

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 59014 B1**
- (43) Date de publication : **31.10.2024**
- (51) Cl. internationale :  
**C05F 17/00; C05G 3/00;  
C09K 101/00; C05F 9/04;  
C12N 1/20; C05F 17/00;  
C12N 1/14**

---

(21) N° Dépôt :  
**59014**

(22) Date de Dépôt :  
**28.12.2022**

(71) Demandeur(s) :

- **Université Cadi Ayyad, Bd Al Kouliyate Marrakech (MA)**
- **Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Route d'Immouzer BP 2626, 30000 FES (MA)**
- **Université mohammed 6 polytechnique (UM6P), Lot 660, Hay Moulay Rachid, Ben Guerir, 43150 (MA)**
- **Université Ibn Tofail, Campus Universitaire B.P 242, 14000 Kénitra (MA)**
- **OCP, 2-4, Rue Al Abtal Hay Erraha, 20200 Casablanca (MA)**

(72) Inventeur(s) :

**Cherkaoui El Modafar ; Soumya El Abed ; Allal Douira ; Sournia Amir ; Adelilah Meddich ; Sanae El Maaloum ; Brahim Benbrik ; Soumaya El Gabardi ; Ayoub Haouas ; Alae El Abed ; Saad Ibnsouda Koraichi ; Youssef Zeroual**

(74) Mandataire :  
**SABA & CO., TMP**

---

(54) Titre : **Elaboration d'un biofertilisant à base des boues de lavage des phosphates et de microorganismes rhizosphériques**

(57) Abrégé : La présente invention décrit la bioformulation d'un biofertilisant en utilisant un phosphocompost à base des boues de lavage des phosphates enrichi avec des bactéries rhizosphériques à activités PGP (Plant Growth-Promotion) et des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) isolés de la rhizosphère de plantes poussant sur les boues de lavage des phosphates. Des consortia de bactéries PGP et de CMA ont été caractérisés en termes de biocompatibilité et de capacité à solubiliser et à mobiliser les formes des phosphates assimilables par la plante à partir de formes de phosphates complexes présentes dans les boues des phosphates. Les performances agronomiques ont été évaluées sur un sol pauvre en phosphate à travers des cultures d'une plante maraichère (tomate), une légumineuse (haricot), une céréale (maïs) et un arbre fruitier (olivier).

**Abrégé**

- 5 La présente invention décrit la bioformulation d'un biofertilisant en utilisant un phosphocompost à base des boues de lavage des phosphates enrichi avec des bactéries rhizosphériques à activités PGP (Plant Growth-Promotion) et des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) isolés de la rhizosphère de plantes poussant sur les boues de lavage des phosphates. Des consortia de bactéries PGP et de CMA ont été caractérisés en termes de
- 10 biocompatibilité et de capacité à solubiliser et à mobiliser les formes des phosphates assimilables par la plante à partir de formes de phosphates complexes présentes dans les boues des phosphates. Les performances agronomiques ont été évaluées sur un sol pauvre en phosphate à travers des cultures d'une plante maraichère (tomate), une légumineuse (haricot), une céréale (maïs) et un arbre fruitier (olivier).

## **Elaboration d'un biofertilisant à base des boues de lavage des phosphates et de microorganismes rhizosphériques**

5

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

Cette invention concerne l'élaboration d'un biofertilisant appliqué en agriculture dont la formulation repose sur la solubilisation des phosphates complexes résiduels des boues de lavage des phosphates par des procédés biotechnologiques faisant intervenir, d'une part l'activité de la flore microbienne durant le processus de compostage, et d'autre part des bactéries à activités PGP et des CMA isolés de la rhizosphère de plantes poussant sur les boues de lavage des phosphates.

Cette invention concerne le processus d'élaboration d'un phosphocompost à base des boues des phosphates et des déchets ménagers organiques, l'isolement, le criblage, la sélection et l'élaboration d'un consortium de bactéries à activité PGP et d'un consortium de CMA présentant des performances agronomiques. Elle concerne également l'optimisation des doses et proportions des différentes composantes de la bioformulation (Phosphocompost, bactéries PGP et CMA) à des fins de biodisponibilité du phosphate assimilable et d'amélioration de la nutrition minérale de la plante assurant la croissance et le développement des plantes cultivées sur un sol pauvre en phosphates.

Outre ses performances agronomiques dans un contexte d'écoproduction durable, cette invention s'inscrit aussi dans une démarche d'économie circulaire en valorisant des déchets verts et des coproduits d'une ressource naturelle (boues de lavage des phosphates) qui restent accumulées en abondance et encore inexploitées malgré leur forte teneur en phosphate minéral sous forme insoluble.

