

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Fernand JACQUIN

Maitre-assistant à la Faculté des Sciences

1^{re} THÈSE :

Contribution à l'étude des processus
de formation et d'évolution
de divers composés humiques

2^e THÈSE :

Proposition donnée par la Faculté

soutenues le Mai 1963 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. les Professeurs R. ECHEVIN, *Président*
F. MANGENOT
P. DUCHAUFOUR } *Examineurs*
R. GAY

UNIVERSITÉ DE NANCY . FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen : M. ROUBAULT

1^{er} Assesseur : M. AUBRY

2^e Assesseur : M. VEILLET

Doyens Honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE, URION

Professeurs Honoraires : MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, LAFFITTE, LERAY, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNÉ, DE MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE, GUÉRIN, CHEVALIER, WAHL.

Maîtres de Conférences Honoraires : MM. RAUX, LIENHART.

Professeurs :

| | | | |
|----------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| MM. | | MM. | |
| URION | Chimie biologique. | HILLY | Géologie. |
| DELSARTE | Analyse supérieur. | LE GOFF | Génie chimique. |
| ROUBAULT | Géologie. | CHAPON | Chimie biologique. |
| VEILLET | Biologie animale. | HEROLD | Chimie industrielle. |
| ECHEVIN | Botanique. | SCHWARTZ | Exploitation minière. |
| BARRIOL | Chimie théorique. | GAYET | Physiologie. |
| BIZETTE | Physique. | MANGENOT | Phytopathologie. |
| GUILLIEN | Electronique. | MALAPRADE | Chimie. |
| GIBERT | Chimie physique. | HADNI | Physique. |
| HERVÉ | Calcul dif. et intég. | DELAMARE DEBOUTTEVILLE | Zoologie. |
| LEGRAS | Mécanique rationnelle. | BONVALET | Mécanique physique. |
| DAVID | Chimie organique. | M ^{me} ROIZEN | Physique. |
| BOLFA | Minéralogie. | KERN | Minéralogie. |
| NICLAUSE | Chimie. | BASTICK | Chimie. |
| FAIVRE | Physique appliquée. | DUCHAUFOUR | Pédologie. |
| AUBRY | Chimie minérale. | NEEL | Chimie ind. organique. |
| DUVAL | Chimie. | GARNIER | Agronomie. |
| COPPENS | Radiogéologie. | WEPPE | Minéralogie appliquée. |
| FRUHLING | Physique. | BERNARD | Géologie appliquée. |
| SUHNER | Physique expérimentale. | | |

Maîtres de Conférences :

| MM. | | MM. | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| WERNER | Botanique. | GUDEFIN | Physique. |
| RÉGNIER | Physico-Chimie. | HORN | Physique. |
| CONDÉ | Zoologie. | CERF | Mathématiques générales. |
| GUSSE | Génie Chimique. | FRENTZ | Biologie animale. |
| CHAMPIER | Physique. | M ^{me} HERVÉ | Math. (propédeutique). |
| GAY | Chimie biologique. | AUROUZE | Géologie. |
| ROCCI | Géologie. | FELDEN | Physique M.P.C. (Epinal). |
| VUILLAUME | Psychophysiologie. | MARI | Chimie (I.S.I.N.). |
| PLAN | Mécanique physique. | LAFON | Physique (I.S.I.N.). |
| M ^{me} BASTICK | Chimie M.P.C. (Epinal). | N... | Physique théor. et nucl. |

Chargés d'Enseignement :

| MM. | | MM. | |
|--------|----------------------------|--------|---------------------|
| EYMARD | Math. (propédeutique). | DEVIOT | Physique du solide. |
| DANYSZ | Mécanique physique (ISIN). | DEPAIX | Mathématiques. |

Secrétaire Principal : M. CARON

AVANT - PROPOS

L'étude de la transformation des matières organiques végétales se situe dans un domaine particulièrement complexe où il était difficile de trouver des solutions valables sans les conseils avisés de Maîtres hautement qualifiés.

J'exprime ma gratitude au Président de ce Jury, M. le Professeur ECHEVIN, auquel je suis redevable de l'essentiel de ma formation pédagogique ; sa bienveillante compréhension m'a permis de concilier les exigences de la recherche et celles parfois si lourdes de l'enseignement.

Ma profonde et sincère reconnaissance ne sera jamais assez concrètement exprimée à l'égard de M. le Professeur MANGENOT. En suivant ses habiles suggestions, et avec tout l'appui de sa vaste culture, j'ai entrepris l'étude de la dégradation biologique de la lignine. Au cours de ces recherches, il m'a constamment suivi, me faisant bénéficier de sa rigueur scientifique et de son souci de la perfection.

M. le Professeur DUCHAUFOUR m'a orienté dans la voie si passionnante, bien que parfois ardue, de la recherche pédologique. Par son enthousiasme, il m'a communiqué le désir d'apprendre et la joie du travail ; son puissant esprit de synthèse a largement contribué à l'unification harmonieuse de l'ensemble de mes résultats. Qu'il veuille bien trouver dans ce mémoire le gage de mon entier dévouement.

Ensemble, MM. les Professeurs MANGENOT et DUCHAUFOUR ont bien voulu discuter du plan de mon mémoire, accepter mon texte et en corriger la présentation, couronnant ainsi une direction efficace et combien compétente de mes recherches. Qu'ils trouvent encore ici l'expression de tous mes remerciements

Ma profonde reconnaissance va aussi à M. le Professeur GAY ; il a su me faire profiter de ses conseils très éclairés tout en me dispensant sa chaude sympathie.

Je remercie également M. le Professeur URION de m'avoir accueilli dans ses laboratoires de Chimie biologique ; en effet, avec l'amicale, mais très haute compétence de M. METCHE, nous avons mis au point une partie difficile de l'étude chromatographique, à savoir le dosage quantitatif des acides-phénols.

Enfin, je n'aurai garde d'oublier mes Collègues et le Personnel de la Faculté, dont la serviable amabilité aida à la réalisation de cette thèse.

SOMMAIRE

Introduction

CHAPITRE PREMIER

Matériel

| | |
|--|----|
| I. — HUMUS NATURELS | 7 |
| A. — Choix | 7 |
| B. — Description des profils et caractérisation des humus .. | 7 |
| 1°) Podzol humo-ferrugineux à alios | 8 |
| 2°) Sol brun lessivé | 10 |
| 3°) Rendzine forestière | 13 |
| 4°) Chernozem | 16 |
| II. — SUBSTANCES VÉGÉTALES | 18 |
| A. — Choix | 18 |
| B. — Caractérisation | 18 |
| C. — Préparation du matériel | 19 |
| D. — Origine des inoculums | 19 |
| 1°) Mull forestier | 20 |
| 2°) Mull calcique | 20 |
| 3°) Humus brut d'un podzol humo-ferrugineux | 20 |
| 4°) Inoculum mixte n° 2 | 20 |
| 5°) <i>Trechispora</i> sp. | 20 |
| E. — Ensemencement | 21 |
| F. — Incubation | 21 |

CHAPITRE II

Etude physico-chimique : Protocole expérimental

| | |
|--|----|
| I. — ETUDE QUANTITATIVE | 23 |
| A. — Définition du terme « Substances humiques » | 23 |
| B. — Méthodes d'extraction | 24 |
| C. — Influence de la purification par précipitations successives sur quelques caractéristiques chimiques des extraits sodiques | 29 |
| 1°) Sur la fraction minérale | 29 |
| 2°) Sur le pouvoir réducteur par manganimétrie | 30 |
| 3°) Sur le rapport C/N | 31 |

| | |
|---|----|
| II. — DENSITÉ OPTIQUE ET FLOCCULATION | 33 |
| A. — Préparation des solutions de substances humiques | 33 |
| B. — Détermination du titre de ces solutions | 33 |
| C. — Etude de la densité optique | 34 |
| D. — Etude de la floculation par CaCl ₂ | 34 |
| III. — LIGNINE ET FRACTION NON HYDROLYSABLE | 34 |
| A. — Méthode de FOREST | 34 |
| B. — Méthode de SALO | 35 |

Etude physico-chimique : Résultats

| | |
|---|----|
| I. — ETUDE QUANTITATIVE DES COMPOSÉS HUMIQUES | 36 |
| A. — Humus naturels | 36 |
| B. — Produits de décomposition <i>in vitro</i> | 36 |
| 1°) Influence de la microflore | 36 |
| 2°) Influence de la dessiccation | 43 |
| II. — DENSITÉ OPTIQUE ET FLOCCULATION | 44 |
| A. — Humus naturels | 45 |
| B. — Produits de décomposition <i>in vitro</i> | 49 |
| 1°) Influence de la microflore | 50 |
| 2°) Influence d'un apport de carbonate de calcium et d'azote | 54 |
| C. — Discussion | 55 |
| III. — LIGNINE ET FRACTION NON HYDROLYSABLE | 56 |
| A. — Humus naturels | 56 |
| B. — Substances végétales | 57 |

CHAPITRE III

Etude électrophorétique des substances humiques : Protocole expérimental

| | |
|--|----|
| I. — DIFFÉRENCE DE POTENTIEL | 61 |
| II. — SOLUTION TAMPON | 62 |
| III. — PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'ACIDES HUMIQUES | 62 |
| IV. — MODE OPÉRATOIRE | 62 |

Résultats de l'étude électrophorétique des substances humiques

| | |
|--|----|
| I. — HUMUS NATURELS | 65 |
| A. — Données bibliographiques | 65 |
| B. — Résultats de nos recherches | 67 |
| C. — Discussion | 71 |

| | |
|---|----|
| II. — PRODUITS DE DÉCOMPOSITION « IN VITRO » | 72 |
| A. — Examen des électrophorégrammes en lumière visible .. | 73 |
| B. — Examen des électrophorégrammes en lumière de Wood | 74 |
| C. — Action des réactifs caractéristiques des composés phénoliques | 75 |
| III. — COMPARAISON ENTRE ACIDES HUMIQUES NATURELS ET PRODUITS DE DÉCOMPOSITION « IN VITRO » | 75 |

CHAPITRE IV

Etude chromatographique : Protocole expérimental

| | |
|---|----|
| I. — TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES | 77 |
| A. — Préparation des extraits | 77 |
| 1°) Extraits aqueux | 77 |
| 2°) Extraits humiques | 78 |
| B. — Purification des extraits | 78 |
| 1°) En vue de l'étude des acides aminés | 78 |
| 2°) En vue de l'étude des composés phénoliques | 79 |
| C. — Préparation des solutions de substances témoins | 79 |
| D. — Préparation et développement des chromatogrammes .. | 80 |
| E. — Identification des composés aminés ou phénoliques | 81 |
| II. — ETUDE DES ACIDES ET DES SUCRES AMINÉS | 82 |
| A. — Solvants | 82 |
| B. — Révélateurs | 83 |
| III. — ETUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES | 85 |
| A. — Solvants | 85 |
| B. — Révélateurs | 88 |
| C. — Dosage quantitatif | 92 |

Résultats de l'étude chromatographique des composés azotés

| | |
|---|-----|
| I. — IDENTIFICATION | 96 |
| A. — Acides aminés | 96 |
| B. — Sucres aminés | 98 |
| II. — ETUDE COMPARATIVE DES ACIDES AMINÉS PRÉSENTS DANS LES HYDROLYSATS DE SUBSTANCES HUMIQUES | 99 |
| A. — Acides humiques naturels | 99 |
| B. — Produits de décomposition <i>in vitro</i> | 101 |
| C. — Discussion | 102 |
| III. — EVOLUTION DES ACIDES AMINÉS SOLUBLES AU COURS DE LA DÉCOMPOSITION « IN VITRO » DES MATIÈRES ORGANIQUES | 102 |

| | |
|--|-----|
| A. — Résultats | 103 |
| 1°) Acides aminés présents dans les extraits de substrats non inoculés | 103 |
| 2°) Acides aminés présents dans les substrats après incubation | 105 |
| B. — Discussion | 106 |
| IV. — EVOLUTION DES ACIDES AMINÉS DANS LES SOLS | 107 |
| A. — Données bibliographiques | 107 |
| B. — Résumé de nos expériences | 108 |
| C. — Discussion | 108 |

Résultats de l'étude chromatographique des composés phénoliques

| | |
|---|-----|
| I. — IDENTIFICATION DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES SIMPLES | 110 |
| II. — ETUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PRÉSENTS DANS LES EXTRAITS AQUEUX DE VÉGÉTAUX FRAIS | 114 |
| A. — Résultats | 114 |
| B. — Discussion | 117 |
| III. — ETUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PRÉSENTS DANS LES EXTRAITS AQUEUX DE VÉGÉTAUX EN COURS DE DÉCOMPOSITION | 118 |
| A. — Résultats | 119 |
| 1°) Extraits aqueux non hydrolysés de sciure en cours de décomposition | 119 |
| 2°) Extraits aqueux hydrolysés de sciure en cours de décomposition | 119 |
| B. — Discussion | 119 |
| IV. — ETUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES LIBÉRÉS PAR HYDROLYSE DE SUBSTANCES HUMIQUES | 120 |
| A. — Acides humiques naturels | 120 |
| 1°) Résultats | 120 |
| 2°) Discussion | 124 |
| B. — Produits de décomposition <i>in vitro</i> | 124 |
| 1°) Influence de la nature du substrat | 124 |
| 2°) Influence de la nature de la microflore | 126 |
| C. — Comparaison entre acides humiques naturels et produits de décomposition <i>in vitro</i> | 129 |

Récapitulation et Conclusion

Bibliographie

INTRODUCTION

Les composés « humiques », notamment les « acides fulviques » et « humiques », peuvent être définis comme des substances de néoformation apparaissant au cours de la décomposition de la matière organique fraîche. Très longtemps, leur connaissance demeura très superficielle ; afin de les caractériser, on tenait compte davantage de leur solubilité que de leur composition ou de leur structure. Leurs propriétés restaient mal définies, sinon inconnues ; on se contentait de citer les acides « créniques » solubles dans l'eau, de parler « d'acides fulviques » solubles dans une liqueur alcaline et non précipitables par les acides ; les acides « humiques » se séparaient du même extrait par précipitation, enfin l'humine était considérée comme totalement insoluble.

Depuis une dizaine d'années environ, de nombreux chercheurs se sont penchés sur le problème de l'humus. Ils ont tenté de préciser la nature et les propriétés de ces composés, en utilisant les méthodes nouvelles mises à leur disposition par la science moderne. Après examen des résultats obtenus, nous constatons que ces derniers peuvent se grouper en trois rubriques principales :

- 1°) Extraction des composés humiques ;
- 2°) Fractionnement de ces composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques ;
- 3°) Etude de leur structure chimique.

Ce sont également ces trois points essentiels qui ont retenu notre attention, et à la solution desquels nous avons essayé d'apporter notre propre contribution. Notre travail présente à ce point de vue une double originalité reposant sur un système de comparaisons :

- 1°) Comparaison entre deux matériels d'étude différents : les humus des sols eux-mêmes et les produits obtenus *in vitro* par dégradation provoquée, de divers substrats végétaux ;
- 2°) Comparaison entre des méthodes d'études différentes : méthodes classiques utilisées depuis longtemps (floculation - densité

optique - pouvoir réducteur) et méthodes modernes mises en œuvre récemment (électrophorèse - chromatographie). Par le jeu de la comparaison des résultats, nous espérons aboutir à certaines conclusions relatives aux composés humiques et concernant principalement :

- a) leur structure et leurs propriétés physico-chimiques fondamentales,
- b) leur mode de formation à partir de la matière organique fraîche.

Un de nos objectifs principaux s'applique à rechercher l'origine des composés humiques. Les substances végétales se dégradent sous l'influence de la microflore du sol et nous observerons plusieurs modes d'action de cette dernière. Divers facteurs viennent modifier le déroulement de ces transformations et augmentent la complexité du problème, citons notamment : le microclimat et la nature géologique du sol ; aussi supprimons-nous l'influence de ces deux facteurs par une étude *in vitro*. D'autre part, cette dernière méthode d'investigation empêche un apport de matières organiques fraîches risquant de masquer partiellement les processus de dégradation et de synthèse.

Pour respecter au maximum les conditions naturelles, nous choisissons nos agents de décomposition dans différents humus actifs. Cependant, les nombreuses controverses sur le rôle de la lignine comme « matière première » des acides humiques, nous ont amené à adjoindre aux inoculums naturels, une souche pure d'un champignon lignivore : *Trechispora* sp., dont nous avons reconnu précédemment l'activité. On remarque d'ailleurs que des champignons, plus ou moins apparentés à notre souche, ont été isolés du sol ; le lecteur se reportera à ce sujet au travail de WARCUP et TALBOT (1962).

Avant d'exposer le détail de nos méthodes de recherche et de nos résultats, nous présentons un bref aperçu des connaissances récemment acquises et concernant les points fondamentaux énumérés ci-dessus.

BIBLIOGRAPHIE RECENTE RELATIVE AUX SUBSTANCES HUMIQUES

A) Méthodes d'extraction.

Actuellement, aucune technique de valeur universelle ne permet de séparer la matière organique fraîche présente dans les sols de la fraction humifiée. Certains auteurs, DAVIES et COULSON (1959)

prétendent réserver le terme d'acides humiques aux humus naturels. A l'opposé, RAUDNITZ (1957) réussit à isoler des substances qu'il qualifie d'acides humiques, à partir de feuilles de Rhododendrons. Par contre, si KONONOVA (1961) admet qu'un extrait aqueux de substance végétale peut contenir des composés dont la structure et les propriétés ressemblent à celles de certains acides humiques, elle indique néanmoins qu'il vaut mieux réserver la dénomination « acides humiques » à la fraction humifiée des sols.

Cette absence d'unanimité dans la définition entraîne obligatoirement une multiplication des méthodes d'extraction. SPRINGER (1952) dissout la matière organique fraîche par le bromure d'acétyle, le résidu étant constitué par les composés humiques. HENIN et TURC (1950), puis MONNIER et *al.* (1962) basent leur méthode de séparation sur les différences de densité entre la matière organique fraîche et l'humus lié à des particules minérales.

Par contre, les méthodes d'extraction par solubilisation de la fraction humique abondent et nous consacrerons une partie de ce travail à les comparer et à les étudier.

B) Fractionnement des composés humiques.

Quelle que soit la méthode d'extraction, les produits obtenus englobent toute une série de corps dont l'ensemble constitue la fraction essentielle de l'humus, à l'exception de l'humine, difficilement extraite du sol étant donnée son union intime avec l'argile. Une technique de fractionnement des composés humiques a été mise au point par TIURIN (1951). Récemment, des méthodes plus précises réussissent à scinder le groupe des acides humiques en plusieurs subdivisions, grâce à certaines de leurs propriétés caractéristiques. LARINA et KASSATOCHKIN (1957) envisagent une analyse aux rayons X. SCHNITZER et WRIGHT (1960 a et 1960 b) emploient les spectres infra-rouges pour comparer les différentes substances humiques. SCHEFFER et *al.* (1959 a), en recourant à l'ultracentrifugation, montrent la possibilité d'une sédimentation fractionnée. KONONOVA, BELCHIKOVA et NIKIFOROV (1958) subdivisent les acides humiques en trois groupes de substances, en se basant sur une méthode de chromatographie sur colonne. SCHOLZ (1959) applique le même procédé et fractionne en sept constituants un mélange d'acides humiques. SCHEFFER et *al.* (1959 b) mettent en parallèle les résultats enregistrés par examen des spectres I. R. ou U. V., avec le fractionnement opéré par passage sur colonne d'alumine.

Quant à la méthode d'investigation par chromatographie sur papier (KONONOVA et BELCHIKOVA, 1960), elle apporte un élément valable d'étude à condition d'être accompagnée par des analyses

chimiques afin de déterminer les teneurs en principaux éléments simples de chacune des fractions. Outre, ces méthodes de fractionnement des acides humiques, trois autres moyens d'investigation ont retenu notre attention et seront décrits ultérieurement ainsi que leurs applications : il s'agit de la détermination de la densité optique et du taux de floculation complétés par la séparation électrophorétique.

C) Constitution chimique des composés humiques.

Les travaux, en ce qui concerne la chimie de l'humus, ont été effectués par l'ensemble des chercheurs, suivant deux groupes de méthodes opposées : les méthodes « synthétiques » et les méthodes « analytiques ».

1°) MÉTHODES SYNTHÉTIQUES :

Elles consistent à essayer de polymériser des éléments simples présumés existants dans les acides humiques. Cette opération s'effectue soit sous l'effet d'agents physico-chimiques, soit sous l'action de différents micro-organismes.

a) Les méthodes physico-chimiques mises en œuvre par les chercheurs sont multiples, citons-en quelques-unes :

- FREYTAG (1961), par action brutale de H_2SO_4 sur du glucose, obtient toute une série de substances brunes dont le degré de polymérisation va croissant. HODGE (1953), puis KATO (1960) analysent le mécanisme de formation des produits de brunissement avec des amino-sucres comme matière première initiale ;
- CHAMINADE (1960), afin d'étudier l'action stimulante des humus, prépare des humus synthétiques actifs par oxydation de l'hydroquinone en milieu alcalin. STEIN et TENDELOO (1959) suggèrent que l'humification met en jeu des réactions d'oxydation semblables à celles du phloroglucinol en présence d'asparagine ;
- EVELYN et *al.* (1960) provoquent une condensation oxydative de tannins. L'étude du mode d'association des différents éléments constitutifs des acides humiques a été réalisée, entre autres, par FLAIG (1960), LYNCH et *al.* (1960), SCHEFFER et ULRICH (1960), MURPHY et MOORE (1960).

b) La production de substances humiques par voie biologique a donné lieu, ces dernières années, à de nombreuses recherches : KONONOVA et ALEXANDROVA (1959), par l'action de *Penicillium* sp.

et *Aspergillus niger*, obtiennent des substances aromatiques à partir d'un milieu nutritif à base de glucose et de nitrate de sodium ; ROMANKOVA et *al.* (1959) constatent que les complexes pseudo-humiques formés par des moisissures possèdent un rapport C/N variant sous l'influence du carbonate de calcium ou de l'azote ajouté à la source de carbone. L'activité de certains actinomycètes aboutit souvent à la formation de substances humiques (TEPPER et *al.*, 1960). D'après SORENSEN (1962), l'attaque de la lignine par diverses bactéries fournit des produits de dégradation susceptibles, en présence d'azote, de former des substances analogues aux acides humiques. HUGÉ (1960), par fermentation de la cellulose, successivement en milieu anaérobie, puis aérobie, obtient des produits similaires aux acides humiques. Dès 1952, MANGENOT entreprend une étude méthodique sur les champignons de certains bois en décomposition ; ensuite des recherches relatives au rôle joué par diverses souches lors de la synthèse des substances humiques permettent de tracer deux schémas différents de la transformation d'une même matière organique végétale (JACQUIN et MANGENOT, 1959 et 1960).

2°) MÉTHODES ANALYTIQUES :

Elles ont pour but de déterminer, soit l'importance de certains groupes fonctionnels (WRIGHT et SCHNITZER, 1959), soit de procéder à une dégradation plus ou moins complète de l'édifice moléculaire.

L'analyse élémentaire en tant que terme ultime de dissociation permet d'observer des variations dans les pourcentages respectifs des quatre éléments principaux (KONONOVA et BELCHIKOVA, 1960), (MURPHY et MOORE, 1960). Cependant, il est préférable de scinder les acides humiques en particules plus représentatives. Pour atteindre ce but, il existe toute une série de moyens, citons entre autres :

- la dégradation par combustion contrôlée à 400° [JOHNSTON (1961)] ;
- l'oxydation nitrique [SCHNITZER et WRIGHT (1960 a et 1960 b) - SCHEFFER et KICKUTH (1961)] ;
- la fusion alcaline [SCHARPENSEEL (1960) - STEELINK et *al.* (1960)].

Mais ces méthodes de dissociation ne peuvent fournir d'indications précises sur la nature des éléments structuraux ; en effet, ceux-ci subissent une dégradation trop importante.

Aussi, comme le préconisent COULSON et *al.* (1959 b), employons-nous des moyens moins énergiques, en l'occurrence une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N. Cette méthode a d'ailleurs été reprise par ALEXANDROVA (1960 c), COFFIN et DE LONG (1960), JAKAB, DUBACH et *al.* (1962).

CHAPITRE I

MATÉRIEL

I. — HUMUS NATURELS

A) Choix.

Le but de notre travail consiste à comparer certains produits obtenus par décomposition *in vitro* de matières organiques et des humus naturels. Les types de substances humiques étudiées doivent donc être variés, afin de renseigner le mieux possible sur les différentes voies de leur formation. De très nombreux travaux se sont attachés à comparer entre eux les humus naturels, mais la grande majorité des recherches porte sur les horizons humiques d'accumulation, alors que les humus très actifs, tel le mull acide, sont passés sous silence. Or, il semble utile de mettre en parallèle l'évolution d'une matière organique à minéralisation rapide avec la formation de substances humiques plus stables. En outre, sous les climats atlantiques, le premier type de matière organique se rencontre fréquemment. Les horizons choisis pour ces différentes raisons sont les suivants :

- A₀ et B₁ d'un podzol désignés par : (A₀), (B₁)
- A₁ d'un mull forestier désigné par : (M)
- A₁ d'une rendzine forestière désigné par : (R)
- A₁ d'un chernozem désigné par : (C)

B) Description des profils.

Il est indispensable de décrire brièvement les profils ayant fourni les échantillons des différents humus.

Les profils, très caractéristiques, et leur végétation, ont été étudiés au laboratoire de pédologie dirigé par Ph. DUCHAUFOUR, suivant les méthodes préconisées dans « tableaux descriptifs et analytiques des sols » du même auteur (1957).

1) PODZOL HUMO-FERRUGINEUX A ALIOS

a) *Emplacement* : Forêt communale de Taintrux, canton Grande Roche (près Nationale 420).

Roche-mère : Grès vosgien.

Situation : Altitude, 500 m ; pente, 25 % ; exposition, sud-est.

Formation végétale : Peuplement pur de Pin sylvestre (coupe à blanc).

Climat : montagnard inférieur, pluviosité environ 1 000 mm. Température moyenne, 8°.

b) *Profil* :

A₀ (0 - 10 cm) : Xéromor fibreux, brun noir, à feutrage dense de racines.

A₁ (10 - 20 cm) : horizon noir ; texture sableuse ; quartz transparent mélangé à des petites masses de matière organique.

A₂ (20 - 40 cm) : horizon cendreux, structure particulaire meuble, texture sableuse ; traînées grisâtres humifères, à taches blanchâtres circulaires ; plasticité nulle.

B₁ (40 - 45 cm) : horizon d'accumulation d'humus brun-noir, peu durci, structure pelliculaire (quartz enrobé d'humus).

B₂ (45 - 55 cm) : alios durci, rouille vif à taches plus claires, passant progressivement à la roche-mère sablonneuse rose.

C (en-dessous de 55 cm) : grès vosgien peu altéré de couleur rose.

Racines abondantes en A₀ - A₁ ; absentes en A₂. Un feutrage de radicelles s'étale sur l'alios, qui n'est pénétré en profondeur que par le « pivot » des Pins sylvestres.

c) *Analyse* : (% sol sec à l'air).

| Hori-zons | pH | Argile | Limon | L. f. | S. f. | S. gr. | Mat. org. | Fer libre |
|----------------|-----|--------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| A ₀ | 4,1 | | | | | | 21,8 | 0,17 |
| A ₂ | 4 | 2,5 | 5 | 11,9 | 20,9 | 57,3 | 1,8 | 0,13 |
| B ₁ | 4,4 | 5 | 4 | 7,2 | 17,5 | 55,1 | 8,2 | 0,65 |
| B ₂ | 5,3 | 4 | 2 | 6 | 20 | 59 | 6,2 | 1,83 |

| Horizons | Complexe absorbant m. val. p. 100 g | | | Mat. org. ‰ | | |
|----------------|--|-----|-------|-------------|------|------|
| | T (à pH 7) | S | S/T ‰ | C | N | C/N |
| A ₀ | 35 | 6,9 | 19,7 | 12,8 | 0,30 | 42,6 |
| A ₂ | 3,1 | 0,9 | 29 | 1,04 | 0,08 | 13 |
| B ₁ | 19,3 | 1,3 | 6,7 | 4,86 | 0,14 | 34,7 |
| B ₂ | 20,6 | 0,8 | 3,8 | 2,4 | 0,10 | 24 |

d) *Commentaire :*

- Sol sableux à profondeur limitée par la présence d'un alios durci : laxis de racines *très denses* en A₀, nulles en A₂, certaines racines fines à direction horizontale tapissent la partie supérieure de l'aliol. Quelques racines ligneuses pivotantes traversent complètement l'aliol pour se ramifier en B.
- Capacité d'échange élevée en A₀, presque nulle en A₂, moyenne en B. Taux de saturation en bases faible dans tous les horizons (sauf en A₂ en raison de la faible valeur de T).
- Lessivage accentué de l'argile et du fer (indice d'entraînement 14 pour le fer ; migration marquée de matière organique en B (acides fulviques libres et acides humiques bruns du groupe H₁).

