement de biomasse.
6. Biofertilisant selon la revendication 1 **caractérisées en ce que** les bactéries fertilisantes sont choisies parmi la souche *Azotobacter chroococcum Ms-03* et la souche *Bacillus subtilis Ms-04* isolées à partir de la rhizosphère des plantes.

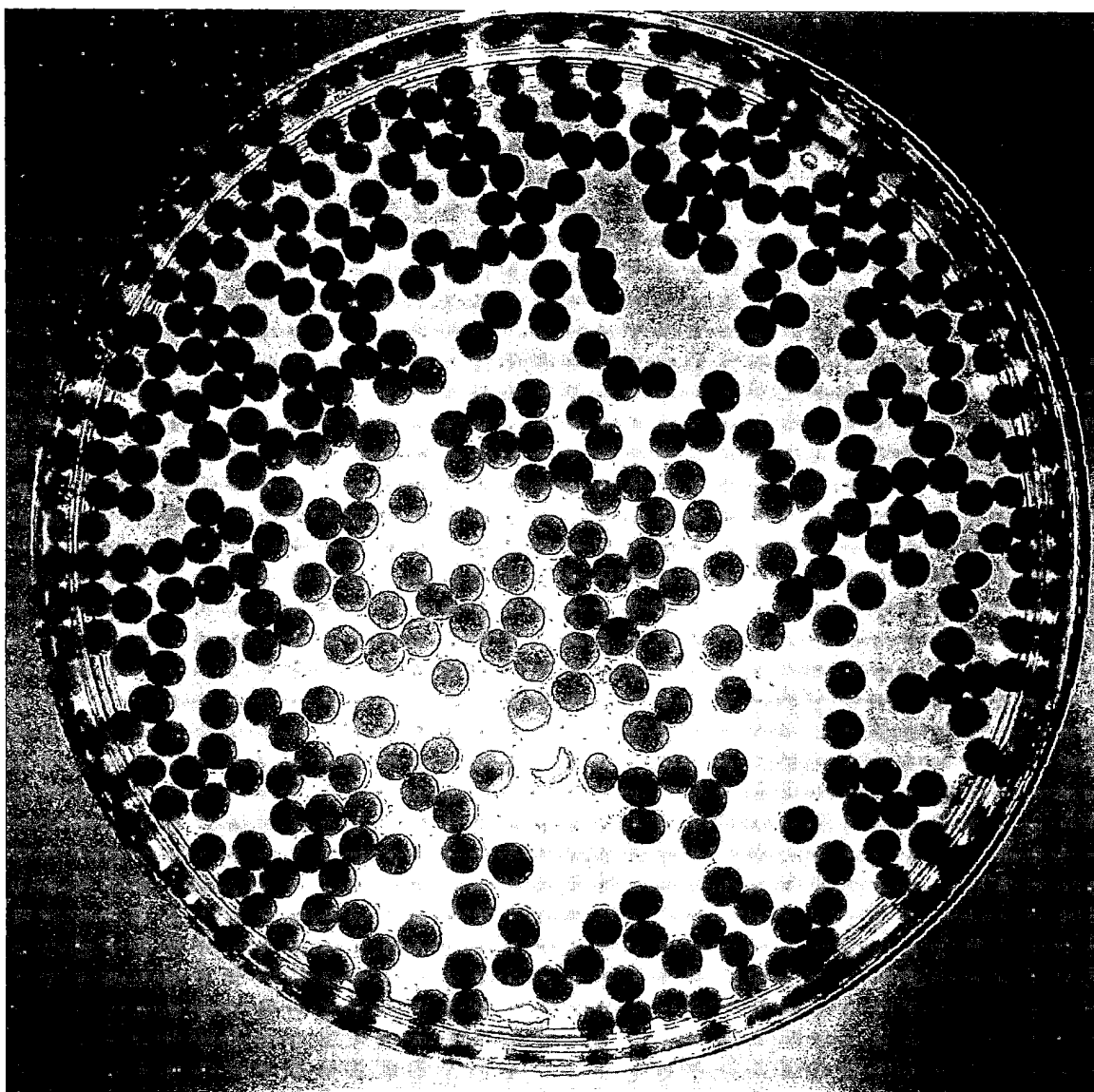


Fig.1



Fig.2

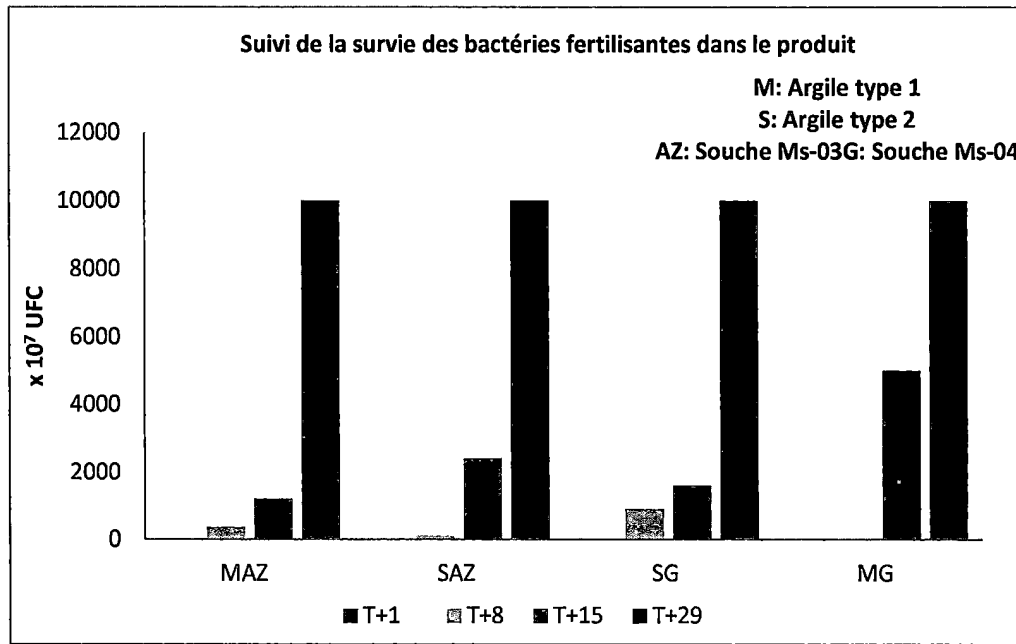


Fig.3

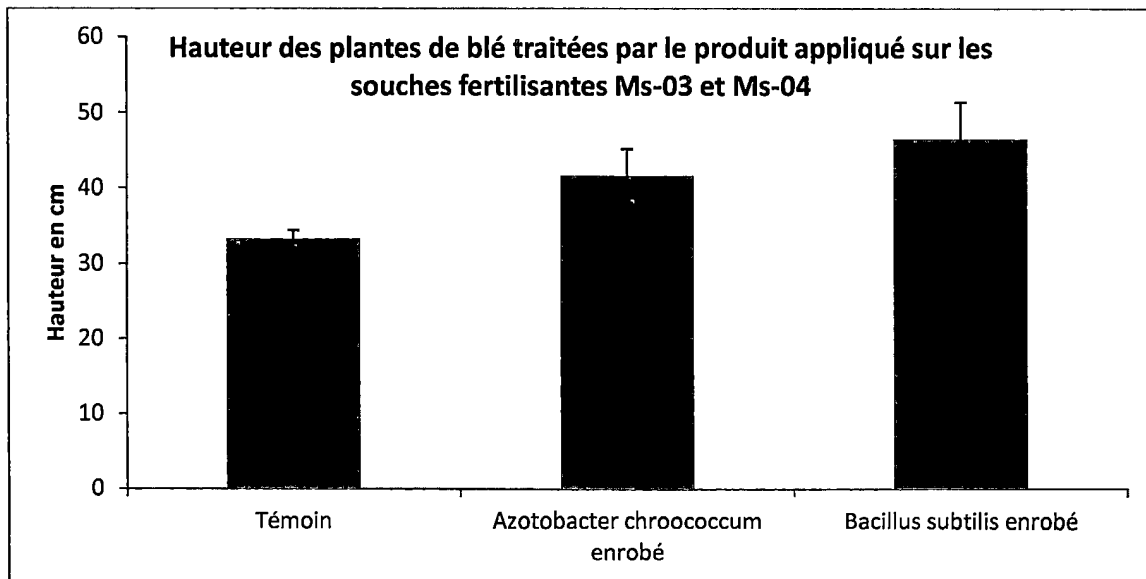


Fig.4

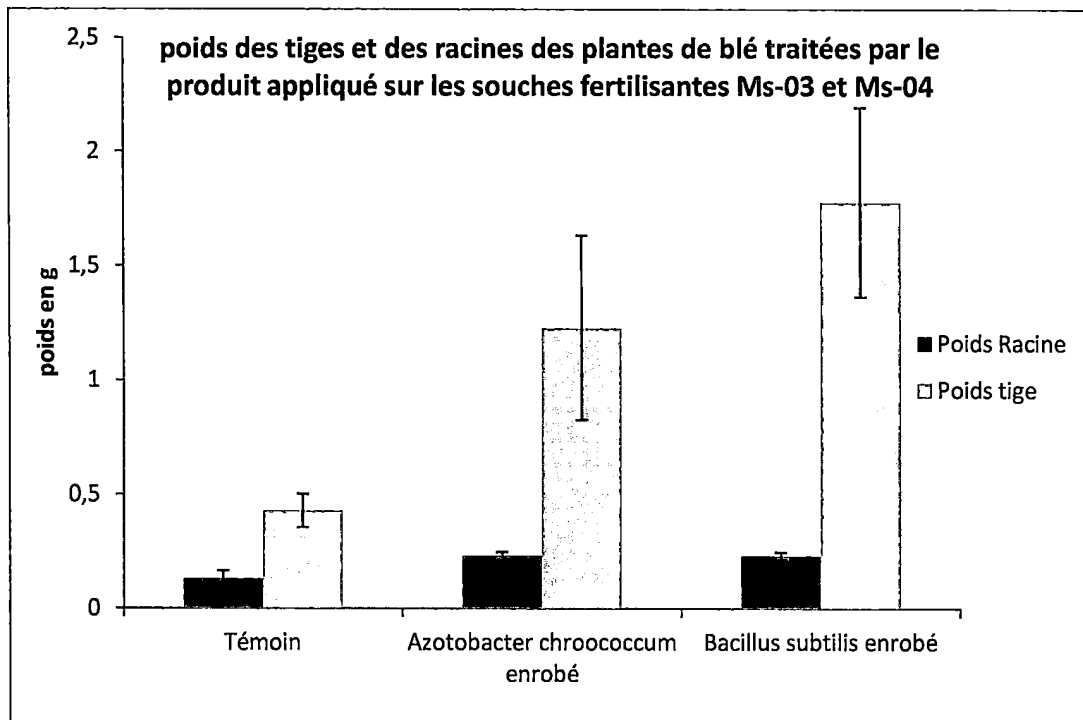


Fig.5

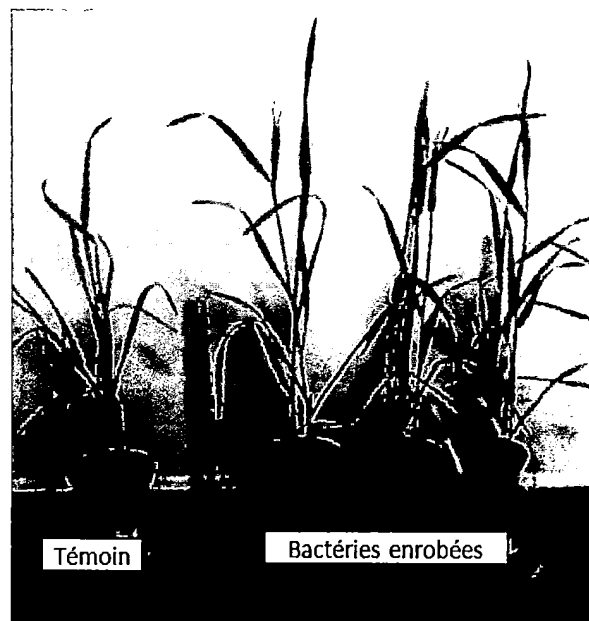


Fig.6

ROYAUME DU MAROC  
\*\*\*\*\*  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
\*\*\*\*\*



المملكة المغربية  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION  
SUR LA BREVETABILITE**

*Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et  
complétée par la loi 23-13*

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 38992	Date de dépôt : 27/04/2016
Déposant : MASCIR (MOROCCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)	
Intitulé de l'invention : Nouveau bio-fertilisant à libération progressive et sa méthode de production	
<b>Classement de l'objet de la demande :</b> CIB : C05F11/08, C12N1/20	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: A. BRINI	Date d'établissement du rapport : 18/05/2018