### **1. État de l'art**

Le phosphore est l'un des nutriments majeurs indispensables pour la croissance et le développement des plantes. Cependant, une grande partie du phosphore présent dans le sol n'est pas assimilable par les plantes. Ainsi, l'apport d'engrais phosphaté facilement soluble et approprié compense l'insuffisance du phosphore inorganique (Pi) utilisé par les plantes. Les engrais phosphatés sont obtenus par attaque chimique acide de la roche phosphatée par l'acide sulfurique produisant le superphosphate simple, de l'acide phosphorique pour fabriquer le superphosphate triple, ou par l'attaque combinée par ces deux acides pour fabriquer le superphosphate enrichi.

Le Maroc détient les premières réserves mondiales de phosphate et représente le troisième producteur et le premier exportateur mondial. L'exploitation des mines de phosphates au Maroc génère des quantités considérables de boues de lavages évacuées par pompage vers des bassins d'épandage, qui après récupération de l'eau par décantation, restent stockés et non valorisés. Les boues de lavage des phosphates contiennent une quantité importante de formes de phosphates résiduelles complexées à d'autres éléments, mais elles ne peuvent être assimilées directement par les plantes. La solubilisation des phosphates complexes des boues de lavage des phosphates peut être assurée par une forte activité biologique du microbiote accompagnant le processus du compostage de la matière organique et par l'addition de champignons et de bactéries rhizosphériques susceptibles de solubiliser des formes de phosphates insolubles.

Le phospho-compostage est fondée sur la décomposition des matériaux organiques générant une activité microbienne intense aboutissant à une production importante de substances humiques et d'acides organiques tels que les acides citrique, malique, fumarique, succinique, pyruvique, tartrique, oxaloacétique, 2-cétogluconique, lacticoxalique, propionique et butyrique.

- 5 L'acidification des phosphates naturels est propice pour la libération du Pi assimilable par les plantes. Le compostage de résidus organiques avec des phosphates naturels (phospho-composts) associé à un apport de microorganismes solubilisateurs de phosphates organiques et minérales (mycorhizes et bactéries PGP) augmente grandement l'efficacité agronomique des phosphates naturels. Ainsi, la rhizosphère des plantes renferme une très grande diversité de
- 10 microorganismes (bactéries, champignons) dont certains sont capables de libérer du Pi à partir de formes de phosphates minérales. Des bactéries rhizosphériques sont capables de solubiliser et de mobiliser le phosphate par production d'acides organiques. Pour leur part, les champignons mycorhiziens peuvent avoir accès au phosphore contenu dans l'apatite en excréant des acides organiques, en particulier de l'acide oxalique en plus de la solubilisation
- 15 du phosphate organique *via* des phosphatases.

## 2. Exposé de l'invention

L'invention consiste à l'élaboration d'un biofertilisant à base des boues de lavage des phosphates qui repose essentiellement sur la solubilisation des formes complexes des phosphates par des procédés biotechnologiques fondées sur :

- 20
- l'activité des microorganismes lors du compostage en produisant un phosphocompost élaboré à partir des boues des phosphates et des déchets ménagers organiques.
  - L'activité de bactéries PGP et de CMA isolés de la rhizosphère de plantes poussant
- 25 sur des boues de lavage des phosphates.

### 2.1. Production du phosphocompost

Le procédé d'élaboration du phosphocompost est réalisé sans aucun procédé de synthèse et comprend les étapes suivantes :

- 30
- Collecte des déchets ménagers, tri et séchage des déchets organiques jusqu'à l'atteinte d'un taux d'humidité entre 50% et 60%.
  - Mélange de la matière organique séchée et des boues de phosphate selon un rapport pondéral de 80 :20 (w, w) respectivement.
- 35
- Production d'un phosphocompost stable et exempt de toute phytotoxicité à travers un processus de compostage dont les paramètres structurales et physicochimiques ont été également contrôlés notamment la température, le pH, le rapport C/N, la conductivité électrique et la dynamique du P, de N et de la matière organique.
- 40
- Evaluation des performances agronomiques du phosphocompost élaboré à travers des cultures de tomate conduites sous serre sur un sol pauvre en phosphate (8 ppm).

