

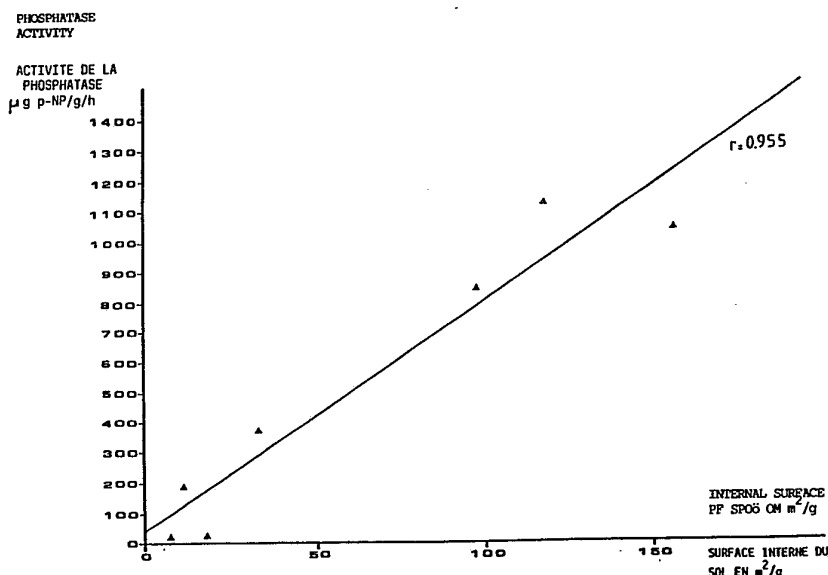


## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b>  <b>G01N 33/24, C12Q 1/42</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 90/07112</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 28 juin 1990 (28.06.90)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR89/00674 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 22 décembre 1989 (22.12.89) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 88/17008 22 décembre 1988 (22.12.88) FR <b>(71)(72) Déposant et inventeur:</b> BOURGUIGNON, Claude [FR/FR]; Marey-sur-Tille, F-21120 Is-sur-Tille (FR). <b>(74) Mandataires:</b> BRUDER, Michel etc. ; Cabinet Michel Bruder, 10, rue de la Pépinière, F-75008 Paris (FR). <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.		<b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

**(54) Title:** METHOD FOR DETERMINING THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF A SOIL**(54) Titre:** PROCEDE DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE D'UN SOL**(57) Abstract**

The method comprises establishing a correlation between, on the one hand, the alkaline phosphate contents of a series of reference soils of which the biological activity is considered to be satisfactory and, on the other hand, another physical and/or chemical characteristic of such series of reference soils, for example, the internal surface of those soils; measuring the alkaline phosphate contents and said other characteristic of the soil being tested; and comparing the results of said measurements with the correlation established from the reference soils.

**(57) Abrégé**

Le procédé consiste: à établir une corrélation entre, d'une part, la teneur en phosphate alcaline d'une série de sols de référence dont l'activité biologique est jugée satisfaisante et, d'autre part, une autre caractéristique physique et/ou chimique de cette série de sols de référence, par exemple la surface interne de ces sols, à mesurer la teneur en phosphate alcaline et ladite autre caractéristique du sol objet de la détermination, et à comparer les résultats desdites mesures à la corrélation établie à partir des sols de référence.

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

-1-

Procédé de détermination de l'activité biologique d'un sol.

La présente invention concerne, d'une manière générale, un procédé de détermination de l'activité biologique d'un sol.

5 A l'heure actuelle, lorsque l'on désire estimer l'activité biologique d'un sol, on doit mettre en oeuvre des méthodes longues et complexes, telles que les méthodes biocidales (Jenkinsson et Ladd, 1981) ou les méthodes de mesure du dégagement de gaz carbonique ou de la teneur en  
10 adénosine tri-phosphate (Maire, 1987). Il s'ensuit que l'on se heurte à un coût d'analyse trop élevé ou à une durée excessive des opérations pour pouvoir appliquer ces méthodes à des déterminations de routine.

Or, il serait souhaitable de pouvoir disposer d'un  
15 procédé qui permette de mesurer l'activité biologique ou microbienne d'un sol, qui soit suffisamment simple, rapide et économique pour que les agriculteurs puissent y avoir recours à titre ordinaire.

Ce but est atteint selon l'invention en ce sens qu'elle  
20 propose un procédé qui consiste :

- à établir une corrélation entre, d'une part, la teneur en phosphatase alcaline d'une série de sols de référence dont l'activité biologique est jugée satisfaisante et, d'autre part, d'autres caractéristiques physiques et/ou  
25 chimiques de cette série de sols de référence,

- à mesurer la teneur en phosphatase alcaline et lesdites autres caractéristiques du sol objet de la détermination, et

- à comparer les résultats desdites mesures à la  
30 corrélation établie à partir des sols de référence.

La teneur en phosphatase alcaline peut être déterminée indirectement par la mesure de son activité enzymatique, laquelle peut être mise en évidence, par exemple, par la dégradation du phosphate de p-nitrophényle en p-nitrophénol.

35 Le choix s'est porté sur la phosphatase alcaline plutôt

-2-

que sur une autre enzyme car cette enzyme répond à quatre critères importants :

- elle intervient dans une voie métabolique fondamentale (cycle de l'ATP) et, donc, elle existe chez  
5 tous les microorganismes ;

- elle n'existe pas dans les racines des plantes,

- son activité ne dépend pas de la teneur en phosphore des sols (la phosphatase acide est, elle, inhibée par les fortes teneurs en phosphore), et

10 - sa technique de dosage est simple et peu coûteuse.