Terme ultime de la dégradation du sol, sur versant chaud de grès vosgien, sous peuplement de Pin sylvestre dépourvu de sous-étage feuillu.

e) *Végétation :*

Coupe rase récente d'un peuplement pur de Pin sylvestre ; jeune plantation de Pin sylvestre et de Chêne rouge.

Relevé sommaire de la végétation du vieux peuplement :

Pinus sylvestris - *Abies alba*, disséminés - *Fagus sylvatica* rare et introduit - *Sorbus aria* - 5, *Sorbus aucuparia* - *Betula verrucosa* - *Rhamnus frangula* - *Calluna vulgaris*, 3-4 - *Molinia coerulea*, 3-4 - *Vaccinium myrtillus*, 3-4 - *Pteridium aquilinum*, 2-3.

f) *Caractère de l'humus :*

— *L'horizon A₀ est un xéromor.* — Il s'agit d'un mor fibreux formé d'éléments mal décomposés reliés par un feutrage mycélien. Les couches L (litière à structure organisée) et F (couche de fermentation) sont épaisses. La couche H humifiée comprend des complexes humiques et des produits intermédiaires.

Par extraction sodique, on obtient un mélange formé d'acides humiques désaturés (H⁺) et de substances provenant de la dégradation des végétaux (complexe humo-lignine ou ligno-protéine). Le pH de 4,1 conditionne la microflore où les bactéries et actinomycètes ne peuvent se développer.

— *L'horizon B*, sur une épaisseur de 5 cm, présente une accumulation d'humus colloïdal à structure pelliculaire. Il faut remarquer que la presque totalité de la matière organique est solubilisée par NaOH. Cet horizon humique accuse une saturation légèrement supérieure à la moyenne des podzols surtout en surface, à la suite d'une coupe récente ayant provoqué une minéralisation partielle de l'horizon A₀.

N. B. — Le fractionnement des acides humiques par la méthode TIURIN (1951) n'a pas été effectué sur l'horizon A₀, car cette méthode ne convient pas aux horizons trop exclusivement organiques ; l'analyse par cette méthode des horizons B d'un profil voisin du précédent, semblable, mais un peu moins humifère, a donné le résultat suivant :

Composés humiques (méthode Tiurin % sol sec à l'air)

| | F ₁ | F ₂ | H ₁ | H ₂ | H ₃ | Total |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| B ₁ | 2,8 | 0,4 | 1,5 | 0 | 0,3 | 5,0 |
| B ₂ | 1,7 | 1,0 | 0,6 | 0 | 0,3 | 3,6 |

2) SOL BRUN LESSIVÉ *

a) *Emplacement :* Forêt de Haye. Route forestière de Nanquette, canton de Reménaumont (Meurthe-et-Moselle).

* Sol n° 16. — Tableaux descriptifs et analytiques des sols (DUCHAUFOUR, 1957).

Roche-mère : Alluvions à cailloux roulés (mêlées à leur partie inférieure à la « Terra fusca »).

Situation : station sensiblement horizontale. Altitude 390 m.

Formation végétale : Hêtraie.

Climat lorrain : pluviosité environ 800 mm. Température moyenne : 9° 3 (Nancy).

b) *Profil* :

A₀ (0 - 1 cm) : litière de feuilles mortes en cours de décomposition.

A₁ (0 - 6 cm) : fins agrégats brun-noir, agglomérés en grumeaux irréguliers par le travail des lombrics.

A₂ (6 - 35 cm) : limoneux, ocre pâle, structure en fins agrégats à tendance nuciforme, présence de quelques cailloux roulés siliceux : racines abondantes jusqu'à partie supérieure de B ; très poreux, plasticité moyenne.

B (35 - 50 cm) : ocre vif, argileux, structure en polyèdres à angles vifs ; présence de cailloux roulés siliceux (peu nombreux) ; enrobements argileux, ocreux et brillants à la surface des unités structurales ; très plastique.

C (en-dessous de 50) : roche-mère argileuse, composée essentiellement de « Terra fusca » : peu de cailloux roulés ; structure à polyèdres de plus en plus gros passant peu à peu à une structure fondue.

c) *Analyse* (% de la terre fine sèche à l'air) :

| Horizons | pH | Argile | Limon | L. f. | S. f. | S. gr. | Mat. org. | Fer libre |
|----------------|-----|--------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| A ₁ | 5,4 | 15,2 | 35,0 | 27,6 | 8,0 | 4,0 | 7,9 | 1,64 |
| A ₂ | 5,5 | 19,2 | 38,3 | 25,9 | 8,2 | 5,1 | 1,8 | 2,00 |
| B | 5,6 | 40,5 | 25,5 | 20,3 | 5,2 | 4,1 | 0,7 | 3,46 |

| Hor. | Complexe absorbant m. val. p. 100 g | | | | | | Mat. org. ‰ | | |
|----------------|-------------------------------------|------|------|------|-------|---------------|-------------|------|------|
| | T à pH 7 | Ca | K | Mg | S | S/T à pH 7 | C | N | C/N |
| A ₁ | 15,6 | 8,50 | 0,72 | 1,12 | 10,34 | 66,2 | 4,67 | 0,26 | 17,9 |
| A ₂ | 6,8 | 1,23 | 0,16 | 0,20 | 1,59 | 23,3 | 1,07 | 0,07 | 15,2 |
| B | 14,6 | 4,87 | 0,41 | 1,75 | 7,03 | 48,1 | 0,43 | 0,05 | 8,6 |

d) *Commentaire :*

- Sol profond, limoneux en surface, argileux en profondeur ; noter l'abondance des sables fins et grossiers, relativement plus élevée que sur Terra fusca pure. L'horizon B retient une réserve d'eau en saison sèche, dans sa partie superficielle.
- Capacité d'échange assez faible, surtout en A₂. Complexe absorbant fortement désaturé en A₂, à saturation moyenne en A₁ et B, qui sont donc les horizons les plus riches.
- Lessivage marqué pour l'argile, le fer et les bases échangeables. Indice d'entraînement supérieur à 2 (fer B/fer A₂).

e) *Végétation :*

- STRATE ARBORESCENTE :
Fagus silvatica 5 - 5 ; *Quercus sessiliflora* 1 - 1.
- STRATE ARBUSTIVE :
Fagus silvatica 2 - 3 ; *Carpinus betulus* 1 - 1.
- STRATE HERBACÉE :
Caractéristiques du Mull.
Milium effusum 1 - 2.
Poa chaixii 3 - 5.
Melica uniflora.
Asperula odorata.
Anemone nemorosa 1 - 2.
Carex silvatica.
Hedera helix.
Lamium galeobdolon 1 - 1.
- ACIDIPHILES ET DIVERS :
Luzula albida 1 - 1.

Deschampsia coespitosa.
Atrichum undulatum.
Rubus fruticosus.

f) *Caractère de l'humus* : Mull forestier mésotrophe.

— L'horizon A₁ présente une structure grumeleuse caractéristique ; il est constitué d'agrégats argilo-humiques. Les éléments humiques sont partiellement saturés en calcium (humus Ca⁺⁺). Le faible rapport C/N allié à une microflore active provoque une minéralisation intense de la matière organique et des composés humiques. Conséquence de ce cycle biologique très rapide : le taux de saturation se maintient aux environs de 65 %, malgré un pH de 5,4.

Composés humiques (méthode Tiurin, % sol sec à l'air)

| | F ₁ | F ₂ | H ₁ | H ₂ | H ₃ | Total |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| A ₁ | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 0 | 0,5 | 4,3 |
| B | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0 | 0,1 | 0,6 |

3) RENDZINE FORESTIÈRE *

a) *Emplacement* : Forêt de Haye - Fonds de Monvaux. Route de Toul à Maron, N. 409 (Meurthe-et-Moselle).

Roche-mère : éboulis de calcaire bajocien.

Situation : pente 30 %, exposée au sud. Altitude : 244 m.

Formation végétale : Chênaie claire à « fruticée calcicole » (Chêne rouvre, couvert 10 %).

Climat lorrain : pluviosité environ 800 mm. Température moyenne : 9° 3 (Nancy).

b) *Profil* :

A₁ (0 - 20 cm) : horizon très humifère, à structure grumeleuse ; très nombreux cailloux calcaires 0,5 à 2 cm (60 % environ), en mélange avec grumeaux noirs irréguliers de 0,1 à 0,5

* Sol n° 8. — Tableaux descriptifs et analytiques des sols (DUCHAUFOR, 1957).

cm ; feutrage dense de racines ; très poreux ; faible cohésion ; plasticité moyenne.

A₁C (20 - 40 cm) : cailloux plus nombreux ; grumeaux plus riches en argile, moins humifères, brun foncé ; racines abondantes jusqu'à 30 cm ; très poreux, peu plastique.

C (en-dessous de 40) : passage progressif à la roche-mère, les cailloux devenant plus gros et plus abondants. Mélange d'éboulis et de « grouine » (petits éléments calcaires).

N. B. — Certaines racines à direction verticale pénètrent profondément dans la roche-mère meuble.

c) *Analyse* (% de la terre fine sèche à l'air).

| Hor. | pH | Arg. | Lim. | L. f. | Sabl. fins | Sabl. gr. | Mat. org. | CO ₃ Ca |
|------------------|-----|------|------|-------|------------|-----------|-----------|--------------------|
| A ₁ | 7,5 | 22,0 | 18 | 12,3 | 9,0 | 20,2 | 13,7 | 33,6 |
| A ₁ C | 7,8 | 18,5 | 13 | 16,3 | 11,6 | 31,3 | 6,3 | 45,2 |

| Hor. | Complexe absorbant m. val. p. 100 g | | | CO ₃ Ca actif | Mat. org. % | | | Fer libre |
|------------------|--|------|------|-----------------------------|-------------|------|------|--------------|
| | T à pH 7 | K | Mg | | C | N | C/N | |
| A ₁ | 37,5 | 0,44 | 2,45 | 4,8 | 8,09 | 0,70 | 11,5 | 1,53 |
| A ₁ C | 21,2 | 0,29 | 1,70 | 9,2 | 3,75 | 0,39 | 9,6 | 1,55 |

d) *Commentaire* :

- Grande importance du « squelette », minorité de terre fine.
- Terre fine à texture franche, structure grenue liée à l'abondance de la matière organique : 14 % en surface, 6 % en profondeur.
- Abondance du carbonate de chaux ; dont une notable proportion est « actif ».

- Capacité d'échange élevée, au moins le double de celle d'un sol brun forestier. Complexe absorbant saturé en calcium et magnésium.
- Aucun lessivage du fer et de l'argile.

Sol peu profond, sec en raison de l'exposition, présentant des défauts chimiques. Mais ces défauts sont, en grande partie, corrigés par deux facteurs favorables :

1°) La roche-mère est un éboulis, meuble et profond, dans lequel les racines des arbres peuvent pénétrer profondément.

2°) La grande abondance de la matière organique corrige l'influence nocive de l'excès de carbonate. Le pH est de 7,5, au lieu de 8 - 8,5 dans les rendzines moins humifères.

Ce sol doit sa stabilité aux caractères particuliers de la station (éboulis et dépôts meubles de pente); en station horizontale, il évolue normalement, sous l'influence de la forêt, vers la rendzine brunifiée.

e) *Végétation* :

— STRATE ARBUSTIVE (couvert 50 %) :

Caract. du Mull calcique.

Fraxinus excelsior.

Acer campestre.

Cornus sanguinea 2 - 3.

Viburnum lantana 2 - 3.

Viburnum opulus.

Divers

Carpinus betulus 3 - 3.

Corylus avellana 3 - 3.

Sorbus aria.

Acer platanoides.

Acer pseudoplatanus.

— STRATE HERBACÉE :

Xéro-calciphiles.

Brachypodium pinnatum 3-3.

Koeleria cristata.

Trifolium medium 1 - 2.

Origanum vulgare 1 - 2.

Teucrium chamaedrys.

Campanula rotundifolia.

Epipactis latifolia.

Euphorbia cyparissias 1 - 2.

Caract. du Mull calcique.

Melica nutans.

Carex glauca.

Laserpitium latifolium.

Viola mirabilis.

Divers

Genista pilosa 1 - 3.

f) *Caractère de l'humus* : Mull calcaire de rendzine.

— L'horizon A₁ réparti sur 20 cm contient une importante quantité d'acides humiques. La moitié environ correspondrait aux

acides humiques gris de Tiurin (H₂ — H₃), lesquels peuvent être associés aux argiles de deux façons :

a) par l'intermédiaire du calcium (humate Ca⁺⁺), solubles dans un extrait sodique seulement après une décalcification préalable.

b) par l'intermédiaire de sesquioxydes de Fe ou Al (humate Fe⁺⁺⁺ ou Al⁺⁺⁺) solubles seulement après extraction des sesquioxydes libres ou même après attaque partielle des molécules d'argiles par H₂SO₄ à chaud.

Si la décomposition de la matière organique est active, les acides humiques sont très résistants à la minéralisation.

Composés humiques (méthode Tiurin, ‰ du sol sec à l'air)

| | F ₁ | F ₂ | H ₁ | H ₂ | H ₃ | Total |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| A ₁ | 1,3 | 1,2 | 0,6 | 1,3 | 0,4 | 4,8 |
| A ₁ C ... | 1,1 | 0,4 | 0,3 | 0,8 | 0,5 | 3,1 |

4) CHERNOZEM *

a) *Emplacement* : Belgorod, Ukraine.

Roche-mère : loess.

Formation végétale : horizon supérieur de terre labourée (rideau-abri).

Climat : steppique, assez humide, pluviosité 522 mm. Température moyenne 6° 6 (Min. abs. : — 35°).

b) *Profil* :

A₁ : noir, humifère, structure motteuse, modifiée en surface par rapport à la structure initiale, sous l'influence de la culture ; en profondeur, passage progressif à une structure plus aérée, en gros grumeaux.

A/C : progressivement moins humifère, plus brun, plus compact ; traînées blanchâtres de « pseudomycélium » calcaire.

C : loess.

* Sol n° 5. — Tableaux descriptifs et analytiques des sols (DUCHAUFOR, 1957)

c) Analyse (% de la terre fine sèche à l'air).

| Hor | pH | Arg. | Lim. | L. f. | Sabl. fins | Sabl. gr. | Mat. org. | Fer libre |
|----------------|-----|------|------|-------|------------|-----------|-----------|-----------|
| A ₁ | 6,5 | 30,5 | 28 | 14,9 | 11,2 | 5,9 | 5 | 0,60 |

| Hor. | Complexe absorbant m. val. p. 100 g | | | | | | Mat. org. % | | |
|----------------|-------------------------------------|------|-----|-----|------|------------|-------------|------|------|
| | T à pH 7 | Ca | K | Mg | S | S/T à pH 7 | C | N | C/N |
| A ₁ | 33,7 | 27,5 | 0,5 | 3,7 | 31,7 | 94 | 2,89 | 0,25 | 11,5 |

d) *Commentaire* :

- Texture argilo-limoneuse ; structure motteuse, assez compacte, modifiée défavorablement par la culture, par rapport à la structure du sol de la steppe initiale.
- Matière organique assez abondante (5 %), bien humifiée, très légèrement acide ; rapport C/N bas, indiquant une bonne activité biologique.
- Capacité d'échange élevée, pratiquement saturée en bases, notamment en Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺, malgré une décarbonatation complète du profil.
- La quantité de fer, relativement faible, indique une altération peu poussée.

e) *Caractère de l'humus* : Mull calcique de steppe.

— L'horizon A₁ se présente sous forme de grumeaux gris noir de la grosseur d'un grain de blé résultant de la floculation d'humus calcique avec la matière minérale. Malgré un pH de 6,5, le taux de saturation atteint 94 % en raison de la haute teneur en cendres des débris biologiques. Le C/N descend à 11, l'humification très intense donne des composés très polymérisés formés exclusivement d'acides humiques gris résistant à la minéralisation. Par contraste, on rencontre une très faible quantité d'acides fulviques libres (F₁).

Composés humiques (méthode Tiurin, % sol sec à l'air)

| | F ₁ | F ₂ | H ₁ | H ₂ | H ₃ | Total |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| A ₁ | 0,3 | 0,6 | 0,4 | 1,7 | 0,3 | 3,3 |

II. - SUBSTANCES VEGETALES

A) Choix.

Le choix des végétaux s'est porté volontairement sur trois substrats susceptibles d'être utilisés comme amendements organiques.

- Paille de *Triticum sativum*.
- Partie aérienne de *Trifolium pratense* prélevée à l'époque de la maturation des graines.
- Sciure de *Fagus silvatica*.

Ces trois échantillons proviennent d'une même région naturelle : « La Haye » située sur calcaire Bajocien plus ou moins mélangé de « Terra fusca ».

B) Caractérisation.

Les valeurs du rapport C/N servent de base à la caractérisation des substrats.

1°) Le carbone organique est dosé suivant la méthode ANNE (1945) modifiée par ANSTETT (1950). Cependant, il nous a semblé préférable de laisser macérer les substances végétales au contact du mélange sulfochromique pendant douze heures à la température du laboratoire avant de porter à ébullition ; en opérant de cette manière, les résultats obtenus sont plus constants. BREMNER et JENKISON (1960) constatent une oxydation incomplète de la matière organique par le bichromate de potassium.

2°) Pour le dosage de l'azote total, on préfère la méthode KJELDAHL. En effet, il a été montré (JACQUIN et PAYEN, 1961) que la méthode ANSTETT (1956) donne des résultats parfois inférieurs à la réalité. Le tableau n° 1 résume les résultats.

TABLEAU 1
Valeurs des rapports C/N des trois substrats

| | C en % | N en % | C/N |
|--------------|--------|--------|-------|
| Trèfle | 41,76 | 3,65 | 11,4 |
| Paille | 44,54 | 0,45 | 98,9 |
| Sciure | 45,90 | 0,12 | 382,5 |

— Les résultats obtenus peuvent être comparés à ceux indiqués par BREMNER et JENKISON (1960), pour un échantillon semblable, en l'occurrence la paille de Blé.

C) Préparation du matériel.

Les végétaux subissent, après dessiccation, un broyage au mixer permettant de réaliser un milieu plus homogène. Après détermination de l'humidité, le matériel est réparti dans des boîtes de Roux ou des fioles d'Erlenmeyer à raison de 8 g. pour une fiole de 6 cm 5 de diamètre, de façon à obtenir une couche peu épaisse de produit, assurant une aération satisfaisante.

— Pour la microflore de rendzine et l'inoculum n° 2, on mélange intimement au végétal 5 % de carbonate de calcium.

— Après remplissage, les fioles bouchées au coton, sont stérilisées successivement deux fois à 125° pendant 30 minutes.

— Nous ajoutons ensuite aseptiquement et d'une façon proportionnelle, sur la base de 20 ml pour 8 g. de matériel, la solution suivante préalablement stérilisée.

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Phosphate monopotassique | 0,5 gramme |
| Phosphate disodique | 0,5 gramme |
| Sulfate de magnésium | 0,5 gramme |
| Chlorure de potassium | 0,5 gramme |
| H ₂ O (q. s. p.) | 1 litre |

Il est reconnu que le rapport C/N joue un rôle essentiel sur la rapidité de la minéralisation des débris végétaux (DUCHAUFOR et MANGENOT, 1957).

Les valeurs de ce rapport pour nos trois substrats étant très différentes, nous ajoutons, à la solution précédente dans le cas de la paille et de la sciure, 6-g/litre de peptone de caséine. Après cette addition supplémentaire d'azote, les valeurs du C/N correspondent à 11,4 pour le Trèfle, 65,9 pour la paille et 133 pour la sciure.

D) Origine des inoculums.

On utilise, d'une part, des inoculums prélevés directement dans la nature à partir d'horizons microbiologiquement actifs, d'autre part, des cultures pures ou mixtes. Chaque inoculum d'humus résulte du mélange de trois prélèvements recueillis dans des boîtes de Pétri stériles.

1°) MULL FORESTIER.

L'échantillon utilisé correspond à un mélange des horizons A₀ et A₁ du mull forestier décrit précédemment.

2°) MULL CALCIQUE d'une rendzine agricole.

En lisière de la Forêt de Haye, trois échantillons sont prélevés dans une parcelle cultivée en betteraves. Au point de vue pédologique, le classement de l'horizon superficiel soumis aux travaux aratoires s'avère difficile ; cependant, des analyses physico-chimiques nous ont permis de le rattacher au type rendzine agricole. Il s'agit d'un sol argilo-calcaire à forte proportion de carbonate de calcium. Le calcaire actif déterminé par la méthode DROUINEAU (1943) correspond à 2,65 %, ce qui entraîne un pH très élevé 7,6 et un complexe absorbant saturé. Le C/N de 8,75 indique un sol riche en azote.

3°) HUMUS BRUT du podzol humo-ferrugineux décrit précédemment.

4°) L'INOCULUM MIXTE n° 2, décrit par MANGENOT (JACQUIN, MANGENOT, 1959), provient d'une culture massive. Celle-ci avait été obtenue en ensemençant à l'aide de copeaux très altérés, un mélange stérile et humidifié de 100 g de sciure fine (tamis 90) et 5 g de CaCO₃. Au moment de son utilisation comme inoculum, le milieu est recouvert d'une croûte noire compacte, épaisse d'environ 3 mm et peuplée de nombreux collemboles. Des fragments de cette couche ont été broyés aseptiquement dans l'eau et la suspension homogène ainsi obtenue a servi, d'une part, à ensemencher nos fioles ; d'autre part, à une analyse microbiologique. La recherche des fixateurs d'azote atmosphérique sur milieu liquide électif montre l'absence d'*Azotobacter*, la présence de *Clostridium*, groupe acéto-butyrique. Par dilution sur plaques de gélose au Maltéa, on a obtenu de très nombreuses colonies bactériennes et des champignons : *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Graphium* sp, en grand nombre et, d'autre part, *Gliomastix convoluta* (Harz) Mason, *Mucor* sp, « *Stemphylium* » sp, et divers mycéliums stériles hyalins.

5°) *Trechispora* sp. a été isolé par F. MANGENOT de copeaux entreposés sur un sol calcaire depuis sept - huit ans. Au moment de leur analyse, la région où cette espèce se développait, présentait un pH de 4,2 et une teneur de 1,89 % d'acides humiques et 4,18 % d'acides fulviques. La souche obtenue provoque une pourriture blanche caractéristique très active. Elle fournit un test tyrosinase positif et laccase faiblement positif. Des essais préliminaires nous montrent qu'elle se développe vigoureusement sur les milieux acides.

Ultérieurement, nous désignerons les inoculums par les abréviations suivantes :

| | |
|------------------------------|----------------|
| Podzol | A ₀ |
| Mull forestier | M |
| Mull calcique agricole | R |
| Inoculum mixte | I ₂ |
| <i>Trechispora</i> | Th |

E) Ensemencement.

On procède à un ensemencement massif :

— Pour les inoculums mixtes, à partir de l'échantillon prélevé aseptiquement, on prépare une suspension aqueuse homogène et concentrée. Un ml de l'inoculum est introduit à l'aide d'une pipette stérile dans chacun des récipients, puis mélangé intimement au substrat.

— Dans le cas d'une souche pure (Th), on procède : soit par inoculation de plusieurs fragments d'une culture sur milieu gélosé solide, soit par inoculation d'un broyat obtenu après développement de la souche en milieu liquide.

F) Incubation.

Les fioles sont conservées dans une armoire vitrée à la température du laboratoire et on maintient l'humidité du substrat à une valeur suffisante par des apports périodiques d'eau distillée stérile, sauf dans le cas de *Trechispora* où l'attaque du substrat s'accompagne de la production d'une grande quantité d'eau de métabolisme. La durée d'incubation varie entre douze et trente mois suivant l'examen envisagé.

CHAPITRE II

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

I. - ETUDE QUANTITATIVE

A) Définition du terme « Substances humiques ».

Il paraît indispensable de définir le sens attaché à ce terme. En effet, de nombreux auteurs lui ont attribué une signification différente.

DUCHAUFOUR (1960 a) subdivise la matière organique du sol en quatre fractions :

- celle des débris encore peu attaqués présentant une structure organisée ;
- celle des produits intermédiaires telle la lignine plus ou moins transformée ;
- celle des complexes colloïdaux formés par synthèse microbienne ou d'origine résiduelle : ils sont encore mal connus et constituent l'humus proprement dit ou la fraction humifiée de la matière organique ;
- celle des composés solubles se minéralisant ou se polymérisant plus ou moins rapidement.

La séparation de la matière organique incomplètement décomposée et de la fraction humifiée semble difficile à obtenir, étant donné l'existence de produits intermédiaires. La définition des acides humiques devra donc correspondre à celle d'une fraction bien définie obtenue suivant un mode d'extraction déterminé.

BURGES (1960 b), rappelant les nombreux travaux antérieurs effectués sur cette question, établit une classification en se basant sur une extraction sodique.

- Humine : matière organique insoluble dans NaOH.
- Acides fulviques : substances organiques solubles dans une solution sodique, mais non précipitables par les acides minéraux.
- Acides humiques : fraction correspondant à la matière organique soluble dans NaOH et précipitable par HCl ; insoluble dans l'alcool.
- Acides hymatomélaniques présentant les caractéristiques de la fraction humique, mais se solubilisant dans l'alcool.

MAYAUDON et SIMONART (1959 a et 1959 b) introduisent une subdivision supplémentaire :

- Humine hydrolysable et non hydrolysable.
- Acides humiques et hymatomélaniques hydrolysables et non hydrolysables.

DAVIES et COULSON (1959) réagissent contre l'extension apportée à la signification du terme acide humique, et souhaitent que cette appellation soit réservée aux seuls acides humiques des sols. Aussi dans ce travail, nous convenons d'appeler « composés humiques » ou « substances humiques », la fraction de matière organique soluble dans l'un des réactifs d'extraction suivants : H₂O et solutions de NaF, NaOH, Na₄P₂O₇ et précipitable par les acides minéraux. En effet, nous essayons de comparer, d'une part, les humus naturels accumulés et localisés dans des horizons de profils différents ; d'autre part, de suivre la formation de ces acides humiques à partir de matière organique d'origine végétale.

B) Méthodes d'extraction.

Le choix du réactif d'extraction des substances humiques, à partir de la matière organique d'un sol ou de végétaux en décomposition, est sujet à de nombreuses controverses.

1°) HYDROXYDE DE SODIUM.

Au début de ces expériences, nous utilisons une solution de NaOH N/10. En effet, ce mode de solubilisation des acides humiques déjà préconisé par SPRENGEL (1826) conserve de nombreux partisans, entre autres : KONONOVA et BELCHIKOVA (1960), NODA et IBA (1958), CORNFIELD (1960), MURPHY et MOORE (1960).

Cependant, peu à peu, parallèlement à d'autres chercheurs, nous avons été amené à comparer plusieurs processus d'extraction. Avant d'exprimer nos résultats, il est intéressant de faire une mise au point des travaux récents publiés sur ce problème complexe. Le réactif le plus ancien consiste en l'emploi d'une solution d'hydroxyde de sodium généralement utilisée à des normalités comprises entre 0,1 et 0,5. Après avoir fait l'historique de la question et cité de nombreux chercheurs adeptes de cette méthode, TINSLEY et SALAM (1961 a) découvrent plusieurs inconvénients à cette extraction alcaline.

a) Les solutions alcalines dissolvent de la silice et cet élément minéral contamine la fraction organique séparée.

b) Elles dissolvent également des composés organiques, principalement la lignine et l'hémicellulose des tissus végétaux encore organisés, ces substances se mélangent alors à la fraction extractible.

c) Une autoxydation des constituants de la matière organique intervient, elle est plus ou moins importante suivant qu'il s'agit d'une extraction sous atmosphère d'azote ou non.

d) D'autres changements peuvent se produire, ils correspondent à l'hydrolyse d'acides aminés et de polymères des sucres ou à des réactions de condensation entre composés aminés et aldéhydes ou phénols.

Certains auteurs, parmi lesquels BATURO et RAKOVSKIJ (1957), POMMER et BREGER (1960) traitent le sol par une solution acide diluée avant d'extraire les humates alcalins.

