

EVOLUTION DES ACIDES HUMIQUES SOU MIS A L'ACTIVITE D'UNE MICROFLORE BACTERIENNE HETEROTROPHE

R. BLONDEAU ⁽¹⁾

RÉSUMÉ

Des acides humiques extraits d'un humus de forêt (horizon A₁ — humus de type mull — extraction par le pyrophosphate de sodium) ont été utilisés comme seule source de carbone dans des expériences d'incubation en présence d'une microflore bactérienne mixte sélectionnée par culture d'adaptation. Après 90 à 100 jours d'incubation à 30°C, l'évolution de certains paramètres (acidité carboxylique, teneur en hydrates de carbone) montre que la composition des acides humiques s'est modifiée sous l'action des bactéries. Ces modifications sont plus prononcées lorsque les cultures aérobies ne sont pas soumises à une agitation, mais elles ne sont pas stimulées par l'incorporation d'une source annexe de carbone organique facilement métabolisable. Lorsque les incubations sont réalisées en anaérobiose (respiration nitrates), l'évolution obtenue est identique ou plus importante qu'en présence d'oxygène. Une anaérobiose continue ne permet cependant pas d'entretenir une activité bactérienne.

La proportion relativement faible des hydrates de carbone humiques utilisés comme source de carbone et l'absence de modifications apparentes dans la polydispersion des molécules (excepté lorsqu'elles ont subi un traitement de stérilisation par la chaleur) prouvent d'autre part que ces acides humiques sont particulièrement résistants à la biodégradation.

MOTS CLÉS : Humus - Acides humiques - Matières organiques du sol - Stabilité de l'humus - Turn over de l'humus.

KEY WORDS : Humus - Humic acids - Soil organic matter - Humus recalcitrance
Humus turn over.

INTRODUCTION

La fraction organique extractible du sol, représentée par les acides fulviques (solubles à pH acide) et les acides humiques (précipitables), est constituée par des composés organiques qui se sont édifîés à partir des produits de la décomposition des végétaux et de résidus d'excrétion d'origine diverse, grâce à l'activité de la méso- et microfaune, des microorganismes, et la présence d'un milieu favorable aux réactions catalytiques. Ces composés très polydispersés et souvent riches en structures aromatiques acquièrent progressivement une stabilité remarquable qui va de pair avec leur maturation. La complexité de ces phénomènes qui interviennent lors du processus de l'humification ou de la maturation a été rappelée récemment (JOCTEUR MONROZIER et DUCHAUFOR, 1986).

Cette résistance à la biodégradation peut être expliquée par des caractéristiques structurales : la présence d'éléments atypiques ou de liaisons atypiques d'origine non enzymatique dans leurs molécules, l'irrégularité des motifs constitutifs de leur architecture et la non reproductibilité des liaisons entre ces motifs, leur inaccessibilité

(1) Université des Sciences et Techniques de Lille. Laboratoire de Microbiologie, Bât. SN2, 59655 Villeneuve-d'Ascq.

aux enzymes extracellulaires. Elle peut aussi découler de certaines propriétés : leur association avec les substances minérales, leur capacité d'inactivation des enzymes. Cette biorésistance est vérifiée par les analyses de datations au moyen du carbone 14 qui indiquent des temps moyens de résidence de l'ordre de plusieurs siècles (TAMM et OSTLUND, 1960 ; PAUL et coll., 1964 ; MARTEL et PAUL, 1974 a ; JENKINSON et RAYNER, 1977 ; GUILLET, 1979), et dans certaines conditions, un environnement particulièrement protecteur peut même conduire à leur persistance pratiquement indéfinie.

Lorsque ces substances humiques se forment au niveau d'un horizon supérieur d'un sol normalement aéré, elles subissent comme toutes les substances organiques naturelles une évolution conduisant à leur minéralisation. Cette évolution est normalement très lente, mais dans les sols cultivés, l'équilibre dynamique entre le processus humificateur et le processus minéralisateur qui conditionnent l'existence et la stabilité du carbone humique est souvent rompu (MARTEL et PAUL, 1974 b ; DORMAAR, 1979 ; COOTE et RAMSEY, 1983 ; TIESSEN et STEWART, 1983 ; MANN, 1986). Comme la perte d'humus qui en découle s'opère à un rythme relativement rapide, elle suggère la mise en œuvre d'un processus d'altération de la résistance des molécules, ou d'un processus de minéralisation excessive de la part de la microflore tellurique.