Par suite, le dosage de l'activité de cette enzyme dans un échantillon de sol reflète bien, et de manière économique, l'activité biologique microbienne du sol en question.

15 Il est toutefois nécessaire de corrélérer cette mesure avec une autre caractéristique du sol.

Dans un premier mode de mise en oeuvre de l'invention, une autre dite caractéristique est la surface interne du sol, c'est-à-dire la surface déployée par une quantité donnée  
20 de sol étalée en couche élémentaire.

Dans un second mode de mise en oeuvre de l'invention, une autre dite caractéristique avec laquelle est corrélée la mesure de la phosphatase alcaline est la teneur en carbone organique du sol.

25 Dans un troisième mode de mise en oeuvre de l'invention, une autre dite caractéristique avec laquelle est corrélée la mesure de la phosphatase alcaline est la capacité d'échange cationique du sol.

Les mesures faites sur les sols de référence permettent  
30 de tirer de la représentation graphique de leur corrélation une droite de régression et l'ensemble axes/droite de régression forme un abaque que l'on utilise ensuite pour estimer l'activité biologique du sol soumis à la détermination.

35 Plus précisément, on a déterminé expérimentalement,

dans le cadre du premier mode de mise en oeuvre évoqué plus haut, que la droite de régression obtenue à partir des couples de mesures

. activité enzymatique de la phosphatase alcaline  
5 exprimée en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol produit à partir de phosphate de p-nitrophényle /g de sol sec/heure, portée en ordonnée

. surface interne du sol exprimée en  $\text{m}^2/\text{g}$  de sol, portée en abscisse,

10 fait apparaître un facteur de régression  $r$  de l'ordre de 0,95.

Dans le cadre du second mode de mise en oeuvre de l'invention, la droite de régression obtenue à partir des couples de mesures

15 . activité enzymatique de la phosphatase alcaline exprimée en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol produit à partir de phosphate de p-nitrophényle /g de sol sec/heure, portée en ordonnée,

. teneur en carbone organique du sol exprimé en  $\text{‰}$ ,  
20 portée en abscisse,

fait apparaître un facteur de régression  $r$  de l'ordre de 0,75.

Dans le cadre du troisième mode de mise en oeuvre de l'invention, la droite de régression obtenue à partir des  
25 couples de mesures

. activité enzymatique de la phosphatase alcaline exprimée en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol produit à partir de phosphate de p-nitrophényle /g de sol sec/heure, portée en ordonnée,

30 . capacité d'échange cationique du sol exprimée en milliéquivalents/g de sol sec portée en abscisse,

fait apparaître un facteur de régression  $r$  de l'ordre de 0,65.

Quel que soit le mode de mise en oeuvre choisi, on  
35 compare les valeurs de l'activité enzymatique de la

-4-

phosphatase alcaline données, d'une part, par la courbe de régression et, d'autre part, par la mesure effectuée sur le sol soumis à la détermination, pour la même valeur d'autres caractéristiques choisies - surface interne du sol, teneur  
5 en carbone organique du sol ou capacité d'échange cationique du sol - et l'on interprète le résultat à partir des hyperboles de confiance comme suit :

- valeur dans les hyperboles à 95 % : bon
  - valeur dans les hyperboles à 90 % : insuffisant  
10 ou fort
  - valeur hors des hyperboles à 90% : mauvais ou excessif
- Il a été vérifié sur plus de deux cents sols agricoles des zones tempérées et tropicales que le procédé selon l'invention donne des résultats parfaitement corrélés avec  
15 ceux des méthodes complexes évoquées plus haut.

Le protocole opératoire des trois variantes du procédé selon l'invention est décrit ci-après, étant toutefois entendu que les techniques de dosage sont en elles-mêmes connues et que l'invention réside dans la corrélation des  
20 mesures.

Pour les sols de référence, dans ces exemples, on a utilisé des prélèvements sur des parcelles d'essais de longue durée (Déhéraïn, Versailles, Dijon, ITCF) dont on connaît bien les fonctionnements et les rendements des  
25 cultures.

#### EXEMPLE 1

Corrélation entre la mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et celle la surface interne du sol.

#### 30 1) Mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase acide

On utilise la méthode de TABATABAI et BRENNER, 1982, In. Methods of Soil Analysis, Part 2 by A.L. PAGE et al. American Society of Agronomy, modifiée par Claude  
35 BOURGUIGNON, 1987.