### 2.2. Elaboration du consortium de champignons mycorhiziens arbusculaires

L'inoculum CMA objet de la présente invention est constitué d'un consortium composite élaboré à partir de plusieurs échantillons isolés de la rhizosphère de plantes poussant sur des

boues de lavage des phosphates entreposées dans des bassins de stockage de la région de Khouribga, Maroc (32°52'51" N et 6°54'22" W).

5 Dans l'objectif d'élaborer un inoculum mycorhizien multi-espèces permettant de répondre à une plus grande diversité de culture et de conditions pédoclimatiques, le consortium de CMA est élaboré à partir de plusieurs échantillons de la rhizosphère de plusieurs plantes et de boues de lavage de différents âges entreposés entre 1994 et 2002. Les performances mycorhizogènes (potentiel infectieux mycorhizien, fréquence de mycorhization, intensité de mycorhization, teneurs en arbuscules, teneur en vésicules) des différents échantillons ont été évaluées sur une plante hautement mycotrophe (sorgho). L'inoculum composite de CMA est entretenu et  
10 multiplié sur une culture d'orge.

L'identification des espèces arbusculaires mycorhiziennes est réalisée à travers les spores fongiques conformément aux descriptions originales décrites sur la base de données internationales INVAM (International Culture Collection of 'Vesicular' Arbuscular Mycorrhizal Fungi) de l'Université de West Virginia établie sur la base de la classification de  
15 Redecker et al. (Mycorrhiza 23, 515-531, 2013).

Le consortium de CMA élaboré est constitué de 31 espèces appartenant à 3 ordres (Glomerales, Gigasporales, Diversisporales), 4 familles (Glomaceae, Gigasporaceae, Acaulosporaceae, Scutellosporaceae et Entrophosporaceae) et 4 genres : *Glomus* (16 espèces), *Acaulospora* (10 espèces), *Entrophospora* (2 espèces), *Scutellospora* (3 espèces). Les différentes espèces mycorhiziennes identifiées sont mentionnées dans l'**Annexe 1**. Les performances agronomiques du consortium de CMA ont été évaluées à travers des cultures de tomate, d'haricot et de maïs conduites sous serre sur un sol pauvre en phosphate (8 ppm) en présence ou non des boues de lavage des phosphates ou du phosphocompost élaboré.

### 25 **2.3. Elaboration du consortium de bactéries PGPR**

Le consortium bactérien présenté dans cette invention est constitué de bactéries à activités PGP isolées de la rhizosphère de plantes poussant sur des boues de lavage des phosphates entreposées dans des bassins de stockage de la région de Khouribga-Maroc (32°52'51" N et 6°54'22" W). Sur la base d'un processus de screening de plusieurs dizaines d'isolats, le consortium retenu est  
30 constitué de quatre espèces bactérienne identifiées à *Bacillus pumilus* X22, *Sphingobacterium suaedae* T47, *Pseudomonas Sp.* DN 13-01 et *Bacillus cereus* 263AG5' (**Annexe 2**).

Le processus d'élaboration de ce consortium bactérien repose sur l'isolement, la sélection d'espèces bactériennes à activité PGPR performantes et la constitution d'un consortium bactérien compatible à travers un criblage progressif comportant les principales étapes  
35 suivantes :

- Capacité des isolats à de solubiliser en milieux solide et liquide le phosphate tricalcique, les phosphates des boues de lavage et la roche phosphatée ;  
40
- Capacité des isolats à produire de l'AIA, des Sidérophores, de l'HCN et de l'ammoniac ;
- Constitution de consortia sur la base de la compatibilité entre isolats (absence d'antagonisme) entre les isolats sélectionnés ;  
45

- Evaluation des performances agronomiques du consortium de bactéries PGPR à travers des cultures de tomate, d'haricot et de maïs conduites sous serre sur un sol pauvre en phosphate (8 ppm) en présence ou non des boues de lavage des phosphates ou du phosphocompost élaboré.

#### 5 2.4. Doses, mode d'utilisation et performances agronomiques du biofertilisant élaboré

10 Les performances agronomiques du biofertilisant élaboré ont été évaluées sous serre sur des cultures d'une plante maraîchère (Tomate, Variété CAMPBELL 33 TECHNI), une espèce de céréale (Maïs, Variété SUPERMONARK), une légumineuse (Haricot, Variété VICTORIA) et un arbre fruitier (Olivier, Variété Picholine marocaine). Les paramètres de croissance et de développement des plantes évalués concernent la hauteur de la partie aérienne, la hauteur de la partie racinaire, le nombre de feuilles, le nombre de fleurs, la biomasse aérienne fraîche, la biomasse aérienne sèche, la biomasse racinaire fraîche, la biomasse racinaire sèche, le nombre de fruits et le poids des fruits.