Les recherches que nous menons actuellement en laboratoire sont destinées à essayer de comprendre les mécanismes qui peuvent conduire à une altération des molécules humiques, ou à essayer de déceler les circonstances qui favorisent leur biodégradation. Parmi celle-ci, l'activité de certains germes telluriques serait susceptible d'initier la minéralisation par une utilisation hétérotrophique du carbone des molécules (BURGES et LATTER, 1960 ; MATHUR et PAUL, 1966 ; MATHUR, 1969, 1970 ; DE BORGER, 1972 ; KHANDELWAL et GAUR, 1980), ou par l'intervention d'un processus plus ou moins proche du cométabolisme (BHARDWAJ et GAUR, 1971 ; KHANDELWAL et GAUR, 1980 ; MANGLER et TATE, 1982 ; BLONDEAU, 1987).

Par l'utilisation des techniques d'adaptation sur des milieux contenant des substances humiques, ou de perfusions de solutions d'acides humiques sur des colonnes de terres, nous n'avons jamais pu isoler de germes capables, en culture pure, d'utiliser les acides humiques comme seule source de carbone. Par contre, une certaine activité a été obtenue à partir de cultures bactériennes mixtes, c'est-à-dire des communautés bactériennes sélectionnées progressivement au cours des cultures d'adaptation sur substances humiques. Cette communication présente les résultats donnés par l'une de ces communautés hétérotrophes capable de croître en présence de carbone humique.

Compte tenu de l'état peu avancé des connaissances sur la structure très complexe de ces acides humiques et des difficultés d'obtention de composés humiques naturels marqués, les critères utilisables pour détecter et suivre les modifications biochimiques subies par les molécules sont peu nombreux. Outre les modifications susceptibles de faire varier la taille des molécules qui sont détectables au moyen de la chromatographie sur gels, il nous a semblé que deux autres critères pouvaient fournir des renseignements utiles : la teneur en hydrates de carbone qui représentent en principe l'une des fractions les plus facilement dégradables par les microorganismes, et la teneur en groupements carboxyliques qui apparaissent souvent en présence d'une certaine activité microbienne.

II - MATERIEL ET METHODES

A) Préparation des acides humiques

Les acides humiques utilisés pour la préparation des milieux proviennent de prélèvements opérés au niveau de l'horizon A₁ (8 à 10 premiers centimètres sous litière) d'un sol d'une forêt située au sud de Lille (Phalempin - végétation de chênes et bouleaux principalement). L'humus est de type mull et la roche mère est une

argile yprésienne. Après un séjour de plusieurs jours à la température du laboratoire, les échantillons sont séchés, broyés, et tamisés. La matière organique non humifiée est éliminée par séparation densimétrique avec le mélange alcool-bromoforme. L'extraction des substances humiques est réalisée sous azote avec une solution de pyrophosphate de sodium 0,1 M. Les acides humiques, obtenus par acidification à pH 1,0 de la solution récupérée après centrifugation à 12 000 g, sont purifiés par ultracentrifugation (100 000 g), dialyse (seuil de coupure : PM 1000), et traitement sur résine Amberlite IR 120 (forme H⁺). Après neutralisation avec la soude, ils sont lyophilisés. Le détail de ces techniques a déjà été mentionné (BLONDEAU, 1986). L'analyse élémentaire de cet acide humique donne (sans cendres) : C % = 52,2 ; H % = 5,1 ; N % = 3,4 (teneur en cendres : 7,3 %), et 36,6 % du carbone est aromatique d'après le spectre de RMN du carbone 13.