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	



**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Revendications  
6
  - Observations à l'appui des revendications maintenues
  - Observations des tiers suite à la publication de la demande
  - Réponses du déposant aux observations des tiers
  - Nouveaux documents constituant des antériorités :
    - Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
    - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)

**Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 5: Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté (N)	Revendications 1-6	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-6	Oui
	Revendications aucune	Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-6	Oui
	Revendications aucune	Non

D1: Mauricio Ivan Schoebitz Cid "Étude de l'encapsulation de rhizobactéries pour la biofertilisation du blé" ; 22-09-2010

<https://www.scribd.com/doc/79980683/These-doctorat-Mauricio-Schoebitz>

D2: D. Sangeetha et al " Survival of Plant Growth Promoting Bacterial Inoculants in Different Carrier Materials"; International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 2012; 3(1):170-178, ISSN 0976 – 3333

D3: YOAV BASHAN "inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture" Biotechnology Advances, Vol. 16, No. 4, pp. 729-770, 1998 Elsevier Science Inc. <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/inoculants.pdf>

D4: Fravel DR et al "Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix". Phytopathology 75:774-777; 1985

[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n07\\_774.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n07_774.pdf)

**1. Nouveauté (N)**

Aucun des documents susmentionnés ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans les revendications 1- 6, d'où celles-ci sont nouvelles conformément à l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

**2. Activité inventive (AI) :**

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue un bio-fertilisant pour l'amélioration de la croissance des plantes comprenant des bactéries comme une matière fertilisante, un support d'inoculation et un bio-polymère. Ledit support d'inoculation est une argile standard et le bio-polymère est un alginat. Ledit bio-fertilisant se présente sous forme des billes sphériques dont le noyau se compose de la matière fertilisante et de l'argile encapsulé dans l'alginat.

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce que une argile modifiée est utilisée au lieu de l'argile standard.

L'effet technique est l'augmentation dans la concentration de l'argile dans le support d'inoculation qui a préservé les bactéries et qui s'est gélifié après ajout d'une faible concentration de l'alginat.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme étant la fourniture d'un bio-fertilisant amélioré.

La solution proposée n'est pas évidente pour la raison suivante :

L'argile standard utilisée dans le document D1 a démontré une incapacité à se gélifier à des concentrations supérieures à 7% et une incapacité à préserver les bactéries à une capacité inférieure à 7%. De ce fait, aucun document de l'art antérieur n'incite l'homme du métier à modifier la composition du bio-fertilisant telle que décrite dans la présente demande pour parvenir à la solution désirée.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-6 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc en tant que telle aux exigences de l'activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

**3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.