

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 42860 B1** (51) Cl. internationale : **C05D 9/02; C05F 11/02; C05G 1/00**
(43) Date de publication : **30.04.2019**

(21) N° Dépôt : **42860**
(22) Date de Dépôt : **24.01.2017**
(30) Données de Priorité : **17.02.2016 EP 16382063.2**
(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/ES2017/070036 24.01.2017**
(71) Demandeur(s) : **FERTINAGRO BIOTECH, S.L., Polígono Industrial La Paz parcelas 185-188 44195 Teruel (ES)**
(72) Inventeur(s) : **ATARES REAL, Sergio ; ROMERO LOPEZ, Joaquin ; SALAET MADORRAN, Ignasi ; FERRER GINES, María ; NARANJO OLIVERO, Miguel Angel ; COLOM TOMAS, Elena**
(74) Mandataire : **ATLAS INTELLECTUAL PROPERTY**

(54) Titre : **COMPOSITION FERTILISANTE QUI COMPREND DES IONS COMPLEXÉS AVEC DES SUBSTANCES HUMIQUES POUR AMÉLIORER LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE PAR LES MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS DANS LE SOL**

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition fertilisante qui comprend des ions cobalt, fer et molybdène complexés avec des substances humiques pour augmenter la capacité des micro-organismes fixant l'azote présents dans le sol tels que Clostridium, en particulier

Inhibition of Nitrogen Fixation in Alfalfa by Arsenate, Heavy Metals, Fluoride, and Simulated Acid Rain (Inhibition de la fixation d'azote dans la luzerne par l'arséniate, les métaux lourds, le fluorure, et la pluie acide simulée)

Soumis pour publication le 5 mai 1980 et sous sa forme revue le 15 décembre 1980

JOHN R. PORTER^{1,2,3} ET RICHARD P. SHERIDAN

Département de Botanique, Université du Montana, Missoula, Montana 59801

ABRÉGÉ

Les effets aigus des solutions aqueuses d'ions As, Cd, Cu, Pb, F, et Zn à des concentrations allant de 0,01 à 100 microgrammes par millilitre et des solutions ajustées à un pH de 2 à 6 avec de l'acide nitrique ou sulfurique ont été étudiés par rapport à la réduction d'acétylène, la photosynthèse nette, la fréquence respiratoire, et la teneur en chlorophylle dans la luzerne Vernal (*Medicago sativa* L. cv. Vernal). Les effets des différents traitements sur la réduction d'acétylène varient entre des effets non démontrables par toute concentration de F⁻ et 42 % d'inhibition par 100 microgrammes de Pb²⁺ par millilitre, et 100 % d'inhibition par 10 microgrammes de Cd²⁺ par millilitre et 100 microgrammes par millilitre d'ions As, Cu²⁺, et Zn²⁺. Zn²⁺ a montré statistiquement une inhibition significative de l'activité à 0,1 microgrammes par millilitre. Les traitements acides n'ont pas été inhibiteurs au-dessus du pH 2, auquel l'acide nitrique pH a davantage inhibé l'activité de réduction d'acétylène que l'acide sulfurique. L'inhibition de la réduction d'acétylène par ces ions a été Zn²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺ > AsO₃⁻ > Pb²⁺ > F⁻. La sensibilité de la réduction d'acétylène aux ions a été à peu près égale à la sensibilité de la photosynthèse, la respiration, et la teneur en chlorophylle lorsque Pb²⁺ a été appliquée, mais a été 1000 fois plus sensible que Zn²⁺. La relation des données aux conditions de terrain et à la pollution industrielle est examinée.

plus grandes (15, 28), le premier étant une étude de l'influence de Cd et de Pb sur le métabolisme de la graine de soja, ainsi que sur l'activité de fixation d'azote. Les auteurs ont constaté une baisse de 71 % de l'activité de réduction de N₂[C₂H₂] causée par le traitement avec 18 µm de Cd²⁺. Le dernier de ces deux rapports comprend des données préliminaires de l'étude rapportée ici et comprend les effets d'une variété de polluants sur une cyanobactérie (*Anabaena* sp), les graines de soja (*Glycine max* L. cv. Kent), le mélilot jaune (*Melilotus officinalis* L.), et deux « espèces » de lichen (*Collema tenax* et *Lecidea* sp).

Les expériences rapportées ici avaient initialement pour but d'étudier l'influence des solutions aqueuses d'ions AsO₃⁻, Cd²⁺, Pb²⁺, F⁻, ou Zn²⁺ sur la capacité de fixation d'azote de systèmes de racines excisées par la technique de réduction d'acétylène. Les effets d'expositions aiguës à la précipitation acide ont également été étudiés par la brumisation avec des solutions au pH spécifique appliquées à des intervalles contrôlés. Pour évaluer correctement la sensibilité du processus de réduction de diazote à ces traitements, les taux de photosynthèse nette de la feuille, les fréquences de respiration de la feuille, la biomasse, la teneur en nodule LHB⁴, et la teneur en Chl de la feuille ont également été mesurés. Les données montrent que l'activité de fixation de l'azote est significativement réduite par la plupart des traitements utilisés et que le processus de réduction de N₂[C₂H₂] est souvent à plusieurs reprises plus sensible aux agressions de polluants environnementaux que les autres paramètres mesurés (25, 26).

Le rôle quantitatif exact de la fixation d'azote biologique n'a été pas étudié dans la plupart des habitats naturels et agricoles. Néanmoins, ces études qui ont été faites (par exemple 32) suggèrent que ce procédé fournit une plus grande part de l'azote fixé pour la croissance de la plante. Toute condition ou circonstance diminuant la capacité de fixation d'azote des organismes diazotrophes freine gravement la tentative d'augmenter la contribution de ces organismes dans la teneur en azote des sols. Le but des expériences rapportées ici était d'étudier les effets de l'exposition aiguë simulée à plusieurs polluants sur la capacité de fixation d'azote de l'association symbiotique entre la luzerne (*Medicago sativa* L. cv. Vernal) et *Rhizobium meliloti*.

Bien qu'il existe de nombreuses recherches sur les effets des polluants sur différents processus physiologiques de plantes, les données concernant les effets polluants sur les organismes de fixation d'azote font défaut. La plupart de ces données ont abordé la croissance des bactéries *Rhizobium* en présence de métaux lourds (14). Seuls deux rapports ont traité ce problème sur les plantes les

MATÉRIEL ET PROCÉDÉS

Culture des plantes. La luzerne Vernal certifiée (*Medicago sativa* L. cv. Vernal) a été plantée dans des bacs remplis de Perlite. L'inoculation a été réalisée lors de l'ensemencement avec des bactéries de fixation d'azote Nocolator pour la luzerne et le trèfle en parsemant une petite quantité de mélange de tourbe dans les rangées avant l'ensemencement. Les plantes ont été arrosées quotidiennement avec l'eau du robinet et deux fois par semaine avec la solution nutritive d'azote de Moore (22). Après 2 semaines, elle a été remplacée par une solution nutritive identique pauvre en azote combiné. Après 4 semaines, les plantes ont été transplantées dans 10 cm de pots remplis de Perlite en groupes de trois plantes ou dans de petits bacs (10 x 20 x 6 cm) pour les expériences de pluie acide. Toutes les expériences ont été menées sur des plantes à 4 et 8 semaines d'ensemencement. Les plantes ont été cultivées dans des chambres de culture lumineuses éclairées par un mélange de tubes fluorescents blanc froid et 25-w d'ampoules incandescentes (200 µE m⁻² s⁻¹) avec 12 h de lumière. Les chambres ont été maintenues à un régime diurne de 24 C de température de jour et de 17 C de température de nuit.