B) Isolement de la microflore bactérienne mixte

La communauté bactérienne utilisée pour les expériences d'incubation a été obtenue par adaptation de la microflore d'un échantillon de terre de jardin inoculé dans un milieu liquide (à raison de 1 g pour 100 ml) contenant ces acides humiques (0,5 g par l) et du glucose (0,1 g par l), placé en incubation à l'obscurité pendant plusieurs mois à 30°C. Après plusieurs transferts dans des milieux nouveaux contenant les acides humiques comme seule source de carbone, cette microflore portant la nomenclature « 16-3 » a conservé un pouvoir de prolifération supérieur à celui de beaucoup d'autres cultures obtenues par inoculation d'échantillons de terre d'origine variée, et sélectionnées selon le même protocole. Son activité a été entretenue par des inoculations répétées à intervalles de 3 à 4 semaines, dans un milieu stérile contenant des sels, des acides humiques (0,5 g par l) et du glucose (0,25 g par l). La composition saline est la suivante en mg par l : KH₂PO₄ : 400 ; K₂HPO₄.3H₂O : 2 200 ; NH₄NO₃ : 500 ; MgSO₄.7H₂O : 200 ; FeCl₃ : 15 ; MnSO₄.H₂O : 0,5 ; ZnSO₄.7H₂O : 1 ; CaCl₂.2H₂O : 0,5 ; CuSO₄.5H₂O : 1 ; KCl : 0,1 ; H₃BO₃ : 0,5 ; CoCl₂.6H₂O : 1 ; Na₂MoO₄.2H₂O : 1 (pH7). L'analyse microbiologique de cette communauté montre la prédominance de 5 bactéries qui totalisent plus de 95 % de la microflore totale (2 sont à Gram positif, 1 à Gram négatif et 2 à Gram apparemment variable).

C) Modalités de culture en présence des acides humiques

Les acides humiques employés pour les expériences d'incubation en présence de la culture mixte « 16-3 » sont stérilisés par autoclavage (110°C - 20 min.) ou par filtration (membrane 0,45 µ).

Ils sont incorporés dans la solution saline (composition finale identique à celle qui est indiquée ci-dessus) de façon à obtenir une concentration finale de 0,5 g par l (pH final 7,8). Lorsque le milieu est destiné à être incubé sous anaérobiose, il est enrichi en nitrates (NaNO₃) de façon à obtenir une concentration finale de 2 g par l.

Ces milieux répartis en fioles d'ermenmeyer sont inoculés avec une culture mixte « 16-3 » âgée de 8 à 12 jours (concentration finale de l'inoculum : 5 % V/V), et l'incubation s'effectue à l'obscurité à 30°C pendant une durée de 90 à 100 jours. Les milieux témoins sont inoculés avec la culture mixte préalablement autoclavée et sont incubés dans les mêmes conditions.

Les flacons prévus pour l'anaérobiose sont purgés avec de l'azote et bouchés hermétiquement. Certaines incubations ont été menées en présence d'une source complémentaire de carbone organique facilement métabolisable telle le glucose (concentration finale 1 g par l), ou en présence d'une agitation continue.

La croissance a été suivie dans certains cas, en effectuant une numération des bactéries sur gélose trypticase soja (Mérieux).

Après incubation, les solutions sont centrifugées, neutralisées et dialysées dans des tubes Spectra Por 6 (seuil de coupure : PM 1000). Les acides humiques sont récupérés pour analyse sous forme de poudre obtenue par lyophilisation.

D) Techniques d'analyses

La gamme de distribution des tailles des molécules est estimée par chromatographie des acides humiques sur colonne de Sephacryl S400 Superfine (Pharmacia) avec comme éluant le tampon Tris HCl pH 9 (force ionique 0,05). Le calibrage est obtenu en utilisant des protéines globulaires.

La teneur en sucres est déterminée par la méthode au phénol sulfurique LIU et coll. (1973) en utilisant pour chaque dosage d'acide humique une gamme de concentration comprise entre 0,2 et 1 mg. Une correction est ensuite apportée en fonction de l'absorbance propre de l'acide humique en milieu sulfurique.

Le dosage des groupements carboxyliques est effectué à partir de poudres décationisées selon la technique de SCHNITZER et GUPTA (1965) et l'acide benzène carboxylique est utilisé comme témoin interne. La présence des structures 1,2 dicarboxyliques est déterminée selon la méthode de ARAI et KUMADA (1983), en utilisant toujours une gamme de concentration pour chaque dosage d'acide humique. La courbe de calibration est obtenue avec l'acide phtalique.

III - RESULTATS

A) Evolution de la microflore au cours de l'incubation

Les numérations réalisées avec les milieux non agités contenant l'acide humique stérilisé par la chaleur montrent que les bactéries inoculées prolifèrent surtout pendant les 60 premiers jours de l'incubation, et en deux phases de croissance successives, avec un maximum vers 15 jours et un autre vers 60 jours (fig. 1). Après 90 jours, le nombre de bactéries viables est du même ordre ou légèrement inférieur au nombre de cellules inoculées au départ et c'est essentiellement pour cette raison que les expériences ne se prolongent pas au-delà de cette période.