15 Après des tests d'optimisation, les différentes composantes de la bioformulation élaborée (Phosphocompost, bactéries PGP et CMA) ont montré un effet synergique qui se manifeste par une biostimulation de la croissance et du développement des espèces végétales testées.

20 Afin d'évaluer le potentiel fertilisant de la bioformulation élaborée, les tests agronomiques ont été conduits avec un sol pauvre en phosphate (8 ppm) enrichi par la bioformulation élaboré conformément au protocole suivant :

- Sol pauvre en phosphate à 8 ppm : 95%.
- 25 ▪ Phospho-compost : 5%.
- Inoculum de CMA apporté au niveau du sol autour des plants : 10 g au moment de la transplantation.
- 30 ▪ Inoculum de bactéries PGP ( $10^8$  UFC) apporté au niveau du sol autour des plants : 10 ml au moment de la transplantation et 10 ml après un mois suivant la transplantation.

35 Par ailleurs, des tests agronomiques ont été réalisés au champ sur la tomate. L'expérience est menée sur un champ de la commune de Saada ( $31^{\circ}37'39.9''$  N and  $08^{\circ}07'46.7''$  W) à côté de la ville de Marrakech. Le climat est semi-aride avec une température maximale de  $36,17^{\circ}\text{C}$ , une température minimale de  $12,8^{\circ}\text{C}$  et une température annuelle moyenne de  $19,5^{\circ}\text{C}$ . Les précipitations annuelles moyennes enregistrées au cours de la durée de vie de l'expérience sur le terrain étaient de 248 mm. Les caractéristiques physiques du sol sont représentées par 52% de sable, 24% d'argile et 24% de limon. Chimiquement, le sol est caractérisé par des teneurs en phosphate de 31 ppm, 1,3% de matière organique, 0,80% de carbone organique total, un pH de 7,9 et une conductivité électrique de 1,72 mS/cm.

Le biofertilisant objet de l'invention a été apporté au moment de la transplantation des plants de tomate à raison de 600 mg de phosphocompost, 60 mg d'inoculum de CMA et de 10 ml d'inoculum de bactéries PGPR ( $10^8$  UFC) pour chaque plant.

45 Les performances agronomiques du biofertilisant élaboré sont évaluées à travers des paramètres de croissance et de développement des plantes (hauteur de la partie aérienne, nombre de feuilles, biomasse aérienne fraîche, biomasse racinaire fraîche et nombre de fruits).

## Annexe 1

5

## Espèces mycorhiziennes arbusculaires du consortium mycorhizien élaboré

N°	Espèces mycorhiziennes	Forme	Couleur	Taille moyenne (µm)	Surface des spores	Nombre de paroi
1	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	Globulaire	Marron jaune	85	Lisse	2
2	<i>Glomus pansihalos</i>	Globulaire	Marron	65,8	Granulaire	2
3	<i>Glomus versiforme</i>	Globulaire	Marron jaune	82	Granulaire	2
4	<i>Glomus deserticola</i>	Globulaire	Jaune blanc	70	Lisse	2
5	<i>Acaulospora sp1.</i>	Ovale	Marron foncé	59	Lisse	2
6	<i>Acaulospora excavate</i>	Globulaire	Jaune claire	61	Lisse	2
7	<i>Glomus manihoti</i>	Globulaire	Jaune	75,4	Granulaire	2
8	<i>Entrophospora kentinensis</i>	Globulaire	Jaune clair	56	Lisse	2
9	<i>Acaulospora laevis</i>	Ovale	Beige	74	Lisse	2
10	<i>Glomus verruculosum</i>	Globulaire	Jaune	85,2	Lisse	2
11	<i>Scutellospora castenea</i>	Globulaire	Marron	96,4	Granulaire	2
12	<i>Entrophospora schenckii</i>	Ovale	Jaune blanc	51	Granulaire	2
13	<i>Scutellospora nigra</i>	Globulaire	Noir	50	Lisse	2
14	<i>Scutellospora biornata</i>	Ovale	Jaune blanc	34	Granulaire	2
15	<i>Acaulospora lacunose</i>	Ovale	Jaune marron	44	Lisse	2
16	<i>Glomus etunicatum</i>	Globulaire	Jaune marron	79,2	Lisse	2
17	<i>Acaulospora gedanensis</i>	Globulaire	Jaune blanc	71,5	Lisse	2
18	<i>Acaulospora sp2.</i>	Ovale	Jaune marron	88	Lisse	2
19	<i>Acaulospora morrowiae</i>	Ovale	Jaune noir	52	Lisse	2
20	<i>Acaulospora colossica</i>	Ovale	Jaune	47	Lisse	2
21	<i>Acaulospora sp3.</i>	Globulaire	Jaune noir	59,5	Lisse	2
22	<i>Glomus caesaris</i>	Globulaire	Orange clair	32,7	Granulaire	2
23	<i>Glomus aureum</i>	Ovale	Marron clair	49	Lisse	2
24	<i>Glomus macrocarpum</i>	Ovale	Marron clair	62,8	Lisse	2
25	<i>Glomus mossae</i>	Ovale	Marron claire	53	Lisse	2
26	<i>Glomus claroideum</i>	Ovale	Jaune clair	76,4	Lisse	2
27	<i>Glomus globiferum</i>	Globulaire	Marron claire	77	Granulaire	2
28	<i>Glomus aggregatum</i>	Globulaire	Orange	70	Lisse	2
30	<i>Glomus fasciculatum</i>	Globulaire	Jaune	55,40	Lisse	2
29	<i>Glomus intraradices</i>	Globulaire	Jaune	61,7	Lisse	2
31	<i>Glomus sp.</i>	Ovale	Beige	50,7	Lisse	2