Traitements. Dans des expériences séparées, des quantités appropriées de Na₂HAsO₄·7H₂O, CdCl₂, NaF, PbCl₂, CuSO₄·5H₂O, ou ZnSO₄·7H₂O ont été ajoutées à de l'eau dans des conteneurs de

¹ Ces activités de recherche sont partiellement conformes aux exigences du diplôme de doctorat de l'Université du Montana.

² Adresse actuelle : Department of Plant Pathology, 406 Plant Sciences Building, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68583.

³ où les demandes devraient être adressées.

⁴ Abréviations : LHB, leghémoglobine ; Nase, nitrogénase.

2 litres pour fournir des solutions de 0,01, 0,1, 1,0, 10, et de 100 $\mu\text{g/ml}$ de As (comme AsO_3^-), Cd^{2+} , F^- , Pb^{2+} , Cu^{2+} , ou Zn^{2+} . Les conteneurs ont été peints avec de la peinture d'aluminium-asphalte pour exclure la lumière de la zone des racines. Les systèmes racinaires des trois plantes ont été placés dans les solutions et les plantes ont été maintenues en place avec des rétenteurs Styromousse. Les solutions ont été renvoyées aux chambres de culture et aérées vigoureusement pendant 72 h. En raison des limites de solubilité des sels, les solutions Pb^{2+} et Cu^{2+} ont été préparées à un pH 5,5 et 6,0, respectivement, tandis que les autres ont été ajustées à un pH de 6,5. Deux ensembles de plantes témoins, qui ont seulement été exposés à de l'eau ajustée au même pH que les solutions du test, ont été fournis pour chaque traitement.

Des solutions pour les simulations de pluie acide ont été préparées à partir de H_2O distillé et ajustées au pH 6, 5, 4, 3, ou 2 avec le H_2SO_4 dilué ou le HNO_3 dilué. Les bacs de plantes ont été recouverts de Parafilm pour exclure les racines dans le milieu de Perlite non tamponné des traitements. Chaque bac a été aspergé à 72 h d'intervalle de 80 ml d'une solution pendant 21 jours. Ce traitement était l'équivalent d'un événement de pluie à 0,4 cm avec une fréquence moyenne de 72 h. Les bacs ont été aspergés quotidiennement depuis la partie inférieure et trempés deux fois par semaine dans la solution nutritive exempte d'azote.

Test de fixation d'azote. L'activité du système de Nase de systèmes racinaires nodulés a été testée par la technique de réduction d'acétylène de Hardy *et al.* (10). À la fin de la période de traitement, les plantes ont été retirées des solutions ou bacs, les pousses et racines séparées à l'hypocotyle, et le système racinaire de chaque traitement a été placé dans un flacon de Erlenmeyer de 125 ml. Chaque flacon a été fermé avec un bouchon à septum en caoutchouc. Après la suppression de 10 ml d'air du flacon avec une seringue étanche au gaz, 10 ml d'acétylène a été injecté dans le flacon. Les flacons ont été incubés dans l'obscurité pendant 2 h à 24 C et rapidement refroidis à 4 C pour stopper la réaction. Des échantillons d'un ml ont été retirés de chaque flacon et injectés dans un chromatographe de gaz PYE 104 avec un détecteur à ionisation de flamme d'hydrogène et une colonne de Porapak R maintenue à 50 C pour la détection d'éthylène. N_2 a été utilisé comme gaz porteur au taux de 600 ml/min. Les taux de réduction d'acétylène ont été calculés en pourcentage de témoins en raison d'une variation quotidienne plutôt large en quantités absolues d'éthylène produit.

Teneur en LHb. Le procédé d'extraction et de détermination de la teneur en LHb des nodules des plantes traitées était une modification du procédé de Dilworth and Williams (6). Après les mesures de la production d'éthylène, les nodules ont été retirés des systèmes racinaires, comptés, et écrasés en un petit volume de tampon de phosphate froid de 0,1 M (pH 7,1) dans un mortier refroidi à 4 C. L'homogénéat a été centrifugé à 2 500 g pendant 15 min (4 C) dans le rotor SS-34 d'une centrifuge RC-2B Sorval. Le fluide surnageant a une nouvelle fois été décanté et centrifugé à 25 000 g pendant 30 min (4 C) pour retirer tout nodule ou débris bactéroïde. La solution a été décantée dans un tube volumétrique, constituée de 10 ml avec le tampon froid, et réduite par l'ajout d'une petite quantité de dithionite de sodium. La teneur en LHb a été déterminée à partir de la densité optique de 555 nm dans un spectrophotomètre enregistreur Shimadzu MPS-50L en utilisant un coefficient d'extinction de 7,9 $\text{cm}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Le spectre d'absorbance de la solution obtenue par ce procédé a très bien correspondu aux solutions de LHb crues réduites préparées par Bergersen and Goodchild (1).

Mesures de la photosynthèse et de la respiration. Six feuilles des plantes traitées ont été utilisées pour déterminer les taux de photosynthèse et les fréquences de respiration. Les taux de photosynthèse nette dans la lumière et les fréquences de respiration dans l'obscurité ont été déterminés dans 5 ml de tampon N°11 de Warburg (pH 8,69) (30) sur un Respiromètre différentiel Gilson. L'intensité de la lumière pendant les lectures de photosynthèse a été

maintenue à 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le bain d'eau du respiromètre a été maintenu à 24 C pour les mesures.

Teneur en Ch1 et Poids sec. Après les mesures de photosynthèse et de respiration, la feuille Ch1 a été extraite avec 90 % de méthanol. La Ch1 a été extraite dans l'obscurité dans des tubes fermés avec un bouchon pendant 72 h et le contenu des six feuilles déterminé à partir de la densité optique de la solution extraite à 650 et 665 nm en utilisant l'équation de Holden (13). Les feuilles ont ensuite été séchées à un poids constant.

La biomasse des pousses et des racines de chaque traitement a également été déterminée après le séchage à un poids constant. En raison de la grande quantité de Perlite s'adhérant aux racines et au tissu racinaire qui serait perdu si toute la Perlite avait été retirée, les échantillons de racines séchées ont été réduits en cendre dans un four à moufle après la pesée et le poids des cendres soustrait du poids sec. Il a été présumé que la variabilité de la teneur en cendres des racines eux-mêmes serait minime.

RÉSULTATS

Arséniate. Des symptômes visibles de la toxicité sont apparus dans les 72 h du traitement seulement dans les solutions de 10 et 100 $\mu\text{g As/ml}$. Ces symptômes sont un flétrissement léger à sévère des feuilles avec peu ou pas de chlorose à 10 $\mu\text{g As/ml}$ et un flétrissement sévère des feuilles avec une chlorose modérée à sévère à 100 $\mu\text{g As/ml}$. Le flétrissement est survenu tout d'abord sur les feuilles les plus basses et a progressé au sommet. Des symptômes similaires ont été rapportés par Woolson *et al.* (33), et ces auteurs ont attribué le flétrissement à l'absorption d'eau inhibée par les racines. Les systèmes racinaires de plantes traitées avec 10 et 100 $\mu\text{g As/ml}$ ont été jaunes, et la plupart des nodules des plantes traitées avec 10 $\mu\text{g As/ml}$ sont devenus verts, indiquant une défaillance du LHB. Les nodules de plantes traitées avec 100 $\mu\text{g As/ml}$ ont gardé la couleur rouge normale, suggérant la préservation de la structure de LHB par l'arséniate ou l'isolation du nodule de l'arséniate.