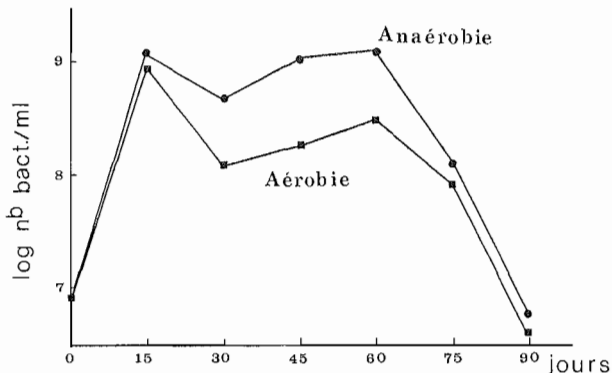


Figure 1 : Evolution de la population bactérienne au cours de l'incubation aérobie et anaérobie en présence des acides humiques stérilisés par la chaleur.

Evolution of bacterial population during aerobic and anaerobic incubation with humic acid treated by heat sterilization.

Si l'évolution de la population bactérienne est assez voisine dans les cultures incubées en aérobiose ou en anaérobiose, la deuxième phase de croissance bactérienne est cependant plus prononcée en conditions anaérobies. En comptabilisant séparément l'évolution des différentes bactéries de la communauté « 16-3 », il faut signaler en outre qu'au cours de cette phase, l'effectif de deux espèces bactériennes l'emporte sur les autres, et à l'état de souches pures, ces bactéries se révèlent être activatrices.

Cette potentialité dénitrificatrice de la microflore « 16-3 » peut être facilement vérifiée en la cultivant dans des milieux liquides répartis en tubes et placés sous anaérobiose au moyen de la paraffine : la formation de gaz n'est obtenue que si le milieu contient des nitrates (aucune activité en présence de sels d'ammonium).

A partir des cultures réalisées avec l'acide humique stérilisé par filtration, l'inoculation conduit à une prolifération bactérienne peu homogène qui se présente essentiellement sous forme d'aggrégats cellulaires brunâtres et difficilement dissociables. Dans de telles conditions, les résultats donnés par les numérations ne sont guère fiables.

B) Evolution de la polydispersion des molécules

En comparant la courbe de distribution des molécules obtenue par le passage sur Sephacryl S400 d'un échantillon d'acide humique issu d'une culture témoin avec celle d'un acide humique qui a été soumis à l'activité des bactéries, un déplacement de la polydispersion vers les molécules les plus petites est décelable, mais uniquement lorsque les échantillons ont subi pour leur stérilisation le traitement par autoclavage. Cette diminution de taille est surtout sensible lorsque les incubations sont réalisées sans agitation et sans incorporation de glucose. Dans le meilleur des cas (fig. 2), on a pu relever un glissement du poids moléculaire dominant de l'acide humique intact, qui est de l'ordre de 45 000 (en supposant une forme globulaire des molécules), à une valeur proche de 35 000.

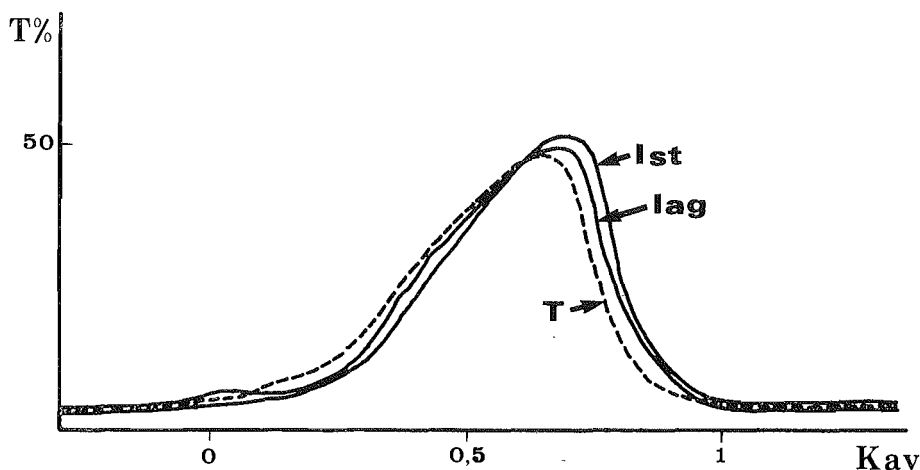


Figure 2 : Distribution des molécules obtenues sur gel Sephacryl S400 à partir d'un échantillon d'acides humiques stérilisés par la chaleur issu d'une culture stérile (T), ou inoculé avec « 16-3 » et incubé avec agitation (lag), ou sans agitation (Ist).