## Annexe 2

## Séquences des amorces concernant les espèces du consortium des bactéries PGP

5 *Bacillus pumilus* strain X22

Accession number (FJ763645.1)

## Fd1 amorce

10 AGGAGGTGGCGCCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGAC  
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAG  
 TTCCTTGAACCGCATGGTTC AAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG  
 CTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG  
 15 AGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGT  
 AACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGT  
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  
 CCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACG  
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCG  
 TGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTA  
 20 AGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGCTGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGAA  
 GACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCG  
 AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACA  
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC  
 TTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT  
 25 CAAATCATCATGCCCCATTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCTGCAAGACCGC  
 AAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAAT  
 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCCGCCCCGTACACAC  
 GAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGTGACAAGAGAG

## 30 R16 amorce

CTCTCTTGTCACTTCGGCGGCTGGCACCATAAAGGTTACCTCCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTG  
 GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT  
 CCAGCTTACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGC  
 35 GGCTTGCAGCCCTTGTCTGTCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACG  
 TCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTACAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGAT  
 CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG  
 TCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCG  
 GTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  
 CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCA  
 40 CTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCA  
 TACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCAGCTACACGTGGAATT  
 CCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCA  
 GACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCAGCG  
 GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGA

45

***Sphingobacterium suaedae* strain T47****Accession number (NR\_145877.1)****Fd1 amorce**

5 TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCAATACATGCAAGTCGGACGGGATCCATCG  
 GAGAGCTTGCTCGAAGATGGTGAGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCATATCAGGGG  
 GATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAACACCCGCATGAGACAGTATTACCGCATGGTATAGCTGTTAAATATTTAT  
 AGGATATGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGTCTAGGG  
 GCTCTGAGAGGAGAATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGA  
 10 ATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCCAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTG  
 CTTTTATCCGGGAATAAACCCAGTACGTGTACTGGGCTGAATGTACCGGAAGAATAAGGATCGGCTAACTCC  
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCCTAGGCG  
 GCCCGTTAAGTCAGGAGTGAAAGACGGCAGCTCAACTGTCGCAGTGCTCTTGATACTGATGGGCTTGAATCCA  
 GTTGAAGTGGGCGGAATAAGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCTTAGAACTCCGATTGCGAAGGCA  
 15 GCTCACTAAAGTGGTATTGACGMTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
 ACGCCTTAAACGATGATGACTCGATGTTAGCGATATATTGTTAGCGTCCAAGCGAAAGCGTTAAGTCATCCACC  
 TGGGGAGTACGCCCGCAAGGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGAGGAGCATGTGGT  
 TTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAGTTAGTGAAGGATGCAGAGACGCATCCGTCCT  
 TCGGGACACGAAACTAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  
 20 GAGCGCAACCCCTATGTTTAGTTGCCAGCATGTTATGGTGGGACTCTAAACAGACTGCCTGCGCAAGCAGTG  
 AGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTA  
 CAACGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCCAATCTTTAAAAGCCGTTACAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACT  
 CGACCCCGTGAAGTTGGATTGCTAGTAATCGCGTATCAGCAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA  
 CACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCTGGGGGTGCCTAAAGCATGTAACCGCAAGGAGCGTGTAGGGCAAA  
 25 ACCGTAATTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAACCAATC

**R16 amorce**

GATTGGTTACCTTGTTACGACTTAGCCCCAATTACCGGTTTTGCCCTAACACGCTCCTTGCGGTTACATGCTTTA  
 GGCACCCCAAGCTTTCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGTCATTGCTGA  
 30 TACGCGATTACTAGCAATCCAACCTCACGGGGTCGAGTTGCAGACCCCGATCCGAACTGTGAACGGCTTTTAA  
 AGATTGGCATCACATTGCTGTGTAGCTGCCCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCCGGACGTAAG  
 GGCCATGATGACTTGACGTGCTCCCGCCTTCTCACTGCTTGCGCAGGCAGGCAGTCTGTTAGAGTCCCCAC  
 CATAACATGCTGGCAACTAAACATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACACCTCACGGCACGAGC  
 TGACGACAGCCATGCAGCA

35

***Pseudomonas Sp.* DN 13-01****Accession number (MG437343.1)****R16 amorce**

40 GTTGCCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCA  
 GAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC  
 TTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAATCTTGCAGCCGTA  
 CTCCCCAGGCGGTCAACTTAGTGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAACTCAAGGTTCCCAACGGCTAGTTGACATCG  
 TTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCACAGTGTGAGTATCAGTC  
 45 CAGGTAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTCACCGCTACACAGGAAATCCACTACC

CACAACCGTACTCTAGCCCAGCAGTTATGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTTACACCCCATCTTAC  
 TGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTG  
 GCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAACTTCAGGGTATTAGCCTAAAGCCCTTCCTCCC  
 AACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGT  
 5 CCAATATTTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCATGTGACTGATCATCCTCTCAGA  
 CCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACAAGCTAATCCGACCTGGGCTCATCTGATAGC  
 GCAAGGTCCGAAGATCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTACGCGGTATTAGCGCCCGTTTCCGGAGCTTATCCC  
 CCACTATCAGGCAGATTCCCAGGTGTTACTCACCCGTCGCGCGCTAAATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTCCGC  
 TCGACTGCA

10

**Fd1 amorce**

TGCAGTCGAGCGGAAGAAGGGAGCTTGTCCCGGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACCTGGGAATCTGC  
 CTGATAGTGGGGATAACGTCCGGAACGGGCGCTAATACCGGTACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATC  
 TTCGGACCTTGCCTATCAGATGAGCCAGGTCCGATTAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGAC  
 15 GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA  
 GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT  
 TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTTTAGGCTAATACCCTGAAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAA  
 GCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA  
 AAGCGCGCTAGGTGGTTCAGTAAGATGGGTGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTG  
 20 CTGGGCTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA  
 CCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAACTAGCCGTTGGGAACCTTGAGTTCCTAGTGGCGCAGCTA  
 ACGCACTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACA  
 AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCAGAGAACCTTC  
 25 CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATG  
 TTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGCACCTAAGGAGAC  
 TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACG  
 TGCTACAATGGGGGATACAAAGGGTTGCCAAGCCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAGTCTCTCGTAGTCCG  
 GATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATA  
 30 CGTTCGCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTGACCAGAAAGTAGCTATCTAACCTTC  
 GGGAGGACGGTACCACGGTTGATCA

***Bacillus cereus 263AG5'*****Accession number (KF836529.1)**

35

**Fd1 amorce**

CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC  
 GCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAATAACTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTG  
 GCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCA  
 40 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTC  
 AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGT  
 GAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCG  
 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGTAG  
 GGTTCCGCCCTTTAGTGTGAAAGTTAACCGATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACT  
 45 CAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTTA  
 CCAGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCAT  
 GGTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA  
 TCATTAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA  
 TGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGC  
 50 TAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAAT  
 CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACACCAGAGAGTTGT  
 AACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACTTTATGAGCCAGCCGCGTAAGTGATCAGAGT

**R16 amorce**

CTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT  
CGCGTTGCTTCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTG  
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGCTCTAACACTCTAACACTTAG  
5 CACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGCA  
GTTACAGACCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTACGCATTCACCGCTACACATGGAA  
TTCCACTTTCCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACAT  
CAGACTTAAGAAAACCACTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCG  
10 CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACT  
TGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTC  
GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGAT  
CACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGT  
CCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTCAATTTGAAACCATGCAGTTCAAAAATATTATCCGGTATTAGCC  
15 CCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCAGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACTTCAT  
AAGAGCAAGTCTTAATCCATTCGCTCGACTGCATTATAGCTGCCGCACTTCG

20

25

30

35

40

45

### Revendications

Il est revendiqué ce qui suit :

1. Biofertilisant formulé avec les composantes suivantes :

- un phosphocompost à base des boues de lavage des phosphates ,
- un consortium de bactéries à activités PGP , et
- un consortium de champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA).