-5-

Le sol est tamisé à 2mm. Une partie est exposée pendant 3 jours à l'air libre et une autre partie est utilisée immédiatement. Dans les deux cas (sol frais et sol séché à l'air), le protocole est le même :

5 a -Mesure de l'humidité

On pèse un échantillon de 50 g de sol séché à l'air ou frais, on le met à sécher pendant 24 heures dans une étuve à 105°C et on le pèse de nouveau après refroidissement dans un dessiccateur. La différence donne la teneur en humidité  
10 exprimée en grammes, teneur dont il faudra tenir compte pour l'expression des résultats (point c4. ci-dessous).

b -Incubation enzymatique

On introduit une prise d'essai de 1 g de sol (frais ou séché à l'air) dans une fiole Erlenmeyer de 50 ml et on  
15 ajoute 0,2 ml de toluène, 4 ml d'une solution tampon à pH 10,8 (Diluer dans 800 ml d'eau, 200 ml d'une solution mère contenant 12,1 g de tampon Tris (hydroxyméthylaminométhane), 11,6 g d'acide malique, 14 g d'acide citrique et 6,3 g d'acide borique dans 488 ml de  
20 NaOH, 1N. Diluer avec H<sub>2</sub>O et ramener à 1 litre) et 1 ml d'une solution de phosphate de p-nitrophényle. On agite, on bouche la fiole et on incube dans un agitateur fonctionnant à 50 révolutions/mn (50 rpm) à 37°C pendant 1 heure. Sous l'action de la phosphatase acide contenue dans la prise  
25 d'essai, une quantité plus ou moins grande de phosphate de p-nitrophényle est convertie en p-nitrophénol.

c -Mesure spectrophotométrique

Elle consiste à mesurer la quantité de p-nitrophénol produite, laquelle est fonction de l'activité de la  
30 phosphatase alcaline.

c1. Témoin :

On met 1g de sol à incuber comme précédemment, mais sans adjonction de phosphate de p-nitrophényle. Après incubation, on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de  
35 CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, à la concentration de 73,5g/litre et 4 ml d'une

-6-

solution aqueuse de NaOH 0,5 Molaire. On agite, puis on filtre sur papier Whatman n° 40 et lit au spectrophotomètre sous 410µm.

c2.Courbe d'étalonnage (solution standard colorée) :

5 On dilue 1 ml d'une solution standard de p-nitrophénol (1g/l) dans 100 ml d'eau et l'on distribue la dilution résultante dans des fioles Erlenmeyer, à raison respectivement de 0, 1, 2, 3, 4 et 5 ml. On ajuste à 5 ml avec de l'eau, ce qui donne une gamme de concentrations  
10 allant de 0 à 50 µg de p-nitrophénol. On mesure l'absorption de cette gamme à 410µm et on trace la courbe correspondante.

c3.prise d'essai

A l'issue de la période d'incubation enzymatique, on ajoute, comme pour le témoin, 1 ml d'une solution aqueuse de  
15  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , à la concentration de 73,5g/litre et 4 ml d'une solution aqueuse de NaOH 0,5 Molaire. On agite, puis on filtre sur papier Whatman n° 40. Le spectrophotomètre étant calé en fonction de l'erreur introduite par le témoin, on mesure l'absorption à 410µm.

20 c4. expression des résultats

A partir de cette absorption et de la courbe d'étalonnage obtenue sous c2, on détermine la concentration en p-nitrophénol de la prise d'essai et donc, indirectement, l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

25 Cette activité est exprimée en µg de p-nitrophénol produit en une heure par 1g de sol sec, c'est-à-dire en tenant compte de la mesure de l'humidité effectuée sous a ci-dessus.

## 2 - Mesure de la surface interne du sol

30 La mesure utilisée est celle de la technique dite "au bleu de méthylène" du Laboratoire Central des Ponts et Chaussées. Le dosage consiste à faire des ajouts de bleu de méthylène (10 g/l) dans une suspension contenant la prise d'essai jusqu'au recouvrement des particules du sol par une  
35 couche monomoléculaire de ce colorant.

-7-

a - Préparation de l'échantillon de sol

Un prélèvement de sol est tamisé à 2mm et une prise d'essai de 1 g est prélevée et mise dans 100 ml d'eau permutée. On y ajoute 10 ml d'une solution aqueuse d'hexamétaphosphate de sodium à 100 g/l. On met ensuite au mixeur pendant 30 secondes.

b - Fixation du bleu de méthylène

On fait des ajouts de 2 ml de solution de bleu de méthylène (10g/l) jusqu'à ce qu'une goutte du mélange suspension de sol/bleu de méthylène, déposée sur du papier filtre, laisse apparaître une auréole bleu clair autour de la tache résultante.

c - Expression des résultats

La surface interne est exprimée en  $m^2/g$  de sol de la façon suivante :

$$\text{Surface interne} = (x.s)(1/y)$$

formule dans laquelle :

x = volume en ml de solution de bleu de méthylène nécessaire pour recouvrir 1g de sol

s = surface en  $m^2$  déployée par 1g de bleu de méthylène, en l'occurrence 19,85  $m^2$

y = pourcentage pondéral d'argile dans le sol.

3 - Corrélation

Une série de mesures a été faite sur des échantillons de sols de référence considérés comme satisfaisants sur le plan de leur activité biologique.

Les résultats sont exprimés graphiquement à la figure 1 du dessin annexé.

A partir de ces résultats, on a pu établir une droite de régression dont le coefficient de régression  $r$  est de 0,955. On obtient ainsi un abaque de corrélation.

4 - Exploitation

En procédant aux mêmes mesures de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et de la surface interne sur un échantillon de sol dont on veut déterminer

l'activité biologique et en comparant les résultats obtenus avec l'abaque issue de l'étape 3, on peut juger de cette activité biologique.

#### EXEMPLE 2

- 5       Corrélation entre la mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et celle de la teneur en carbone organique.

1) Mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase acide

- 10       On procède comme à l'exemple 1 et le résultat obtenu est exprimé de la même façon.