Molecular distribution achieved on Sephacryl S400 gel from humic acids sample treated by heat sterilization of a sterile culture (T), or a « 16-3 » inoculated culture incubated with shaking (lag), or without shaking (Ist).

Le Sephacryl S400, utilisé pour ces analyses, présente comme avantage la possibilité d'obtenir une distribution continue de l'ensemble des molécules de l'échantillon, sans effet d'exclusion (domaine de fractionnement : 20 000 — 8×10^6 pour les protéines globulaires). Corrélativement, les courbes de distribution perdent un peu de leur précision, particulièrement dans le domaine des petites molécules, et cet argument pouvait expliquer la similitude apparente des résultats donnés par les acides humiques filtrés. Des analyses de polydispersion ont alors été menées sur Sephacryl S200 dont la gamme de fractionnement correspond à des masses moléculaires plus petites (5 000 à 250 000), mais la comparaison des courbes issues de cette nouvelle analyse n'apporte aucune correction aux conclusions précédentes.

C) Evolution de la teneur en sucres et en groupements carboxyliques

Lorsque les acides humiques sont utilisés comme seule source de carbone dans les milieux, les dosages montrent toujours une diminution de la teneur en sucres (tableau 1). Cette diminution est un peu plus importante lorsque les cultures sont menées avec des acides humiques stérilisés par filtration, et dans ce cas, elle peut atteindre une valeur voisine de 15 %. Ces hydrates de carbone contenus dans la préparation d'acides humiques sont relativement labiles puisque 87 % sont récupérés dans l'hydrolysate après traitement avec l'acide trifluoroacétique 4N pendant 2 heures à 100°C sous azote. L'analyse qualitative permet en outre d'identifier la présence classique des 6 monosaccharides majeurs : arabinose, mannose, glucose, galactose, xylose et rhamnose.

L'acidité carboxylique, au contraire, augmente lorsque les acides humiques sont soumis à l'activité des bactéries, surtout lorsque l'incubation s'effectue en anaérobiose. Les structures 1,3 dicarboxyliques, qui représentent environ 40 % de l'acidité carboxylique totale, subissent par contre très peu de variations, sauf dans une expérience en anaérobiose, au cours de laquelle on a pu noter une accentuation très nette de leur concentration (tableau 1).

Tableau I : Teneur en hydrates de carbone et en groupements carboxyliques des acides humiques récupérés après différentes conditions d'incubation au cours de 3 expériences successives (la 1^{re} avec acides humiques stérilisés par la chaleur, les 2 autres : par filtration). Les résultats sont exprimés en poids sans cendres.

Carbohydrates and carboxyl content of humic acids recovered after various incubation methods during 3 experiments running. (the first with humic acid treated by heat sterilisation, the others by filtration). Results expressed by ash-free weight.

Conditions d'incubation	hydrates de carbone (μg eq. glucose/mg)	carboxyles totaux(a) (meq./g)	1,2 dicarboxyles (meq./g)
Exp. 1			
Témoin	52,5	5,1	2,10
Aérobiose	47,2	5,5	1,95
Anaérobiose	48,6	5,8	1,95
Exp. 2			
Témoin	58,4	5,0	2,12
Aérobiose	52,2	5,9	1,85
Anaérobiose	51,5	6,5	1,96
Exp. 3			
Témoin	56,2	5,0	2,23
Aérobiose	48,8	6,4	2,42
Anaérobiose	47,4	7,5	3,00

(a) 3 répétitions par échantillon (coefficient de variation : 4 %).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats prouvent qu'en présence de bactéries hétérotrophes, les acides humiques peuvent subir des modifications de leur composition ou de leur structure. L'évolution de deux paramètres a été plus particulièrement analysée : la diminution de leur teneur en hydrates de carbone et l'augmentation de leur acidité carboxylique. Cette évolution a été mise en évidence par des dosages chimiques, mais des analyses par spectroscopie de RMN du carbone 13 ont également permis de vérifier cette évolution, notamment pour les carbones carboxyliques. D'autres éléments de modifications de structure sont suggérés dans ces spectres mais l'exploitation rationnelle de cette technique, par ailleurs très séduisante étant donné la richesse en carbone des acides humiques, ne semble pas encore envisageable, compte tenu de l'altération trop superficielle subie par les molécules.