2. Le biofertilisant selon la revendication 1 où la production du phosphocompost est caractérisée par un procédé de compostage comportant :

- un mélange des boues de lavage du phosphate et la fraction organique séchée des déchets ménagers collectés sélectivement selon un rapport pondéral de 20 :80 (w, w) respectivement, et
- un contrôle de la maturation, des caractéristiques physico-chimiques et de la phytotoxicité du phosphocompost élaboré.

3. Le biofertilisant selon la revendication 1 où le consortium des bactéries PGP est constitué de quatre souches caractérisées en ce qu'elles sont choisies dans le groupe des souches bactériennes/souches fongiques: *Bacillus pimilus* X22, *Sphingobacterium suaedae* T47, *Pseudomonas Sp.* DN 13-01 et *Bacillus cereus* 263AG5'.

4. Le biofertilisant selon la revendication 1 où le consortium des CMA est constitué de 31 espèces mycorhiziennes arbusculaires.

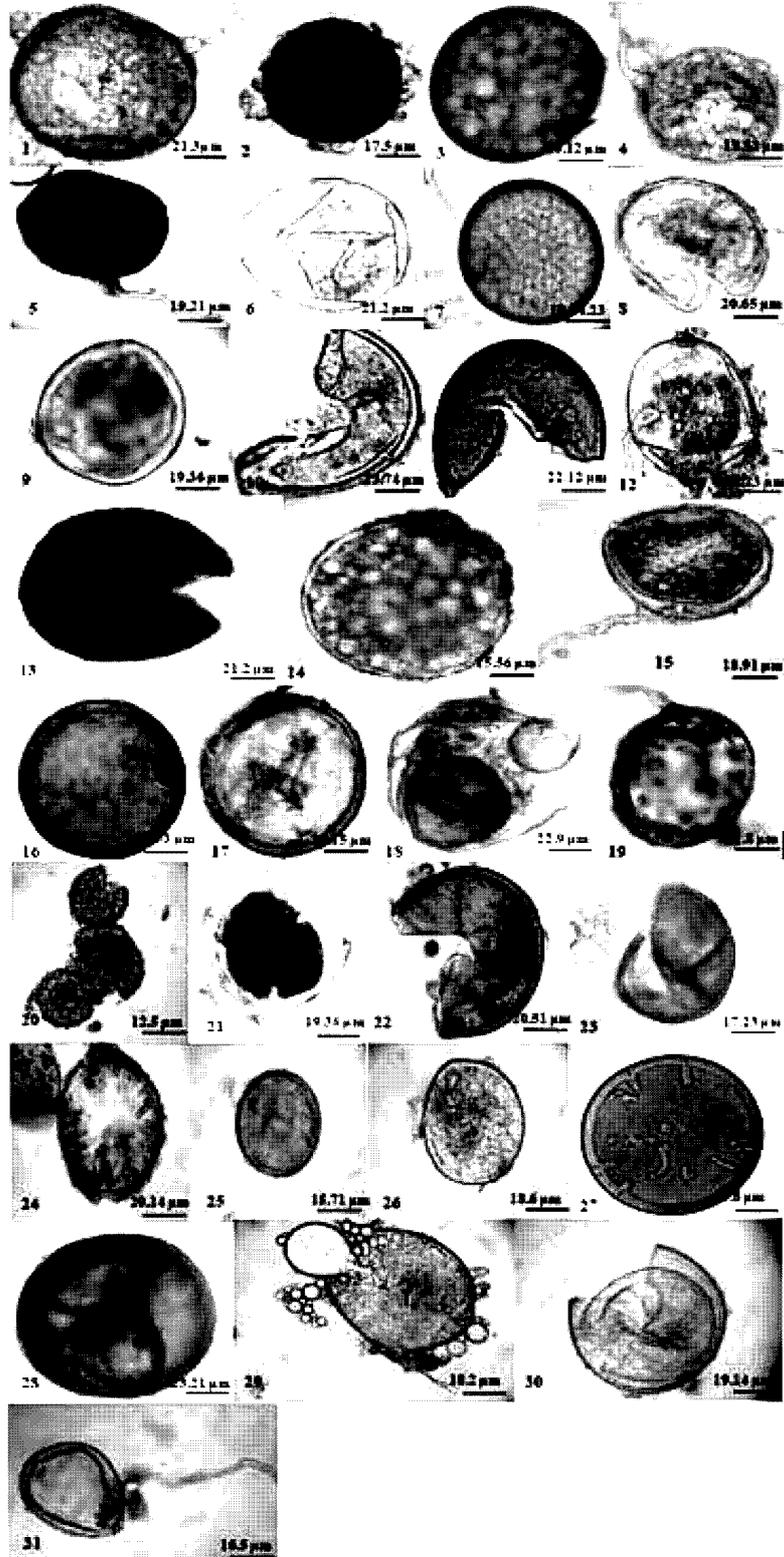
5. Procédé de production du biofertilisant selon la revendication 1, caractérisé par les étapes suivantes :