Lorsque les plantes ont été traitées avec l'arséniate, 20 % de réduction de l'activité s'est produit sur les plantes traitées avec 1 $\mu\text{g As/ml}$, ce qui a été significativement différent du témoin, mais non des traitements avec 0,01 ou 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.1). L'inhibition de l'activité a été plus prononcée dans les traitements avec 10 et 100 $\mu\text{g As/ml}$, avec 50 à 55 % de réduction de l'activité dans l'inhibition antérieure totale de cette dernière.

L'inhibition de la photosynthèse et de la respiration par As a été significative à 100 $\mu\text{g As/ml}$ (Fig. 1), mais non à des concentrations inférieures. La perte de Ch1 à 100 $\mu\text{g As/ml}$, et uniquement légèrement à 10 $\mu\text{g/ml}$, correspond généralement à l'étendue de la chlorose visuelle observée après le traitement.

Cadmium. Les symptômes visuels de toxicité de Cd^{2+} sont apparus seulement dans le traitement avec 100 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{ml}$. Ils incluent un flétrissement léger à modéré de toutes les feuilles avec une légère chlorose à l'extrémité pétiolaire de certaines feuilles. De l'anthocyanine a été produite sur certaines feuilles tel qu'il est montré par la couleur rouge sur le côté abaxial et la base de la feuille.

La réduction de l'activité de fixation de $\text{N}_2[\text{C}_2\text{H}_2]$ s'est produite à 1, 10, et 100 $\mu\text{g de Cd}^{2+}/\text{ml}$ (Fig. 2). La réduction de l'activité apportée par le traitement avec 1 $\mu\text{g de Cd}^{2+}/\text{ml}$ a été de 38 %, et a été significativement différente du témoin et des traitements avec 0,1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{ml}$, mais n'a pas été significativement différente des données obtenues par les traitements avec 0,01 $\mu\text{g/ml}$. L'inhibition de l'activité Nase a été de 100 % à 10 et 100 $\mu\text{g de Cd}^{2+}/\text{ml}$.

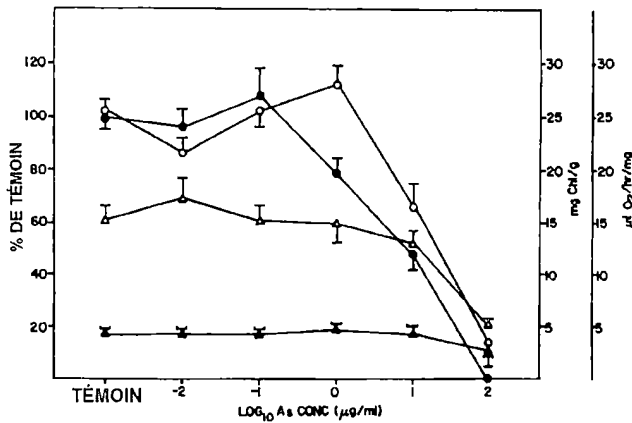


FIG. 1. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl *versus* la concentration en As ($\mu\text{g/ml}$). C_2H_4 hauteur de pic /mg LHb, ●—●; $\mu\text{l O}_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu\text{l O}_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, Δ — Δ . Chaque point représente la moyenne de 15 expériences de trois plantes à chaque concentration. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

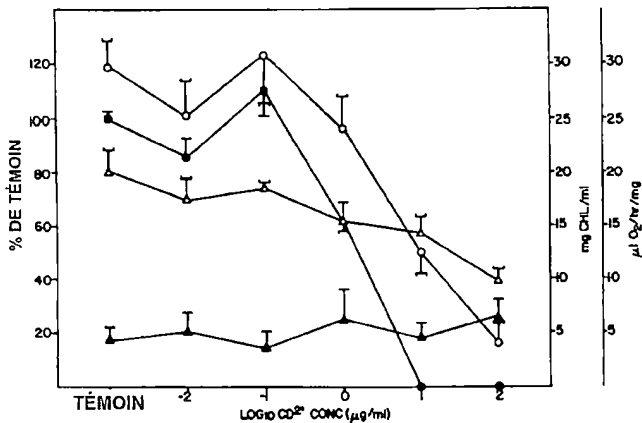


FIG. 2. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl *versus* la concentration en Cd^{2+} ($\mu\text{g/ml}$). C_2H_4 hauteur de pic /mg LHb, ●—●; $\mu\text{l O}_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu\text{l O}_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, Δ — Δ . Chaque point représente la moyenne de 19 expériences de trois plantes à chaque concentration. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

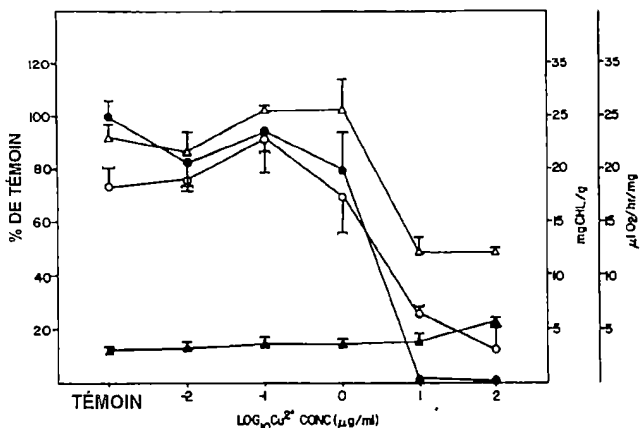


FIG. 3. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl *versus* la concentration en Cu^{2+} ($\mu\text{g/ml}$). C_2H_4 hauteur de pic /mg LHb, ●—●; $\mu\text{l O}_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu\text{l O}_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, Δ — Δ . Chaque point représente la moyenne de 15 expériences de

trois plantes à chaque concentration. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

La photosynthèse nette a été significativement réduite à 10 et 100 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{ml}$ (Fig. 2) et la teneur en Chl n'a cessé de baisser avec une concentration croissante de Cd^{2+} . Bien qu'il y ait eu de légères augmentations dans les fréquences de respiration à 1 et 100 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{ml}$, il semble ne pas y avoir d'effet significatif de Cd^{2+} sur la respiration.

Cuivre. Les symptômes visuels de toxicité de Cu^{2+} ont été légers. Le flétrissement modéré de feuilles dans le tiers inférieur de certaines plantes s'est uniquement produit à 100 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{ml}$. La chlorose survenue dans certaines feuilles flétries, et une production d'anthocyanine ont été observées à 100 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{ml}$. Les racines étaient généralement bleu-noir à 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$, indiquant que le Cu^{2+} dans la solution a été soit absorbé par les cellules racinaires et maintenu sans beaucoup de translocation, ou le Cu^{2+} a été précipité sur la surface racinaire. De nombreux nodules de plantes traités avec 100 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{ml}$ étaient verdâtres, mais non à des concentrations inférieures.