KONONOVA et BELCHIKOVA (1960) procèdent également à une décalcification préalable. MURPHY et MOORE (1960), avant d'extraire les acides humiques par une solution sodique, hydrolysent le substrat par une solution d'HCl à 2 % sous atmosphère de N.

Rappelons qu'en 1951, TIURIN utilisait la soude comme réactif d'extraction. Il distinguait les acides humiques libres directement extractibles, de ceux extraits seulement après élimination des ions Ca^{++} et même élimination des ions Al^{+++} et Fe^{+++} ; cette méthode a servi à la caractérisation des humus naturels (cf. chapitre premier).

2°) SELS ALCALINS.

L'usage de sels alcalins offre de nombreuses variantes. Au cours des réactions, les acides humiques se transforment en sels de sodium ou d'ammonium solubles.

CHAMINADE (1946) conseille l'oxalate d'ammonium.

Certains auteurs remplacent celui-ci par NaF à 1 %, afin de permettre un dosage direct par manganimétrie (Manil, 1961).

Ces dernières années, l'usage du pyrophosphate de sodium tend à se généraliser : BROMFIELD, COULSON et DAVIES (1959) l'utilisent à la concentration de 17 g/litre, BACHELIER (1960), puis COULSON, DAVIES et KHAN (1959 a), d'une part, et ALEXANDROVA (1960 a), d'autre part, emploient une solution 0,1 M. KONONOVA et BELCHIKOVA (1961) préconisent une solution de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ additionnée de NaOH (pH 13).

3°) DIVERS.

Les sels alcalins et l'hydroxyde de sodium ne constituent pas les seuls moyens d'extraction ; bien d'autres procédés servent au même usage et nous ne citerons que les plus récents :

MARTIN (1962) solubilise les acides humiques dans NH_4OH .

BURGES et LATTER (1960), STEELINK et *al.* (1960) préfèrent l'acide lactique et PARSONS et TINSLEY (1960) l'acide formique.

Il faut également mentionner l'utilisation du sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique : TINSLEY et SALAM (1961 a), DUBACH, MEHTA et DEUEL (1961).

Une étude sur la solubilisation par les composés organiques a été publiée par SCHEFFER, ZIECKMANN et PAWELKE (1960).

4°) COMPARAISONS.

Devant cette multitude de méthodes, les comparaisons deviennent inévitables : parmi les dernières, celles d'EVANS (1959) et TINSLEY et SALAM (1961 a et 1961 b) envisagent l'emploi de sels alcalins : pyrophosphate, fluorure, oxalate et citrate.

SAVAGE et STEVENSON (1961) oxydent les produits d'extraction obtenus en traitant des horizons organiques soit par une solution de NaOH N/5 ou de pyrophosphate 0,1 M à pH 9. Ils détectent les produits intermédiaires et constatent que ceux-ci diffèrent suivant le mode d'extraction ; ceux obtenus au pyrophosphate étant plus sensibles à l'oxydation.

SCHEFFER et *al.* (1960) comparent l'extraction soit par des solvants organiques, soit par une solution sodique. Ces auteurs montrent que les substances à faibles poids moléculaires extraites par les solvants organiques ne paraissent pas se retrouver dans les extraits par NaOH 0,5 N ; elles auraient subi une polymérisation oxydative. L'extraction aux solvants organiques : alcool, acétone, dioxane, diméthylformamide, pyridine, mettrait en évidence des

composés humiques ne se différenciant pas tellement par leur composition, mais par leurs dimensions particulières. Cependant, cette méthode ne permet pas un dosage quantitatif. SCHEFFER et *al.* conseillent donc, si l'on désire employer une solution sodique, de procéder à une extraction préalable avec des solvants organiques, ce qui, en outre, augmente la quantité de produits solubilisés par NaOH.

5°) CHOIX.

Parmi toutes ces méthodes, un choix s'impose :

a) *Pour les humus naturels*, nous avons comparé entre eux les produits obtenus par NaOH 0,1 N; cependant, les sols à complexe absorbant saturé ont subi une décalcification préalable.

b) *Pour effectuer l'extraction de débris végétaux* en décomposition, nous avons dû comparer les quantités de substances humiques obtenues après différentes méthodes d'extraction sodique. Cette expérience requiert l'emploi d'un substrat témoin (paille), puis, celui du même végétal après incubation en présence de différentes micro-flores. Le contenu de chaque fiole préalablement homogénéisé est réparti en quatre fractions égales, subissant chacune un traitement différent.

- Extraction NaOH 0,1 N.
- Extraction NaOH 0,1 N sous atmosphère d'azote.
- Extraction NaOH précédée d'une extraction par l'acétone.
- Extraction NaOH précédée d'une extraction par l'acétone et d'une extraction par l'alcool éthylique.

Les résultats en ml de $KMnO_4$ par g de matière sèche sont consignés dans le tableau n° 2.

TABLEAU 2

Influence du processus d'extraction sur la solubilisation des substances humiques

| Substrats et inoculum | Extraction par NaOH 0,1 N | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-----------|--------------------------|------------------------------------|
| | A l'air | sous N | Prétraitement acétone | Prétraitement acétone alcool |
| Paille témoin .. | 23,2 ml/g | 21,6 ml/g | 23,7 ml/g | 16,5 ml/g |
| Paille + P | 113 | 105 | 95 | 76,6 |
| Paille + M .. | 58 | 62 | 82 | 70 |
| Paille + I ₂ .. | 101 | 98 | 115 | 91 |

Aucune différence significative n'apparaît si l'on compare entre eux les deux premiers traitements ; l'extraction préalable à l'acétone fournit des chiffres plus élevés avec les deux derniers inoculums, ceci présente une analogie certaine avec les résultats enregistrés par SCHEFFER et *al.* (*loc. cit.*). Néanmoins, l'alcool éthylique solubilise une fraction des substances humiques ; celle-ci pourrait correspondre à la fraction hymatomélanique, ce qui diminue d'autant la quantité extraite par la soude.

Certes, les extractions organiques modifient la nature et la quantité des substances humiques, mais SCHEFFER et *al.* (*loc. cit.*) admettent que l'extraction sodique garde une valeur pour les humus stables.

D'autre part, comme nous l'avons indiqué lors de l'étude des produits d'humification de sciure (MANGENOT et JACQUIN, 1960), l'extraction NaOH, par rapport à FNa, solubilise des quantités de substances plus importantes, mais conserve leur ordre de classement.

L'influence de l'extraction, sous atmosphère d'azote ou non, est étudiée d'une manière approfondie par WRIGHT et SCHNITZER (1959) sur les horizons A₀ et B₁ d'un podzol. Les variations en éléments simples C — H — O — N — S sont insignifiantes, quant à celles des groupements fonctionnels, elles se traduisent par des fluctuations de faible amplitude. L'atmosphère inerte ou non influerait davantage sur la formation de substances humiques que sur leur nature (PICHARD, 1931) ; en effet, à partir d'un horizon organique et sous atmosphère d'azote, on obtient très rapidement, par extractions successives, une solution incolore ; si l'on ne prend cette précaution, des acides humiques se forment quasi indéfiniment aux dépens des substances intermédiaires.

De toutes façons, les différentes méthodes d'extraction ne solubilisent qu'un certain nombre de maillons de la longue chaîne des éléments issus de la transformation de la matière organique.

En définitive, nous précisons que notre travail a pour but de suivre la formation des substances humiques lors de la dégradation de matières organiques végétales et de rattacher les faits observés *in vitro* à ceux rencontrés dans la nature. Pour cette raison, nous employons des méthodes qui, si elles sont imparfaites, permettent néanmoins une comparaison, dans des conditions d'extraction identiques, entre certains produits de transformation des substances végétales, il s'agit :

- d'une seule extraction sodique N/10 pour la caractérisation des substances ;
- de quatre extractions successives pour le dosage quantitatif, ce qui permet d'obtenir la majeure partie des intermédiaires susceptibles de donner des acides humiques.

Dans les deux cas, le végétal non inoculé subit le même traitement.

C) Influence de la purification par précipitations successives sur quelques caractéristiques chimiques des extraits sodiques.

Une méthode de purification des extraits humiques consiste à réaliser une alternance de précipitations et de dissolutions successives. Nous avons donc étudié les modifications des propriétés chimiques consécutives à ce traitement. Ce travail s'effectue sur trois horizons différents :

A₀ et B₁ d'un podzol,
A₁ d'un mull forestier.

Afin d'obtenir le maximum de résultats significatifs, on établit un parallèle entre des substances humiques ayant subi une seule précipitation par H₂SO₄ concentré (rapport acide, extrait sodique 1/10) et une fraction similaire transformée par dix précipitations alternées avec dix solubilisations sodiques. Après chaque filtration, un lavage à H₂SO₄ N/10 permet d'éliminer l'excès d'acide. Les diverses phases de ces travaux s'exécutent sur du matériel humide n'ayant supporté aucune dessiccation.

1°) DOSAGE DE LA FRACTION MINÉRALE.

Lors de l'extraction, le complexe organo-minéral peut ne pas se dissocier complètement, ce qui provoque la solubilisation de certains minéraux avec les acides humiques. MISTERKI et LOGINOV (1960) admettent qu'une fraction minérale fait partie intégrante des acides humiques. Pour déterminer le pourcentage de ces éléments, nous calcinons les acides humiques au four à moufle pendant six heures à une température de 600°.

TABLEAU 3

Influence de la purification sur l'importance de la fraction minérale

| Horizons | Teneurs en cendres | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | après une précipitation | après dix précipitations |
| A ₀ podzol | 2,6 % | 2,6 % |
| B ₁ podzol | 11,7 % | 7,8 % |
| A ₁ mull | 38,7 % | 28,02 % |

Dans un horizon A_0 , le pourcentage de cendres n'évolue pas et prouve une incorporation des minéraux aux acides humiques. Par contre, avec les autres horizons, on assiste à une diminution de la teneur en cendres de l'ordre de 25 %.

SCHNITZER, SHEARER et WRIGHT (1959) signalent que, dans la matière organique extraite par des réactifs différents, puis soumise à dialyse, le pourcentage de cendres s'élève entre 20 et 40 %, suggérant une association entre la matière organique, l'argile, les métaux et les cations. ALEXANDROVA (1960 b), étudiant la composition et la nature des cendres dans les acides humiques, montre une variation qualitative entre celles d'un podzol (absence de bases) et celles d'un chernozem (faible quantité de bases) ; les éléments prédominants correspondent à Fe_2O_3 , Al_2O_3 , SiO_2 , P_2O_5 .

KONONOVA et TITOVA (1961), après séparation électrophorétique des acides humiques, observent la présence de fer libre dans la fraction mobile des acides humiques de l'horizon illuvial d'un podzol.

En résumé avec certains humus, issus d'horizons dans lesquels les fractions minérales et organiques s'interpénètrent, nous rencontrons de réelles difficultés pour obtenir la séparation des minéraux intimement liés aux acides humiques, de ceux entraînés au cours du processus d'extraction.

2°) DÉTERMINATION DU POUVOIR RÉDUCTEUR PAR MANGANIMÉTRIE.

Ce procédé classique, utilisé entre autres par CHAMINADE (1946), DUCHAUFOR (1960 a), permet d'évaluer quantitativement les acides fulviques et humiques. Ce dosage demande à être effectué dans des conditions rigoureuses afin d'obtenir des résultats précis. A une fraction aliquote de la solution humique (généralement 10 ml), on ajoute 20 ml d'une solution titrée de $KMnO_4$, 0,1 N. Un témoin, dans lequel les acides humiques sont remplacés par une solution sodique N/10, permet de déterminer la correction due à la destruction de $KMnO_4$ par chauffage en milieu alcalin. Le mélange de solution est porté à 100° sur une plaque chauffante, puis maintenu à ébullition modérée pendant exactement dix minutes. Après refroidissement, on ajoute dans la fiole 10 ml d'acide sulfurique au 1/5, puis 20 ml d'acide oxalique 0,1 N et l'on dose l'excès d'acide par manganimétrie. Les résultats sont exprimés en ml de $KMnO_4$ N/10 par gramme de matière sèche. Dans le tableau n° 4, nous comparons l'équivalence entre un ml de $KMnO_4$ N/10 et un poids déterminé d'acides humiques séchés à 105° , mais sans déduction de la fraction minérale.

TABLEAU 4

Variations du pouvoir réducteur en fonction du nombre de précipitations

| Horizons | Correspondances $KMnO_4$ / Acides humiques (équivalence de 1 ml de MnO_4K en mg) | |
|--------------------|---|-----------------------------|
| | après une précipitation | après dix précipitations |
| A_0 podzol | 0,884 | 0,667 |
| B_1 podzol | 1,05 | 0,647 |
| A_1 mull | 1,7 | 0,988 |

Les correspondances observées sont nettement liées aux types d'humus. ZIECKMANN et MEYER (1960) admettent que les substances humiques sont des édifices moléculaires analogues, mais doivent être considérées comme des membres d'une série de polymères homologues se caractérisant par de grandes différences de réactivité.

Les trois équivalences obtenues confirment cette théorie puisque le pouvoir réducteur varie du simple au double, entre un humus A_0 de podzol et A_1 d'un mull.

Après dix précipitations, le pouvoir réducteur est accru ; si l'on peut admettre une élimination de la charge minérale pour le mull, cette cause ne peut être retenue pour un A_0 dont le taux de cendres ne varie pas comme nous venons de le dire. On pourrait supposer que, au cours des dix précipitations successives, il se produirait une hydrolyse partielle des substances humiques avec libération de groupements réactionnels. D'ailleurs BÉRÈS et *al.* (1957) ont émis l'hypothèse qu'une fraction des acides fulviques dériverait des acides humiques ; ALEXANDROVA (1960 a) constate que, si l'on extrait davantage d'acides fulviques par la méthode TIURIN que par l'emploi du pyrophosphate, ce résultat serait la conséquence d'une hydrolyse partielle des acides humiques. SAVAGE et STEVENSON (1961) signalent l'oxydation possible des substances humiques par H_2O_2 ou $KMnO_4$ avec libération entre autres d'acide oxalique dont le pouvoir réducteur est important.

3°) DÉTERMINATION DU RAPPORT C/N DES ACIDES HUMIQUES.

Le dosage de l'azote total s'effectue suivant la méthode de microkjeldahl.

L'utilisation de la méthode ANNE (1945) permet de déterminer la quantité de carbone ; l'échantillon doit correspondre à un pour-

centage en cet élément compris entre 50 et 75 mg. Nous tenons compte des précautions indiquées par SIMAKOV et *al.* (1960), précautions relatives à l'emploi de conditions de travail rigoureusement constantes.

TABLEAU 5

Influence de la purification sur le rapport C/N de trois acides humiques

| Horizons | Azote % | | Carbone % | | C/N | |
|----------------|----------------|------|----------------|-------|----------------|------|
| | Précipitations | | Précipitations | | Précipitations | |
| | 1 | 10 | 1 | 10 | 1 | 10 |
| A ₀ | 2,4 | 2,08 | 52 | 53 | 21,6 | 25,4 |
| B ₁ | 1,9 | 1,9 | 47,8 | 50,2 | 25,1 | 26,4 |
| M | 2,35 | 2,77 | 44,4 | 52,35 | 18,8 | 18,8 |

Après une seule précipitation, nous constatons une nette différence entre la teneur en azote des acides humiques issus d'horizons superficiels ou profonds, mais cette différence s'avère moins élevée que celle enregistrée par WRIGHT et SCHNITZER (1959). Ces auteurs mentionnent en effet des pourcentages respectifs de 2,34 et 0,72 pour les mêmes horizons. Il faut encore noter que nos chiffres sont beaucoup plus faibles que ceux publiés par KONONOVA et ALEXANDROVA (1959). Ces derniers indiquent des taux d'azote de 5,9 % dans un humus brut ; par contre, BURGESS (1960 b) signale que les valeurs obtenues peuvent s'abaisser aux environs de 1 %.

Les trois horizons étudiés se comportent très différemment vis-à-vis des précipitations successives :

Avec l'horizon B, l'influence des dix précipitations est négligeable sur l'ensemble des résultats.

En ce qui concerne le mull, la stabilité du C/N des acides humiques jointe à une augmentation des taux d'azote et de carbone, paraît être en corrélation avec une diminution de la fraction minérale, ce qui confirme les hypothèses émises à propos des variations du pouvoir réducteur.

Enfin, pour A₀, l'augmentation du C/N et la perte d'azote peuvent s'expliquer par une hydrolyse partielle, libérant dans les molécules d'acides humiques, une fraction des chaînes latérales qui, on le sait, présentent une teneur en azote plus élevée.

II. - DENSITE OPTIQUE ET FLOCCULATION

L'étude de ces deux propriétés, en liaison avec la caractérisation des substances humiques est couramment utilisée : citons entre autres WELTE (1955), FREYTAG (1955), KONONOVA et BELCHIKOVA (1956), MISTERKI et LOGINOV (1959), SAEKI et AZUMA (1960), CORNFIELD (1960). En se basant sur ces travaux, nous employons le protocole expérimental décrit par JACQUIN et MANGENOT (1960).

A) Préparation des solutions de substances humiques.

Après avoir subi une extraction par NaF, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ou NaOH, puis une précipitation à l'aide de H_2SO_4 à 10 %, les acides humiques sont séparés par filtration et redissous dans NaOH 0,1 N ; la solution obtenue est ensuite soumise à dialyse. Dans ce but, on utilise un manchon de cellophane baignant dans un courant d'eau distillée. Après trois jours, les acides humiques flocculent très légèrement.

B) Détermination du titre des solutions.

Plusieurs méthodes semblent logiques et méritent d'être comparées :

1°) En fonction du poids d'acides humiques après dessiccation à 105°. Une solution à 272 mg d'acides humiques par litre est préparée sans tenir compte de l'importance de la fraction minérale ;

2°) En fonction du pouvoir réducteur : on compare des solutions d'acides humiques ramenées au même pouvoir réducteur. Etant donné la variabilité de cette propriété suivant les types d'humus, cette méthode a été abandonnée ;

3°) Par rapport à la teneur en carbone, nous déterminons le titre des solutions en attaquant au mélange sulfochromique (ANNE, 1945) soit la solution dialysée d'acides humiques, soit son produit d'évaporation à sec à une température de 50° C.

Dans les trois cas, il reste ensuite à ajuster la solution au titre de 136 mg de carbone par litre. Pour cela, le dialysat partiellement flocculé est additionné de NaHCO_3 0,1 N ; dans les proportions de 1/10, puis on amène à la concentration voulue à l'aide d'une solution tampon d'acide borique, chlorure de potassium et carbonate de sodium de pH 7,5 (BRUNEL, 1948).

C) Etude de la densité optique.

L'examen des solutions titrées est effectué dans les six heures au spectrocromimètre JOUAN à l'aide d'une cuve de 1 cm. Le témoin correspond à du bicarbonate de sodium 0,1 N dilué dix fois par la solution tampon pH 7,5.

Les densités optiques sont relevées pour les longueurs d'ondes suivantes : 420 - 472 - 490 - 530 - 550 - 580 - 620 - 665 - 720 m μ . Le rapport Q 4/6 s'établit à l'aide des valeurs obtenues à 420 et 665 m μ .

D) Etude de la floculation par CaCl₂.

Nous attachons une grande importance à la détermination du taux de floculation, car elle permet de mesurer la sensibilité des acides humiques vis-à-vis des cations. Les recherches concernent généralement la sensibilité en regard des ions calcium, cependant MISTERKI et LOGINOV (1959) ont étudié cette propriété, en fonction des ions Al et Fe.

Nous employons des solutions d'acides humiques titrées à 136 mg en carbone et ajustées à pH 7,5, identiques à celles utilisées pour la mesure de la densité optique.

A 5 ml de cette solution, on ajoute 3 ml de solution de CaCl₂ de manière à obtenir des concentrations finales de 10 - 20 - 30 - 40 - 60 et 80 m. eq. de Ca/l.

Après vingt-quatre heures, les mélanges sont centrifugés et la densité optique du surnageant mesurée par rapport au tampon. La valeur obtenue est alors calculée en % de la densité optique d'un témoin sans Ca ; enfin, on exprime le taux de coagulation en soustrayant ce dernier chiffre de 100. Le résultat ne dépend pas de la longueur d'onde choisie, mais nous avons toujours opéré à 450 m μ , ce qui correspond aux lectures les plus précises.

III. - LIGNINE ET FRACTION NON HYDROLYSABLE

Pour étudier parallèlement la fraction non hydrolysable des acides humiques et la teneur en lignine du matériel végétal, nous comparerons deux méthodes.

A) Méthode de Forest (1946).

Elle dérive de la méthode classique de détermination de la lignine selon KLASON. Le substrat broyé à l'aide d'un microbroyeur

est réduit en particules passant à travers un tamis n° 80. Dans certains cas, on procède à une extraction préalable par NaOH 0,1 N afin d'éliminer les « acides humiques et fulviques ».

Ensuite, la substance est attaquée à froid par l'acide sulfurique à 72 % pendant seize heures. Après cette macération, la concentration d'acide est ramenée par dilution à 3 %. Le mélange subit une ébullition sous réfrigérant ascendant pendant quatre heures. La fraction non hydrolysable recueillie sur verre fritté est lavée à l'eau chaude jusqu'à élimination des sucres réducteurs et des ions SO_4^{--} .

Eventuellement, après calcul du poids de matière sèche, on détermine le pourcentage de cendres et d'azote sur cette fraction non hydrolysable.

B) Méthode de Salo (1957).

Cet auteur, lors d'une étude critique du dosage de la lignine, recommande de procéder avant l'attaque sulfurique à des extractions préalables. Le matériel est broyé jusqu'à passage au tamis n° 80. A deux grammes de l'échantillon tamisé, on ajoute 100 ml d'eau distillée et l'on porte à ébullition pendant trente minutes, on filtre, lave à plusieurs reprises à l'eau chaude, puis on entraîne le résidu solide dans un ballon à l'aide de 100 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 2 N. L'hydrolyse est maintenue ensuite pendant une heure par ébullition sous réfrigérant ascendant. Les produits solubles sont alors éliminés par lavages successifs à l'eau, puis à l'alcool, jusqu'à obtention d'un filtrat clair. Ensuite, une extraction est effectuée pendant trois heures, au Soxhlet, par le mélange alcool benzène (dans des proportions 1/2). La suite de la méthode correspond à celle de KLASON.

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE :

RÉSULTATS

I. - ETUDE QUANTITATIVE

A) Humus naturels.

En ce qui concerne les humus naturels, le dosage effectué selon la méthode TIURIN nous a permis d'obtenir des valeurs consignées lors de l'étude des profils (cf. chapitre I). Nous nous bornerons ici à exposer les résultats de nos recherches sur les substances végétales.

B) Produits de décomposition « in vitro ».

1°) INFLUENCE DE LA MICROFLORE.

Dans un premier stade, nous nous bornons à étudier l'influence de l'inoculum sur la décomposition de la matière organique de chacun des trois substrats. Les valeurs initiales du pH doivent se rapprocher de celles observées dans la nature ; pour cette raison, nous ajoutons du carbonate de calcium, dans le cas d'une rendzine et de l'inoculum n° 2. D'autre part, afin d'accélérer la transformation des végétaux à rapport C/N élevé, nous mélangeons au substrat de l'azote organique sous forme de peptone de caséine. Ces deux apports sont effectués dans des conditions bien déterminées et décrites dans le chapitre premier.

a) *Etude des substrats après une incubation de quinze mois.*

Les modifications d'aspect et de pH sont notées par rapport à des témoins préparés dans les mêmes conditions, mais non inoculés.

● ASPECT.

Sciure de Hêtre (planche 1) :

- Podzol + N : Le milieu de teinte brun roux est parsemé de taches noirâtres ou blanchâtres. Il se dégage une odeur âcre piquante à l'ouverture du flacon.
- Mull + N : Le substrat présente une teinte uniforme brun roux avec odeur de bois humide.
- Rendzine + N + CO₃Ca : La coloration initiale brun noir laisse ensuite apparaître des taches incolores.
- Inoculum n° 2 + N + CO₃Ca : Le résidu teinté en brun noirâtre est parfaitement inodore.
- Th + N : La sciure régulièrement décolorée présente une forte humidité accompagnée d'une odeur fongique agréable.

Paille de Blé :

- Podzol + N : Le milieu offre l'aspect d'une masse brun verdâtre avec de nombreuses fructifications noirâtres en têtes d'épingles.
- Mull + N : La coloration du substrat devient plus brune. Mais l'odeur est peu caractéristique.
- Rendzine + N + CO₃Ca : On assiste à un noircissement plus poussé des fibres végétales avec dégagement d'une assez forte odeur de fumier.
- Inoculum n° 2 + N + CO₃Ca : Le résidu, de teinte brun tabac, est inodore.
- Th + N : Pour *Trechispora*, on observe une décoloration générale à l'exception de quelques taches brun-roux.

Trèfle violet :

- Podzol : Le milieu présente une coloration noirâtre accompagnée d'une forte odeur de bois moisi.
- Mull : Le substrat de coloration brun caramel dégage une odeur très accentuée de fumier en décomposition. On assiste au développement des fructifications de *Coprinus lagopus* Fr, f. *macrosporus* (det. F. MANGENOT).
- Rendzine + CO₃Ca : Ici l'aspect se rapproche de celui du témoin.
- Inoculum n° 2 + CO₃Ca : Le résidu de coloration brun-roux reste toujours inodore.
- Th : Le Mycelium très peu développé n'accuse aucune odeur caractéristique.

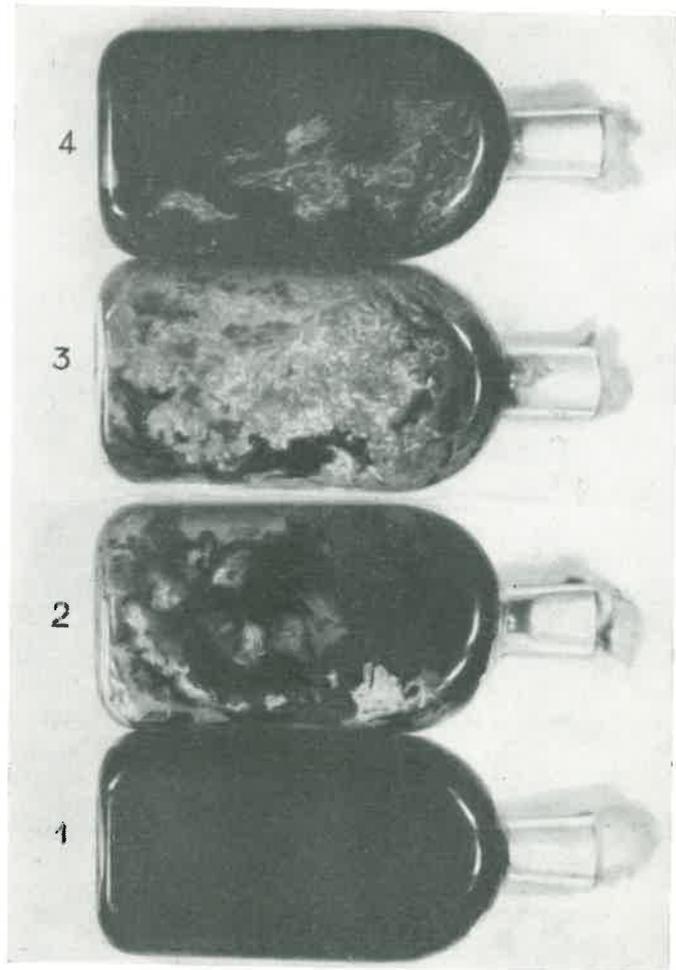


PLANCHE N° 1

Aspect de la sciure de Hêtre après dix-huit mois d'incubation.

- 1) Sciure non inoculée.
- 2) Sciure plus microflore de podzol.
- 3) Sciure plus souche de *Trechispora*.
- 4) Sciure plus microflore de rendzine.

● pH.

Le contenu de chaque fiole est recueilli, puis additionné de deux volumes d'eau distillée et laissé au repos quinze minutes. Le pH est ensuite déterminé par potentiométrie à l'électrode de verre.

TABLEAU 6

pH mesurés après une incubation de quinze mois

| Substrats | Apports | pH |
|----------------------------------|--------------------------|------|
| <i>Sciure témoin</i> | + N | 5 |
| Sciure avec podzol | + N | 5,54 |
| Sciure avec mull | + N | 6,42 |
| Sciure avec rendzine | + N + CO ₃ Ca | 5,6 |
| Sciure avec I ₂ | + N + CO ₃ Ca | 7,75 |
| Sciure avec Th | + N | 3,95 |
| <i>Paille témoin</i> | + N | 4,7 |
| Paille avec podzol | + N | 6,6 |
| Paille avec mull | + N | 7,1 |
| Paille avec rendzine | + N + CO ₃ Ca | 8,19 |
| Paille avec I ₂ | + N + CO ₃ Ca | 8,03 |
| Paille avec Th | + N | 4,3 |
| <i>Trèfle témoin</i> | | 6,01 |
| Trèfle avec podzol | | 7,62 |
| Trèfle avec mull | | 8,4 |
| Trèfle avec rendzine | + CO ₃ Ca | 7,10 |
| Trèfle avec I ₂ | + CO ₃ Ca | 9,28 |
| Trèfle avec Th | | 5,49 |

Pour un même traitement, dans la majorité des cas, la valeur du pH s'élève généralement dans l'ordre : sciure, paille, Trèfle.