La teneur en hydrates de carbone a été prise en considération dans ce type d'expériences car ces sucres représentent au sein des acides humiques une fraction relativement labile, libérable pour la plupart par hydrolyse. Comme ils sont probablement situés dans les portions plus périphériques des macromolécules, tout au moins si on se réfère au modèle structural proposé par HAWORTH (1971), ils sont aussi plus facilement accessibles aux bactéries. Par une approche enzymatique, MAJUMDAR et RAO (1978) montrent également cette position périphérique des sucres fixés sur un « core » aromatique à propos des acides fulviques. OGNER (1980) a montré d'autre part que de tels acides humiques forestiers pouvaient contenir des sucres peu communs et des liaisons de nature très diverse.

Ces hydrates de carbone représentent néanmoins, avec les acides aminés ou protéines, les molécules les plus aptes à être métabolisées par les bactéries. Dans nos expériences, 10 à 15 % des sucres totaux sont utilisés, ce qui ne représente finalement qu'une fraction très minime des acides humiques : de l'ordre de 0,5 à 0,8 %. L'utilisation de ce carbone organique est probablement à l'origine de la première phase de multiplication des bactéries qui est mise en évidence par les numérations. Mais à propos de cette stimulation bactérienne, il faut aussi tenir compte des effets secondaires découlant des propriétés physiologiques des acides humiques lorsqu'ils sont en solution (VISSER, 1985 a).

L'augmentation de l'acidité carboxylique correspond à une évolution classique lorsque des substances organiques sont soumises à une activité microbienne aérobie et habituellement, les composés naturels possédant de nombreux carboxyles ou hydroxyles sont plus facilement minéralisables. Une évolution inverse, c'est-à-dire une réduction des groupes carboxyles a déjà été signalée à propos de l'attaque des acides humiques par des champignons (HURST, 1963) mais ces résultats n'ont pas été confirmés (PAUL et MATHUR, 1967). Les groupes carboxyles apparus au cours de l'incubation en présence de la microflore « 16-3 » sont probablement situés à la périphérie des molécules, mais ne semblent pas provenir de l'ouverture de cycles aromatiques, puisque de nouvelles structures 1,2 dicarboxyliques, à une exception près, n'apparaissent pas.

L'absence de variations dans les courbes de polydispersion relatives aux échantillons humiques non autoclavés prouve que l'architecture des molécules n'a guère été touchée. Si on admet que l'altération due aux bactéries n'a pas été sélective, nous avons vu que cette altération des molécules ne devrait représenter qu'une perte de poids minime, de l'ordre de 1 à 3 %, et une telle modification n'est guère détectable par la technique chromatographique employée. Avec les échantillons stérilisés par autoclavage, il est possible que l'architecture des molécules ait été légèrement modifiée par la chaleur, et que certaines liaisons, en devenant accessibles aux enzymes bactériennes, ont pu alors entraîner une modification plus nette de leur taille.

Lorsqu'une source de carbone organique annexe est incorporée pour favoriser le processus de « cométabolisme » (HORVATH, 1972), la microflore « 16-3 » ne semble pas agir plus efficacement sur les acides humiques. D'autres substrats que le glucose (glycérol, cellobiose, amidon, benzoate) ont également été expérimentés mais sans

succès. Dans des conditions expérimentales différentes et plus proches des conditions naturelles, mais avec des acides humiques de synthèse, MARTIN et HAIDER (1979) obtiennent un résultat identique.

Une autre action cette fois plus néfaste est constatée lorsque les cultures sont placées en agitation. Ce phénomène peut être expliqué par l'effet dispersif qui empêche la formation des agrégats cellulaires susceptibles de promouvoir l'activité des bactéries, mais aussi par un excès d'oxygène dans le milieu. La microflore « 16-3 » s'adapte d'ailleurs facilement lorsque le milieu devient déficient en oxygène libre, en utilisant comme accepteurs d'électrons les nitrates du milieu (= respiration nitrates).