Il n'y a pas eu de réduction statistiquement significative de l'activité de réduction de $\text{N}_2[\text{C}_2\text{H}_2]$ à des concentrations en dessous de 10 $\mu\text{g de Cu}^{2+}/\text{ml}$ (Fig. 3). À cette concentration, l'inhibition a été de 97% et a été complète à 100 $\mu\text{g/ml}$. Des expériences similaires réalisées avec la luzerne Ranger (Porter, données non publiées) ont montré des données quasiment similaires, avec 100% d'inhibition d'activité de Nase à 10 ainsi qu'à 100 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{ml}$.

La production d' O_2 photosynthétique a été inhibée de 64% à 10 $\mu\text{g de Cu}^{2+}/\text{ml}$, mais n'a pas été significativement affectée à des concentrations plus faibles. La plus forte réduction dans la feuille Chl s'est produit après le traitement avec 10 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{ml}$. La fréquence de respiration des feuilles de luzerne a augmenté à chaque concentration de Cu^{2+} , mais non significativement en dessous de la plus forte concentration utilisée.

Plomb. Il n'y a eu aucun symptôme visuel de toxicité de Pb^{2+} dans aucune des plantes de luzerne traitées. Cela est probablement dû à la pauvre absorption du Pb^{2+} par les cellules racinaires (18) ou à la pauvre translocation de Pb^{2+} dans la plante (16). Les deux pourraient être dues à la liaison du Pb^{2+} avec PO_4^{3-} , soit dans le milieu soit dans la plante.

Aucune réduction significative dans l'activité Nase n'a été observée lorsque les plantes ont été traitées avec Pb^{2+} , et la teneur en Chl de la feuille a été similairement intacte (Fig. 4). La photosynthèse nette a significativement augmenté à 0,1 $\mu\text{g de Pb}^{2+}/\text{ml}$ et a été inhibée à 100 $\mu\text{g de Pb}^{2+}/\text{ml}$. La stimulation de la respiration n'a pas été statistiquement significative à aucun niveau de Pb^{2+} .

Zinc. Un très léger flétrissement accompagné d'une légère chlorose est survenu dans les feuilles les plus en hauteur dans certaines plantes traitées avec 100 $\mu\text{g de Zn}^{2+}/\text{ml}$. Les nodules sont devenus verts dans les plantes traitées avec 1 $\mu\text{g de Zn}^{2+}/\text{ml}$ dans seulement une expérience et a été donc atypique.

Le traitement Zn a produit une inhibition significative de l'activité de fixation de $\text{N}_2[\text{C}_2\text{H}_2]$ à 10 et 100 $\mu\text{g de Zn}^{2+}/\text{ml}$ (Fig. 5). Il y a également eu une réduction significative de 25% dans l'activité de réduction d'acétylène à 0,1 $\mu\text{g de Zn}^{2+}/\text{ml}$, et cette réduction a été plus importante lorsque l'activité était basée sur le poids des racines (données non montrées).

L'inhibition significative de la photosynthèse nette a seulement été à 0,01 et 100 $\mu\text{g de Zn}^{2+}/\text{ml}$ (Fig. 5). Le degré d'inhibition est similaire à celui présent dans les chloroplastes d'épinard isolé exposés à 1,5 $\mu\text{g de Zn}/\text{ml}$ (9). La perte de Chl à 100 $\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{ml}$ était suffisante pour compter dans la réduction dans l'activité photosynthétique. L'effet de Zn^{2+} sur la respiration était similaire aux résultats obtenus pour les autres métaux lourds.

Fluorure. Les symptômes visibles de toxicité de fluorure ont été vus dans seulement quelques plantes traitées avec 100 $\mu\text{g F}^-/\text{ml}$,

apparaissant comme un flétrissement général léger à sévère des feuilles. La chlorose a été citée comme un effet toxique de F^- (21), mais elle n'a été observée ici ni visuellement ni dans l'analyse de la teneur en Chl de la feuille (Fig. 6). Il n'y a eu aucun effet significatif sur aucun des traitements avec F^- sur la fixation de $N_2[C_2H_2]$, le taux photosynthétique net, la fréquence de respiration, ou la teneur en Chl de la feuille. En accord avec les données de Hitchcock et al. (12), les résultats avec le traitement F^- ont été très variable.

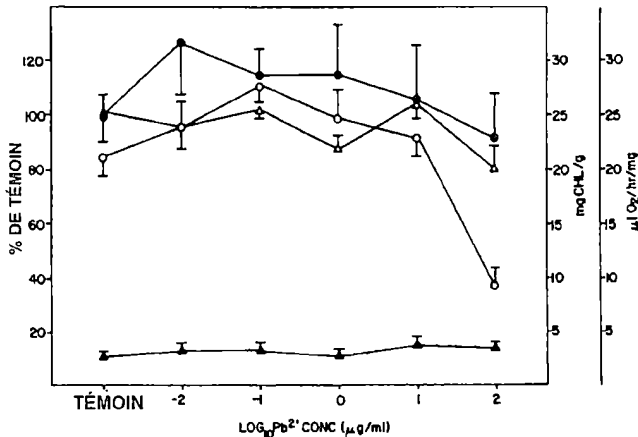


FIG. 4. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl versus la concentration en Pb^{2+} ($\mu g/ml$). C_2H_4 hauteur de pic /mg LHB, ●—●; $\mu l O_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu l O_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, △—△. Chaque point représente la moyenne de 15 expériences de trois plantes à chaque concentration. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

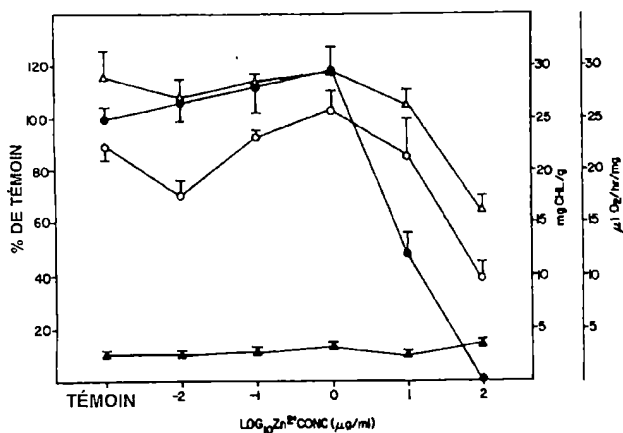


FIG. 5. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl versus la concentration en Zn^{2+} ($\mu g/ml$). C_2H_4 hauteur de pic /mg LHB, ●—●; $\mu l O_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu l O_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, △—△. Chaque point représente la moyenne de 16 expériences de trois plantes à chaque concentration. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

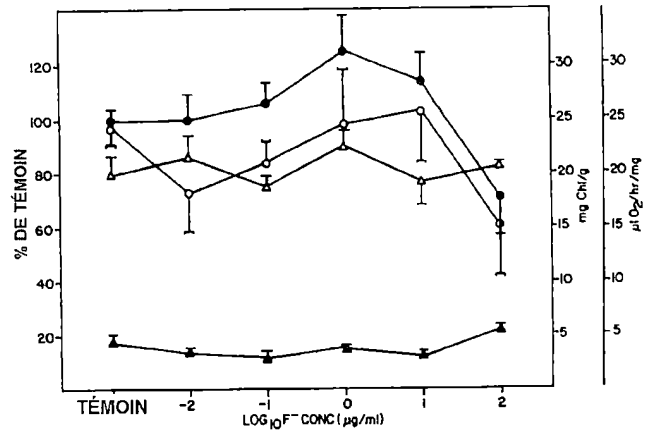


FIG. 6. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl versus la concentration en F^- . C_2H_4 hauteur de pic /mg LHB, ●—●; $\mu l O_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu l O_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, △—△. Chaque point représente la moyenne de 21 expériences de trois plantes à chaque concentration. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

Pluie acide. Les effets de la pluie de H_2SO_4 et de HNO_3 ont été testés pour inclure les deux plus importants acides minéraux dans la précipitation acide (20). L'inclusion de HNO_3 permet également une étude supplémentaire sur les effets du nitrate ajouté sur la réduction d'acétylène.