Avec les inoculums mixtes, le pH reste toujours supérieur à 5,5, par contre avec Th, il descend au-dessous de 4. Toutefois, on enregistre un fait particulier après attaque d'une microflore de rendzine sur sciure ; dans ce cas, malgré un apport de CO₃Ca, le fléchissement du pH s'accompagne d'une décoloration du substrat. Ces manifestations peuvent être interprétées comme le résultat d'une attaque par un champignon lignivore. En effet, d'après MIKOLA (1958), la décomposition de la lignine dans les litières forestières correspond à une diminution du pH et une décoloration du milieu. Les cultures pures de *Trechispora* accusent ces deux mêmes particu-

larités ; or, nous avons déjà signalé en collaboration avec F. MANGENOT (1960) que ce champignon dégrade rapidement la lignine avec production de substances humiques.

b) *Extraction des composés humiques et fulviques.*

L'extraction par NaOH N/10, à raison de 100 ml de solution pour 10 g de matériel, a été effectuée successivement quatre fois sur chaque échantillon. Si, dès la deuxième opération, la sciure fournit des extraits incolores, les autres substrats, après quatre extractions, donnent encore des extraits légèrement teintés et comprenant essentiellement des substances fulviques. Ce fait résulte probablement de phénomènes d'oxydation en milieu alcalin ; phénomènes dont la réalité est indiscutable et qui donnent naissance à des substances humiques artificielles.

Après traitement par H₂SO₄ des produits extractibles, on sépare par filtration la fraction précipitée. Nous constatons que la rapidité de filtration varie toujours dans le même ordre pour les inoculum mixtes : très rapide avec la microflore de podzol, rapide pour le mull, lente pour la rendzine, très lente pour l'inoculum n° 2. Par contre, les colorations des produits semblent liées au substrat et sont énumérées dans le tableau 7. Ici encore, on note cependant une exception pour les composés obtenus par action de l'inoculum de rendzine sur sciure ; dans ce cas, les composés fulviques présentent une teinte rouge-brun.

TABLEAU 7

Teinte des substances extractibles par NaOH N/10, en fonction du substrat

| Substrats | Colorations des substances humiques | Colorations des substances fulviques |
|--------------|--|---|
| Sciure | brun clair | jaune paille clair |
| Paille | brun vert | jaune ambré |
| Trèfle | brun acajou | rouge - brun |

c) *Dosage des substances humiques et fulviques.*

Les résultats obtenus par le dosage manganométrique de ces substances sont récapitulés dans le tableau 8. Chaque chiffre correspond à la moyenne de trois manipulations (il faut noter que la variabilité entre les trois dosages par manganométrie est très faible, de l'ordre de 0,1 à 0,3 ml). Le pouvoir réducteur, comme il a été montré précédemment, dépend de la nature des acides humiques.

Aussi les résultats sont-ils exprimés en ml de $KMnO_4$ par g de matière sèche ; d'autre part, il est intéressant de calculer les résultats par rapport au poids de matière sèche initiale et au poids de matière sèche après incubation.

TABLEAU 8

Taux de décomposition et pourcentage de composés humiques et fulviques obtenus après extraction sodique

| Inoculums et Substrats | Apports | Perte de poids en % du poids initial (taux de décom- position) | Composés humiques exprimés en ml de $KMnO_4$ par g de matière sèche | | Composés fulviques exprimés en ml de $KMnO_4$ par g de matière sèche | | |
|------------------------------|--------------|---|--|-------------------------------------|---|-------------------------------------|------|
| | | | par rapport au poids initial | par rapport au poids final | par rapport au poids initial | par rapport au poids final | |
| Témoin : S | N | 0,2 | 16 | 16 | 27 | 27 | |
| | P | 0,3 | 24 | 24 | 54 | 54 | |
| | T | 0,7 | 28 | 29 | 64,5 | 65 | |
| Podzol : S | N | 11,3 | 25 | 28,5 | 43 | 48,5 | |
| | P | 40,7 | 131 | 221 | 56 | 95 | |
| | T | 44,5 | 73 | 131 | 50,5 | 91 | |
| Mull : S | N | 14,2 | 25 | 29 | 43 | 50 | |
| | P | 44,4 | 113 | 203 | 50 | 59 | |
| | T | 50,95 | 78 | 159 | 50,5 | 103 | |
| Rendzine : S | N + CO_3Ca | 9,4 | 31 | 34 | 82 | 90,5 | |
| | P | N + CO_3Ca | 37,5 | 87 | 128 | 51 | 81,5 |
| | T | CO_3Ca | 39,7 | 38 | 63 | 35,5 | 55 |
| I n° 2 : S | N + CO_3Ca | 8,75 | 32 | 35 | 39 | 42,5 | |
| | P | N + CO_3Ca | 40,85 | 138 | 232 | 53 | 89 |
| | T | CO_3Ca | 41,95 | 66 | 113,5 | 41,5 | 71,5 |
| Th : S | N | 28,6 | 53 | 74 | 84 | 117 | |
| | P | N | 43,1 | 73 | 128 | 83 | 145 |
| | T | | 17,6 | 50,5 | 61 | 51 | 62 |

S = Sciure - P = Paille - T = Trèfle - N = Azote.

Quelques conclusions peuvent être tirées de ces résultats.

— *Vitesse de décomposition* :

La perte de poids au cours de l'incubation est, sans contestation possible, liée au substrat.

Pour la paille et le Trèfle avec les inoculums mixtes, on constate des taux sensiblement voisins malgré un C/N nettement

différent ; ce fait permet de démontrer que, si ce rapport joue un rôle prépondérant sur la rapidité de la décomposition d'une matière organique végétale, il ne peut cependant s'agir d'une action exclusive.

Avec la sciure, on remarque un faible taux de décomposition (de l'ordre de 10 %) pour tous les inoculum sauf *Trechisporu* où il atteint 28 %.

— Production de substances humiques et fulviques au cours des différentes incubations :

Nous avons déterminé pour chaque traitement la quantité de substances susceptibles d'être solubilisées par extraction sodique. Celle-ci est exprimée en ml de $\text{KMnO}_4 \text{ N}/10$ par gramme de matière sèche recueillie après incubation. Toutefois, il nous a paru nécessaire de soustraire de ces résultats les valeurs obtenues, dans les mêmes conditions de solubilisation, pour les trois témoins non inoculés.

TABLEAU 9

Production de composés humiques et fulviques
au cours des diverses incubations

| Inoculum | Composés humiques | | | Composés fulviques | | | Rapports Composés humiques / Composés fulviques | | |
|----------------------|-------------------|------|------|--------------------|------|------|---|-----|------|
| | Substrats | | | Substrats | | | Substrats | | |
| | S | P | T | S | P | T | S | P | T |
| | ml/g | ml/g | ml/g | ml/g | ml/g | ml/g | | | |
| Podzol..... | 12,5 | 197 | 102 | 21,5 | 41 | 26 | 0,58 | 4,8 | 3,9 |
| Mull..... | 13 | 179 | 130 | 23 | 35 | 38 | 0,56 | 5,1 | 3,4 |
| Rendzine..... | 18 | 104 | 34 | 63,5 | 27,5 | —6 | 0,28 | 3,8 | — |
| I ₂ | 19 | 208 | 84,5 | 15,5 | 35 | 6,6 | 1,2 | 5,9 | 12,9 |
| Th..... | 58 | 104 | 32 | 90 | 91 | —3 | 0,64 | 1,1 | — |

• Pour les composés humiques, à première vue, une relation apparaît entre le taux de décomposition de la matière organique et l'intensité de la production de ces substances (cf. tableau 8) ; cependant, bien que les pertes de poids subies par la paille et le Trèfle soient du même ordre de grandeur, les quantités de substances humiques néoformées se révèlent sensiblement deux fois plus faibles pour le second substrat. Néanmoins, nous l'avons déjà signalé, un dosage manganométrique permet de déterminer davantage une variation de pouvoir réducteur plutôt qu'un poids précis d'acides

humiques. Or, rien n'exclut l'hypothèse selon laquelle les composés de néoformation dérivant d'un matériel riche en azote (Trèfle) soient plus condensés et moins réducteurs que ceux issus d'un substrat à fort C/N (paille).

Par contre, si l'action sur la sciure des inoculums mixtes se traduit par un faible taux de décomposition accompagné d'une production minimale de substances humiques, à l'opposé, l'attaque de ce même matériel par *Trechispora* se concrétise par une production de composés humiques au moins trois fois plus élevée.

● Pour les composés fulviques, les résultats se révèlent nettement différents des précédents. L'action de *Trechispora* sur la sciure engendre une quantité de substances fulviques très importante. La décomposition de la sciure après quinze mois aurait donc produit beaucoup plus de corps intermédiaires que de substances humiques. L'action de la souche lignivore pourrait engendrer des polyphénols simples (HENDERSON, 1955) et des polysaccharides (BERNIER, 1958). Ultérieurement, nous apporterons une confirmation de la première hypothèse tout en admettant, pour certaines souches de champignons, la possibilité d'une formation de polysaccharides de synthèse.

L'apparition d'une fraction plus importante d'acides fulviques après action d'un inoculum de rendzine sur sciure pourrait être une des conséquences de l'action de la microflore. Il est possible d'émettre l'hypothèse d'une corrélation entre l'augmentation des substances fulviques et l'activité d'organismes lignivores.

Par contraste, le Trèfle libère des quantités beaucoup plus faibles d'acides fulviques. On peut admettre qu'en présence d'une quantité importante d'azote, ou plus précisément dans le cas d'un rapport C/N voisin de 10, les produits intermédiaires se transforment très rapidement par condensation en substances humiques.

● Le rapport substances humiques - substances fulviques traduit les différences mentionnées ci-dessus, à savoir la prépondérance d'une formation d'acides fulviques au cours de la décomposition de substrats pauvres en azote.

2°) INFLUENCE DE LA DESSICATION.

L'influence de la dessiccation est constatée sur des substances humiques issues de la décomposition d'une matière végétale. Dans ce but, nous utilisons de la sciureensemencée par des inoculums différents. Après incubation, le produit de chaque fiole est homogénéisé, puis divisé en trois fractions : l'une immédiatement extraite par NaOH N/10, l'autre, après dessiccation à la température du laboratoire, la troisième, après passage à l'étuve à 105° pendant douze heures.

Les fluctuations relatives à la quantité de substances humiques s'observent toujours dans le même sens, comme l'indique le tableau 10 où les résultats sont exprimés en ml de KMnO_4 par gramme de matière sèche de matériel traité.

TABEAU 10

Influence de la dessiccation sur les substances humiques

| Substrats et inoculums | Produit frais | Dessiccation à l'air | Dessiccation à 105° |
|----------------------------------|---------------|-------------------------|------------------------|
| Sciure (P) | 13,5 ml/g | 17,5 ml/g | 21 ml/g |
| Sciure (M) | 15,7 | 20,8 | 25,1 |
| Sciure (R) | 16,4 | 22,9 | 29,5 |
| Sciure (I ₂) | 21,3 | 29,8 | 32,9 |

Après une dessiccation plus ou moins poussée, nous assistons, d'une façon constante, à une augmentation de la quantité des substances humiques. Notons cependant qu'il s'agit d'expérience *in vitro*. Après incubation, il existe des substances humiques, mais certainement aussi de très nombreux produits intermédiaires, solubles partiellement dans l'eau. Il est intéressant de souligner dans nos conditions d'expérience, l'influence de la dessiccation sur l'augmentation du taux des composés humiques ; ces derniers dérivent vraisemblablement d'une condensation de produits non précipitables par les acides minéraux et probablement de natures très diverses.

Dans la nature, le lessivage intervient au cours de la transformation de la matière organique fraîche par entraînement des « produits solubles ». Cependant, ceux-ci peuvent se condenser soit au cours de périodes sèches ou de gel dans les horizons supérieurs (DUCHAUFOR et JACQUIN, 1959), soit par une simple déshydratation en profondeur.

II. - DENSITE OPTIQUE ET FLOCCULATION

Les densités optiques enregistrées aux différentes longueurs d'ondes permettent l'établissement de courbes ou la détermination du rapport de WELTE (1955). Celui-ci correspond au rapport des densités optiques mesurées à 472 et 665 m μ . Notons que le Q 4/6 est utilisé systématiquement en U. R. S. S. pour caractériser les divers types d'acides humiques (KONONOVA, BELCHIKOVA, ALEXANDROVA, 1960).

A) Humus naturels.

Rappelons les humus étudiés et leurs abréviations :

- A₀ : A₀ d'un podzol.
- B : B₁ du même podzol.
- M : A₀ et A₁ d'un mull forestier.
- R : A₁ d'une rendzine forestière.
- C : A₁ d'un chernozem.

1°) INFLUENCE DE LA MÉTHODE UTILISÉE POUR LE DOSAGE DES SOLUTIONS D'ACIDES HUMIQUES.

Nous comparons les densités optiques obtenues à partir de solutions titrées et prenons comme référence un poids déterminé de matière sèche ou de carbone. La première méthode donne des résultats satisfaisants si l'on se trouve en présence d'acides humiques pauvres en éléments minéraux. Autrement, comme nous l'avons déjà signalé, il est difficile de distinguer la fraction minérale intégrée dans l'édifice moléculaire de celle représentant les impuretés entraînées lors de l'extraction. Actuellement, il semble que la meilleure méthode consiste à préparer les solutions de même titre en carbone (KONONOVA, 1958). D'après TIURIN (1951), un coefficient permet de passer du poids de carbone au poids de substances humiques, il correspond à 1,724. ALEXANDROVA (1960 a) précise que ce rapport varie entre 1,7 et 1,85 en fonction de la nature des corps étudiés.

2°) INFLUENCE DU MODE D'EXTRACTION.

Le tableau 11 récapitule les valeurs des densités optiques mesurées pour les différentes solutions d'acides humiques, en fonction de l'emploi de l'un ou l'autre des trois réactifs d'extraction. Pour B₁ et C, nous sommes amenés à diluer de moitié les solutions à 136 mg, en effet, celles-ci ne se prêtent pas à une lecture précise aux faibles longueurs d'ondes.

L'ensemble de nos résultats montre que le choix de l'un des trois réactifs d'extraction n'exerce qu'une influence secondaire sur les valeurs des densités optiques obtenues avec les différents acides humiques ; cette conclusion confirme les travaux d'ALEXANDROVA (1960 a) relatifs à une comparaison similaire, mais effectués seulement sur deux types d'humus. Il nous faut cependant noter, au cours de la dialyse, une précipitation partielle et irréversible du produit résultant de l'extraction sodique d'un chernozem : par oxydation alcaline, on assiste à la néoformation d'humine, substance correspondant au stade ultime des synthèses humiques. Cette polymé-

risation chimique pourrait également expliquer l'abaissement du rapport Q 4/6 remarqué dans la majorité des extractions par solubilisation dans NaOH N/10.

TABLEAU 11

Influence du réactif d'extraction sur les densités optiques de cinq types d'acides humiques naturels

| Horizons et réactifs d'extraction | Longueurs d'ondes en m μ . | | | | | | | | | Q $\frac{472}{665}$ | |
|---|--------------------------------|-------|-------|-----|------|-----|------|------|------|---------------------|-----|
| | 420 | 472 | 490 | 530 | 550 | 580 | 620 | 665 | 720 | | |
| A ₀ : N | N | 132 | 95 | 85 | 57 | 48 | 36 | 25 | 16 | 9,2 | 5,9 |
| | F | 135 | 97 | 86 | 56 | 46 | 34,5 | 24,5 | 15 | 8,5 | 6,4 |
| | P | 138 | 98 | 84 | 56 | 46 | 34 | 23 | 14 | 8 | 7 |
| B ₁ : N | N | 150 | 140 | 128 | 94 | 78 | 61 | 44 | 29 | 18 | 4,8 |
| | F | > 150 | > 150 | 140 | 103 | 88 | 68 | 50 | 33 | 20,5 | |
| | P | > 150 | > 150 | 150 | 110 | 94 | 74 | 54 | 35 | 22 | |
| B _{1/2} : F | F | 102 | 72 | 65 | 50,5 | 43 | 33 | 25,5 | 16 | 11 | 4,2 |
| | P | 110 | 80 | 72 | 55 | 47 | 37 | 28 | 18 | 11 | 4,4 |
| M : N | N | 129 | 94 | 83 | 57 | 48 | 36,5 | 26 | 17,5 | 10,5 | 5,4 |
| | F | 114 | 84 | 75 | 50 | 42 | 32,5 | 23,5 | 15,5 | 9 | 5,4 |
| | P | 104 | 75 | 66 | 43 | 35 | 27 | 19,5 | 12 | 7 | 6,2 |
| R : N | N | 150 | 130 | 118 | 86 | 72 | 56 | 39 | 25,2 | 15 | 5,2 |
| | F | 150 | 125 | 111 | 80 | 68 | 53 | 37 | 23 | 14 | 5,4 |
| | P | 115 | 88 | 78 | 55 | 46 | 35 | 24 | 15 | 9 | 5,8 |
| C : N | N | | | | | 142 | 105 | 88 | 67 | 49 | |
| | F | | | | | 150 | 132 | 102 | 73 | 46 | |
| | P | | | | | 138 | 110 | 84 | 59 | 35,5 | |
| C/2 : N | N | 150 | 121 | 111 | 89 | 77 | 51,5 | 43 | 33 | 25 | 3,6 |
| | F | 150 | 137 | 122 | 96 | 81 | 66 | 50 | 35 | 24 | 3,9 |
| | P | 140 | 112 | 102 | 78 | 67 | 54 | 41 | 29,5 | 18 | 3,9 |

N : solution de NaOH N/10.
 F : solution de NaF à 1 %.
 P : solution de Na₄P₂O₇ à 1 %.

3°) VARIATIONS DE LA DENSITÉ OPTIQUE EN FONCTION DE LA NATURE DE L'HUMUS.

Pour concrétiser les mesures de densité optique aux différentes longueurs d'ondes, il nous a paru opportun de tracer les courbes correspondant aux cinq types d'acides humiques obtenus par extraction sodique (fig. 1).

Dès 1956, KONONOVA et BELCHIKOVA considèrent qu'une relation étroite existe entre le degré d'évolution des acides humiques

et leur densité optique, les composés les plus pâles correspondant aux substances les moins polymérisées. Nombreux sont les adeptes de cette théorie ; elle permet de déterminer le degré d'humification d'une matière organique en se référant à l'étude de sa densité optique [SOKOLOV *et al.* (1961), TAN et VAN SCHUYLENBORG (1961)].

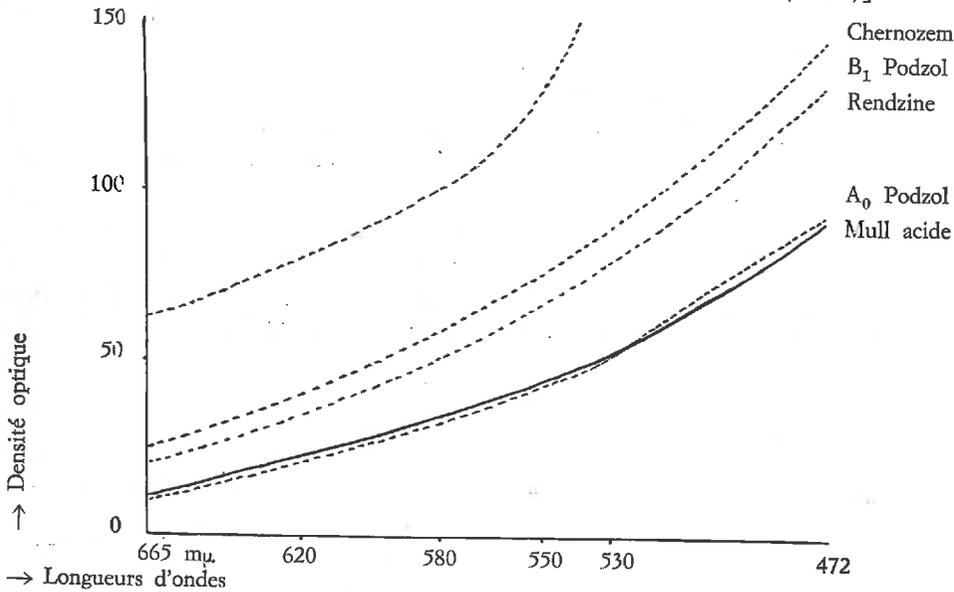


FIGURE 1

Courbes des densités optiques pour cinq types d'acides humiques naturels.

Nos résultats, concrétisés par la figure 1, montrent les variations de teinte de solutions ajustées au même taux de carbone, mais issues de divers acides humiques. Cette évolution est en accord avec les théories généralement admises et concernant le degré d'humification des principaux humus naturels, à l'exception toutefois des acides humiques d'un mull acide de plaine, représentés sur le graphique par la courbe en trait plein. Or, même si cet humus, à minéralisation rapide, n'existe que d'une façon sporadique sous climats continentaux, il nous semble nécessaire de mentionner ce cas particulier dont l'explication sera envisagée après l'étude du rapport Q 4/6.

4°) VARIATIONS DU RAPPORT DE WELTE EN FONCTION DE LA NATURE DE L'HUMUS.

WELTE (1955) estime que ce rapport Q 4/6 varie suivant le type d'humus et serait lié par une relation inverse aux taux d'azote présents dans ces substances.

En comparant nos résultats (cf. tableau 11), nous observons un ordre de classement inverse entre les densités optiques et le rapport Q 4/6. Cependant, il est intéressant d'insister à nouveau sur le cas du mull acide : pour une densité optique voisine d'un A_0 , on note un rapport Q 4/6 très proche de celui d'une rendzine. Or, les auteurs précédemment cités admettent qu'un faible rapport est l'apanage d'acides humiques fortement polymérisés (acides humiques gris) ; par contre, l'augmentation du Q 4/6 témoigne en faveur d'une polymérisation plus faible.

De toute façon, il semble préférable de caractériser un composé humique par l'expression simultanée de ces deux valeurs (densité optique et rapport Q 4/6).

5°) ETUDE DE L'APTITUDE A LA FLOCCULATION.

Les différences d'aptitude des composés humiques à flocculer en présence d'ions calcium sont inscrites dans le tableau 12.

TABLEAU 12

Variations du taux de flocculation suivant le réactif d'extraction pour cinq types d'acides humiques naturels

| Horizons et réactifs d'extraction | Taux de flocculation à | | | | | |
|---|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|
| | 10 m. eq. * | 20 m. eq. | 40 m. eq. | 60 m. eq. | 80 m. eq. | |
| A ₀ : N | louche | 66 | 79 | 84 | 89 | |
| | F | louche | 63 | 80 | 84 | 90 |
| | P | louche | 70 | 79 | 85 | 90 |
| B ₁ : N | 57 | 81 | 87 | 84 | 91 | |
| | F | 67 | 81 | 87 | 90 | 93 |
| | P | 72 | 86 | 89 | 91 | 94 |
| M : N | 35 | 74 | 84 | 90 | 91 | |
| | F | 33 | 64 | 82 | 86 | 88 |
| | P | 22 | 66 | 83 | 86 | 87 |
| R : N | 49 | 83 | 90 | 91 | 93 | |
| | F | 59 | 83 | 90 | 91 | 94 |
| | P | 42 | 79 | 90 | 91 | 98 |
| C : N | 91 | 92 | 98 | 98 | 98 | |
| | F | 94 | 96 | 99 | 99 | 99 |
| | P | 95 | 96 | 99 | 99 | 99 |

N = NaOH N/10 - F = FNa 1 % - P = Na₄P₂O₇ 1 %

* m. eq. = milli-équivalent de calcium par litre.

Comme pour la densité optique, l'influence du réactif d'extraction est peu prononcée ; nous remarquons cependant, dans l'ordre

N. F. P., un faible fléchissement pour un mull acide et une légère augmentation pour les acides humiques de l'horizon d'accumulation d'un podzol.

Tous les humus étudiés flocculent à 80 m. eq. dans des proportions comprises entre 80 et 99 %. Le chiffre le plus significatif correspond donc au taux de flocculation calculé en présence de 10 m. eq. de calcium ; à cette concentration, on note des différences maxima entre les acides humiques. Nous avons tenté d'observer s'il existait des relations entre la densité optique, l'aptitude à la flocculation et le rapport Q 4/6 ; dans ce but, nous comparons les caractéristiques suivantes d'acides humiques naturels obtenus par extraction sodique :

a) densité optique mesurée à 580 m μ , longueur d'ondes où toutes les densités optiques sont lisibles pour des solutions d'acides humiques titrées à 136 mg de carbone par litre ;

b) l'aptitude à flocculer en présence de 10 m. eq. de calcium par litre ;

c) le rapport Q 4/6.

L'ensemble des résultats est rapporté dans le tableau 13.

TABLEAU 13

Comparaison des densités optiques, taux de flocculation et Q 4/6 d'acides humiques naturels

| Horizons | Densité optique | Taux de flocculation | Q 4/6 |
|----------------------|-----------------|----------------------|-------|
| A ₀ | 36 | louche | 5,9 |
| R | 56 | 49 | 5,2 |
| B | 61 | 57 | 4,8 |
| C | 105 | 91 | 3,6 |
| M ₂ | 36,5 | 35 | 5,4 |

Il existe une certaine relation entre la densité optique et le taux de flocculation. Aussi, à l'avenir pour caractériser un composé humique, nous nous contenterons d'exprimer les valeurs des seuils de flocculation, des densités optiques et du rapport Q 4/6.

B) Produits de décomposition « in vitro ».

En premier lieu, notons que les substances humiques formées *in vitro* présentent toujours une coloration beaucoup plus pâle que

celles d'acides humiques naturels, ceci pour une teneur égale en carbone, même s'il s'agit d'un humus brut.

Avant d'entreprendre l'étude des influences respectives des diverses microflores ou de quelques modifications de la nature du milieu (pH — taux d'azote), nous avons, à la suite des travaux de SCHEFFER, ZIECKMANN et PAWELKE (1960), comparé l'étude de la densité optique de produits solubilisés par NaOH avec ou sans extraction préalable aux solvants organiques. Nous ne mentionnerons pas les résultats ; ceux-ci n'entraînent aucune modification dans l'ordre de classement des substances humiques ; toutefois signalons une légère augmentation de la densité optique après traitement à l'alcool. Cette fluctuation pourrait être liée à l'élimination des acides hymatomélaniques, lesquels, d'après KUKHARENKO et YEKATERININA (1960), présentent généralement une faible coloration.

1°) INFLUENCE DE LA MICROFLORE.

Nous examinons successivement les répercussions de ce facteur sur la densité optique, le rapport Q 4/6 et le seuil de floculation.

a) *Etude des variations de la densité optique :*

L'activité des diverses microflores sur la sciure entraîne la formation de substances humiques dont les caractéristiques de teinte sont nettement différentes. Pour les composés issus de la paille, on obtient un rétrécissement de l'éventail des courbes des densités optiques, mais l'ordre de classement reste sensiblement le même. Par contre, avec le Trèfle, tous les composés humiques présentent des teintes voisines. Avant de tirer quelques conclusions de ces faits, nous représentons les courbes des densités optiques obtenues à partir de la sciure, matériel où les divergences en fonction de la microflore sont maxima (fig. 2).

— La courbe représentée en trait plein matérialise les densités optiques du produit obtenu, en faible quantité, par extraction sodique, puis précipitation par HCl, à partir d'une sciure de Hêtre autoclavée, mais non inoculée.

Deux catégories bien distinctes de substances humiques apparaissent immédiatement après observation du graphique :

Après attaque par *Trechispora*, les substances humiques correspondent à des composés très pâles dont la densité optique est inférieure à celle des produits obtenus à partir du témoin, conformément à nos travaux antérieurs (JACQUIN, MANGENOT et VAUTRIN, 1959).