2) Mesure de la teneur en carbone organique

- La méthode utilisée est celle de ANNE, P. 1945; Ann. Agron. 15:161-172, modifiée par la norme AFNOR d'analyse des  
15       sols. Elle consiste à oxyder le carbone organique par une solution sulfo-chromique à l'ébullition et à doser les ions  $Cr^{+++}$  par spectrophotométrie à 625  $\mu m$ .

a - Mode opératoire

- On opère sur une prise d'essai de sol pesant de 200 mg  
20       à 5 g selon que le sol est supposé contenir de 20 à 1 % de carbone. On introduit cette prise d'essai dans un ballon à col rodé, on ajoute 50 ml de mélange sulfo-chromique (30 g de  $CrO_3$  dissous dans 540 ml d'eau distillée + 500 ml d'acide sulfurique concentré) et 15 ml d'acide sulfurique concentré.  
25       Après avoir adapté au col rodé du ballon un réfrigérant à reflux, on porte le contenu du ballon à l'ébullition pendant 5 mn. On laisse refroidir pendant 30 mn, puis on transvase quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml. On laisse reposer une heure, après quoi on décante le liquide clair de  
30       la fiole. Après un nouveau repos, de 12 heures cette fois, on décante dans un pilulier à bouchon hermétique.

b - Mesure spectrophotométrique

b1. Gamme étalon

- On prépare, à partir d'une solution mère de glucose à  
35       10 g/l (donc à 4 g de carbone par litre), une gamme de

dilutions titrant respectivement 0, 10, 20, 60, 100, 200, 300, 400, 500 et 600 µg de carbone/ml. On mesure l'absorption de cette gamme sous 625 µm et on trace la courbe d'étalonnage correspondante.

5        b2. Mesure

L'appareil étant calé pour tenir compte de l'absorption d'un témoin préparé selon le principe classique rappelé sous l'exemple 1, on mesure l'absorption de la prise d'essai préparée comme indiqué sous a (suspension de liquide d'incubation), et l'on s'en rapporte à la courbe d'étalonnage pour en tirer la concentration en carbone exprimée en µg de carbone par cm<sup>3</sup> de suspension (valeur qui peut directement être rapportée au poids de sol sec).

c - Expression des résultats

15        La teneur en carbone organique est exprimée comme suit :

$$\text{Teneur en carbone (\%)} = (z) (1/50p) (100) (1/100-h)$$

formule dans laquelle :

20        z = concentration en carbone en µg/g

p = poids de la prise d'essai (en g)

h = humidité de la terre (en g) mesurée comme à l'exemple 1.

25        3 - Corrélation

Une série de mesures a été faite sur des échantillons de sols de référence considérés comme satisfaisants sur le plan de leur activité biologique.

Les résultats sont exprimés graphiquement à la figure 2 du dessin annexé.

A partir de ces résultats, on a pu établir une droite de régression dont le coefficient de régression  $r$  est de 0,7502. On obtient ainsi un abaque de corrélation.

4 - Exploitation

35        En procédant aux mêmes mesures de l'activité

-10-

enzymatique de la phosphatase alcaline et de la teneur en carbone organique sur un échantillon de sol dont on veut déterminer l'activité biologique et en comparant les résultats obtenus avec l'abaque issu de l'étape 3, on peut  
5 juger de cette activité biologique.

### EXEMPLE 3

Corrélation entre la mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et celle de la capacité d'échange cationique.

#### 10 1) Mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase acide

On procède comme à l'exemple 1 et le résultat obtenu est exprimé de la même façon.

#### 2) Mesure de la capacité d'échange cationique

15 On utilise la méthode de RHOADES, J.D. 1982. In : Methods of soil analysis, Part 2 by PAGE, A.L. ; MILLER, R.H. and KEENEY, D.R. American Society of Agronomy, Madison, U.S.A.

Cette méthode distingue les sols contenant des  
20 carbonates et les sols acides.

#### 2a- Sols contenant des carbonates

##### 2a1 -Mode opératoire

On pèse 4 à 5 g de sol sec que l'on met dans un tube à centrifuger. On ajoute 33 ml d'une solution saturante de  
25 NaOAc, 0,4N et de NaCl 0,1N avec 60 % d'éthanol et ajustée à pH 8,2 avec une solution de NaOH 6N. On agite pendant 5 mn et on centrifuge à 1000 tours/mn pendant 5 mn. On élimine le surnageant et on répète d'opération quatre fois. On ajoute ensuite 33 ml d'une solution de MgNO<sub>3</sub> à 0,5 N, on agite  
30 pendant 5mn et on centrifuge jusqu'à éclaircissement du surnageant que l'on verse dans une fiole de 100 ml. On répète l'opération deux fois et on ramène à 100 ml exactement.

On dose, dans des aliquots du contenu de la fiole, le  
35 sodium et le chlore présents dans la solution par rapport à

-11-

des solutions standard (Méthode de RHOADES, section 10-3.4 du même ouvrage).