Les symptômes visuels de la pluie de H_2SO_4 ont été généralement insignifiants aux valeurs de pH au-dessus de 3. Plusieurs nodules des plantes traitées au pH 3 étaient verts ou dégonflés. Les plantes traitées avec les solutions H_2SO_4 au pH 2 étaient plus petites que les autres plantes traitées et ont montré une nécrose et une chlorose sévères le long de la plante. La production d'anthocyanine a été observée dans la plupart des feuilles de ces plantes. Très peu de nodules des plantes traitées au pH 2 sont devenus verts, mais certains ont dégonflé.

Les symptômes de dommages ont été généralement plus sévères lorsque les solutions de HNO_3 ont été appliquées. Les plantes traitées au pH 2 étaient sévèrement nécrotiques ou mortes, et la production d'anthocyanine était prononcée. Certaines liaisons nécrotiques étaient également présentes sur certaines plantes traitées avec des solutions au pH 3, et il y a eu une légère production d'anthocyanine. Les nodules des plantes traitées au pH 2 étaient verts ou disséqués, mais les nodules dans d'autres traitements semblaient normaux.

L'activité de fixation de $N_2[C_2H_2]$ n'a pas été significativement altérée au-dessus du Ph 2 avec aucun acide (Fig. 7 et 8). L'inhibition de l'activité au pH lorsque HNO_3 a été utilisé était presque deux fois plus importante que lorsque H_2SO_4 était l'acide étudié. Cela signifie un effet additif des ions d'hydrogène et du nitrate sur le processus de Nase. Un effet remarqué avec les deux acides était une augmentation dans le nombre de nodules par poids unitaire de racine tandis que la concentration d'ions d'hydrogène augmentait (Fig. 9). Cet effet a été plus prononcé après le traitement de H_2SO_4 même si la baisse de la biomasse des racines a été minime, et il était moins prononcé lorsque HNO_3 a été utilisé tandis que la biomasse des racines a baissé drastiquement. Ce dernier était probablement dû encore une fois au nitrate ajouté.

La photosynthèse nette a été inhibée de 55 % lorsque les plantes ont été traitées avec des solutions de H_2SO_4 au pH 2 (Fig. 7), mais n'a pas été significativement altérée à aucun pH lorsque HNO_3 a été utilisé (Fig. 8). Il n'y a eu aucun effet significatif du traitement acide sur la respiration des feuilles au-dessus du pH 2 avec aucun acide.

La longueur du traitement acide a également permis de mesurer les accumulations relatives de la biomasse affectées par chaque

traitement. La biomasse des racines a baissé au pH 2 lorsqu'aucun acide n'a été utilisé (Fig. 9). La biomasse de la plante totale n'a pas été significativement affectée par le traitement de H_2SO_4 , tandis que la biomasse des racines et de la plante a été augmentée lors des traitements entre un pH de 3 et un pH de 5 par rapport à l'augmentation observée au pH 6 lorsque HNO_3 a été appliqué. Les intervalles très larges d'erreur-type calculés pour les données du traitement de HNO_3 illustrent la grande variabilité de valeurs observées avec cet acide.

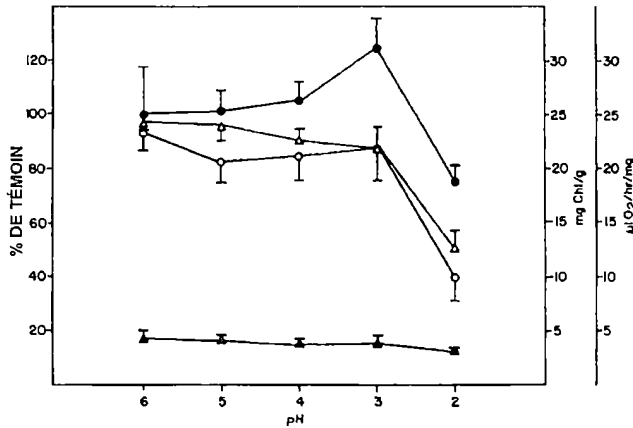


FIG. 7. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et les teneurs en Chl *versus* pH de solutions de traitement de H_2SO_4 . C_2H_4 hauteur de pic /mg LHb, ●—●; $\mu l O_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu l O_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, △—△. Chaque point représente la moyenne de 10 expériences de trois plantes à chaque pH. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

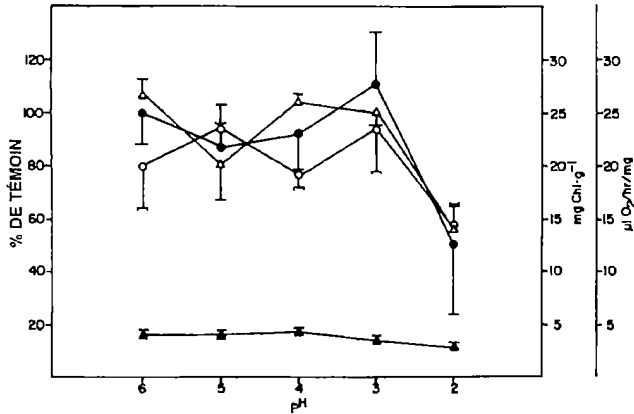


FIG. 8. La réduction d'acétylène, la photosynthèse, la respiration, et la teneur en Chl *versus* pH de solutions de traitement de HNO_3 . C_2H_4 hauteur de pic /mg LHb, ●—●; $\mu l O_2$ produit/h·mg, ○—○; $\mu l O_2$ consommé/h·mg, ▲—▲; mg Chl/g, △—△. Chaque point représente la moyenne de 10 expériences de trois plantes à chaque pH. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

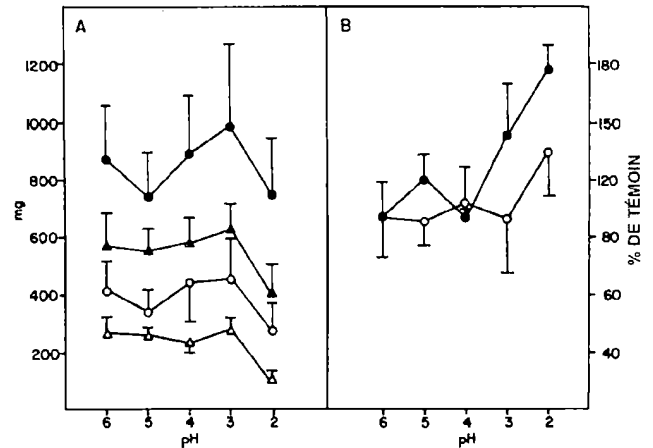


FIG. 9. Poids des pousses, poids des racines, et nodulation *versus* pH de solutions de traitement aux H_2SO_4 et HNO_3 . A, poids des pousses après le traitement au H_2SO_4 , ●—●; poids des racines après le traitement au H_2SO_4 , ○—○; poids des pousses après le traitement au HNO_3 , △—△; poids des racines après le traitement au HNO_3 , ▲—▲. B, nodules/g racine après le traitement au H_2SO_4 , ●—●; nodules/g racine après le traitement au HNO_3 , ○—○. Chaque point représente la moyenne de 10 expériences de trois plantes à chaque pH. Les barres indiquent les erreurs type des moyennes.