L'activité des germes dénitrifiants en présence d'acides humiques en solution a déjà été signalée par VISSER (1985 b) et la nécessité de la présence de l'oxygène, dans nos expériences, s'explique par l'activité des bactéries strictement aérobies qui font partie du consortium « 16-3 ». Il faut cependant préciser que si le processus de la respiration nitrates n'a lieu, en principe, que sous pression partielle en oxygène très réduite, on a pu démontrer au cours d'expériences en laboratoire ou dans la nature que la présence d'oxygène ne constituait pas un obstacle (GARCIA, 1975), et même que sous forme de traces, cet oxygène pouvait stimuler la dégradation dénitrificatrice de composés organiques (OTTOW et FABIG, 1985 ; SLEAT et ROBINSON, 1984).

Ces transformations subies par les acides humiques sont en tout cas de nature oxydative puisque nous observons constamment une augmentation des groupes carboxyles, mais celles-ci peuvent tout aussi bien représenter un début de minéralisation des acides humiques qu'une étape finale de leur maturation. Nous avons préféré utiliser comme substrat pour les bactéries, des acides humiques extraits par le pyrophosphate dans le but de minimiser les altérations moléculaires, mais ce procédé conduit également à la libération des acides humiques les plus mobiles, et en principe les moins évolués. L'étude comparative de l'évolution de différents échantillons humiques d'origine diverse ou issus de procédés d'extraction variés devrait apporter des éléments de réponse à cette question. Un nouveau critère d'une analyse qualitative de l'humus pourrait en découler.

Reçu pour publication : novembre 1987

Accepté pour publication : janvier 1988

REMERCIEMENTS :

Ce travail a reçu une aide financière du Centre National de la Recherche Scientifique (PIREN - ATP Matières organiques dans les sols).

HUMIC ACID EVOLUTION IN PRESENCE OF HETEROTROPHIC BACTERIAL MICROFLORA

Humic acids of a forest humus (A₁ horizon — humous of mull type — sodium pyrophosphate extraction) were used as unique carbon supply in incubation experiments carried out with mixed bacterial microflora selected by adaptation cultures. After 90-100 days incubation period at 30°C, evolution of a number of chemical (carboxyl group analysis, carbohydrate-content) indicate a modification of humic acids composition under bacterial activity. These alterations were more marked in no shaken cultures but, they were not stimulated by addition of a readily available carbon supply. In anaerobic culture (nitrate respiration), the alteration rate was identical or more important than in presence of oxygen ; Nevertheless continuous anaerobic culture did not support bacterial activity (fig. 1).

The limited quantity of humic carbohydrates used as carbon supply and the absence of conspicuous modifications in molecular size distribution (except when they were treated by heat sterilization) prove elsewhere that these humic acids were exceptionally resistant to biodegradation (fig. 2).