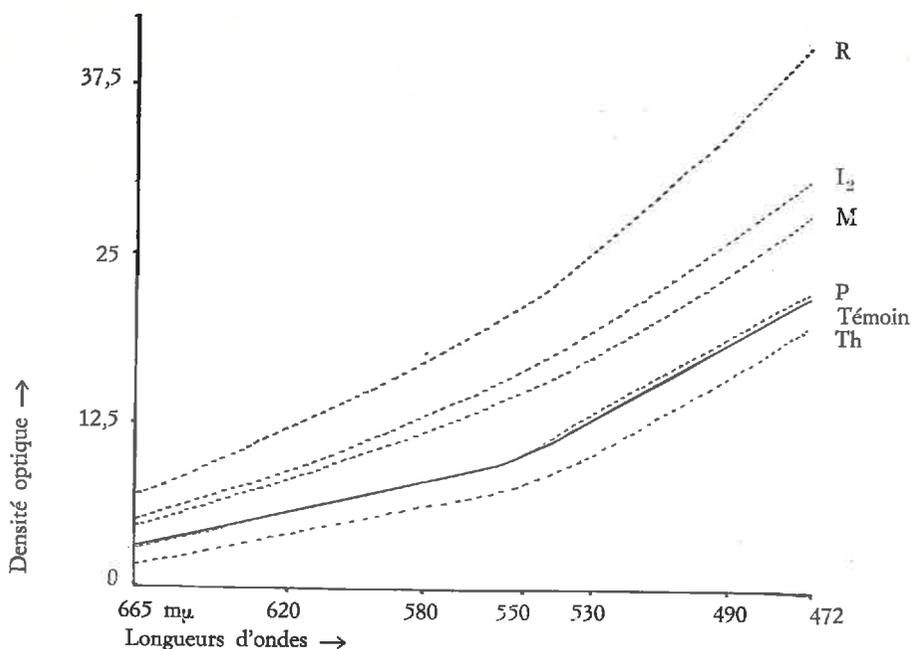


FIGURE 2

Courbes des densités optiques des substances humiques obtenues par décomposition de sciure de Hêtre sous l'influence de diverses microflores.

Après action d'une microflore de podzol, les composés humiques présentent une teinte sensiblement égale à celle des produits de ce même témoin. Nous assistons ensuite à une augmentation de la densité optique dans l'ordre suivant : mull, I n° 2, rendzine. Néanmoins, le maximum atteint après action d'une microflore de rendzine est loin de correspondre à la densité optique des acides humiques naturels d'un humus brut. En effet, dans les mêmes conditions d'étude, on note, à la longueur d'ondes de 472 mμ, une densité voisine de 40 dans le premier cas, alors que, dans le second, on observe un chiffre de 95, donc plus de deux fois supérieur.

De l'ensemble des résultats obtenus avec les trois substrats, il ressort le fait suivant : plus le matériel est pauvre en azote, plus l'influence de la microflore semble prépondérante. A l'opposé, pour un substrat à rapport C/N faible (inférieur à 12), nous ne relevons que des différences insignifiantes dans les caractéristiques des substances humiques résultant de l'action des diverses micro-

flores. Si les valeurs des densités optiques mesurées à 472 m μ varient entre 18,5 et 40 pour les substances humiques issues de sciure, nous constatons une homogénéité beaucoup plus grande dans le cas du Trèfle où les valeurs de densité optique s'échelonnent entre 60 et 68 ; cependant à un écart restreint correspond un degré de condensation plus élevé, celui-ci restant toutefois inférieur à celui rencontré dans un A₀ de podzol.

b) *Etude des variations du rapport Q 4/6 :*

L'ensemble des résultats représentés dans le tableau 14 indique une variation inverse des valeurs du rapport Q 4/6 suivant que les inoculum agissent sur sciure ou Trèfle.

TABLEAU 14

Variations du Q 4/6 en fonction du substrat et de l'inoculum

| Inoculum | Substrats | | |
|----------------------|-----------|--------|--------|
| | Sciure | Paille | Trèfle |
| Témoin | 6 | 7 | 9,9 |
| Podzol | 8,2 | 4,8 | 5,9 |
| Mull | 5,8 | 6 | 8,5 |
| Rendzine | 5,6 | 5,5 | 8,7 |
| I ₂ | 6,5 | 5,3 | 8,4 |
| Th | 9,4 | 10 | 5,8 |

Dans le cas de la sciure, la dégradation d'une substance fortement lignifiée s'accompagne d'une libération de produits peu colorés et vraisemblablement peu polymérisés. Cette production se traduit par une augmentation très nette du Q 4/6 surtout avec Th et P. Au contraire, les autres inoculum accusent une légère diminution du Q 4/6, celle-ci, certainement consécutive à l'action de microflore variées engendrant la formation de substances humiques plus condensées.

Avec un substrat également ligneux, mais à faible rapport C/N comme le Trèfle, nous assistons à l'apparition de substances humiques plus condensées et plus colorées. Celles-ci résultent certainement d'une interaction entre produits du métabolisme des champignons lignivores, tels que des phénols (HENDERSON, 1955) ou des polysaccharides (BERNIER, 1958) et l'azote contenu dans ce matériel.

Sur la paille, seule l'action de Th donne des composés de forts Q 4/6. Les inoculum mixtes au contraire produisent des substances plus polymérisées.

c) *Aptitude à la floculation :*

Le tableau 14 bis, résumant les taux de floculation, suggère quelques comparaisons.

| Substrats et Inoculum | Taux de floculation | | | | |
|-----------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 20 m. eq. | 30 m. eq. | 40 m. eq. | 60 m. eq. | 80 m. eq. |
| Sciure : R | 7,5 | 22,2 | 33,3 | 63,8 | 75,8 |
| M | | 3,7 | 32 | 69,1 | 75,8 |
| P | | | 13,3 | 54,9 | 67,7 |
| I ₂ | | | 4,2 | 48,8 | 70,1 |
| Th | | | 3,9 | 31 | 56,9 |
| Paille : R | | | 43,8 | 59,7 | 73,5 |
| M | | | 37,5 | 50,3 | 67,1 |
| P | | | 22,3 | 51 | 65,2 |
| I ₂ | | | 5 | 45,5 | 66 |
| Th | | | | 19,1 | 32,5 |
| Trèfle : R | | 8 | 35 | 55,8 | 69,9 |
| M | | 3,6 | 48 | 72 | 74,4 |
| P | | 15,8 | 40 | 51,3 | 76 |
| I ₂ | | 5,7 | 35,4 | 55,6 | 68,8 |
| Th | | 14,7 | 25,6 | 30,2 | 70,2 |

Si, au cours de la formation de substances humiques *in vitro*, on obtient toujours des produits floculables par H⁺, ceux-ci se révèlent beaucoup moins sensibles aux ions Ca⁺⁺. Après un bref calcul, notons que le taux de floculation de 50 % se rencontre pour tous les inoculum mixtes pour une concentration en électrolytes inférieure à 65 m. eq. Par contre, avec la souche pure de lignivore, le même taux de floculation nécessite respectivement 67,5 m. eq. avec le Trèfle, 71 avec sciure et une concentration supérieure à 80 m. eq. avec paille. Ceci montre, une fois de plus, que l'attaque d'un substrat par *Trechispora* donne lieu à une production de substances humiques particulièrement peu condensées. La signification de ces résultats s'accroît encore par une comparaison avec les acides humiques d'un A₀ de podzol où pour 30 m. eq., on note un taux de floculation voisin de 75 %.

2°) INFLUENCE D'UN APPORT DE CARBONATE DE CALCIUM ET D'AZOTE.

Nous avons seulement comparé l'influence de ces facteurs sur la densité optique de substances humiques obtenues après incubation de paille en présence d'une microflore de mull. Trois séries de fioles sont préparées contenant respectivement les milieux suivants :

- paille ;
- paille additionnée d'asparagine de manière à obtenir un C/N de 15, voisin de celui du trèfle ;
- paille additionnée de 5 % de carbonate de calcium.

Les substances humiques sont toujours comparées aux extraits sodiques d'un témoin non inoculé ; la figure 3 concrétise les différentes valeurs des densités optiques.

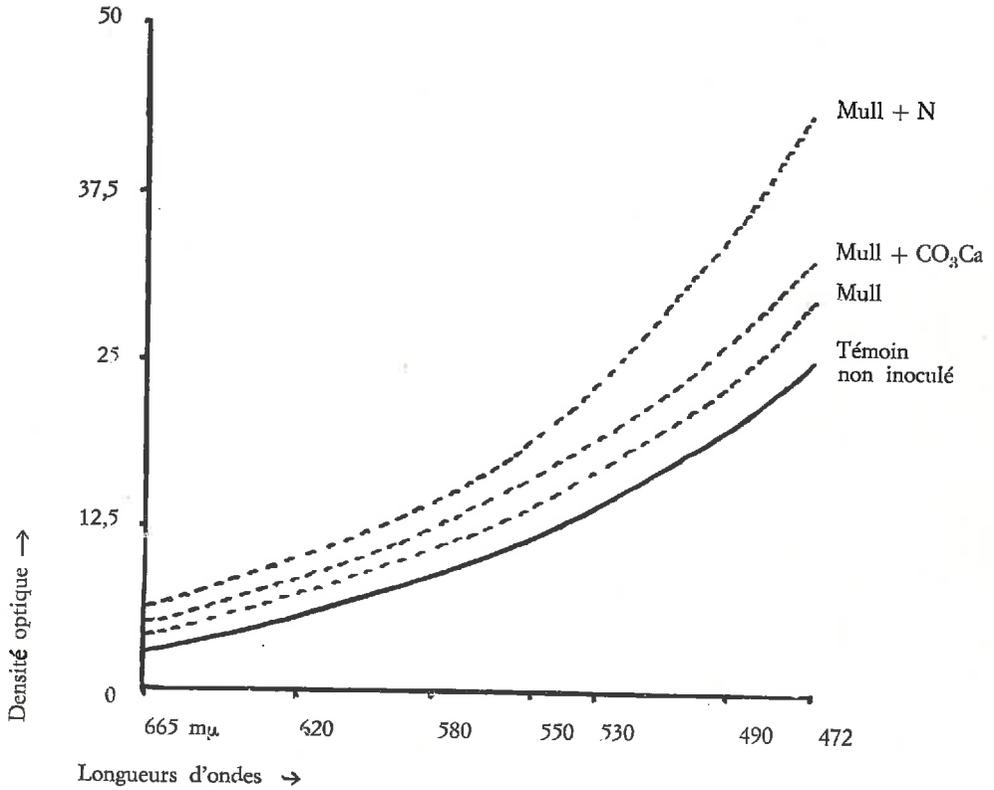


FIGURE 3

Influence d'un apport d'azote ou de carbonate de calcium sur les densités optiques de substances humiques obtenues par décomposition du substrat paille par une microflore de mull.

Si l'augmentation des valeurs de la densité optique n'est pas négligeable, en présence de carbonate de calcium, l'accroissement est beaucoup plus net si l'on apporte un complément d'azote. L'étude des valeurs des rapports Q 4/6 montre une variation inverse avec celle des densités optiques et les résultats correspondent aux données ci-dessous :

| | |
|---|-----|
| — Paille autoclavée, mais non inoculée | 7 |
| — Paille inoculée avec Mull | 6,5 |
| — Paille inoculée avec Mull en présence de CO ₃ Ca | 5,4 |
| — Paille inoculée avec Mull en présence d'azote | 5,2 |

On enregistre donc une augmentation du degré de polymérisation en présence de CO₃Ca et d'azote. COULSON, DAVIES et LEWIS (1960 a) mentionnent l'influence favorable du calcium sur la condensation des molécules humiques. Une élévation du taux de polymérisation en présence d'azote s'avère conforme à l'ensemble de nos résultats et mérite d'être l'objet de recherches plus poussées ; un travail complémentaire concernant l'action du pH et du taux d'azote en fonction des diverses microflores* est entrepris ; il complètera ultérieurement ces premières recherches.

C) Discussion.

Dans le cas d'un substrat pauvre en azote, mais riche en lignine (paille de Blé et surtout sciure de Hêtre), nous assistons à la production de substances humiques peu polymérisées ; le degré de condensation diminue en fonction d'une activité lignivore croissante.

L'activité des inoculum mixtes, au contraire, se traduit par une synthèse de substances humiques plus condensées. Nous retrouvons là les deux schémas relatifs à la formation des composés humiques déjà signalés en 1959 (JACQUIN et MANGENOT). Cependant si nous rapprochons ces observations de l'étude de nos résultats quantitatifs (cf. tableau 9), il apparaît nettement que la richesse en azote du substrat joue un rôle prépondérant sur le degré d'humification, surtout s'il existe une forte activité lignivore. En effet, le rapport substances humiques - substances fulviques passe de 0,64, lors de la décomposition d'une sciure, à plus de 32 avec le Trèfle ; dans ce dernier cas, on enregistre une présence pour ainsi dire exclusive des substances humiques au détriment des acides fulviques. Nous suggérons donc la possibilité d'une polymérisation entre produits issus de la dégradation de la lignine et l'azote présents dans le substrat.

III. - LIGNINE ET FRACTION NON HYDROLYSABLE

A) Humus naturels.

Si l'on admet que l'extraction sodique entraîne une certaine quantité de lignine, il peut être légitime d'appliquer aux acides humiques les méthodes de dosage de cette substance. Après dessiccation à 105° et pulvérisation des acides humiques naturels, nous en déterminons la fraction hydrolysable. Dans ce but, nous employons la méthode de FOREST ; les acides humiques sont donc traités par l'acide sulfurique à 72 %. Les résultats, exprimés en pourcentage des substances non hydrolysables par rapport au poids de matière sèche initiale, correspondent aux valeurs suivantes :

| | |
|----------------------|--------|
| A ₀ | 54,7 % |
| M | 51 % |
| R | 47 % |
| B | 45,2 % |
| C | 38,5 % |

Ces chiffres montrent une diminution de la fraction non hydrolysable dans une série d'humus allant d'un podzol à un chernozem.

MAYAUDON et SIMONART (1959 b), étudiant les produits de décomposition d'une paille de riz, suggèrent que les substances quaternaires retrouvées dans la fraction hydrolysable proviennent du métabolisme microbien, tandis que la fraction non hydrolysable serait principalement élaborée aux dépens de la lignine ou des substances phénoliques.

Pour un A₀, nous constatons un taux élevé de produits non hydrolysables, celui-ci pourrait résulter d'une solubilisation partielle de lignine plus ou moins dégradée, au cours de l'extraction sodique (TINSLEY et SALAM, 1961 a).

De même, dans un mull acide, malgré une rapide minéralisation de la matière organique, il est probable que le pourcentage élevé de la fraction non hydrolysable représente la lignine résistant aux attaques microbiennes.

Dans les horizons A₀ et M, la lignine serait donc très peu altérée par les microflores respectives d'où le pourcentage élevé de substances non hydrolysables dans les extraits sodiques.

D'autre part, la diminution de la fraction non hydrolysable dans les acides humiques de chernozem découlerait d'une végétation à prédominance de graminées en régions steppiques. Or, ces végétaux, surtout dans les premiers stades de leur développement, produisent une matière organique relativement pauvre en lignine.

B) Substances végétales.

1°) COMPARAISON DES MÉTHODES SALO ET DE FOREST.

Pour les substances végétales, on admet couramment l'existence d'une relation étroite entre la richesse du matériel en lignine et l'importance de la fraction non hydrolysable. Nous comparons ici deux méthodes de dosage de la lignine : méthode de FOREST (1946) et SALO (1957). Le poids des cendres et le taux d'azote sont déterminés sur la fraction non hydrolysable ; dans les deux cas, le taux de cendres se révèle sensiblement identique et, d'autre part, le pourcentage d'azote ne présente pas de différence significative. Le tableau 15 permet une comparaison entre les deux méthodes.

TABLEAU 15
Comparaison de deux méthodes de dosage de la lignine

| Substrats | Méthode DE FOREST | | | | Méthode SALO | |
|------------------------|---------------------------|------|-----------|----------|---------------------------|----------|
| | Fraction non hydrolysable | N % | Cendres % | % réel * | Fraction non hydrolysable | % réel * |
| Sciure de Hêtre | 25,49 | 0,38 | 3,9 | 23,9 | 16,2 | 15,2 |
| Paille de Blé | 24,84 | 0,91 | 6,7 | 21,75 | 13,1 | 11,47 |
| Trèfle à maturité | 28,23 | 3,44 | 3,1 | 21,25 | 19,2 | 14,86 |

* Le pourcentage à déduire correspond à la somme des taux de protéines ($N \times 6,25$) et de cendres.

La méthode SALO indique donc un pourcentage de lignine plus faible, l'hydrolyse préalable libérant des composés intermédiaires (polysaccharides) qui pourraient être insolubilisés lors de l'attaque brutale par H_2SO_4 concentré. Ce processus est particulièrement net avec la paille. Cependant, BRUSCHE (1960), après une étude critique, reconnaît comme très valable la méthode de KLASON, dont celle de FOREST est une simple application. D'autre part, comme le mentionnent JACQUIN et MANGENOT (1959), pour suivre l'évolution de la substance végétale, il semble essentiel de renoncer à l'extraction préalable aux solvants organiques ; ceux-ci pouvant entraîner des quantités appréciables de lignine plus ou moins transformée, surtout dans le cas d'un matériel déjà altéré. Aussi pour nos études comparatives, avons-nous utilisé la méthode de FOREST.

2°) INFLUENCE DE LA MICROFLORE.

Après dix-huit mois de dégradation, nous comparons le taux de décomposition (calculé par rapport au poids initial de matière

sèche) au taux de substances non hydrolysables ; ce dernier s'exprime en pourcentage du résidu d'incubation ; néanmoins, avant hydrolyse nous éliminons et dosons les substances extractibles à la soude.

Le tableau 16 permet une comparaison de ces valeurs.

Toutefois, il convient de rapporter la lignine retrouvée en fin d'expérience à celle présente dans le substrat initial, en calculant l'indice L.

$$L = \frac{\text{taux final non hydrolysable} \times \text{poids final total}}{\text{taux initial non hydrolysable} \times \text{poids initial}}$$

Cet indice peut être supérieur à 100, ce qui s'explique soit par une condensation de produits intermédiaires sous l'influence de H₂SO₄ (FREYTAG, 1961), soit par la synthèse de substances non hydrolysables.

TABLEAU 16

Comparaison des taux de décomposition à la fraction non hydrolysable, aux indices L et aux quantités de substances humiques après dix-huit mois d'incubation

| Microflores et substrats | Taux de décomposition % | Fraction non hydrolysable % | Indices L | Substances humiques exprimées en ml de KMnO ₄ par g de matière sèche | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------|---|------|
| Témoins : S | 0,2 | 24,5 | | 1,6 ml/g | |
| | P | 0,3 | | 2,4 | |
| | T | 0,7 | | 2,8 | |
| Podzol : S | 11,3 | 27,9 | 74 | 2,8 | |
| | P | 40,7 | 69 | 22,1 | |
| | T | 44,5 | 38,85 | 80 | 13,1 |
| Mull : S | 14,2 | 31,1 | 101 | 2,9 | |
| | P | 44,4 | 103 | 20,3 | |
| | T | 50,95 | 49,35 | 96 | 15,9 |
| Rendzine : S | 9,4 | 25,9 | 89 | 3,4 | |
| | P | 37,5 | 32,65 | 115 | 12,8 |
| | T | 39,7 | 46,1 | 110 | 6,3 |
| I ₂ : S | 8,75 | 31,8 | 109 | 3,5 | |
| | P | 40,85 | 30,2 | 101 | 23,2 |
| | T | 41,95 | 45,4 | 104 | 11,3 |
| Th : S | 28,6 | 17,1 | 46 | 7,4 | |
| | P | 43,1 | 23,7 | 76 | 12,8 |
| | T | 17,6 | 32,7 | 107 | 6,1 |

S = Sciure - P = Paille - T = Trèfle.

Ce tableau met en relief les faits fondamentaux suivants :

a) Il permet de constater une baisse de la teneur en substances non hydrolysables sous l'influence d'une microflore de podzol. Ce phénomène est encore plus net sous l'action de *Trechispora* à l'exception du substrat Trèfle : en effet, l'indice L s'abaisse au-dessous de 50 % dans la sciure attaquée par ce champignon. En relation avec cette disparition d'une partie de la lignine, on assiste à la production d'une grande quantité d'acides fulviques et de substances humiques peu polymérisées. Il est donc possible d'envisager que la lignine constitue, dans ce cas, la matière première des acides fulviques et humiques ;

b) Avec les inoculums de mull, I₂ et rendzine (exception faite de ce dernier sur sciure), on note une valeur de la fraction non hydrolysable sensiblement constante ou même légèrement accrue. Toutefois, comme un taux de décomposition élevé révèle une dégradation active, les acides humiques pourraient se former aux dépens de matériaux différents de la lignine. En effet, tout récemment GREENE et STEELINK (1962) viennent de mettre en évidence la présence d'acide 3-5 dihydroxybenzoïque dans les acides humiques ; les auteurs suggèrent que certains composés phénoliques des plantes, autres que la lignine, peuvent être incorporés dans la formation de molécules humiques ;

c) La microflore de podzol fournit des résultats intermédiaires entre ceux de lignivore (Th) et ceux des autres inoculums. Nous sommes amené à attribuer à ces acides humiques une origine mixte ;

d) La flore de rendzine agit sur la sciure d'une façon bien particulière. Après un certain temps d'incubation, le produit de teinte d'abord foncée, s'éclaircit et des taches blanchâtres apparaissent. En relation avec ce phénomène, l'acidité augmente et le taux de substances non hydrolysables diminue. Tous ces faits semblent confirmer le début d'activité d'une souche lignivore jusqu'alors restée à l'état latent, peut être en raison des phénomènes de concurrence vitale ;

e) Il est intéressant de noter que le pourcentage d'azote dans la fraction non hydrolysable varie fortement en fonction de la microflore. Dans le cas d'une sciure-témoin, nous observons 0,38 % d'azote total. Ce pourcentage s'élève aux environs de 0,8 avec les inoculums mixtes, pour atteindre 2,3 % avec *Trechispora*. Cette fluctuation, également remarquée par MANGENOT et REYMOND (1963), pourrait être liée au métabolisme des organismes présents dans les différents inoculums. On peut imaginer que les produits résultant de l'attaque du champignon lignivore (phénols) se combinent à l'azote du substrat pour former des complexes « polyphénols - protéines » résistant à l'hydrolyse (HANDLEY, 1954).

CHAPITRE III

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

L'électrophorèse sur papier permet un fractionnement des substances humiques en fonction des différences de « mobilité » dans un champ électrique. Nos travaux, relatifs à la caractérisation des acides humiques (MANGENOT et JACQUIN, 1960), nous ont amenés à étudier ce procédé de séparation (JACQUIN, 1961). Comme dans toute méthode, il faut tenir compte de l'intervention de plusieurs facteurs : parmi les plus importants, citons la différence de potentiel et les caractéristiques de la solution tampon.

I. - DIFFERENCE DE POTENTIEL

Le déplacement des substances humiques varie en fonction du voltage. NODA et IBA (1958) se réfèrent aux publications de SCHEFFER et *al.* (1955) pour comparer les résultats obtenus soit en utilisant une forte différence de potentiel, soit par l'emploi d'un faible voltage. Une différence de potentiel de 50 volts/cm améliore très peu le fractionnement, par contre l'accentuation de phénomènes secondaires, tel le dégagement calorifique, nécessite un appareillage plus complexe. Aussi, ces auteurs préconisent-ils l'utilisation d'une différence de potentiel de l'ordre de 5 à 20 volts. Comme à l'intérieur de ces limites, on n'enregistre pas de variations notables, nous employons 7 volts/cm.

II. - SOLUTION TAMPON

La nature de la solution tampon n'intervient que s'il existe une possibilité de réaction entre cette solution et les substances humiques. Par contre, l'influence du pH est importante. SCHEFFER et *al.* (1955) indiquent un optimum de 8,6. WRIGHT et *al.* (1958) étudiant la mobilité des constituants humiques signalent un maximum de déplacement au voisinage de la neutralité. COULSON et *al.* (1959 b) n'enregistrent aucune migration à pH 3,09, mais des différences nettes de mobilité se manifestent déjà pour une valeur de 6,4.

Après plusieurs essais, nous avons retenu deux solutions tampons :

A) Tampon de CLARK et LUBS décrit par BRUNEL (1948) afin d'obtenir un pH de 7,4 et comprenant les solutions suivantes :

| | |
|---|--------|
| — Solution de phosphate monopotassique M/5 .. | 50 ml |
| — Solution NaOH N/5 | 30 ml |
| — H ₂ O distillée q. s. pour | 200 ml |

B) Tampon Borax, de pH 9, préconisé par COULSON et EVANS (1958), puis utilisé par JOHNSTON (1959), WALDRON et MORTENSEN (1961) :

— Solution de tétraborate de sodium à 9,54 g par litre d'eau distillée.

III. - PREPARATION DES SOLUTIONS D'ACIDES HUMIQUES

COULSON et *al.* (1959 b) montrent l'identité des résultats obtenus en partant d'une solution d'acides humiques dans un milieu tampon de pH élevé ou dans NaOH N/10.

Les acides humiques, après précipitation par l'acide chlorhydrique, sont centrifugés, puis lavés, d'abord par HCl 0,1 N, ensuite par l'eau distillée jusqu'à l'apparition d'un liquide légèrement coloré. Les acides humiques sont enfin dissous dans une solution sodique N et ce, en général, dans les proportions de 5 % (P/V). Cependant, l'influence de la concentration en acides humiques sur la répartition des différentes fractions se révèle faible, ce qui nous permet d'étudier, le cas échéant, de très petites quantités de substance dissoute dans un minimum de solution sodique.

IV. - MODE OPERATOIRE

A) Préparation de la cuve à électrophorèse (Frentz, 1960).

On remplit les compartiments latéraux jusqu'à un centimètre du bord avec environ 300 ml de solution tampon. Le niveau est

uniformisé à l'aide d'une communication temporaire. Cette précaution indispensable évite les courants hydrauliques dans le papier. Ensuite, un débit constant, mais faible, de la solution électrolytique est assuré dans chaque compartiment. La liaison avec le tonnelet réservoir s'établit par un tube en verre en forme d'Y. L'excédent du liquide, après passage dans la cuve, est recueilli dans deux flacons ; après homogénéisation, on peut utiliser la même solution tampon pour cinq à six électrophorèses. En outre, il est recommandé d'inverser les électrodes de temps à autre, de manière à éviter toute polarisation unilatérale.

B) Préparation des bandes de papier.

La nature du papier filtre n'intervient pratiquement pas sur les diagrammes d'électrophorèse, aussi utilisons-nous des bandes de papier Arches 302 généralement de 270×70 mm. Celles-ci sont toujours découpées perpendiculairement à la trame du papier.

C) Dépôt des solutions.

Les solutions sont déposées à l'aide de micropipettes graduées, à raison de quarante microlitres pour une bande de papier de 70 mm de largeur. Le dépôt se fait suivant un tracé actif situé à 6 cm de l'extrémité de la bande de papier, côté cathode. La répartition doit être régulière, sans approcher toutefois à plus de 5 mm des deux bords. Pour cette manipulation délicate, nous préconisons une insufflation légère, de façon à ne pas créer de bulles sur le papier. Toute irrégularité dans la répartition se traduit par une irrégularité de migration. Plusieurs méthodes sont successivement expérimentées :

1°) Dépôt des substances humiques sur une bande de papier sec : l'imprégnation par la solution électrolytique a lieu dans un bain, tout en laissant émerger la zone de dépôt. Ensuite, on fixe immédiatement la bande de papier sur le support de l'appareil à électrophorèse, très rapidement par capillarité, une imbibition complète se réalise. Ce procédé, s'il permet une répartition plus homogène, possède un inconvénient : la dessiccation des substances humiques modifie légèrement la répartition entre acides humiques gris et acides humiques bruns.

2°) Les bandes de papier sont fixées dans le cadre support et introduites dans la cuve à électrophorèse : le tampon monte par capillarité dans le papier et l'imbibe en totalité après une demi-heure. Les déposes sont alors effectuées. Nous avons constaté que la ligne médiane de jonction perturbe légèrement la migration des substances très mobiles.

3°) Finalement, nous conseillons d'imprégner les bandes par une immersion complète et rapide. Celles-ci sont ensuite fixées sur le support et laissées un quart d'heure dans l'enceinte de la cuve à électrophorèse. Après ce laps de temps, on procède au dépôt des solutions humiques.

D) Electrophorèse.

Le passage du courant est maintenu pendant trois heures. Cette durée permet une bonne séparation, les substances colorées les plus mobiles migrant d'environ 12 cm. Ensuite, les électrophorégrammes sont séchés horizontalement à la température du laboratoire.

E) Observations.

1°) EN LUMIÈRE VISIBLE.