- élaboration d'un phosphocompost à base des boues de lavage des phosphates et des déchets organiques,
- élaboration d'un consortium de bactéries PGP isolés de la rhizosphère de plantes sauvages poussant sur les boues de lavage des phosphates,
- élaboration d'un consortium de CMA isolés de la rhizosphère de plantes sauvages poussant sur des boues de lavage des phosphates, et
- enrichissement du phosphocompost avec le consortium de PGP et le consortium de CMA.

6. Le biofertilisant selon les revendications 1 à 5, pour une utilisation dans la fertilisation de sols pauvres en phosphate et évaluation des performances agronomiques sur des différentes espèces de plantes d'intérêt économiques représentées par une plante maraichère (tomate), une légumineuse (haricot), une céréale (maïs) et un arbre fruitier (olivier).

Annexe 1 (Suite)

Spores des espèces mycorhiziennes arbusculaires du consortium mycorhizien élaboré



## 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 : 59014	Date de dépôt : 28/12/2022
Déposant : Université Cadi Ayyad; Université Sidi Mohammed Ben Abdellah; Université mohammed 6 polytechnique (UM6P); Université Ibn Tofail et OCP	
Intitulé de l'invention : Elaboration d'un biofertilisant à base des boues de lavage des phosphates et de microorganismes rhizosphériques	
<b>Classement de l'objet de la demande :</b>	
CIB : C05F17/00, C05F17/20, C09K101/00, C05G3/00, C12N 1/14, C12N1/20 CPC : C05F17/00, C05F17/20, C05F9/04, C05G3/80	
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 type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: Redouane TELLAA	Date d'établissement du rapport : 25/09/2024
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)
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

**Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1 - 6	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1 - 6	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1 - 6	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 : VALORISATION DES PHOSPHATES NATURELS POUR UNE AGRICULTURE DURABLE : IMPACT AGRONOMIQUE ET ENVIRONNEMENTAL

**1. Nouveauté**

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques de la revendication 1, d'où l'objet de ladite revendication est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13. Par la suite les revendications

2-6 dépendantes sont aussi nouvelles.

## **2. Activité inventive**

Le document D1 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit une étude pour sélectionner des bactéries solubilisatrices de phosphate, cinq genres ont été sélectionnés : Pseudomonas, Bacillus, Serratia et Burkholderia. L'effet synergique de la co-inoculation de la souche bactérienne la plus performante (Pseudomonas corrugata SP77) avec le champignon mycorhizien à arbuscules Rhizophagus irregularis a également été étudiée.

La différence entre l'objet de la revendication 1 et le document D1 réside en ce que le consortium bactérien et fongique est plus large. L'effet technique lié à cette différence est l'amélioration de la biostimulation, de la croissance et du développement des espèces végétales testées.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut-être considéré comme la fourniture d'une autre bioformulation (Phosphocompost+bactéries+champignons) pour l'amélioration de la nutrition minérale des plantes.

La solution proposée dans la présente demande implique une activité inventive. En effet, il n'existe pas d'incitations dans le document D1 pour que l'homme du métier puisse arriver à l'objet de la présente revendication sans faire preuve d'inventivité.

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 première revendication dont l'objet est considéré inventif pour les raisons énoncées ci-dessus. Ainsi, elles satisfont également, en tant que telles, aux exigences de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13 concernant l'activité inventive.

## **3. Application industrielle**

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.