

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
9 octobre 2014 (09.10.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/163473 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C05F 11/08 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/MA2014/000006

(22) Date de dépôt international :
1 avril 2014 (01.04.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
35804 5 avril 2013 (05.04.2013) MA

(71) Déposant : VALORHYZE [—/MA]; Agropolis- GI5-GI6,
Commune rurale de Mejjatte, Meknes (MA).

(72) Inventeurs : ERRAKHI, Rafik; Riad Zitoune, Appart 1,
E2, Tranche B, Meknes (MA). LEBRIHI, Ahmed; Rue 4,
N°5, Villa Sara, Hay Nasser, Meknes (MA).

(74) Mandataire : ELKERTATI, Mustapha; 12, Local N°9
Rue Abou Faris Elmarini, Hassan, Rabat (MA).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues (règle 48.2.h))

(54) Title : LIQUID FORMULATION COMPRISING TWO PHOSPHORUS-SOLUBILIZING *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* LR1 FOR USE IN AGRICULTURAL FERTILIZATION

(54) Titre : FORMULATION LIQUIDE DE DEUX DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENCE* LR1 SOLUBILISATRICE DE PHOSPHORE APPLICABLE POUR LA FERTILISATION AGRICOLE

(57) Abstract : The bacteria PGPR play a very important role in the solubilization of phosphorus which is insoluble in soil. However, they are too few to compete in the rhizosphere with other bacteria present in the soil. Thus the amount of phosphorus released by these small communities is generally insufficient to increase in-situ plant growth substantially. Consequently, it is necessary to inoculate the plants with a high concentration of a target microorganism which is higher than that normally found in the soil in order to benefit from the phosphate-solubilizing property in order to increase plant yields. The invention concerns the use of a biofertilizer product based on a phosphorus-solubilizing strain, known as *Pseudomonas fluorescens*. The invention also concerns the formulation method which was included from the outset in the mass production of the bacterial strain. Tests have been performed both on the stability of the strain in the product and on the efficiency thereof in improving crop yields.

(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 partie 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 fluorescens*. 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 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.



WO 2014/163473 A1

Titre

FORMULATION LIQUIDE DE PSEUDOMONAS FLUORESCENCE 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 du 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 H_2PO_4^- . 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 cet 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 estimé 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 fluorescens*.

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 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. 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 fluorescens* 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 isolée 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 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 polyéthylènes 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 clair (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 fluorescens</i>	34,51

Essai 1 : essais sur Maïs 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 une 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 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 des figures

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

Figure 2 : essais sur Maïs grandeur nature

Les Revendications

- 1- Produit biofertilisant de solubilisation de phosphore caractérisé par la formulation liquide constituée de:
 - *Pseudomonas fluorescens*
 - 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- Procédé de fabrication du produit de la revendication 1 caractérisé par 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- Le produit de la revendication 1 et 2 est appliqué pour la solubilisation de Phosphore insoluble dans le sol et le rendre disponible pour les plantes pour la stimulation de leur croissance.
- 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.