L'examen des électrophorégrammes montre immédiatement un fractionnement des acides humiques en plusieurs bandes colorées. Ces bandes plus ou moins diffuses caractérisent donc le pouvoir migrateur dans un champ électrique. L'observation directe donne une première estimation ; cependant, une méthode plus précise s'impose afin de déterminer avec rigueur la position et l'importance de chaque fraction.

2°) A L'AIDE D'UN PHOTOMÈTRE ENREGISTREUR ZEISS II.

Cet appareil permet de mesurer d'une façon automatique l'intensité de la coloration des différentes bandes : les meilleurs enregistrements correspondent à des électrophorégrammes dont la largeur est de 4 cm, de cette façon, la bande colorée coïncide exactement avec la fente du photomètre. Nous pouvons ainsi établir un graphique des aires en fonction de la « densité optique ». Ensuite, l'évaluation des surfaces délimitées par les secteurs correspondant aux bandes colorées permet d'obtenir la proportion des différents acides humiques ainsi séparés. Dans ce travail, nous nous sommes bornés à distinguer deux fractions, l'une de grande mobilité, la seconde peu ou pas mobile.

3°) EN LUMIÈRE DE WOOD.

En observant avec une lampe Pleuger (3 600 Å), avec exposition des électrophorégrammes soit aux vapeurs acides, soit aux vapeurs ammoniacales, nous ne remarquons aucune différence significative.

4°) OBSERVATION APRÈS PULVÉRISATION SUR LES ÉLECTROPHORÉGRAMMES DE RÉACTIFS CARACTÉRISTIQUES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES.

La préparation et l'utilisation de ces réactifs sont conformes aux procédés indiqués lors de l'étude chromatographique (cf. chapitre IV).

RÉSULTATS

DE L'ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE

I. - HUMUS NATURELS

L'observation des électrophorogrammes d'acides humiques naturels montre très nettement deux fractions principales : l'une, généralement de teinte grise et de faible mobilité ; l'autre, toujours de teinte brune et de forte mobilité.

Cette séparation des acides humiques a déjà été obtenue par différents auteurs, dont nous rappellerons brièvement les travaux et les résultats essentiels.

A) Données bibliographiques.

La définition de deux types d'acides humiques gris et bruns de SPRINGER a été reprise par DUCHAUFOUR (1954) avec un essai de séparation des deux fractions.

Lors des premières études par électrophorèse de substances humiques de synthèse, SCHEFFER et *al.* (1955) distinguent deux fractions qui correspondent par la teinte aux acides humiques bruns et gris.

COULSON et *al.* (1959 b), à partir d'un acide humique de tourbe, observent trois groupes de substances : la première fraction ne migre pas, en raison de sa neutralité électrique ou de son adsorption par le papier ; la seconde, très mobile, comprendrait une substance très simple ou un groupe de substances étroitement apparentées ; la traînée intermédiaire proviendrait de l'adsorption continue de substances de mobilité croissante.

KAURITCHEV et *al.* (1960), par l'emploi de l'électrophorèse continue, apportent des résultats intéressants. Ils comparent différents acides humiques naturels obtenus par extraction sodique N/10. Ces auteurs constatent que les électrophorogrammes diffèrent essen-

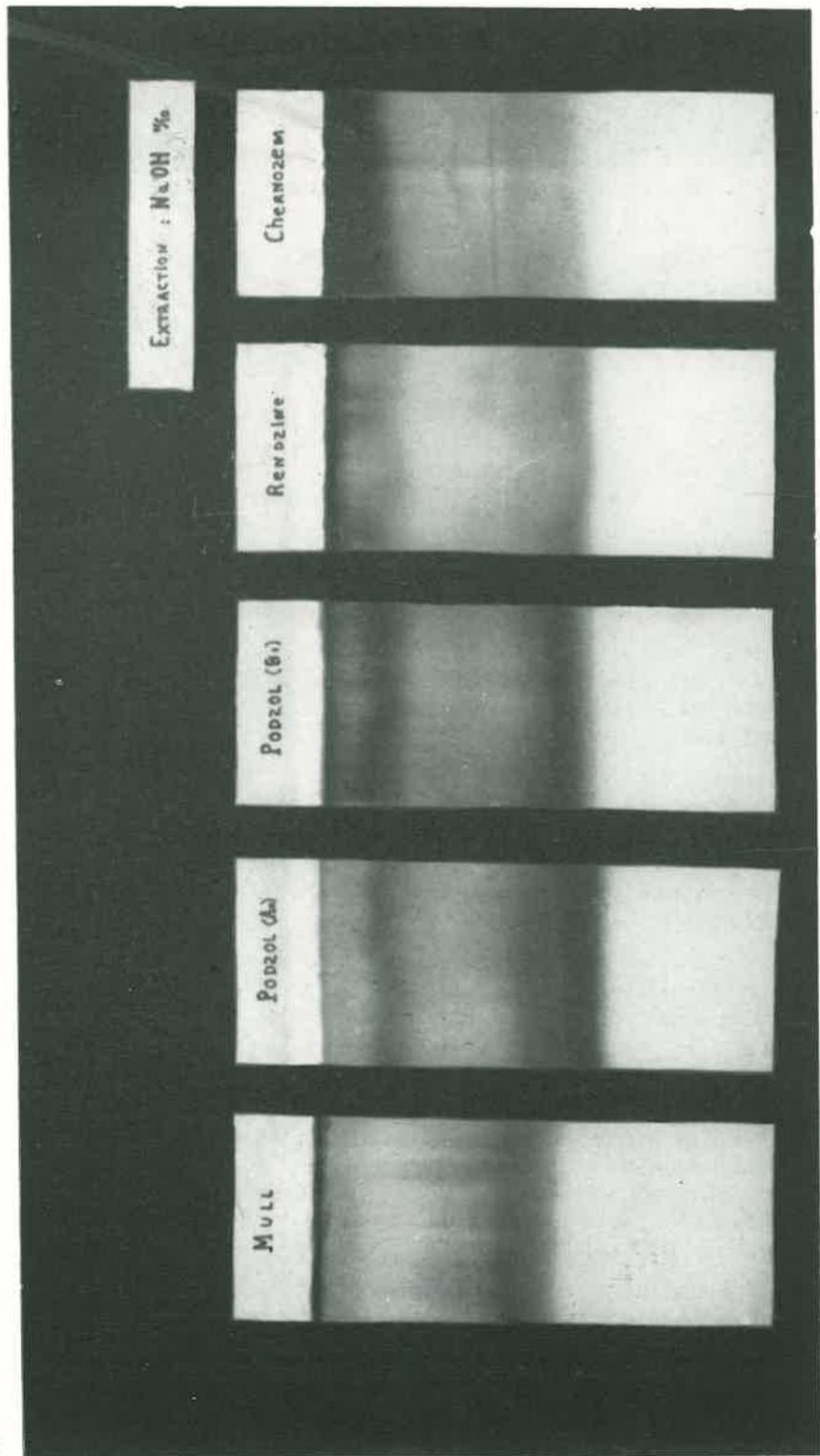


PLANCHE 2
Electrophotogrammes de cinq acides humiques naturels

tiellement entre eux, par la forme et la teinte des fractions, grise ou brune. Etudiant la corrélation entre la mobilité des substances et leur coefficient d'extinction (Q 4/6 de Welte), ils observent que les fractions les plus mobiles possèdent un coefficient augmentant avec la rapidité de migration vers l'anode. KAURITCHEV et *al.* supposent qu'une grande mobilité est liée à une structure simple. Dans la série des humus issus de : chernozem - solonetz - podzol - krasnozem, la bande formée par les fractions grises diminue progressivement pour, finalement, disparaître ; inversement, la bande des fractions brunes s'accroît.

La combinaison des fractionnements chimique et électrophorétique (DUCHAUFOR et JACQUIN, 1963) conduit à une séparation plus poussée des différentes fractions présentes dans les acides humiques. Les résultats de cette méthode, très intéressants pour les humus évolués, présentent une valeur moindre pour les horizons organiques. Aussi, pour comparer des produits d'humification peu polymérisés à un humus brut, nous nous contentons de l'emploi de l'électrophorèse.

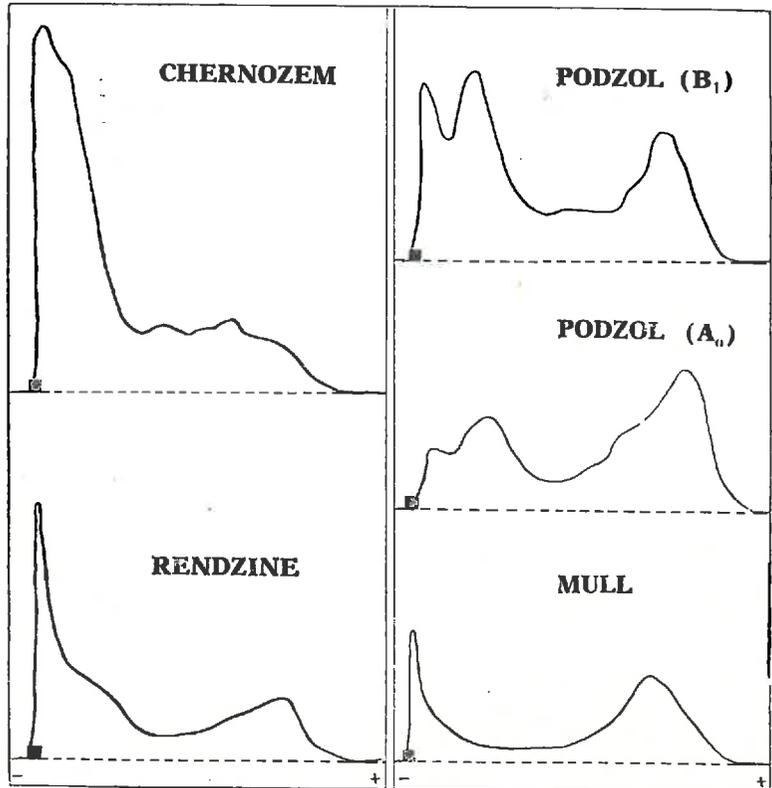
B) Résultats de nos recherches.

1°) EXAMEN DES ÉLECTROPHORÉGRAMMES EN LUMIÈRE VISIBLE (planche 2) :

- a) *Chernozem*. — Nous constatons une nette prédominance des fractions grises. La fraction brune dans cet humus est seulement représentée par quelques bandes d'intensité très faible.
- b) *Rendzine*. — Si l'on admet une liaison entre le degré de polymérisation et la mobilité, les fractions les plus polymérisées l'emportent sur les fractions brunes. DUCHAUFOR (1960 a) aboutit à la même conclusion en se basant sur une méthode de séparation par voie chimique.
- c) *B₁ Podzol*. — Il existe une fraction très importante comprenant essentiellement des produits intermédiaires résultant sans doute d'une polymérisation des substances solubles entraînées de l'horizon supérieur.
- d) *A₀ Podzol*. — Dans les horizons superficiels de ce podzol, la fraction brune domine incontestablement et la fraction grise est réduite.
- e) *Mull forestier*. — Quant aux acides humiques issus de ce mull, ils se comportent tout différemment : l'absence totale de la fraction grise est frappante, en effet, s'il existe une bande non mobile, assez importante, celle-ci présente une couleur brun-ocre très caractéristique.

Les courbes enregistrées au photomètre ZEISS II, à partir des différents électrophorégrammes, sont représentées ci-après (fig. 4).

FIGURE 4
Enregistrements d'électrophorégrammes d'acides humiques naturels
(Tampon phosphate)



— enregistrement de la densité optique des différents acides humiques après migrations électrophorétiques.
- - - - Tracé de la densité optique d'un papier vierge.
■ Tiret matérialisant l'endroit de chaque dépose.

La séparation en deux fractions principales est très nette, de sorte qu'il est possible de calculer le rapport fraction peu mobile / fraction mobile. Notons que la première correspond aux acides humiques de teinte grise, sauf pour le mull forestier, et la seconde aux acides humiques bruns. Après expérimentation sur plusieurs échantillons, nous pouvons énoncer les résultats suivants :

— Chernozem : le rapport fraction peu mobile - fraction mobile est toujours supérieur à 6 ;

- Rendzine et horizon d'accumulation d'un podzol : rapport généralement compris entre 1 et 2 ;
- Horizon organique d'un podzol et horizon A₁ d'un mull : rapport inférieur à l'unité.

2°) EXAMEN DES ÉLECTROPHORÉGRAMMES EN LUMIÈRE DE WOOD :

On observe une fluorescence blanc-bleuté vers l'anode au-delà des fractions brunes. Son intensité paraît liée à celle de ces fractions. Par contre, aux bandes grises, se superpose une fluorescence rose-saumon plus ou moins intense, sauf sur les fractions immobiles où elle n'existe pas.

Ici encore, il faut mettre à part les acides humiques issus d'un mull forestier où l'absence de la fluorescence saumon est de règle, ce qui confirme l'absence d'acides humiques gris dans cet humus. La discrimination entre cet horizon et les autres s'accroît encore par l'apparition d'une fluorescence jaune-orange très nette et bien délimitée, dans une zone de faible mobilité.

3°) ACTION DES RÉACTIFS CARACTÉRISTIQUES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PULVÉRISÉS SUR LES ÉLECTROPHORÉGRAMMES :

Des réactions positives apparaissent seulement dans une bande très mobile et non visible sur les électrophorégrammes par l'observation directe. Cette zone, migrant davantage vers l'anode que celle de la fraction brune, réagit avec la benzidine diazotée, le chlorure ferrique et surtout le nitrate d'argent ammoniacal. Ce fait significatif prouve que seuls réagissent les corps peu condensés et très mobiles. Ces substances simples et non colorées pourraient jouer un rôle dans la formation de l'édifice moléculaire des composés humiques.

On peut rapprocher de ce travail une étude similaire de KONONOVA et TITOVA (1961). Ces deux auteurs pulvérisent sur les électrophorégrammes une solution de ferrocyanure de potassium, afin de mettre en évidence la présence de fer dans les acides humiques.

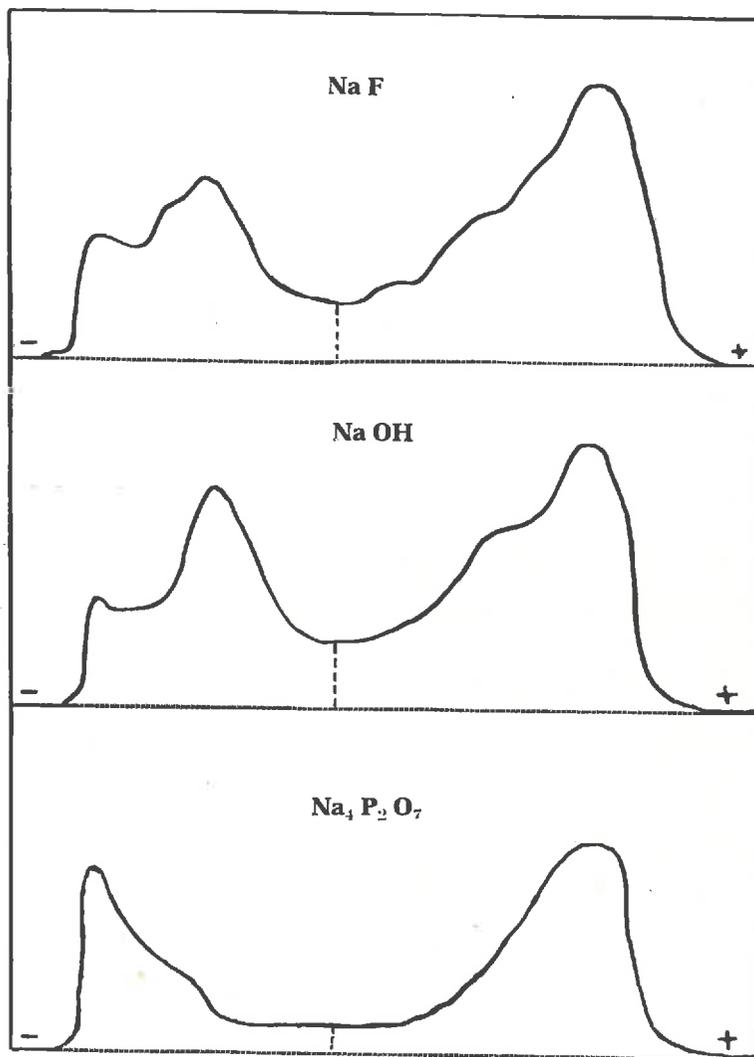
4°) INFLUENCE DU RÉACTIF D'EXTRACTION SUR LES ÉLECTROPHORÉGRAMMES D'ACIDES HUMIQUES NATURELS :

Nous comparons ici les acides humiques d'un A₀ de podzol extraits soit par NaF, NaOH ou Na₄P₂O₇. Les trois courbes obtenues par l'enregistrement des électrophorégrammes sont représentées ci-après (fig. 5).

A priori, l'influence du mode d'extraction devrait jouer au maximum avec cet horizon organique où l'on rencontre de nombreux

FIGURE 5

Influence du réactif d'extraction sur l'enregistrement d'électrophorégrammes d'acides humiques d'un humus brut (Tampon phosphate)



- Tracé de la densité optique d'un papier vierge.
- Enregistrement de la densité optique des différentes solutions humiques après migration électrophorétique.
- Séparation entre la fraction peu ou pas mobile (côté cathode) et la fraction mobile (côté anode).

composés intermédiaires susceptibles de se transformer par oxydation alcaline. Or, les variations sont de faible importance. Comme, d'autre part, nous constatons des phénomènes semblables pour les quatre types d'humus étudiés, l'emploi de l'un des trois réactifs d'extraction ne modifie donc pas une classification basée sur le fractionnement électrophorétique.

C) Discussion.

La relation entre les fractions grises et brunes semble très intéressante, elle permet d'établir une échelle dans la variation du degré de polymérisation des acides humiques.

BURGES (1960 a) confirme cette séparation suivant la taille des particules. D'après cet auteur, si l'on soumet une même solution humique à deux passages successifs en électrophorèse continue, le fractionnement obtenu à chaque opération est identique ; par contre, si on intercale, une précipitation ou une dessiccation entre les deux passages, il se produit un nouveau fractionnement. BURGES suggère qu'il s'agit d'une agrégation des petites particules et cet auteur conclut qu'une étude électrophorétique correspond plutôt à une séparation par groupe de molécules de diamètres différents, qu'à une différenciation chimique.

Nous avons essayé de comparer sur une solution humique l'action d'une précipitation simple avec celle de précipitations alternées de dessiccations. Dans ce but, on soumet des acides humiques à dix précipitations successives sans dessiccation ; les électrophorogrammes de ces substances sont analogues à ceux d'acides humiques obtenus après une seule précipitation. Par contre, dix précipitations alternées avec dix dessiccations à une température de 50° modifient les électrophorogrammes. En effet, le rapport fraction peu mobile - fraction mobile varie de 0,7 avec une seule dessiccation, à 0,9 après dix dessiccations. Cette expérience démontre l'influence de la dessiccation sur la formation abiologique de substances humiques polymérisées, influence que nous avons déjà fait remarquer (DUCHAUFOR et JACQUIN, 1959). Ces résultats ont été obtenus pour des acides humiques d'un humus brut. Il est possible d'envisager, au cours de la dessiccation, une modification de structure d'une fraction des acides humiques. Il se produirait une polymérisation physique avec formation de substances moins mobiles. Toutefois, une seule expérience ne nous permet pas de généraliser cette constatation en l'appliquant à tous les humus naturels.

Cependant, cette hypothèse de polymérisation physique paraît confirmée par des observations sur le terrain. On remarque, d'une façon très nette, une accentuation de la dominance des acides humiques gris sous les climats à saisons fortement contrastées

(alternance de dessiccation ou de congélation). Les sols gris forestiers et les chernozems sont fréquents dans les régions continentales et absents sous les climats atlantiques. L'absence d'acides humiques gris dans un mull forestier sur sol brun lessivé résulterait d'une intense activité microbienne, donc d'une minéralisation très rapide des acides humiques bruns, liée à de faibles variations climatiques. Dans cet horizon, la phase de polymérisation ne se produirait pas ou serait réduite. Dans les régions équatoriales, AUBERT (1959) note que les caractéristiques de l'humus sous forêt dense varient sensiblement en fonction des conditions climatiques et principalement de la pluviométrie. La matière organique mobile et dispersée ne forme généralement pas d'horizons humiques très développés, par contre, on observe fréquemment l'enrichissement des eaux de rivières en substances humiques. Dans les régions tempérées, au contraire, BACHELIER (1960) souligne que le dessèchement doit ralentir l'action de la flore déshumifiante et favoriser l'hétéropolycondensation des acides humiques. Ces quelques faits montrent l'influence du climat, principalement de la dessiccation, sur la présence d'horizons humifiés et sur la formation d'acides humiques gris.

D'autre part, l'étude électrophorétique des acides humiques complète les résultats de la chromatographie, elle permet une classification impossible à réaliser par cette dernière méthode. En effet, en utilisant les techniques chromatographiques, préconisées par KONONOVA et BELCHIKOVA (1960), nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence nette entre plusieurs types d'acides humiques. La chromatographie circulaire ne permet qu'une séparation entre constituants non mobiles (gris ou bruns) et fractions mobiles fluorescentes et faiblement colorées. KONONOVA et BELCHIKOVA (*loc. cit.*), après une étude approfondie, constatent une analogie de constitution chimique entre ces fractions mobiles et les acides fulviques. Nos diverses observations effectuées après électrophorèse (fluorescence - réactions colorées), nous amènent à formuler une conclusion analogue pour la fraction la plus mobile.

En résumé, une étude par électrophorèse permet de préciser certaines caractéristiques importantes des humus naturels.

II. - PRODUITS DE DECOMPOSITION « IN VITRO »

Après extraction sodique des produits de décomposition *in vitro*, les composés humiques sont préparés suivant la technique décrite antérieurement.

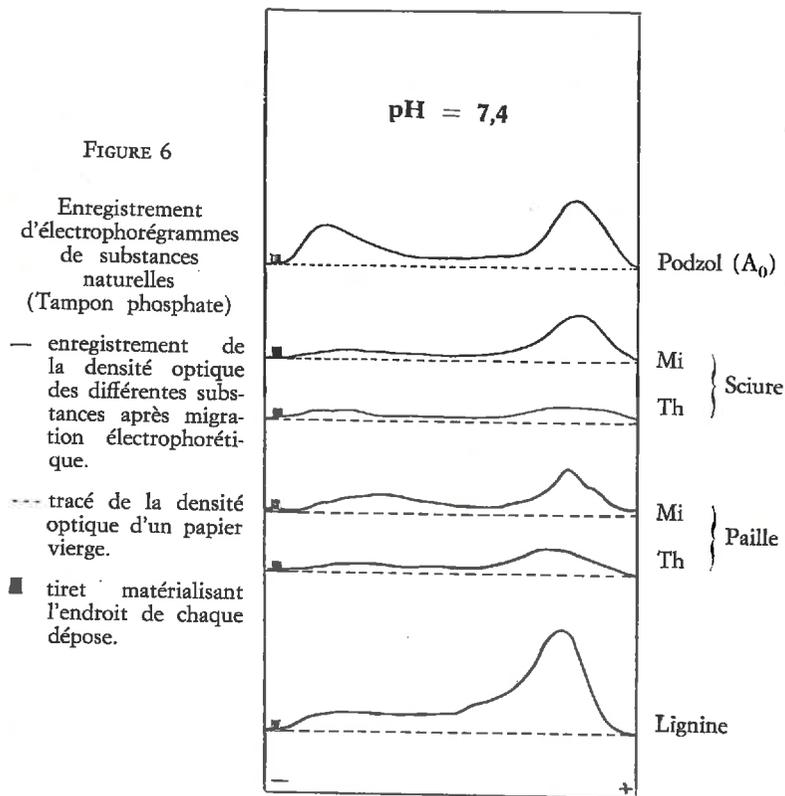
Pour l'étude électrophorétique de ces substances, nous utilisons successivement, comme solutions électrolytiques, les tampons phosphate (pH = 7,4) et borax (pH = 9). En effet, si le premier

permet une nette séparation de la fraction brune mobile, le second donne des bandes plus diffuses, mais il en résulte un fractionnement supplémentaire.

D'autre part, il y a intérêt à travailler sur de petites quantités, afin de pouvoir réaliser la comparaison de toutes les substances humiques ; aussi employons-nous des bandes de papier Arches, de 4 cm de largeur et effectuons-nous des déposes correspondant à 10 microlitres d'une solution à 5 %.

A) Examen des électrophorégrammes en lumière visible.

Après examen de très nombreux électrophorégrammes, nous remarquons qu'aucune des substances humiques obtenues à partir de décomposition *in vitro* ne présente de fraction polymérisée importante. Le rapport fraction peu mobile sur fraction très mobile se situe toujours en-dessous de l'unité et souvent même la fraction immobile fait défaut ; d'autre part, comme les acides humiques bruns



dominant largement, ces substances humiques nous paraissent comparables à celles extraites d'un A₀ de podzol.

L'étude de divers échantillons ne permet pas d'enregistrer de différences significatives en fonction des substrats ou des microflores (à l'exception de *Trechispora*). Nous rejoignons ainsi les conclusions de NODA et IBA (1958) : lors de l'étude d'acides humiques formés au cours de décomposition de substances végétales, ces auteurs ne peuvent obtenir de séparations caractéristiques entre les produits issus de la dégradation de diverses substances végétales fraîches, par contre, ils notent une différence très nette entre ces derniers produits et un humus naturel de sol volcanique. Nos résultats sont résumés par la figure 6 représentant les enregistrements d'électrophorogrammes de diverses substances naturelles.

Les courbes représentent les enregistrements d'électrophorogrammes de substances humiques issues soit d'un A₀ de podzol, soit de la dégradation des substrats sciure et paille par des microflores mixtes (Mi), ou par un champignon lignivore (Th).

a) L'enregistrement de la densité optique par le photodensimètre ZEISS caractérise bien l'absence de substances humiques peu ou pas mobiles chez les produits de décomposition *in vitro*. Cependant, après incubation du substrat paille par des microflores mixtes, nous observons l'existence de composés humiques de mobilité intermédiaire ; ces derniers sont certainement liés à la présence de molécules humiques assez condensées. Toutefois, les substances humiques *in vitro* étudiées n'ont jamais atteint un degré d'humification voisin de celui rencontré dans un humus brut de podzol.

b) On remarque un contraste très net entre le produit de dégradation provenant d'une microflore mixte d'une part, et celui de *Trechispora*, d'autre part. Dans le premier cas, on obtient une prédominance des produits bruns ; par contre, la souche lignivore engendre des substances peu colorées, surtout sur sciure.

c) Les électrophorogrammes obtenus avec les produits de décomposition du Trèfle ne sont pas représentés. En effet, nous obtenons dans tous les cas des courbes similaires à celles tracées pour la paille en présence d'inoculum mixtes. Cette absence de différence entre substrats, après action des diverses microflores, a déjà été soulignée lors de l'étude du taux de décomposition (cf. chapitre II).

B) Examen des électrophorogrammes en lumière de Wood.

a) Produits résultant de l'action d'une microflore mixte. Nous distinguons trois zones fluorescentes bien définies :

- une fluorescence rose-saumon déjà rencontrée avec les acides humiques naturels se superpose à la fraction de teinte grise peu mobile ;

- il existe également comme pour les humus naturels, une fluorescence intense et blanc-bleuté située au-delà des fractions brunes mobiles, côté anode ;
- par contre, on note une fluorescence supplémentaire violet foncé, coïncidant avec la fraction brune mobile.

b) Produits résultant de l'attaque de *Trechispora* :

- on assiste à une diminution très nette de l'intensité de toutes les fractions fluorescentes ; mais, en particulier, la fluorescence violet foncé, coïncidant avec la fraction brune mobile, tend à disparaître complètement.

C) Action de réactifs caractéristiques des phénols.

Comme pour les humus naturels, on remarque des bandes réagissant positivement au chlorure ferrique et au nitrate d'argent ammoniacal au-delà de la fraction brune mobile.

III. - COMPARAISON ENTRE ACIDES HUMIQUES NATURELS ET PRODUITS DE DECOMPOSITION « IN VITRO ».

Deux faits principaux ressortent de l'ensemble de nos résultats :

A) Les observations relatives aux substances humiques obtenues *in vitro* comparées à celles provenant d'humus naturels montrent le faible degré d'évolution des premières ; l'électrophorèse des produits de décomposition *in vitro* met en évidence l'importance minime des fractions peu mobiles ; en outre, en lumière de WOOD, on ne remarque qu'une légère fluorescence rose-saumon. Or, les acides humiques naturels offrent des caractéristiques inverses et cela avec une intensité croissante en fonction du degré de polymérisation.