DISCUSSION

Les données montrent que les effets de composants polluants appliqués séparément varient considérablement. Le fluorure a peu ou pas d'effet sur aucun des paramètres mesurés. De façon similaire aux conclusions de Lagerwerff *et al* (18), Pb^{2+} a été relativement non toxique au système de luzerne. Les autres métaux lourds, Cd^{2+} , Cu^{2+} , et Zn^{2+} , ont montré des effets similaires de photosynthèse réduite, teneur en Chl, et réduction de $N_2[C_2H_2]$. L'effet toxique de très faibles concentrations (0,1 $\mu g/ml$) de Zn^{2+} a été surprenant dans la mesure où la tolérance des légumes à ce métal a été rapportée (27). La sensibilité à cet élément dans le système de fixation d'azote de la luzerne réside probablement dans les bactéroïdes, étant donné que les rhizobiums se sont avérés fortement sensibles aux faibles concentrations de Zn dans le milieu de croissance (14). Les effets de la pluie acide simulée étaient légèrement au-dessus du pH 2. L'effet inhibiteur accru de la « pluie » induite par HNO_3 est attendu en raison de l'inclusion supplémentaire de nitrate. À la lumière des travaux de Munns (23) et autres, l'effet de l'augmentation des ions H^+ sur la nodulation est surprenant. Il n'a pas été déterminé pourquoi cet effet a été observé ici.

Le site spécifique de l'activité inhibitrice ou stimulatrice est plus difficile à mesurer que les effets physiologiques obtenus. Néanmoins, plusieurs études ont été réalisées pour appuyer l'analyse des effets observés ici. Un effet probable des métaux étudiés ici est l'inactivation d'enzymes par la liaison à des groupes de sulfhydryle. Cela pourrait dénaturer le Nase même ou d'autres enzymes avec des groupes sulfhydryle au site actif.

Il a été prouvé que le cadmium inhibe l'oxydation et la photophosphorylation (3, 19) sur les jeunes plantes de graine de soja et com. Le cuivre et le zinc pourraient avoir des effets similaires. Les effets de Cd^{2+} sur le système de Nase de luzerne correspondent étroitement avec les travaux de Huang *et al* (15), qui montrent 71 % d'inhibition de l'activité de Nase après le traitement avec 18 μM Cd^{2+} (2 μg Cd^{2+}/ml). Hampp *et al* (9) ont également démontré une réduction dans le taux de fixation de CO_2 causé par le traitement avec Cd^{2+} . On considère généralement que le photosynthétat frais est nécessaire pour maintenir l'activité de Nase. À la lumière de ce qui précède, l'inhibition de la photosynthèse à 0,01 μg de Zn^{2+}/ml et 100 μg Pb^{2+}/ml sans réductions parallèles dans l'activité de Nase est

difficile à expliquer. Il est possible que les réserves de carbohydrates puissent être modifiées pendant une durée lorsque le traitement n'affecte pas directement le système de Nase. Potentiellement, le plomb a un effet sur la synthèse LHb similaire à l'interruption de la synthèse hémique chez les animaux (31). Le manque d'effet peut refléter sa faible disponibilité dans le nodule. Il n'a pas été déterminé pourquoi l'intégrité nodulaire a davantage été affectée par les solutions de H₂SO₄ au pH 3 que les solutions au pH 2.

Le taux photosynthétique, la respiration, et la teneur en Chl ont été utilisés dans l'évaluation de l'impact des polluants dans d'autres expériences de laboratoire et de terrain. Néanmoins, il semble que le système de réduction de N₂[C₂H₂] est beaucoup plus sensible au traitement des polluants par rapport à d'autres mesures. Ce processus a été à peu près égal en sensibilité à d'autres mesures lorsque Pb²⁺ a été appliqué, mais jusqu'à 1000 fois plus sensible que d'autres paramètres lorsque Zn²⁺ a été appliqué. Des dommages visuels sur les plantes après les événements polluants industriels est la technique d'évaluation la plus communément utilisée, mais il est clair que l'activité de réduction d'acétylène est souvent plus sensible aux attaques de polluants.

L'effet inhibiteur de ces ions sur la réduction d'acétylène a été Zn²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺ > AsO₃⁻ > Pb²⁺ > F⁻. Les limites de la qualité de l'eau fédérale pour l'arsenic (10 µg/ml), Cu²⁺ (5 µg/ml), et Zn²⁺ (10 µg/ml) pour l'application d'eau d'irrigation aux sols à texture fine (8) ne sont probablement pas assez basses pour empêcher la réduction de la fixation d'azote des légumineuses de culture, y compris avec les applications à court terme comprises dans les critères de qualité. Même le niveau le plus bas de 5 µg de Zn²⁺/ml pour l'application continue conduira probablement à une inhibition de l'activité de fixation.

L'une des tâches les plus importantes, mais aussi les plus difficiles, après les travaux de ce type est d'essayer de rapprocher les données aux conditions de terrain. Plus de travaux sur les effets des polluants combinés et de vraies expériences de terrain doivent être réalisés avant que toute corrélation fiable puisse être faite, mais des recherches de laboratoires servent de base pour diriger ces travaux supplémentaires. Un inconvénient des travaux de terrain sans travaux préliminaires en laboratoire est qu'il n'est pas possible de rattacher les effets observés aux polluants individuels. Les données observées ici indiquent que de sévères dommages à l'activité de fixation d'azote de la luzerne se seraient produits avant que les dommages visuels n'aient été observés. Même une surveillance minutieuse de la photosynthèse ou de la teneur en Chl du feuillage pourrait ne pas parvenir à détecter les dommages qui sont survenus en dessous du sol. Il est possible qu'une légère inhibition de l'activité de Nase sur une période en années pourrait faire baisser la capacité de fertilité et de production des systèmes naturels et agricoles affectés. L'importance de la contribution de l'azote fixé de la luzerne et autres légumes dans les habitats agricoles et naturels nécessite une attention particulière aux dommages à ce système.