Figure 1

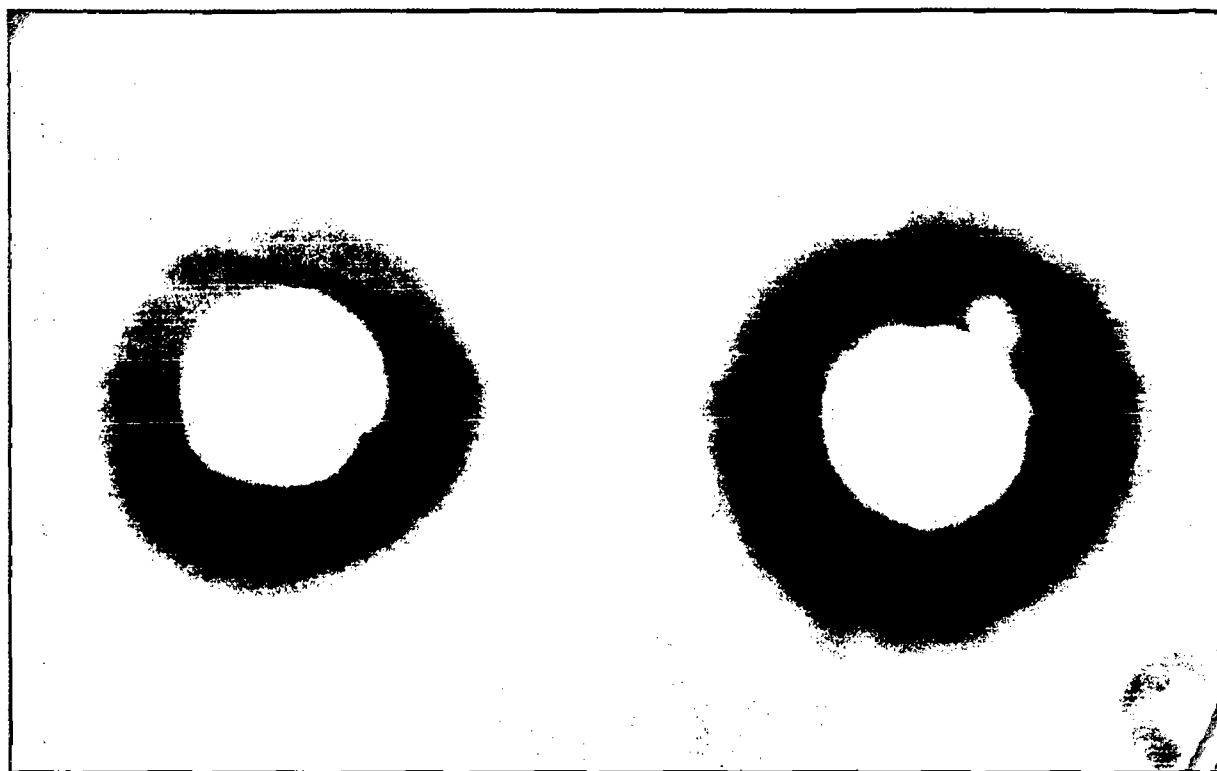
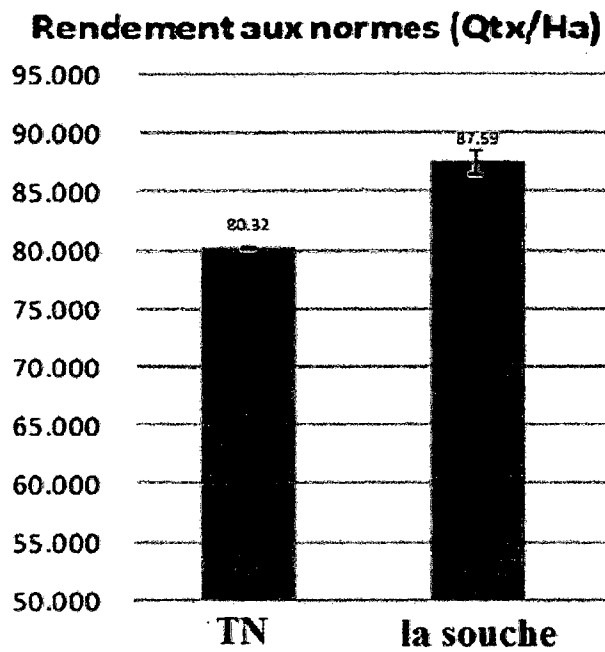
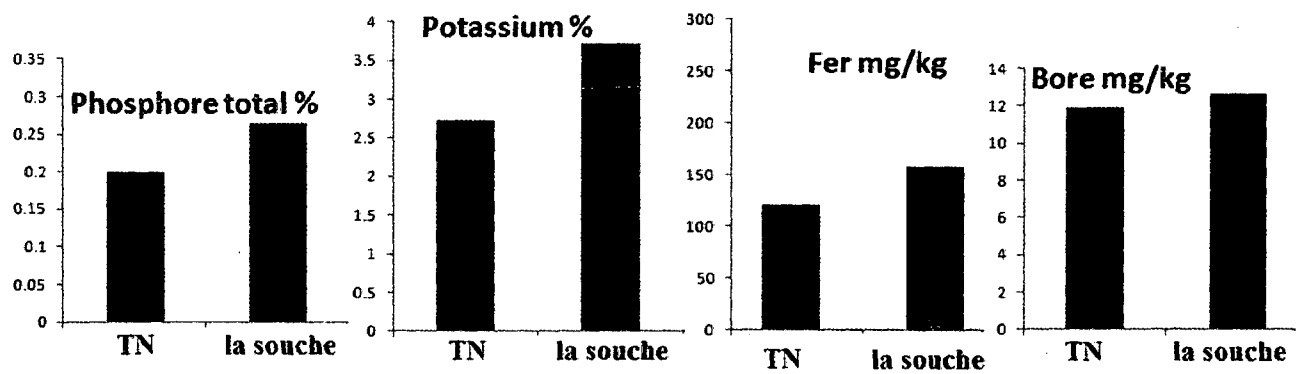


Figure 4

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/MA2014/000006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C05F11/08