#### 2a2 - Expression des résultats

La capacité d'échange cationique (C.E.C.), en 5 milliéquivalents pour 100 g de sol sec, est exprimée comme suit :

$$\text{C.E.C.} = (100/p \text{ sol}) [(cNa)(100/v \text{ al}) - (cCl)(100/v \text{ al})(cNaCl)]$$

10 dans laquelle :

- p sol est le poids en grammes de l'échantillon de sol
- cNa est la concentration en Na, exprimée en 15 milliéquivalents par litre, de la solution saturante
- v al est le volume de l'aliquot en ml
- cCl est la concentration en Cl, exprimée en 20 milliéquivalents par litre, de la solution saturante
- cNaCl est la concentration en NaCl, exprimée en 25 milliéquivalents par litre, de la solution saturante

#### 2b- Sols acides

##### 2b1 - Mode opératoire

25 On pèse 2 g de sol sec que l'on place dans un tube à centrifugation. On ajoute 20 ml d'une solution de  $\text{BaCl}_2$  0,1M. On agite pendant 2 heures et on centrifuge. On jette le surnageant et on répète l'opération deux fois avec 20 ml de  $\text{BaCl}_2$  0,002M. On ajoute 10 ml d'une solution de  $\text{MgSO}_4$  30 0,005M et on agite pendant 1 heure. On ajuste la capacité d'échange à celle d'une solution de référence de  $\text{MgSO}_4$  0,0015M par ajouts successifs d'une solution de  $\text{MgSO}_4$  0,005M ou d'eau distillée. On agite doucement pendant une nuit. On pèse le tube et on centrifuge. On détermine le pH et la 35 concentration en Mg du surnageant.

-12-

### 2b2 Expression des résultats

La capacité d'échange cationique (C.E.C.), en milliéquivalents pour 100 g de sol sec, est exprimée comme suit :

5

- si l'on n'a ajouté que de l'eau distillée :

$$CEC = 100(0,1 - C_1 V_3) / p \text{ sol}$$

10

- si l'on a ajouté du  $MgSO_4$

$$CEC = 100(0,01V_1 - C_1 V_3) / p \text{ sol}$$

formules dans lesquelles :

15

- p sol = poids en grammes de l'échantillon de sol sec

-  $C_1$  = concentration en Mg dans le surnageant en milliéquivalents/ml

-  $V_1$  = volume en ml de la solution de  $MgSO_4$  ajoutée

20

-  $V_3$  = volume en ml de la solution finale de surnageant.

### 3 - Corrélation

Une série de mesures a été faite sur des échantillons de sols de référence considérés comme satisfaisants sur le plan de leur activité biologique.

25

Les résultats sont exprimés graphiquement à la figure 3 du dessin annexé.

A partir de ces résultats, on a pu établir une droite de régression dont le coefficient de régression  $r$  est de 0,6482. On obtient ainsi un abaque de corrélation.

30

### 4 - Exploitation

En procédant aux mêmes mesures de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et de la capacité d'échange cationique sur un échantillon de sol dont on veut déterminer l'activité biologique et en comparant les

35

résultats obtenus avec l'abaque issu de l'étape 3, on peut juger de cette activité biologique.

Que l'on ait recours à l'un ou l'autre mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on n'a à effectuer que des opérations simples, rapides et peu coûteuses. On peut, par suite, les appliquer couramment aux sols agricoles en vue d'aboutir à une "analyse conseil". Cela est d'autant plus utile que l'intensification de l'agriculture a conduit à une perte de matière organique dans les sols avec une baisse consécutive de leur activité microbienne. Le procédé selon l'invention permet aux agriculteurs de juger de l'état de leur sol ainsi que de vérifier l'efficacité de tel ou tel produit dans le maintien ou l'augmentation de son activité biologique.

Il est bien entendu que la présente invention n'est pas limitée aux modes opératoires décrits ci-dessus, à titre d'exemples. En particulier, l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline pourrait être déterminée en utilisant un autre substrat que le phosphate de p-nitrophényle, ou même la phosphatase alcaline pourrait être dosée directement par tout procédé approprié. De même, la teneur en carbone, la C.E.C. et la surface interne pourraient être mesurées par toutes autres méthodes reconnues sur le plan national ou international.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de détermination de l'activité biologique d'un sol, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à établir une corrélation entre, d'une part, la teneur en phosphatase alcaline d'une série de sols de référence dont l'activité biologique est jugée satisfaisante et, d'autre part, d'autres caractéristiques physiques et/ou chimiques de cette série de sols de référence,

- à mesurer la teneur en phosphatase alcaline et lesdites autres caractéristiques du sol objet de la détermination, et

- à comparer les résultats desdites mesures à la corrélation établie à partir des sols de référence.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à mesurer la teneur en phosphatase alcaline de façon indirecte, par une mesure de son activité enzymatique.

3 - Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'une autre dite caractéristique est la surface interne du sol.

4 - Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que la droite de régression obtenue à partir des couples de mesures

. activité enzymatique de la phosphatase alcaline exprimée en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol produit à partir de phosphate de p-nitrophényle /g de sol sec/heure, portée en ordonnée,

. surface interne du sol exprimée en  $\text{m}^2/\text{g}$  de sol, portée en abscisse,

fait apparaître un facteur de régression  $r$  de l'ordre de 0,95.

5 - Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'une autre dite caractéristique est la teneur en carbone organique du sol.

6 - Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce

que la droite de régression obtenue à partir des couples de mesures

- 5 . activité enzymatique de la phosphatase alcaline exprimée en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol produit à partir du phosphate de p-nitrophényle /g de sol sec/heure, portée en ordonnée,
- . teneur en carbone organique du sol exprimé en pour mille (‰), portée en abscisse,

fait apparaître un facteur de régression  $r$  de l'ordre de  
10 0,75.