B) Les différences enregistrées, entre les électrophorégrammes de composés humiques obtenus par action de diverses microflores, nous ont suggéré d'effectuer une comparaison avec ceux d'une lignine. Afin d'extraire cette substance d'une sciure de Hêtre, nous employons la méthode de BRAUNS (1952), il s'agit d'une longue macération, en présence d'alcool éthylique, suivie de nombreuses dissolutions et précipitations, respectivement par le dioxane et l'éther sulfurique. La migration électrophorétique de cette lignine se matérialise par la formation d'une seule fraction brune très mobile, accompagnée d'une fluorescence violet intense (fig. 6). Or, ces caractéristiques sont inhérentes à la fraction « brune mobile »

observée dans tous les électrophorégrammes de substances humiques obtenues par décomposition *in vitro*, sauf après attaque de *Trechispora*. Il semble donc possible de formuler la double hypothèse suivante :

1°) En présence d'une microflore mixte, la dégradation initiale d'un substrat végétal respecterait en grande partie la fraction lignifiée.

2°) Au contraire, l'activité d'un champignon lignivore tel que *Trechispora* engendrerait la décomposition immédiate de la lignine en éléments plus simples, comme en témoignerait la diminution, puis la disparition des caractéristiques attachées à cet élément, à savoir la présence d'une fraction brune très mobile allée à une forte fluorescence violette.

CHAPITRE IV

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

I. - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Nous utilisons pour l'essentiel, les principes généraux exposés dans les ouvrages classiques de BLOCK *et al.* (1958), LINSKENS (1959), LEDERER (1960). Seules seront décrites les techniques particulières à l'étude des acides aminés ou des composés phénoliques.

A) Préparation des extraits.

1°) EXTRAITS AQUEUX.

Lors de ces recherches, nous étudions plus particulièrement les extraits solubles d'horizons organiques de sols ou de végétaux en décomposition. Le substrat est mis à macérer avec de l'eau distillée dans des proportions (poids/volume) de 1/10 pour les sols ou de préférence 1/20 pour les végétaux ; afin d'éviter toute activité microbienne, on ajoute 1 % de chloroforme. Après agitation, les suspensions sont conservées à la température de + 4° C pendant huit jours, puis filtrées. On concentre les extraits, sous pression réduite, à l'aide d'un évaporateur rotatif ou pour les faibles quantités, dans un exsiccateur. Dans tous les cas, l'évaporation a lieu à une température inférieure à 40° C. Au cours de l'étude de l'évolution des acides aminés, nous utilisons une technique un peu différente ; en effet, nous avons constaté qu'une extraction par les acides dilués permettait d'obtenir une plus grande quantité de sucres aminés ; on utilise donc comme liquide d'extraction, une solution 0.5 N d'acide chlorhydrique.

D'autre part, il a paru intéressant d'étudier les produits libérés par l'hydrolyse des extraits aqueux. Pour cette opération, l'extrait est additionné d'acide chlorhydrique, afin d'obtenir une normalité 6 N, puis placé en tubes que l'on scelle et que l'on porte à la température de 105° pendant vingt-quatre heures. La filtration, après refroidissement, a lieu sur verre fritté.

2°) EXTRAITS HUMIQUES.

L'extraction par une solution sodique N/10 est toujours réalisée dans des conditions rigoureusement semblables. Après précipitation, les acides humiques sont redissous par NaOH N/10 et soumis à dialyse contre de l'eau distillée. A l'aide de la méthode ANNE (1945), on détermine la teneur en carbone de la solution dialysée ; ensuite, les solutions sont amenées à une concentration identique en cet élément. Eventuellement, l'hydrolyse acide est faite sur solution dialysée concentrée et titrée. Une autre technique consiste à partir d'un poids déterminé d'acides humiques séchés à 105° comme l'indiquent COULSON, DAVIES et KHAN (1959 a). Nous utilisons 1 ml d'acide chlorhydrique 6 N pour 20 mg d'acides humiques, l'hydrolyse effectuée en tube scellé est poursuivie pendant vingt-quatre heures à la température de 105°.

L'étude des composés phénoliques présents dans les acides humiques a été faite récemment par SCHARPENSEEL (1960). Cependant, cet auteur, en vue de l'identification, procède au préalable à une fusion alcaline. Par l'emploi de moyens de dégradation moins brutaux, nous pensons qu'il est possible d'obtenir des constituants dont la structure est moins altérée.

B) Purification des extraits.

1°) EN VUE DE L'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS :

L'extrait concentré est soumis à un passage sur résine échangeuse de cations, la duolite C 20, suivant la technique utilisée par KIENTZLER, DENANTES et FABERT (1959). L'éluat contient des acides aminés, des peptides à faible poids moléculaire et des bases organiques ; il est concentré, sous pression réduite, évaporé à sec et repris par 2 ml d'eau distillée. Conservé à la glacière, cet extrait est prêt à être chromatographié ; il permettra l'identification des acides aminés par rapport à des acides témoins. Cependant, une purification aussi complète n'est pas indispensable pour obtenir une comparaison valable entre acides aminés extraits de façon identique de plusieurs substances humiques. Des comparaisons ont été faites entre des cartes chromatographiques obtenues avant et après passage sur la colonne de polystyrène sulfoné, elles présentent une analogie rigoureuse quant au nombre et à la disposition relative des spots ; seuls, les Rf sont modifiés.

2°) EN VUE DE L'ÉTUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES :

Afin d'obtenir une séparation des composés phénoliques de l'extrait aqueux, plusieurs méthodes sont proposées : LINSKENS (1959) préconise une série d'agitations successives avec l'éther sulfurique ; LAURENT (1961), PICTET et BRANDENBERGER (1960), une défécation à l'acétate de plomb ; LOVE et BROWN (1960) recommandent la précipitation par une solution de gélatine à 1 % ; HENDERSON (1955), SIMONART et VIAUX (1959), une extraction continue par l'éther. Après plusieurs essais, nous nous sommes arrêtés à la technique suivante : les extraits aqueux sont soumis à une extraction continue soit par l'éther éthylique, soit par l'acétate d'éthyle [COULSON, DAVIES, LEWIS (1960 a)], après avoir subi une acidification par l'acide chlorhydrique ($\text{pH} < 1$).

Cette extraction a lieu dans un extracteur en verre pendant six heures consécutives. Les extraits dans l'éther ou dans l'acétate d'éthyle sont conservés à la glacière dans des fioles à bouchons rodés. La concentration de ces extraits a lieu par des méthodes différentes pour une étude qualitative ou quantitative.

a) *Etude qualitative* :

On ajoute 0,5 à 1 ml d'acétate d'éthyle aux extraits étherés, l'évaporation moins rapide de ce corps permet une dépose correcte des extraits concentrés. HENDERSON (1955), lors de son étude sur la libération des composés aromatiques au cours de la décomposition des sciures, utilise l'extraction à l'éther, suivie d'une évaporation totale puis, d'une redissolution par l'alcool absolu. BARBIER et LEDERER (1957) conseillent une concentration à froid et partielle.

Nos extraits ne sont jamais amenés à sec ; en effet, par expérience, on constate après dessiccation une insolubilisation partielle des extraits dans l'acétate d'éthyle.

b) *Etude quantitative* :

Une fraction aliquote d'extrait étheré est concentrée à l'évaporateur, puis disposée dans un tube à hémolyse ; ensuite, on continue la concentration par évaporation sous vide à l'aide d'un tube capillaire. La dépose se fait sur le chromatogramme avec une micropipette à réservoir. Après chaque manipulation, les récipients doivent être rincés à l'aide d'éther éthylique.

C) Préparation des solutions de substances témoins.

Pour tous les acides aminés étudiés et solubles dans l'eau, on prépare une solution à 0,5 %.

Les composés phénoliques sont dissous dans le méthanol également à la concentration de 0,5 %.

Les solutions standards obtenues sont conservées à la glacière à + 4°.

Pour l'identification, les déposes sont effectuées à l'aide de micropipettes graduées de 5 μ l, ce qui correspond pour chaque spot à une quantité de 25 μ g. Cependant dans quelques cas, cette concentration est augmentée, afin d'obtenir certaines réactions colorées peu sensibles.

Par contre, pour la détermination quantitative des composés phénoliques, on utilise des solutions diluées. Les déposes varient de 1,25 à 25 μ g afin de rester dans le domaine d'application de la loi de BEER - LAMBERT.

D) Préparation et développement des chromatogrammes.

1°) CHROMATOGRAPHIE UNIDIMENSIONNELLE :

— Cette méthode permet d'atteindre plusieurs buts :

a) Au cours d'essais préliminaires, il est possible d'évaluer la concentration optimum d'extrait à déposer sur le papier ;

b) Après une détermination exacte des constituants, elle offre la possibilité d'effectuer une comparaison semi-quantitative entre plusieurs extraits ;

c) En utilisant successivement plusieurs systèmes de solvants, elle nous renseigne sur l'évolution de certains composés au cours de la décomposition de la matière organique.

— Nous employons l'une ou l'autre des techniques suivantes :

a) Chromatographie ascendante, en utilisant soit des cuves spéciales où la feuille de papier plonge directement dans le solvant, soit des cloches en verre ; dans ce dernier cas, la feuille de papier est enroulée en forme de cylindre. Les chromatogrammes plongent dans le liquide sur une hauteur d'environ 0,5 cm. La migration du solvant par capillarité se poursuit pendant un temps variable en fonction de la nature de celui-ci ;

b) Chromatographie descendante. Dans cette alternative, seul l'usage des cuves à chromatographie est possible. Cette méthode permet d'obtenir, à l'aide d'une migration maximum, une séparation plus nette des composés à faibles R_f ;

c) Chromatographie circulaire. Le processus est uniquement employé pour la séparation des acides humiques comme le conseillent KONONOVA et BELCHIKOVA (1960).

2°) CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE :

La chromatographie bidimensionnelle avec différents couples de solvants permet de comparer les migrations relatives des éléments à identifier par rapport à des cartes témoins.

3°) PAPIER :

Nous utilisons couramment le papier Arches 302, lequel nous donne entière satisfaction. Cependant, lorsqu'il nous faut comparer nos résultats à ceux d'autres auteurs, nous employons le papier indiqué dans la bibliographie.

4°) DÉPOSES :

On effectue les déposes à l'aide de micropipettes graduées de 1 à 20 μ l. Pour le dosage quantitatif, nous préférons, dans certains cas, l'emploi de micropipettes capillaires, de capacité plus élevée, préparées au laboratoire. Les déposes sont bien distinctes et séparées d'au moins 3 cm sauf lorsqu'il est prévu une élution postérieure, dans ce cas, l'on répartit la substance à chromatographier sur toute la ligne de départ.

5°) SOLVANTS :

Leur mode de préparation sera indiqué ultérieurement en fonction de l'étude à entreprendre. Les corps utilisés correspondent à des produits chimiques « purs » ou redistillés.

6°) DÉVELOPPEMENT DES CHROMATOGRAMMES :

Après séchage des déposes, les chromatogrammes sont disposés dans les enceintes à chromatographie. Généralement, on procède à la saturation de l'atmosphère à l'aide d'une phase du solvant. Après un temps variable, suivant la nature des constituants de ce solvant, on introduit la phase mobile. La durée de la migration est également fonction du solvant. Pendant le développement du chromatogramme, la température ambiante est maintenue à 23° ($\pm 0,5$) à l'aide d'un thermostat.

E) Identification des composés aminés ou phénoliques.

Celle-ci repose sur trois critères fondamentaux :

a) Détermination des Rf de chaque substance et comparaison des résultats obtenus avec des cartes établies à l'aide de composés témoins ;

b) Confrontation des colorations formées par rapport à celles de corps purs ayant migré dans les mêmes conditions expérimentales et utilisation, le cas échéant, de réactions spécifiques ;

c) Utilisation de témoins internes afin d'obtenir la superposition des spots témoins avec ceux des substances à identifier. Ce processus est répété avec plusieurs systèmes de solvants.

II. - ETUDE DES ACIDES ET DES SUCRES AMINES

A) Les solvants.

1°) PHÉNOL :

La purification acquise, nous mélangeons le phénol à de l'eau distillée, dans les proportions de 1 g pour 9 g d'eau. Cette solution, conservée à l'abri de la lumière, permet de préparer le solvant. Dans ce but, on introduit dans une ampoule à décanter un volume de la solution précédente avec un volume d'eau distillée. Après agitation, le mélange donne par décantation deux phases. Cette séparation s'opère très lentement ; elle doit s'effectuer dans la chambre à chromatographie, à l'obscurité et à température constante.

— La phase légère (eau saturée de phénol) est déposée dans un bac, au fond de la cuve à chromatographie, on dispose également une boîte de Pétri contenant une solution d'ammoniaque à 0,3 %. En effet, le pH est un facteur important qui modifie la valeur du Rf, spécialement avec les acides aminés. Dans ces conditions, les acides aminés « acides », tels que les acides aspartique et glutamique restent fixés sur le papier, plus près du point de départ, tandis que les acides aminés « basiques » migrent plus loin.

— Les chromatogrammes sont disposés dans la cuve, et, pour éviter l'oxydation du phénol, il est préférable de remplacer l'air par un gaz inerte. Pendant douze heures, nous laissons l'atmosphère de la cuve s'équilibrer, afin d'obtenir un milieu alcalin saturé de vapeur d'eau.

— Cette période terminée, on introduit la phase lourde (phénol saturé d'eau) dans les gouttières où pendent les chromatogrammes. La migration se poursuit pendant trente heures, à l'obscurité et à la température de 23° C.

— Ensuite, les chromatogrammes, retirés de la cuve, sont séchés par ventilation d'air froid, jusqu'à complète disparition de l'odeur de phénol. Le front du solvant est matérialisé le plus souvent par une ligne brune ; cette région peut être éliminée (CHAMPIGNY, 1960), car elle gêne le déplacement du deuxième solvant.

2°) COLLIDINE, LUTIDINE, EAU DISTILLÉE 1/1/2 :

Ce solvant se sépare en deux phases : l'eau saturée de collidine-lutidine (phase lourde) est placée dans le fond de la cuve, pour

équilibrer l'atmosphère. Ensuite, la phase légère, mélange de collidine-lutidine, est introduite dans les gouttières. Le développement se poursuit à l'obscurité à 23° C et dure de quarante-huit à cinquante heures. Il est très difficile d'observer le front du solvant.

3°) BUTANOL, ACIDE ACÉTIQUE, EAU 4/1/5 :

On agite ce mélange dans une ampoule à décanter et on laisse s'équilibrer à la température de la chambre à chromatographie ; cette opération doit durer au moins douze heures (CARLES et *al.*, 1958). La phase légère sert comme solvant ; la phase aqueuse permet la saturation de l'enceinte à chromatographie. Le développement s'effectue pendant environ vingt-huit heures à une température de 23° C. Cependant avec les sucres aminés, il se produit un effet de traînée ; CRUMPTON (1959) attribue cette élongation des spots à la formation d'acétates d'amino-sucres.

— Les trois solvants, dans la suite de cet exposé, seront désignés respectivement par les termes de : Phénol - Collidine - Butanol.

— Pour la chromatographie à deux dimensions, nous utilisons les systèmes suivants :

- phénol puis butanol [BOULANGER et BISERTE (1951), GROBBELAAR et *al.* (1955)] ;
- phénol puis collidine [DENT (1947), AUCLAIR et MALTAIS (1952)].

B) Révélateurs.

1°) ACIDES AMINÉS :

Après séchage, les chromatogrammes sont imprégnés à l'aide d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans le butanol. Ensuite, ils sont placés dans une étuve saturée de vapeur de butanol. La coloration optimum des différents spots est constatée après un chauffage à 80° C pendant vingt minutes.

2°) SUCRES AMINÉS :

a) Le réactif à la ninhydrine donne, avec la plupart des protéines, la même coloration qu'avec les acides aminés. Cependant, ZACCHARIUS et TALLEY (1960 et 1962) signalent que certains corps dépourvus d'azote réagissent positivement. D'autre part, TROUT (1958) note que le tryptophane provoque des interférences.

b) Réaction spécifique de Morgan-Elson (PARTRIDGE et WESTALL (1948)). On emploie les solutions suivantes :

- a) 1° Acétyl-acétone 0,5 ml dissous dans 50 ml de Butanol ;
 - 2° 5 ml d'une solution aqueuse de potasse à 50 % dans 20 ml d'éthanol. Mélanger, au moment de l'emploi, 0,5 ml de la solution (1) avec 10 ml de la solution (2) ; ce réactif n'est pas stable.
- b) On dissout 1 g de p—diméthylaminobenzaldéhyde dans 30 ml d'éthanol. Après addition de 30 ml de HCl concentré, on dilue avec 180 ml de butanol. Ce réactif se conserve plusieurs semaines.

— Le chromatogramme sec est imprégné avec (a), puis laissé cinq minutes à l'étuve à 105°. Après pulvérisation de (b), on l'introduit à nouveau dans l'étuve pendant cinq minutes, mais à 90°. Les hexosamines libres forment une tache rouge-cerise, la N—acétyl glucosamine donne un spot presque violet. Cependant à la différence des hexosamines libres, les dérivés N acétylés se colorent en violet foncé avec la solution de p—diméthylaminobenzaldéhyde sans traitement préalable.

CRUMPTON (1959) étend la portée de la réaction à d'autres sucres aminés, lesquels, à l'exception de l'acide muranique et de la fructosamine donnent des spots rouge-cerise.

c) Méthode de STOFFYN-JEANLOZ (1954). Initialement, on dépose sur la feuille de papier les extraits contenant les hexosamines, puis on pulvérise une solution de ninhydrine ; celle-ci est préparée par dissolution de 2 g de ninhydrine dans 100 ml d'éthanol à 95 % contenant 4 % de pyridine. Les chromatogrammes sont ensuite suspendus dans une étuve au fond de laquelle on place un bac rempli d'une solution aqueuse de pyridine à 50 %. Après trois heures, à la température de 80°, les sucres aminés se dégradent en pentoses de structure correspondante. Ensuite, on développe les chromatogrammes par technique descendante pendant quarante heures avec le solvant butanol, éthanol, eau, 4/1/1. La ninhydrine et certains complexes colorés provenant de la dégradation des sucres aminés sont entraînés au front du solvant. Après séchage, on pulvérise successivement sur le papier une solution saturée de nitrate d'argent, puis une solution 0,5 N de NaOH dans l'éthanol à 50 %. Les sucres réducteurs, à la température de la salle, sont révélés par l'apparition d'une tache sombre. Un écueil doit être évité : l'emploi d'une quantité trop importante de sucres aminés ne permet pas une dégradation complète de ces corps, on obtient plusieurs spots indiquant la formation de produits intermédiaires. STOFFYN et JEANLOZ conseillent des doses de 1 à 150 µg ; MUIR (1957) applique cette méthode à des hexosamines inconnues.

d) Nous obtenons une confirmation des résultats en employant pour révéler les sucres, après dégradation par la pyridine, une solution de phtalate d'aniline (LEDERER, 1960). Celle-ci provient de la dissolution successive de 8 g 93 d'aniline et 1 g 66 d'acide phtalique dans 100 ml de butanol saturé d'eau. Les aldopentoses donnent une couleur rouge, les aldohexoses, méthylpentoses et acides uroniques des teintes brunes. Les cétooses produisent peu ou pas de coloration. Des teintes variées apparaissent avec les sucres méthylés.

e) Emploi de la p—anisidine phosphatée.

Il s'agit d'un réactif général des sucres colorant les taches d'une façon caractéristique en fonction de leur nature (MUKHERJEE et *al.*, 1952).

III. - ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES

A) Solvants.

1°) CRITÈRE DU CHOIX D'UN SOLVANT :

Le choix d'un solvant pour l'étude des composés phénoliques est régi par différents facteurs :

a) nécessité d'obtenir une séparation maximum des constituants d'un mélange ; ceci implique une migration régulière en limitant au minimum l'effet de traînée. Pour une étude qualitative, les spots peuvent se situer sur toute la surface des chromatogrammes ; dans le cas d'une étude quantitative, une migration médiane est préférable ;

b) reproductibilité des Rf ;

c) l'emploi de certains solvants donne par déduction une indication sur la nature des composés étudiés. Ce fait présente un intérêt indéniable en liaison avec le nombre imposant de substances phénoliques susceptibles de se rencontrer chez les végétaux. En outre, il permet d'obtenir une indication sur l'évolution de ces composés vers une polymérisation plus ou moins élevée. Tout groupement hydroxyle se révèle polaire et hydrophile, une augmentation de l'hydroxylation entraîne une augmentation de polarité et de solubilité dans l'eau ; elle affecte, le cas échéant, les séparations entre le butanol et l'eau en faveur de l'eau.

— Dès 1956, ROBERTS remarque que les Rf dans l'eau et le butanol 4/1/5 sont liés à la structure de la substance phénolique. En 1960, ce même auteur indique que tous les composés flavonoïdes ayant une structure plane ne migrent ni dans l'eau, ni dans les

solvants contenant 0 à 2 % d'acide ; la cellulose absorbe les substances phénoliques et lorsqu'une molécule contient deux noyaux phénoliques dans le même plan, l'absorption est suffisante pour prévenir l'élution par des solvants aqueux. Dans l'eau, toutes les flavones restent stationnaires, mais les glucosides sont mobiles.

— COULSON et EVANS (1958) étudient l'influence de la position du groupe OH chez les acides monohydroxyaromatiques ; la migration varie dans l'ordre ortho > méta > para.

— RESPLANDY (1959) énonce quelques principes relatifs à la migration des phénols ; celle-ci varie en fonction directe avec l'acidification du milieu et en fonction inverse de la concentration en sel neutre. Cet auteur vérifie que le classement des Rf de composés homologues demeure constant quelle que soit la composition de la solution aqueuse d'électrolyte. A l'inverse des polyamines, il apparaît clairement que la multiplication des hydroxyles phénoliques sur une molécule de référence entraîne une augmentation de Rf. Par contre, la présence de groupements non fonctionnels ou, dans une série, l'accroissement du poids moléculaire se traduit, comme pour les composés aminés, par l'abaissement du Rf. Il s'ensuit que les dérivés bicycliques ont des Rf notablement supérieurs à leurs homologues monocycliques. Une particularité existe chez les phénols carboxylés : en effet, la présence d'un groupe carboxyle dans la molécule d'un phénol provoque l'abaissement des Rf, sauf dans le cas de l'eau distillée où le Rf augmente fortement. Ce fait peut être utilisé pour l'analyse d'extraits complexes. D'autre part, avec des solutions aqueuses d'électrolytes les substances phénoliques migrent toujours moins facilement que les glucosides correspondants.

— SMITH (1960 a et 1960 b) confirme que la conjugaison augmente la valeur des Rf dans des solvants aqueux et diminue cette valeur dans les solvants à base de butanol.

2°) DESCRIPTION DES PRINCIPAUX SOLVANTS UTILISÉS :

a) Eau distillée (CARTWRIGHT et ROBERTS, 1954), ou de préférence eau acidifiée par 2 % d'acide acétique afin de supprimer l'ionisation (SMITH, 1960 a et b)).

— Migration : 8 - 9 heures pour un front de 40 à 45 cm en chromatographie ascendante.

b) n-butanol/acide acétique/eau, soit dans les proportions 4/1/5 (SCHARPENSEEL, 1960) ou 4/1/2,2 (LOVE et BROWN, 1960). Nous utilisons de préférence les préparations 4/1/2,2 avec lesquelles on obtient une seule phase. Après migration, il est intéressant de porter les chromatogrammes à la température de 105° pendant trois minutes, afin d'éviter les résidus acides sur le papier, lesquels

gènent l'apparition de la couleur caractéristique (ARMSTRONG et *al.*, 1956).

— Migration : 22 - 24 heures pour un front de 30 - 35 cm.

c) n-butanol saturé par une solution à 2 % de NH_4OH , soit directement (PEARL et Mc COY, 1961), soit après imprégnation du papier par une solution d'acide borique saturée à froid (COLOMBO et *al.*, 1961). Il est nécessaire d'obtenir une imprégnation uniforme afin de prévenir la formation de spots irréguliers ; dans ce but, on pulvérise la solution d'acide borique ou mieux on procède à une immersion dans un bain. Malgré les remarques de SMITH (*loc. cit.*) sur la stabilité des phénols en milieu alcalin, ce solvant donne une séparation très nette.

— Migration : 20 - 22 heures pour un front de 30 - 35 cm.

d) n-butanol, pyridine, eau 10/3/3 (PEARL et Mc COY, 1961). Il faut éviter une concentration trop élevée des produits, sinon on obtient une élongation assez importante des spots, ce qui rend la détermination des R_f assez difficile.

— Migration : 20 - 22 heures pour un front de 40 - 45 cm.

e) Butanol secondaire/eau/4/1 (VAN SUMERE - PARMENTIER et TEUCHY, 1961 b). On trempe la feuille de papier Arches dans un bain d'acide acétique glacial. Après séchage à l'air, une deuxième immersion est effectuée dans une solution tampon à pH 7,4 (BRUNEL, 1948). Les dépôts s'effectuent sur le papier tamponné et sec.

— Migration : 24 heures pour un front de 30 - 32 cm.

f) Isobutanol/acide formique/eau soit dans les proportions 0/1/9 ou 9/1/0, ce qui permet des variations dans la migration des différents constituants.

g) Benzène/acide acétique/eau : 6/7/3 [GRIFFITHS (1958), YANG et WENDER (1962)].

— Migration : 7 - 8 heures pour un front de 25 - 30 cm.

h) m-crésol/eau/acide acétique 50/48/2 (SCHARPENSEEL, 1960). Les spots sont bien réguliers, mais il se produit une interférence avec la p.-nitraniline.

i) REIO (1958) établit une étude systématique de quelques 450 composés phénoliques à l'aide de six solvants désignés respectivement A. B. C. D. E. F.

A. — 100 ml de méthylisobutylcétone sont agités pendant une heure avec 10 ml d'acide formique à 4 %. La phase organique est utilisée comme phase mobile.

- B. — Nous avons été amené à modifier légèrement ce solvant pour diminuer les effets de traînée et accroître la netteté des taches. Le chloroforme est stabilisé par 2 % d'éthanol (V/V) et la proportion d'acide formique augmentée, ce qui nous donne : chloroforme 200, acide formique 3,2, méthanol 20, eau 16,8 (V/V). Ces produits sont mélangés intimement par agitation, pendant une heure. Il faut ici mentionner l'influence de l'état de saturation de l'atmosphère. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un unique chromatogramme par cuve.
- C. — On utilise la phase organique d'un mélange benzène/éthylméthylcétone/acide formique à 2 % dans les proportions 90/10/10 et après agitation d'une heure.
- D. — 100 ml de benzène sont agités avec 10 ml d'acide acétique à 2 %.
- E. — Consiste en un mélange éthylméthylcétone/eau/diéthylamine 92, 1/7, 7/0,2. Les Rf des acides-phénols sont généralement très faibles dans ce solvant.
- F. — Ethylméthylcétone / acétone / eau / acide formique 80/4/12/2. A l'inverse du précédent, les acides-phénols migrent vers le front du solvant.

— La durée de migration pour ces six solvants varie entre 6 et 8 heures pour un front de 30 à 35 cm, toujours en chromatographie ascendante.

j) Chromatographie bidimensionnelle : ROBERTS (1956) conseille l'acide acétique à 2 % suivi d'une migration dans le butanol 4/1/2,2 ; COULSON, DAVIES et LEWIS (1960 a) préconisent également ce système. Aussi utilisons-nous ces deux solvants, en employant de préférence l'acide acétique en première dimension. En outre, dans certaines études, nous employons alternativement F de REIO et butanol 4/1/2,2 ; B. de REIO et acide acétique à 2 %. Il nous arrive également de nous servir du même solvant pour deux migrations perpendiculaires.

b) Révélateurs.

La détection des composés phénoliques est basée sur l'emploi de nombreux révélateurs faisant intervenir des réactions différentes :

- réduction du AgNO_3 par les phénols réducteurs ;
- copulation des composés phénoliques avec des sels de diazonium ;
- formation de complexes colorés.

Certaines réactions sont spécifiques et liées à la nature des corps étudiés.

On utilise, en outre, l'observation en lumière ultra-violette (3.600 Å).

1°) Chlorure ferrique et ferricyanure de potassium [BARTON et *al.* (1952), HATHWAY (1958)] : ce réactif général de détection des phénols se compose d'un mélange, volume à volume des solutions aqueuses à 1 % de FeCl_3 et de $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$. La pulvérisation est immédiatement suivie d'un lavage à l'acide chlorhydrique dilué (2 N), puis d'un second à l'eau distillée. A part quelques exceptions, tel l'acide p-hydroxybenzoïque, ce réactif permet une nette localisation des phénols sur le chromatogramme.