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C05F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1 126 713 A (YANG AIMIN [CN]) 17 July 1996 (1996-07-17) claims 1, 4-7	1-4
Y	----- WO 2011/099024 A1 (PATEL BABUBHAI C [IN]) 18 August 2011 (2011-08-18) claims 1, 2	1-4
Y	----- WO 2010/122501 A2 (CAREPRO BIO TECHNOLOGIES P LTD [IN]; PAIKRAY SITARAM [IN]) 28 October 2010 (2010-10-28) claims 1, 2, 3	1-4
Y	----- EP 2 154 121 A2 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU]) 17 February 2010 (2010-02-17) paragraph [0021]; claims 1, 6; example 9 ----- -/-	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 September 2014

Date of mailing of the international search report

11/09/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merel-Rausch, Eva

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/MA2014/000006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/154962 A1 (PATEL BABUBHAI C [IN]) 15 December 2011 (2011-12-15) claims 1, 2 -----	1-4
Y	WO 2013/035032 A2 (CHAUDHARI SHARAD N [IN]) 14 March 2013 (2013-03-14) claim 1 -----	1-4
Y	FR 2 901 787 A1 (SARL FRANCE CHAMPAGNE APPROVIS [FR] SARL FRANCE CHAMPAGNE APPROVISIONN) 7 December 2007 (2007-12-07) claims 1, 4, 5 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/MA2014/000006

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 1126713	A	17-07-1996	NONE	
WO 2011099024	A1	18-08-2011	NONE	
WO 2010122501	A2	28-10-2010	US 2012031157 A1 WO 2010122501 A2	09-02-2012 28-10-2010
EP 2154121	A2	17-02-2010	AR 066364 A1 CA 2685100 A1 CN 101720312 A CR 11133 A CU 23590 A1 EP 2154121 A2 PA 8779001 A1 PE 02312009 A1 US 2010300166 A1 WO 2008131699 A2 ZA 200907615 A	12-08-2009 06-11-2008 02-06-2010 08-03-2010 30-10-2010 17-02-2010 09-02-2009 03-04-2009 02-12-2010 06-11-2008 28-07-2010
WO 2011154962	A1	15-12-2011	NONE	
WO 2013035032	A2	14-03-2013	NONE	
FR 2901787	A1	07-12-2007	BE 1017409 A3 ES 2338958 A1 FR 2901787 A1	05-08-2008 13-05-2010 07-12-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/MA2014/000006

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C05F11/08

ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

C05F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CN 1 126 713 A (YANG AIMIN [CN]) 17 juillet 1996 (1996-07-17) revendications 1, 4-7	1-4
Y	WO 2011/099024 A1 (PATEL BABUBHAI C [IN]) 18 août 2011 (2011-08-18) revendications 1, 2	1-4
Y	WO 2010/122501 A2 (CAREPRO BIO TECHNOLOGIES P LTD [IN]; PAIKRAY SITARAM [IN]) 28 octobre 2010 (2010-10-28) revendications 1, 2, 3	1-4
Y	EP 2 154 121 A2 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH [CU]) 17 février 2010 (2010-02-17) alinéa [0021]; revendications 1, 6; exemple 9	1-4
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 septembre 2014

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/09/2014

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Merel-Rausch, Eva

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/MA2014/000006

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2011/154962 A1 (PATEL BABUBHAI C [IN]) 15 décembre 2011 (2011-12-15) revendications 1, 2 -----	1-4
Y	WO 2013/035032 A2 (CHAUDHARI SHARAD N [IN]) 14 mars 2013 (2013-03-14) revendication 1 -----	1-4
Y	FR 2 901 787 A1 (SARL FRANCE CHAMPAGNE APPROVIS [FR] SARL FRANCE CHAMPAGNE APPROVISIONN) 7 décembre 2007 (2007-12-07) revendications 1, 4, 5 -----	1-4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/MA2014/000006

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 1126713 A	17-07-1996	AUCUN	
WO 2011099024 A1	18-08-2011	AUCUN	
WO 2010122501 A2	28-10-2010	US 2012031157 A1 WO 2010122501 A2	09-02-2012 28-10-2010
EP 2154121 A2	17-02-2010	AR 066364 A1 CA 2685100 A1 CN 101720312 A CR 11133 A CU 23590 A1 EP 2154121 A2 PA 8779001 A1 PE 02312009 A1 US 2010300166 A1 WO 2008131699 A2 ZA 200907615 A	12-08-2009 06-11-2008 02-06-2010 08-03-2010 30-10-2010 17-02-2010 09-02-2009 03-04-2009 02-12-2010 06-11-2008 28-07-2010
WO 2011154962 A1	15-12-2011	AUCUN	
WO 2013035032 A2	14-03-2013	AUCUN	
FR 2901787 A1	07-12-2007	BE 1017409 A3 ES 2338958 A1 FR 2901787 A1	05-08-2008 13-05-2010 07-12-2007