7 - Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'une autre dite caractéristique est la capacité d'échange cationique du sol.

8 - Procédé selon la revendication 2 ou 7, caractérisé  
15 en ce que la droite de régression obtenue à partir des couples de mesures

- 20 . activité enzymatique de la phosphatase alcaline exprimée en  $\mu\text{g}$  de p-nitrophénol produit à partir de phosphate de p-nitrophényle /g de sol sec/heure, portée en ordonnée,
- . capacité d'échange cationique du sol exprimée en milliéquivalents/g de sol, portée en abscisse,

fait apparaître un facteur de régression  $r$  de l'ordre de  
0,65.

25 9 - Procédé selon l'une quelconque des revendication 4, 6 ou 8 caractérisé en ce qu'il consiste à comparer les valeurs d'activité enzymatique de la phosphatase alcaline données, d'une part, par la courbe de régression et, d'autre part, par la mesure sur le sol soumis à la détermination,  
30 pour la même valeur d'autres caractéristiques choisies entre la surface interne du sol, sa teneur en carbone organique et sa capacité d'échange cationique, et à interpréter le résultat à partir des hyperboles de confiance comme suit :

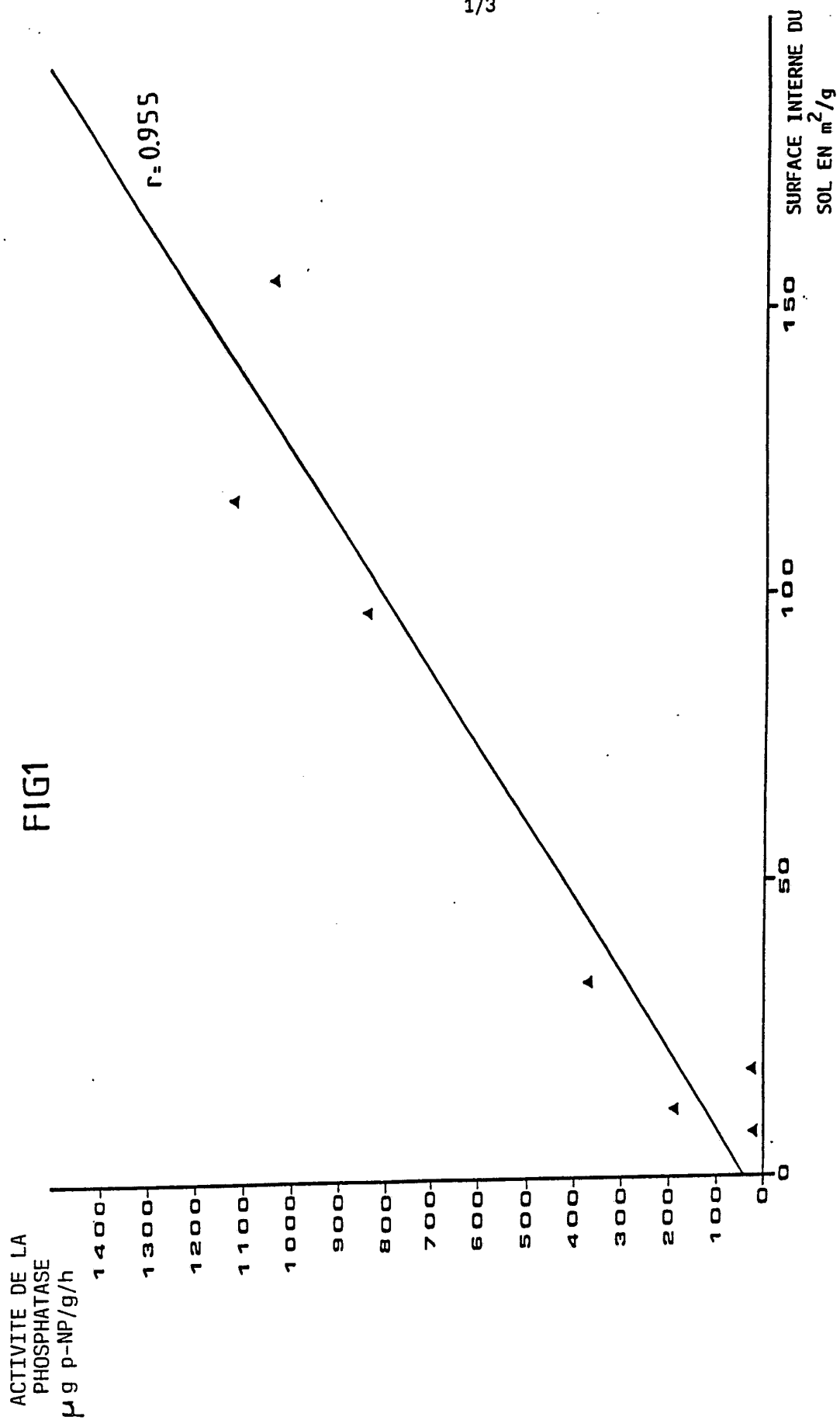
- valeur dans les hyperboles à 95 % : bon
- 35 - valeur dans les hyperboles à 90 % : insuffisant