Les dommages aux systèmes de fixation d'azote des légumes sont probablement survenus sur de vastes zones de ce pays. Les centrales alimentées au charbon, les raffineries de pétrole, les fonderies, et autres industries très polluantes sont de plus en plus souvent installées dans les zones agricoles et naturelles. Les éléments suivants ont été rapportés en excès en raison de l'activité industrielle : l'arsenic (2 000 µg/g) (29), Cu²⁺ (4 695 µg/g) (11), F⁻ (10 000 µg/g) (24), Pb²⁺ (2 000 µg/g) (5), et Zn²⁺ (135 000 µg/g) (5). Peu de données sont disponibles sur la disponibilité des plantes à ces éléments, mais jusqu'à 961 µg Cu²⁺/g ont été estimés comme disponibles aux plantes à proximité d'une fonderie de cuivre dans le Montana Centre-Sud par l'extraction d'acétate d'ammonium (11). Les pluies acides capables de générer les effets rapportés ici sont rares, mais Likens et Bormann (20) ont rapporté un événement de pH 2,1 dans le nord-est des États-Unis. De grandes surfaces peuvent

également être affectées par ces polluants en fonction du sens du vent et de la vitesse. Une étude d'une centrale alimentée au charbon dans le Michigan a montré un enrichissement des sols en métaux lourds 9,65 km au nord de la centrale (17), et il s'est avéré que les fonderies augmentent les concentrations de métaux sur une zone de 200 km² (2). Il s'est avéré que le transport des espèces acides affecte les zones sur 1000 km depuis le point de production (7). L'utilisation du système sensible de fixation d'azote pour évaluer les dommages de la pollution devrait être pleinement développée.

Remerciements— Nous remercions Sharon Rodrigue, Terry Long, et John Head qui ont participé à la réalisation d'une partie des expériences.

LITTÉRATURE CITÉE

1. BERGERSEN FJ, DJ GOODCHILD 1973 Cellular location and concentration of leghemoglobin in soybean root nodules. *Aust J Biol Sci* 26: 741-756
2. BERRY WL, A WALLACE 1974 Trace Elements in the Environment: Their Role and Potential Toxicity as Related to Fossil Fuels: A Preliminary Study. University of California Laboratory of Nuclear Medicine and Radiation Biology, Berkeley
3. BITTELL JE, DE KOEPE, RJ MILLER 1974 Sorption of heavy metal cations by corn mitochondria and the effects on electron and energy transfer reactions. *Physiol Plant* 30: 226-230
4. BURNS RC, RWF HARDY 1975 Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer-Verlag, New York
5. BUCHAUER MJ 1973 Contamination of soil and vegetation near a zinc smelter by zinc, cadmium, copper, and lead. *Environ Sci Technol* 7: 131-135
6. DILWORTH MJ, DC WILLIAMS 1967 Nucleic acid changes in bacteroids of *Rhizobium lupini* during nodule development. *J Gen Microbiol* 48: 31-36
7. ENGSTROM A 1971 Air pollution across national boundaries: the impact on the environment of sulfur in air and precipitation. Sweden's case study for the United Nations conference on the human environment. PA Norstedt and Sons, Stockholm
8. FEDERAL WATER POLLUTION CONTROL ADMINISTRATION 1968 Water Quality Criteria. Department of Interior, Washington, DC
9. Hampf R, K Beulich, H Ziegler 1976 Effect of Zn and Cd on photosynthetic CO₂-fixation and Hill activity of isolated spinach chloroplasts. *Z Pflanzenphysiol* 77: 336-344
10. HARDY RWF, RD HOLSTEN, EK JACKSON, RC BURNS 1968 The C₂H₂-C₂H₄ assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43: 1185-1207
11. HARTMAN LM 1975 Fungal flora of the soil as conditioned by varying concentrations of heavy metals. PhD thesis. Université du Montana, Missoula
12. HITCHCOCK AE, DC MCCUNE, LH WEINSTEIN, DC MACLEAN, JS JACOBSON, RH MANDL 1971 Effects of hydrogen fluoride on alfalfa and orchard grass: a summary of experiments from 1952 through 1965. *Contrib Boyce Thompson Inst* 24: 363-385
13. HOLDEN M 1965 Chlorophylls *In* TW Goodwin, ed, Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, New York, pp 461-488
14. HOLDING AJ, JF LOWE 1971 Some effects of activity and heavy metals in the *Rhizobium*-leguminous plant association. *In* TA Lie, EG Mulder, eds, Biological Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habitats. *Plant Soil Special vol*, pp 153-166
15. HUANG C-Y, FA BAZZAZ, LN VANDERHOEF 1974 The inhibition of soybean metabolism by Cd and Pb. *Plant Physiol* 54: 122-124
16. Karamanos RE, JR Battany, JWB Stewart 1976 The uptake of native and applied Pb by alfalfa and bromegrass from soil. *Can J Soil Sci* 56: 485-494
17. KLEIN DH, P RUSSELL 1972 Heavy metals: fallout around a power plant. *Environ Sci Technol* 7: 357-358
18. LAGERWERFF JV, WH ARMIGER, AW SPECHT 1973 Uptake of Pb by alfalfa and corn from soil and air. *Soil Sci* 115: 455-460
19. LEE KC, BA CUNNINGHAM, GM PAULSEN, GH LIANG, RB MOORE 1976 Effects of Cd on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiol Plant* 36: 4-6
20. LIKENS GE, F BORMANN 1974 Acid rain: a serious regional environmental problem. *Science* 184: 1176-1179
21. McNULTY IB, DW NEWMAN 1961 Mechanism(s) of fluoride induced chlorosis. *Plant Physiol* 36: 385-388

22. MOORE TC 1974 Research Experiences in Plant Physiology: A Laboratory Manual. Springer-Verlag, New York, pp 417-433
23. MUNNS DV 1969 Enzymatic breakdown of pectin and acid-inhibition of the infection of *Medicago* roots by *Rhizobium*. Plant Soil 30: 117-120
24. PETERS R 1972 Carbon-Fluorine Compounds. Associated Scientific Publishers, London
25. PORTER JR 1979 The effects of simulated atmospheric pollutants on nitrogen fixation in alfalfa. PhD thesis. Université du Montana, Missoula
26. PORTER JR, RP SHERIDAN 1979 The effects of simulated atmospheric pollutants on N₂ fixation in alfalfa (Abs). Plant Physiol 63: S-114
27. RASCIO N 1977 Metal accumulation by some plants growing on Zn-mine deposits. Oikos 29: 250-253
28. SHERIDAN RP 1979 Effects of airborne particulates on nitrogen fixation in legumes and algae. Phytopathology 69: 1011-1018
29. TEMPLE PJ, SN LINZON, BL CHAI 1977 Contamination of vegetation and soil by As emissions from secondary Pb smelters. Environ Pollut 12: 311-320
30. UMBREIT WW, RH BURRIS, JF STAUFFER 1964 Manometric Techniques, Ed 4. Burgess Publishing Co, Minneapolis
31. VALLEE BL, DD ULMER 1972 Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Annu Rev Biochem 41: 91-128
32. WOODMANSEE RG 1978 Additions and losses of nitrogen in grassland ecosystems. BioScience 28: 448-453
33. WOOLSON EA, JH AXLEY, PC KEARNEY 1971 The chemistry and phytotoxicity of As in soils. I. Contaminated field soils. Soil Sci Soc Am Proc 35: 938-943

Casablanca, le 24 décembre 2018

Commentaires sur l'objection soulevée dans l'opinion accompagnant le rapport de recherche,

Messieurs,

Concernant l'étape inventive revendication 1, le demandeur est respectueusement en désaccord avec cette opinion pour les raisons suivantes :

Le document D6 fait référence à un procédé pour la production de complexes chélatés de métaux polyvalents solubles dans l'eau avec des acides humiques directement sans utiliser d'acides hydrocarboxyliques individuels dans lequel le procédé comprend le mélange avec l'humate de métal alcalin, les sulfates de fer, le cuivre, la manganèse, le zinc et le cobalt, ainsi que l'acide borique et les sels d'acide molybdique, à un pH de 7,0-7,8, et dans lequel la quantité totale d'équivalents en milligramme de métaux ajoutée sous la forme de sulfate ne dépasse pas les 30 % de la capacité d'échange de la solution d'humate de métal alcalin.