BIBLIOGRAPHIE

- ARAI S., KUMADA K., 1983. — The determination of 1,2-dicraboxylylate structures in humic acid by fluorescein formation. *Geoderma*, 31, 151-162.
- BHARDWAJ K.K.R., GAUR A.C., 1971. — Isolation and characterization of some humic acid decomposing bacteria and fungi from soil. *Zbl. Bakteriologie Parasitenkunde Infekt. Krankh. Hyg.*, 126, 307-312.
- BLONDEAU R., 1986. — Comparison of soil humic and fulvic acids of similar molecular weight. *Org. Geochem.*, 9, 47-50.
- BLONDEAU R., 1987. — Generation of hydroxyl analogous radicals by *Arthrobacter* sp. *FEMS Microbiol. Lett.*, 41, 263-267.
- BURGES A., LATTE P., 1960. — Decomposition of humic acid by fungi. *Nature*, 186, 404-405.
- COOTE D.R., RAMSEY J.F., 1983. — Quantification of the effects of over 35 years of intensive cultivation on four soils. *Can. J. Soil Sci.*, 63, 1-14.
- DE BORGER R., 1972. — Le dégagement de CO₂ lors de la décomposition microbologique des acides fulviques. *C.R. Acad. Sc.*, 274, 2104-2107.
- DORMAAR J.F., 1979. — Organic matter characteristics of undisturbed and cultivated chernozemic and solonchic A horizons. *Can. J. Soil Sci.*, 59, 349-356.
- GARCIA J.L., 1975. — La dénitrification dans les sols. *Bull. Inst. Pasteur*, 73, 167-193.
- GUILLET B., 1979. — Etude du renouvellement des matières organiques des sols par les radioisotopes (¹⁴C). In : *Pédologie, Tome 2* (DUCHAUFOR Ph., SOUCHIER B., eds), Masson, Paris, pp. 210-226.
- HAWORTH R.D., 1971. — The chemical nature of humic acid. *Soil Sci.*, 111, 71-79.
- HORVATH R.S., 1972. — Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.*, 36, 146-155.
- HUC A.Y., DURAND B.M., 1977. — Occurrence and significance of humic acids in ancient sediments. *Fuel*, 56, 73-80.
- HURST H.M., 1963. — Aromatic acid-reducing systems in fungi. In : *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. (PRIDHAM J.B., ed.), PERGAMON PRESS, pp. 121-128.
- JENKINSON D.S., RAYNER J.H., 1977. — The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments. *Soil Sci.*, 123, 298-305.
- JOCTEUR MONROZIER L., DUCHAUFOR Ph., 1976. — Données récentes sur l'humification. *Science du Sol*, 25, 377-388.
- KHANDELWAL K.C., GAUR A.C., 1980. — Degradation of humic acids extracted from manure and soil by some streptomycetes and fungi. *Zbl. Bakteriologie Parasitenkunde Infekt. Krankh. Hyg.*, 135, 119-122.
- LIU D., WONG P.T.S., DUTKA B.J., 1973. — Determination of carbohydrates in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. *Water Res.*, 7, 741-746.
- MAJUMDAR S.K., RAO C.V.N., 1978. — Physico-chemical studies on enzyme-degraded fulvic acid. *J. Soil Sci.*, 29, 489-497.
- MANGLER J.E., TATE R.L., 1982. — Source and role of peroxidase in soil organic matter oxidation in Pahokee muck. *Soil Sci.*, 134, 226-232.
- MANN L.K., 1986. — Changes in soil carbon storage after cultivation. *Soil Sci.*, 142, 279-288.
- MARTEL Y.A., PAUL E.A., 1974 a. — The use of radiocarbon dating of organic matter in the study of soil genesis. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38, 501-506.
- MARTEL Y.A., PAUL E.A., 1974 b. — Effects of cultivation on the organic matter of grassland soils as determined by fractionation and radiocarbon dating. *Can. J. Soil Sci.*, 54, 419-526.
- MARTIN J.P., HAIDER K., 1979. — Biodegradation of ¹⁴C— labeled and cornstalk lignins, phenols, model phenolase humic polymers, and fungal melanins as influenced by a readily available carbon source and soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 283-389.
- MATHUR S.P., PAUL E.A., 1966. — A microbiological approach to the problem of soil humic acid structures. *Nature*, 212, 646-647.
- MATHUR S.P., 1969. — Microbial use of podzol Bh fulvic acids. *Can. J. Microbiol.*, 15, 677-680.
- MATHUR S.P., 1970. — Degradation of soil humus by the fairy ring mushroom. *Plant Soil*, 33, 717-720.

- OGNER G., 1980. — The complexity of forest soil carbohydrates as demonstrated by 27 different o-methyl monosaccharides, 10 previously unknown in nature. *Soil Sci.*, 129, 1-4.
- OTTOW J.C.G., FABIG W., 1985. — Influence of oxygen aeration on denitrification and redox level in different bacterial bath cultures. In : *Planetary Ecology* (CALDWELL D.E., BRIERLY J.A., BRIERLY C.L., eds), Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 427-440.
- PAUL E.A., CAMPBELL C.A., RENNIE D.A., Mc CALLUM K.J., 1964. — Investigation of the dynamic of soil humus utilizing carbon dating techniques. *Trans. 8th Int. Congr. Soil Sci.*, 3, 201-208.
- PAUL E.A., MATHUR S.P., 1967. — Cleavage oh humic acids by *Penicillium frequentans*. *Plant Soil*, 27, 297-299.
- SCHNITZER M., GUPTA U.C., 1965. — Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Amer. Proc.*, 29, 274-727.
- SLEAT R., ROBINSON J.P., 1984. — The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds. *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 381-384.
- TAMM C.O., OSTLUND H.G., 1960. — Radiocarbon dating of soil humus. *Nature*, 185, 706-707.
- TIESSEN H., STEWART J.W.B., 1983. — Particle-size fractions and their use in studies of soil organic matter : II. Cultivation effects on organic matter composition in size fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 509-514 .
- VISSER S.A., 1985 a. — Physiological action of humic substances on microbial cells. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 457-462.
- VISSER S.A., 1985 b. — Effect of humic acids numbers and activities of micro-organisms within physiological groups. *Org. Geochem.*, 8, 81-85.