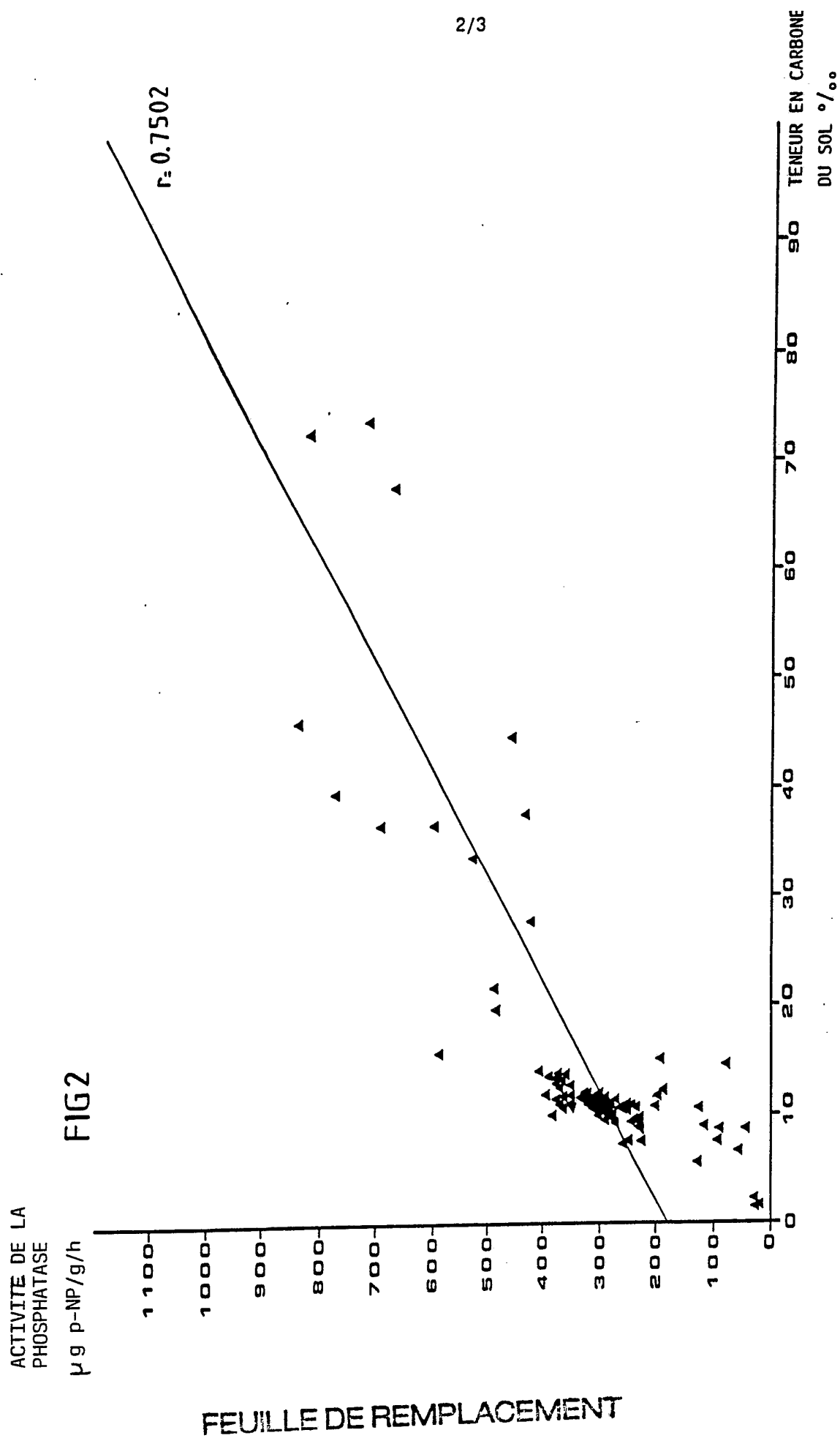
-16-

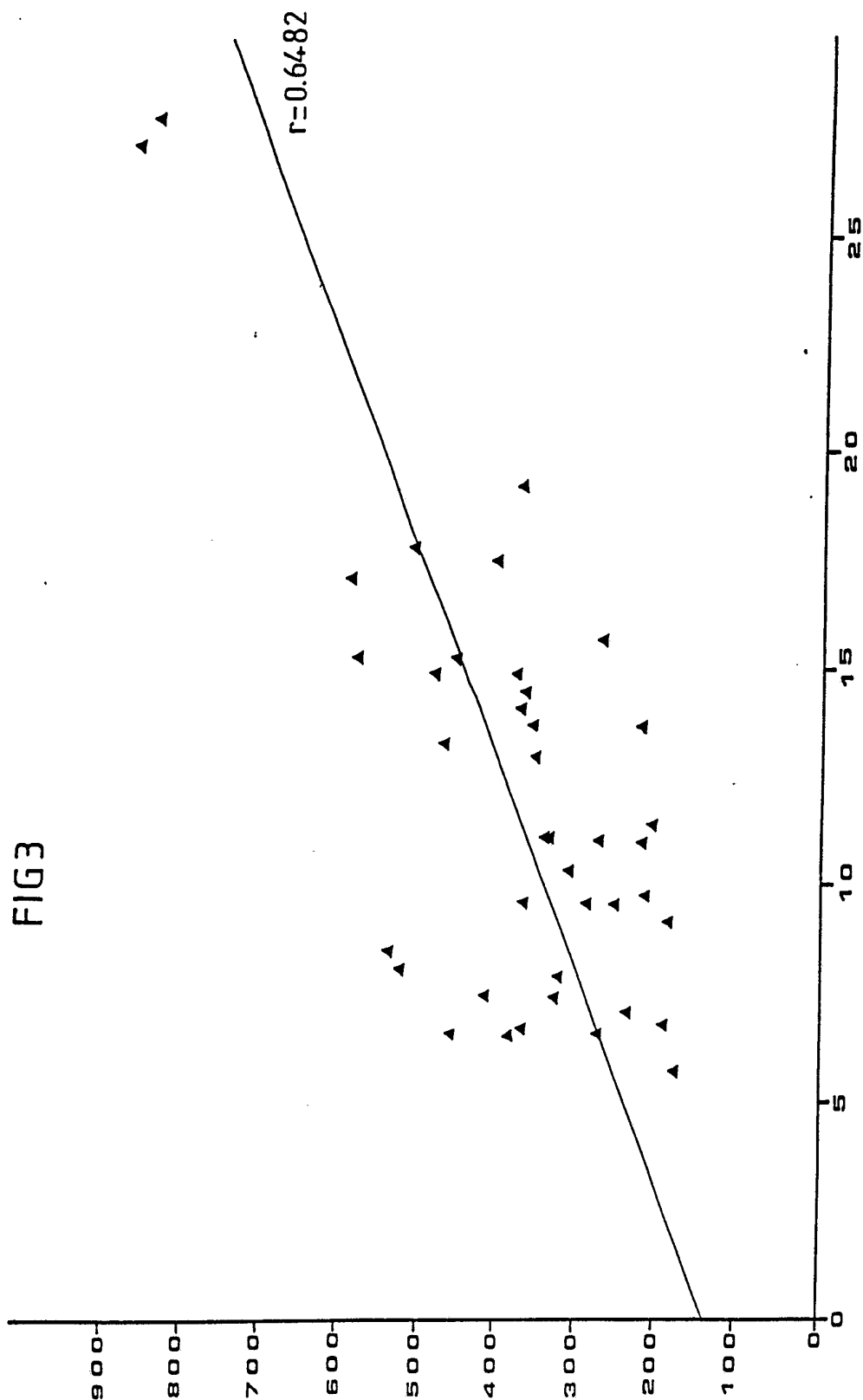
ou fort

- valeur hors des hyperboles à 90 % : mauvais  
excessif.

1/3







# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 89/00674

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> G 01 N 33/24, C 12 Q 1/42		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>5</sup>	G 01 N, C 12 Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>9</sup></b>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Chemical Abstracts, volume 94, No. 5, 2 February 1981, (Columbus, Ohio, US), P. Nannipieri et al.: "Extraction of phosphatase, urease, proteases, organic carbon, and nitrogen from soil", see page 451, abstract 29252k, & Soil Sci. Soc. Am. J. 1980, 44(5), 1011-16	1,2,5,6
A	Biological Abstracts, volume 87, No. 7, 1989, (Philadelphia, PA, US), T. Suttner et al.: "Correlation between the arginine ammonification, enzyme activities, microbial biomass, physical and chemical properties of different soils", see page AB-1102, abstract 77236, & Zentralbl Mikrobiol 143(8): 569-573, 1988	
-- ./.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search 26 March 1990 (26.03.90)		Date of Mailing of this International Search Report 24 April 1990 (24.04.90)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Biological Abstracts, volume 78, No. 9, 1989, (Philadelphia, PA, US), W.A. Dick: Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities", see pages 7257-7258, abstract 64394, & Soil Sci Soc Am J 48(3): 569-574 --	
A	EP, A, 0085348 (AMERICAN HOECHST CORP.) 10 August 1983  -----	

FR 8900674  
SA 33499

**EPO FORM P0479**

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 89/00674