Bien que le produit obtenu par ce procédé comprenne des ions de fer, de cobalt et de molybdène chélatés avec de l'acide humique, des ions de cuivre, de manganèse et de zinc chélatés avec de l'acide humique seront également obtenus.

Comme la présente demande fournit une composition fertilisante du type N, P, K, NP, NK, PK ou NPK qui comporte des ions métalliques de cobalt, de fer et de molybdène complexés avec des substances humiques, son objectif est d'améliorer la capacité de fixer biologiquement l'azote par les microorganismes de fixation d'azote présents dans les sols et d'augmenter l'absorption de l'azote sous la forme de dérivés d'ammonium, de nitrite et de nitrate par les plantes.

Il est connu de l'art antérieur, en particulier dans le cas du zinc et du cuivre, qu'un tel type de métaux lourds sont des inhibiteurs pour la fixation d'azote (voir par exemple "Inhibition of Nitrogen Fixation in Alfalfa by Arsenate, Heavy Metals, Fluoride, and Simulated Acid Rain" (Inhibition de la fixation d'azote dans la luzerne par l'arséniate, les métaux lourds, le fluorure, et la pluie d'acide stimulée), par John R. Porter et Richard P. Sheridan, Plant Physiol. (1981) 68, 143-148, une copie de ce document est annexée ; ou "Effects of cadmium, nickel, copper, and zinc on nitrogen fixation by soybeans" (Effets du cadmium, du nickel, du cuivre et du zinc sur la fixation d'azote par les graines de soja), Stephen J. Vesper, T. Craig Weidensaul, Vesper, S.J. & Craig Weidensaul, T. Water Air Soil Pollut (1978) 9: 413. <https://doi.org/10.1007/BF00213536>, <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00213536>, Abrégé : **« Les applications de cadmium et de Ni (1, 2,5, et 5 ppm), de Cu et de Zn (1, 5, et 10 ppm) ont**

inhibé la fixation de N₂ par les graines de soja dans la culture du sable. En général, le degré de toxicité était Cd > Ni > Cu > Zn. Le cadmium a fortement réduit le nombre de nodules, le poids sec et la fixation de N₂. Bien que la nodulation sur les plantes traitées par Ni était adéquate, la fixation de N₂ a été très faible. Le cuivre a réduit la nodulation, mais a directement inhibé la fixation de N₂ à seulement 5 et 10 ppm. Le zinc a réduit la nodulation, mais n'a inhibé que légèrement la fixation de N₂. De très faibles taux de léghémoglobine (LHb) ont été détectés dans les nodules traités par Cd- et Ni-, mais ceux traités par Cu- and Zn ont eu des niveaux de LHb beaucoup plus proches de ceux du témoin. L'ammoniac s'est accumulé dans la plupart des cas, en parallèle avec la baisse concomitante dans la fixation de N₂. L'ammoniac, un répresseur de synthèse de nitrogénase, peut être important dans la limitation de la fixation de N₂ dans les nodules de graines de soja lorsque les plantes se sont développées en présence de niveaux relativement élevés de métaux lourds. »). **Donc, l'utilisation de ces ions dans un engrais ne peut pas améliorer la fixation d'azote comme la présente invention le fait et ceci est démontré par la description (pages 7-8) et la figure 2.**

Par conséquent, **l'utilisation de la composition d'humate obtenue en suivant les instructions de D6 dans toute composition définie dans D1-D5 ne peut pas améliorer la capacité de fixation d'azote et/ou augmenter l'absorption d'azote, car il est bien connu que du moins une partie des ions métalliques utilisés dans D6 inhibe la fixation d'azote.**

Cordialement

Annexes :

Document : "Inhibition of Nitrogen Fixation in Alfalfa by Arsenate, Heavy Metals, Fluoride, and Simulated Acid Rain" (Inhibition de la fixation d'azote dans la luzerne par l'arséniate, les métaux lourds, le fluorure et la pluie d'acide stimulée), par John R. Porter et Richard P. Sheridan, Plant Physiol. (1981) 68, 143-148.

ATLAS INTELLECTUAL PROPERTY
SARL
20, Allée des Andromedes
France Ville - Casablanca



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

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 42860	Date de dépôt : 24/01/2017
	Date d'entrée en phase nationale : 03/07/2018
Déposant : FERTINAGRO BIOTECH, S.L.	Date de priorité: 17/02/2016
Intitulé de l'invention : COMPOSITION FERTILISANTE QUI COMPREND DES IONS COMPLEXÉS AVEC DES SUBSTANCES HUMIQUES POUR AMÉLIORER LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE PAR LES MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS DANS LE SOL.	
Classement de l'objet de la demande :	
CIB : C05D9/02, C05F11/02, C05G1/00	
CPC : C05D9/02, C05F11/02, C05G1/00	
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: BRINI Abdelaziz	 Date d'établissement du rapport : 05/04/2019
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 :
- 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)

D7 : John R.porter et al « Inhibition of Nitrogen Fixation in Alfalfa by Arsenate, Heavy Metals, Fluoride, and Simulated Acid Rain ». Plant Physiol. 1981 Jul; 68(1): 143-148.

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

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: EP1612200A2
D2: EP0284339B1
D3: US5213692A
D4: DE4105247A1
D5: US5354350A
D6: RU2237643C2

D7 : John R.porter et al « Inhibition of Nitrogen Fixation in Alfalfa by Arsenate, Heavy Metals, Fluoride, and Simulated Acid Rain ». Plant Physiol. 1981 Jul; 68(1): 143-148.

1. Nouveauté (N) :

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

2. Activité inventive (AI) :

Le document D6 qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit un engrais et une méthode de préparation dudit engrais complexe à base d'humine lorsque des humates de métaux alcalins sont mélangés avec du fer, du cuivre, du manganèse, du zinc, du sulfate de cobalt, de l'acide borique et d'un sel d'acide de molybdène. Le produit obtenu sera donc un engrais comprenant des ions fer, cobalt et molybdène chélatés avec de l'acide humique (voir abrégé).

L'objet de la revendication 1 diffère du document D6 en ce que ledit engrais comprend une composition fertilisante de type N, P, K, NP, NK, PK ou NPK.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme étant la fourniture d'une composition fertilisante pour améliorer la fixation biologique de l'azote par les micro-organismes.

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

Il est bien connu de l'art antérieur d'enrichir la composition fertilisante "conventionnelle" N, P et K par des ions métalliques de fer, de cobalt, et/ou de molybdène complexés avec des substances humiques comme décrit dans les documents D6, D3, ou bien D5. Egalement, il est connu du document D7 que le zinc et le cuivre sont considérés comme étant des inhibiteurs de la fixation de l'azote.

Partant du document D6 et D7, l'homme du métier ne pourrait pas prendre le document D6 comme enseignement de départ pour parvenir à la composition fertilisante de la présente demande puisque la composition fertilisante décrite dans D6 contient de cuivre et du zinc qui sont considérés par D7 comme étant des inhibiteurs de fixation de l'azote.

Par conséquent, aucun des documents susmentionnés ne divulgue ni suggère une composition fertilisante telle que décrite dans la présente demande pour améliorer la capacité de fixation biologique de l'azote par des micro-organismes.

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

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

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

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