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB <sup>5</sup> : G 01 N 33/24, C 12 Q 1/42		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>5</sup>	G 01 N, C 12 Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>*</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
X	Chemical Abstracts, volume 94, no. 5, 2 février 1981, (Columbus, Ohio, US), P. Nannipieri et al.: "Extraction of phosphatase, urease, proteases, organic carbon, and nitrogen from soil", voir page 451, résumé 29252k, & Soil Sci. Soc. Am. J. 1980, 44(5), 1011-16	1,2,5,6
A	Biological Abstracts, volume 87, no. 7, 1989, (Philadelphia, PA, US), T. Suttner et al.: "Correlation between the arginine ammonification, enzyme activities, microbial biomass, physical and chemical properties of different soils", voir page AB-1102, résumé 77236, & Zentralbl Mikrobiol 143(8): 569-573, 1988	
--		
./.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« 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)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« 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.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26 mars 1990	24 APR 1990	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	MISS D. E. KOTNIECZYK	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Biological Abstracts, volume 78, no. 9, 1989, (Philadelphia, PA, US), W.A. Dick: Influence of long-term tillage and crop rotation combinations on soil enzyme activities", voir pages 7257-7258, résumé 64394, & Soil Sci Soc Am J 48(3): 569-574 --	
A	EP, A, 0085348 (AMERICAN HOECHST CORP.) 10 août 1983  -----	

FR 8900674  
SA 33499

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 17/04/90

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

**EPO FORM P0472**