2°) Benzidine diazotée (LISON, 1953) : initialement, on prépare une solution de benzidine à 0,6 % dans l'acide chlorhydrique concentré ; 1,4 ml de cette solution est mélangé à 98 ml d'eau distillée. Ensuite, on mélange, à la température de 0 degré, 10 ml de cette solution diluée à 60 ml d'une solution également refroidie de nitrite de sodium à 10 %. Après agitation, on filtre sur papier, puis on pulvérise le filtrat sur le chromatogramme. Après deux minutes d'attente, à la température ordinaire, on lave par immersion dans un bain d'eau distillée. Les phénols donnent des colorations brunes légèrement différentes ; ceux qui se rattachent au type phloroglucinol se caractérisent par une teinte brun-rouge. ROUX et MAÏHS (1960) estiment que ce réactif est très intéressant pour l'étude des flavonoïdes.

3°) Vanadate d'ammonium [SCHARPENSEEL (1960), KLINKHAMMER (1958)] : on pulvérise sur le chromatogramme une solution saturée de vanadate d'ammonium, des taches allant du gris olive au noir apparaissent. Après un début de dessiccation, on pulvérise à nouveau une solution alcoolique de p-anisidine (0,5 g de p-anisidine dans 2 ml de H_3PO_4 concentré et complété à 100 ml avec de l'alcool absolu, puis filtré). Il se forme des taches jaune-orangé ; un chauffage à 80° accélère le processus.

4°) Nitrate d'argent ammoniacal : ce réactif déjà utilisé par PARTRIDGE et WESTALL (1948) a été repris par de nombreux auteurs [entre autres : CARLES et *al.* (1958)]. On mélange juste avant pulvérisation et en parties égales une solution de AgNO_3 0,1 N et une solution de NH_4OH 0,1 N. Pour éviter une précipitation trop rapide, une goutte d'acide acétique normal est ajoutée pour 5 ml de solution de nitrate d'argent. Le chromatogramme, abandonné à la température du laboratoire, reste à la lumière diffuse et à l'abri du soleil. L'apparition des taches s'échelonne dans le temps, suivant la nature du composé phénolique. BURKE et *al.* (1960) préconisent l'emploi d'acide nitrique afin d'éliminer, en partie, la teinte de fond du chromatogramme.

5°) Observation en lumière ultra-violette : les chromatogrammes sont examinés sous une lampe Pleuger (lumière de WOOD correspondant à 3 650 Å) avec ou sans exposition aux vapeurs d'ammoniaque (TRONCHET, 1960).

6°) P-nitraniline diazotée (PRIDHAM, 1957), préparée au moment de l'emploi par le mélange des solutions suivantes :

- p-nitraniline à 0,5 % dans HCl 2 N (P/V) .. 5 ml.
- nitrite de sodium à 5 % 0,5 ml.
- acétate de sodium à 20 % 15 ml.

Après séchage à l'air, on note les teintes obtenues, puis on pulvérise une solution de carbonate de sodium à 15 %. RIBEREAU-GAYON (1959) signale que la première pulvérisation doit être légère ; ceci est exact pour une détermination qualitative. Par contre, une étude quantitative demande une imprégnation complète des chromatogrammes, celle-ci est obtenue par pulvérisation sur les deux faces. Dans ce cas, la solution de Na_2CO_3 est diluée de moitié afin d'éviter une cristallisation sur le papier lors du séchage. En procédant ainsi, la teinte de fond homogène laisse apparaître les taches avec un contraste parfaitement adapté à l'enregistrement photométrique.

7°) Acide sulfanilique diazoté (BRAY *et al.*, 1950) : 25 ml d'une solution d'acide sulfanilique (0,3 %) dans HCl à 80 % (P/V) sont mélangés, juste avant pulvérisation à 1,5 ml d'une solution à 5 % de nitrite de sodium. BLOCK *et al.* (1958) préconisent une variante en inversant les concentrations : 25 ml d'une solution fraîchement préparée de NaNO_2 à 5 % sont lentement additionnés à 0°, à 5 ml d'acide sulfanilique dans HCl (0,9 g d'acide sulfanilique dans 9 ml d'acide chlorhydrique concentré suivi d'une dilution à 100 ml avec de l'eau distillée). Au cours de l'application des deux méthodes, après emploi de l'un ou l'autre réactif, on pulvérise sur le chromatogramme encore humide une solution de Na_2CO_3 à 15 %.

8°) Acide phosphomolybdique [REIO (1958 et 1960) - RESPLANDY (1959)] : on utilise une solution à 2 % de $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$, 29 H_2O , puis on pulvérise une solution d'ammoniaque diluée.

9°) 2-6 dibromoquinone - 4 chloroïmide (REIO, 1958) : 50 mg de 2-6 dibromoquinone - 4 chloroïmide sont dissous dans un mélange composé de 12 ml de dioxane séché par CaH_2 et 3 ml d'acétone. Avec les composés phénoliques, on obtient, après pulvérisation d'ammoniaque diluée, des colorations diverses en général bleues, vertes ou grises.

10°) Chlorure ferrique (REIO, 1958) : une solution à 6 % de FeCl_3 , 6 H_2O et diluée à 2 % au moment de l'emploi. Ce réactif

moins sensible que le mélange de FeCl_3 et $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ donne souvent des teintes caractéristiques, mais sujettes aux influences de pH (BRAY et THORPE, 1954).

11°) Amino - 4 - antipyrine : nous apportons une modification au réactif d'Emerson décrit par VAN SUMERE, PARMENTIER et TEUCHY (1961 b). Sur les chromatogrammes, on pulvérise une solution de NaOH N/10. Après séchage rapide à température ordinaire, on imprègne le papier d'une solution de ferricyanure de potassium à 1 %. L'oxydation alcaline des acides-phénols se produit rapidement, le chromatogramme étant encore humide, on pulvérise une solution à 1 % d' amino - 4 - antipyrine.

12°) 2 - 4 - dinitrophénylhydrazine (REIO, 1958) : 500 mg de 2 - 4 - dinitrophénylhydrazine sont dissous à chaud dans un litre d'acide chlorhydrique N. La solution est filtrée après vingt-quatre heures. Les composés aldéhydiques ou cétoniques forment, avec ce réactif, des colorations jaunes ou oranges. Rarement d'autres substances donnent une réaction positive.

13°) Benzidine (COLOMBO et *al.*, 1961) : on mélange volume à volume une solution 0,1 M de benzidine dans l'éthanol avec une solution normale d'acide chlorhydrique. Les aldéhydes réagissent et on obtient des teintes différentes pour la vanilline et l'aldéhyde syringique.

14°) Ethylène-diamine (CARTWRIGHT et ROBERTS, 1954) : une solution 2 M de dichlorhydrate d'éthylène diamine est amenée à un pH supérieur à dix par addition d'éthylène diamine. Le mélange est dilué d'un égal volume d'eau. Ce réactif révèle l'acide gallique et les dérivés galloylés. On obtient une teinte jaune-brun, mais d'autres corps réagissent tels les acides caféique et gentsique.

15°) p - diméthylaminobenzaldéhyde : 500 g de ce corps sont dissous dans 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et 100 ml d'alcool absolu. On voit apparaître une coloration rose vif passant au rouge à chaud (GSTIRNER et BOPP, 1957).

16°) Vanilline (LAURENT, 1962), réalisée par le mélange de :

| | |
|---|--------|
| Vanilline : 10 % (P/V) dans l'éthanol | 2 vol. |
| HCl, 12 N | 1 vol. |

— Ce réactif révèle les catéchines et les leucoanthocyanes avec apparition d'une coloration rouge. ROUX et MAÏHS (1960) proposent une variante lors de l'emploi de ce réactif pour l'identification et l'estimation des composés flavonoïdes associés avec des tanins condensés.

17°) Vanilline - acide p - toluène - sulfonique dû à ROBERTS, CARTWRIGHT et WOOD (1956), puis repris par ROUX et MAÏHS

(1960) ; il permet la séparation des composés flavonoïdes contenant un noyau du type phloroglucinol de ceux contenant un noyau du type résorcinol.

Le réactif est une solution de vanilline (2 g) et d'acide p - toluène - sulfonique (1 g) dans 100 ml d'éthanol absolu. Après pulvérisation, les chromatogrammes sont chauffés à 80° - 100° pendant cinq à dix minutes.

C) Dosage quantitatif.

1°) PRINCIPE.

Nous avons mis au point une méthode de dosage quantitatif par photométrie directe des acides vanillique et p - hydroxybenzoïque. Cette méthode a été étendue en collaboration avec M. METCHE, Q.H. NGUYEN et E. URION (1962) à différents acides phénols. Son principe repose sur l'application de la loi de BEER-LAMBERT à une substance colorée fixée sur un support solide homogène tel que le papier.

On peut écrire :

$$E = \log \frac{I_0}{I} = k \frac{a}{S},$$

E = extinction,

I₀ = intensité de la lumière incidente,

I = intensité de la lumière transmise,

k = coefficient d'extinction,

a

— = quantité de substance colorée fixée par unité de surface.

L'utilisation d'un photomètre enregistreur permet de tracer directement la courbe d'extinction de la tache colorée. On détermine la surface de la courbe au planimètre ou bien on procède directement à une intégration automatique au moyen d'un intégrateur électronique.

La surface de la courbe d'extinction est proportionnelle à la quantité de substance colorée, dans des limites de concentrations déterminées, propres à chaque acide phénol.

Cette méthode est déjà employée dans des domaines différents : ROUX et MAÏHS (1960) l'utilisent pour le dosage des flavonoïdes ; SCHOENEMANN et *al.* (1961) l'appliquent aux glucides.

2°) SÉPARATION DES ACIDES PHÉNOLS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

a) Solvants :

La méthode que nous développons ici ne peut être utilisable qu'à la condition que les taches correspondant aux divers consti-

tuants soient nettement séparées. Ceci suppose le choix convenable d'un certain nombre de facteurs, notamment le choix du solvant et la fixation de la durée de développement.

Aussi, après différents essais, nous avons sélectionné trois systèmes solvants parmi ceux décrits antérieurement :

- Benzène/acide acétique/eau, 6/7/3 (V/V),
- B de REIO modifié,
- Butanol secondaire/eau, 4/1 (V/V).

b) *Révélateurs* :

Il est essentiel d'obtenir des spots nets sur un fond homogène. Aussi avons-nous fait appel aux deux révélateurs suivants :

- p - nitraniline diazotée,
- amino - 4 - antipyrine.

3°) PHOTOMÉTRIE.

Aussitôt après séchage à température ambiante, on découpe sur les chromatogrammes une bande transversale de 5×20 cm, perpendiculaire au sens du développement. Cette bande peut contenir quatre à cinq taches : la tache de concentration à déterminer et trois ou quatre témoins de concentration connue.

Nous avons remarqué que les meilleurs enregistrements correspondaient à des taches dont le diamètre était sensiblement du même ordre que la longueur de la fente du photomètre.

On trace ensuite la courbe d'extinction en fonction de la position des taches sur la bande. Nous utilisons pour cette opération un enregistreur automatique d'extinction ZEISS II qui, muni d'un intégrateur, permet en même temps de tracer la courbe intégrale correspondante.

Nous pouvons aisément établir ainsi le graphique des aires en fonction des concentrations des taches-témoins. Cette courbe est une droite ; une simple interpolation permet alors de connaître la concentration de l'échantillon.

Pour que la méthode se prête bien aux dosages, il est nécessaire que le graphique $S = f(c)$, aire de la courbe d'extinction en fonction de la concentration, soit linéaire. Il faut aussi que la sensibilité soit satisfaisante d'où le choix du révélateur le mieux adapté, à la fois sensible, et dont la coloration suit la loi de BEER dans le domaine des concentrations explorées.

Pour accroître la sensibilité, il suffit de choisir le filtre optique qui donne le maximum d'extinction. Dans le cadre limité de cette étude, nous avons retenu deux filtres :

- un filtre orange (transmission maximum $600 \text{ m}\mu$) ;
- un filtre vert-bleu (transmission maximum $500 \text{ m}\mu$).

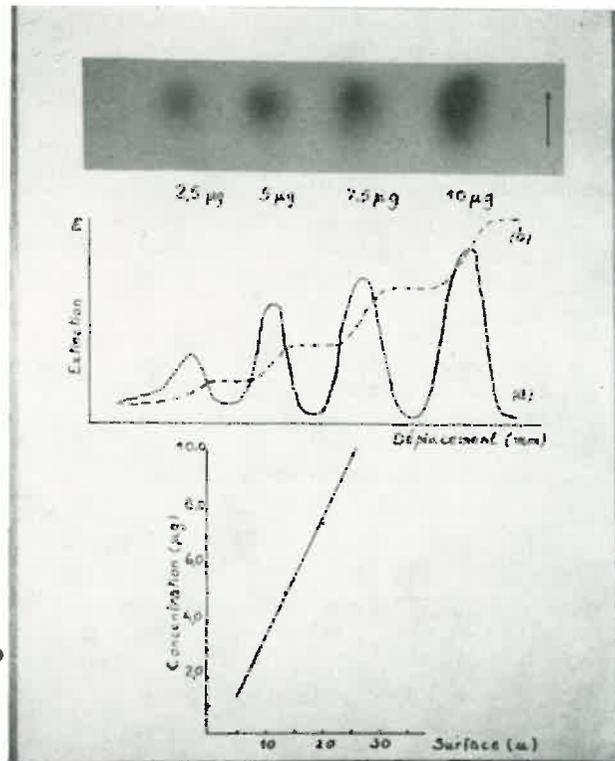


PLANCHE 3

Etude quantitative par photodensimétrie d'acide vanillique

Dans ces conditions, l'établissement d'une gamme de concentrations témoins de 1,25 μg à 10 μg permet de tracer pour les deux acides phénols une courbe $S = f(c)$ et de préciser le domaine de sensibilité, domaine à l'intérieur duquel la relation est linéaire.

Les possibilités de la méthode illustrées sur la planche 3 sont exprimées par les résultats obtenus avec l'acide vanillique.

Nous avons disposé en haut de la figure, la bande chromatographique révélée à la paranitraniline diazotée et qui comprend quatre taches avec des quantités croissantes d'acide vanillique, soit : 2,5 - 5 - 7,5 - 10 μg .

La flèche indique le sens de migration du solvant B. Sur le diagramme situé immédiatement en-dessous, on a représenté la variation d'extinction caractéristique de chaque tache en fonction du déplacement de la bande, courbe (a), ainsi que la courbe intégrale correspondante, courbe (b), donnant la somme des aires de chaque vague de la courbe d'extinction.

Les différences d'ordonnées entre deux paliers consécutifs de la courbe intégrale sont proportionnelles à la surface délimitée par chacune des vagues de la courbe d'extinction.

Le diagramme du bas de la figure représente la relation entre la concentration des taches exprimées en microgrammes et la surface des vagues de la courbe d'extinction, elles-mêmes exprimées en unités arbitraires.

Pour les deux acides-phénols avec les solvants et les révélateurs appropriés, nous avons établi les courbes correspondantes.

Notons cependant l'influence de la technique employée pour effectuer les déposes sur le chromatogramme. Pour avoir le maximum de précision, nous préférons déposer au départ des volumes égaux de solutions-témoins et de solution-échantillon. Dans le cas où la concentration de cette dernière est en dehors des limites de sensibilité, il est facile de procéder à une dilution ou à une concentration préalable, afin de se trouver dans le domaine d'application de la relation linéaire. Dans ces conditions, la précision atteinte est meilleure que 5 %.

La méthode offre donc l'avantage, sur celle préconisée par VAN SUMERE - PARMENTIER et TEUCHY (1961 a et b), d'éviter l'élution des chromatogrammes.

RÉSULTATS

DE L'ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE

DES COMPOSÉS AZOTÉS

— Parmi les composés azotés susceptibles d'exister soit dans la matière organique fraîche, soit dans la fraction humifiée des sols, deux groupes de substances ont retenu plus spécialement notre attention : il s'agit des acides et des sucres aminés.

— Après avoir signalé les difficultés rencontrées lors de l'identification des différents corps, nous entreprendrons une étude comparative des acides aminés présents dans les hydrolysats d'humus naturels ou de substances humiques issues de la dégradation *in vitro* de divers végétaux.

— Ensuite nous aborderons l'étude de la dynamique des acides aminés libérés par décomposition de protéines végétales sous l'influence d'inoculum variés.

— Finalement par comparaison entre nos propres résultats et ceux d'autres chercheurs, nous émettrons plusieurs hypothèses relatives à l'évolution des acides aminés dans les sols.

I. - IDENTIFICATION

A) Acides aminés.

Aussitôt révélé par une solution de ninhydrine, chaque chromatogramme bidimensionnel est comparé avec les cartes publiées par des auteurs ayant travaillé dans des conditions semblables. Les positions relatives des spots fournissent une première approximation sur la nature des acides aminés à identifier. La couleur du complexe ninhydrine - acide aminé apporte éventuellement une précision supplémentaire, principalement avec les corps suivants : acide aspartique (bleu) - proline (jaune) - sérine (violet-brun-rouge)

- tyrosine (violet-gris). Le Rf reste le principal élément d'identification. Cette valeur demeure constante dans des conditions d'expériences rigoureusement précises ; cependant, il est préférable de se baser sur le rapport des migrations entre deux acides aminés : l'un connu, l'autre à déterminer. Comme substance de référence, nous utilisons la valine, acide aminé dont la migration avec les solvants employés est importante. Les rapports observés nous permettent d'établir des présomptions quant à la nature des acides aminés à identifier. Nous établissons ensuite des cartes en nous servant comme témoins des acides aminés supposés présents dans les extraits.

Néanmoins, si avec des solutions témoins, il est aisé d'obtenir un chromatogramme impeccable, avec les extraits, il faut tenir compte des deux contingences suivantes : révéler le plus grand nombre de constituants et éviter la superposition d'un élément prédominant avec un élément mineur. D'autre part, les acides aspartique et glutamique à forte concentration sont susceptibles de former plusieurs spots (HACKMANN et LAZARUS, 1955) ; HARDY et *al.* (1955) admettent une séparation possible entre deux acides aminés pour une différence de Rf de cinq unités en chromatographie unidimensionnelle et une somme des différences égale à sept unités en bidimensionnelle.

Malgré de nombreuses précautions, il existe généralement une interférence entre les spots d'acides aminés, interférence due aux différences de concentration. Le tableau ci-dessous permet la comparaison des Rf obtenus avec des acides aminés dont la concentration varie suivant la nature de l'acide humique hydrolysé et les Rf de substances témoins.

TABLEAU 17

Variations de Rf de plusieurs acides aminés en fonction de leur concentration dans des hydrolysats d'acides humiques naturels

| Nature de l'acide aminé | Solvant : Phénol | | | | Solvant : Collidine | | | Solvant : Butanol | |
|-------------------------|------------------|------------------------|-----------|----------|---------------------|-----------|----------|-------------------|----------|
| | Rend-zine | Pod-zol A ₀ | Pod-zol B | Té-moins | Rend-zine | Pod-zol B | Té-moins | Pod-zol B | Té-moins |
| Leucine | 73 * | 81 | 75 | 75 | 58 | 63 | 57 | 61 | 61 |
| Valine | 65 | 77 | 69 | 69 | 31 | 42 | 40 | 46 | 46 |
| Alanine | 43 | 54 | 47 | 55 | 18 | 22 | 22 | 26 | 25 |
| Tréonine | 41 | 45 | 47 | 46 | 24 | 22 | 23 | 17 | 20 |
| Acide glutamique .. | 27 | 26 | 27 | 27 | 9 | 7 | 7 | 14 | 17 |
| Acide aspartique .. | 7,5 | 6 | 7 | 12 | 3 | 3 | 6 | 10 | 12 |

* Les Rf sont multipliés par 100.

Pour confirmer une identification, nous employons la méthode des témoins internes à raison d'un ou plusieurs témoins par extrait. Quelques réactions spécifiques sont également utilisées. Le réactif à l'isatine, décrit par ARCHER et *al.* (1950), permet de mettre en évidence, le cas échéant, la proline et la tyrosine. Avec le réactif d'ARCHER et CROCKER (1952), l'arginine se révèle en un spot allongé de teinte rouge sur fond blanc.

B) Sucres aminés.

L'étude des spots montre des corps réagissant à la ninhydrine et à la p-anisidine phosphatée. Le réactif de MORGAN-ELSON (PARTRIDGE et WESTALL, 1949) spécifique des sucres aminés est positif.

La mobilité des substances dans différents solvants ne permet pas une identification certaine ; nous rencontrons ici les difficultés signalées par BREMNER (1958). Néanmoins, par l'étude des produits de dégradation des sucres aminés, suivant la méthode STOFFYN-JEANLOZ (1954), nous constatons la présence d'arabinose et de xylose. Ces deux pentoses, déterminés par comparaison avec des témoins, correspondent aux produits de dégradation de la glucosamine et de la galactosamine ; nous avons d'ailleurs vérifié ce fait et, par conséquent, la présence des deux hexosamines dans les extraits.

Un autre spot n'a pu être identifié ; il apparaît lors de l'étude des produits de transformation de la matière organique et réagit positivement avec la ninhydrine et les réactifs généraux des sucres. D'autre part, la réaction au nitrate d'argent ammoniacal indique une substance réductrice. La coloration rose-rouge, obtenue après pulvérisation de ninhydrine, permet d'envisager deux hypothèses :

1°) SCHRAM et *al.* (1953) constatent que l'hydrolyse de substances végétales (foin - tourteau) par l'acide chlorhydrique 6 N donne lieu à la formation de produits se colorant en rouge sous l'action d'une solution de ninhydrine. ZACCHARIUS et TALLEY (1960 et 1962) identifient cette substance, il s'agit de l'acide lévulinique $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$. En accord avec les travaux de SCHRAM (*loc. cit.*), nous remarquons qu'une hydrolyse par HCl 6 N dégrade le glucose ; cependant, pour obtenir ce phénomène, l'action du même acide employé à une concentration beaucoup plus faible (0,5 N) se révèle insuffisante. Conséquence de ces essais, le spot inconnu ne résulte certainement pas de l'action du réactif de solubilisation utilisé pour entraîner les sucres aminés. Nous avons alors isolé la substance à identifier par plusieurs éluions chromatographiques avec l'aide de deux solvants (il est à noter qu'une

hydrolyse par HCl 6 N ne la dégrade que très légèrement). Ensuite, nous avons effectué l'essai de LASSAIGNE sur le résidu provenant de l'évaporation d'une solution concentrée de cette substance. Ce test classique, utilisé pour déceler l'azote élémentaire dans une substance organique, donne un résultat nettement positif. Donc le spot non identifié ne correspondrait pas à l'acide lévulinique.

2°) CRUMPTON (1959) indique que les différents sucres aminés donnent, en présence du réactif d'ELSON - MORGAN, des colorations semblables à celles obtenues par les hexosamines. BREMNER (1958) étudie la nature des sucres aminés résultant du métabolisme microbien. Cet auteur suggère la possibilité d'obtenir, en dehors de la glucosamine et de la galactosamine, des substances plus complexes. Il démontre, en outre, l'instabilité de ces deux sucres aminés à pH élevé, avec formation de produits plus polymérisés.

Rien n'exclut donc la formation d'une substance analogue lors de la décomposition de la matière organique. Aussi pensons-nous que ce spot correspond à un complexe du type amino - sucre et dans la suite de notre travail nous le désignerons sous le terme général d'osamine.

II. - ETUDE COMPARATIVE DES ACIDES AMINES PRESENTS DANS LES HYDROLYSATS DE SUBSTANCES HUMIQUES

A) Acides humiques naturels.

L'étude comparative porte sur les quatre humus naturels suivants :

A₀ et B₁ de podzol, A₁ de mull acide et A₁ d'une rendzine.

Une première comparaison montre une similitude entre les spots d'acides aminés présents dans les quatre hydrolysats d'acides humiques naturels, la planche 4 en témoigne ; elle représente un chromatogramme révélé par la ninhydrine après migration dans le solvant butanol. Remarquons ici que ce chromatogramme résulte de déposes d'hydrolysats d'acides humiques n'ayant subi aucune purification préalable ; par contre, la planche 5 matérialise un chromatogramme obtenu après purification des hydrolysats suivant les techniques décrites antérieurement.

L'interprétation d'un chromatogramme unidimensionnel ne peut être que partielle aussi, ne pouvons-nous nous dispenser d'utiliser la chromatographie bidimensionnelle afin d'identifier les composés

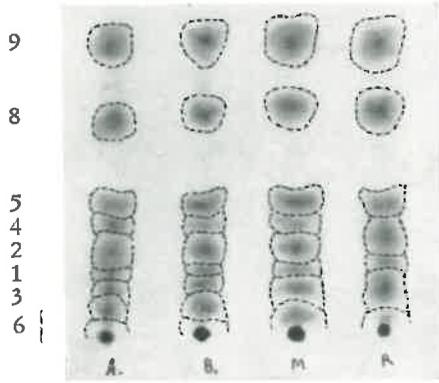


PLANCHE 4

Hydrolysats d'acides humiques naturels, de gauche à droite :

A₀ de podzol, B₁ de podzol, A₁ de Mull, A₁ de rendzine.

Les chiffres correspondent à la nomenclature de la planche 6 bis.

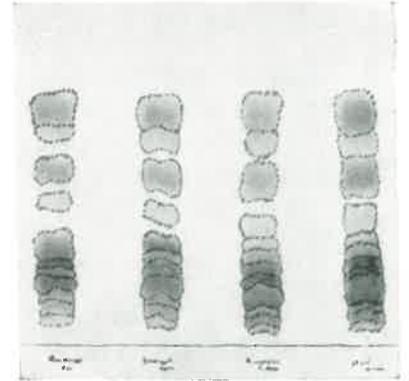
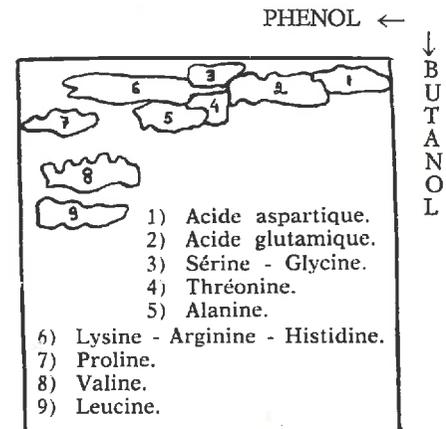


PLANCHE 5

Hydrolysats de substances humiques *in vitro*, de gauche à droite :

A₁ de rendzine et A₀ de podzol après extraction NaOH.
A₁ de rendzine et A₀ de podzol après extraction NaF.

Les chiffres correspondent à la nomenclature de la planche 6 bis.



PLANCHES 6 et 6 bis

Chromatographie bidimensionnelle d'un hydrolysats purifié d'acides humiques d'un B₁ de podzol

aminés. Même par cette méthode, malgré une déminéralisation soignée, et l'emploi de plusieurs systèmes de solvants, nous rencontrons des difficultés pour isoler certains acides aminés ; le fait est d'ailleurs signalé par BISERTE et *al.* (1960). Ces auteurs constatent que la région des chromatogrammes occupée par les acides diamminés est généralement confuse ; elle se présente très souvent sous forme d'une traînée dans laquelle la séparation de l'arginine, de la lysine, et de l'histidine ne correspond pas à des limites précises. D'autre part, l'importance relative des différents acides aminés joue un rôle prépondérant sur la netteté des résultats.

Douze corps cependant ont été identifiés avec certitude :

— Acide aspartique - acide glutamique - alanine - arginine - glycine - histidine - leucine - lysine - proline - sérine - thréonine - valine.

L'observation de la surface et de l'intensité des spots permet une appréciation semi-quantitative. Après plusieurs chromatogrammes bidimensionnels effectués pour chaque hydrolysats d'acide humique naturel, on constate la prédominance des douze acides aminés identifiés (planches 6 et 6 bis). Il faut cependant noter que l'hydrolyse peut affecter certains acides aminés (LYNCH et *al.*, 1959) ; elle détruit le tryptophane et diminue la quantité des composés suivants : sérine, méthionine, thréonine ; la cystine et la cystéine subissent une oxydation avec transformation en acide cystéique. D'autre part, d'après CHAMPIGNY (1960), l'hydrolyse provoque certaines réactions secondaires, entre autres, la formation de substances du type acides humiques.

B) Produits de décomposition « in vitro ».

Nous comparons les hydrolysats de substances humiques issues de l'activité de microflores de rendzine et de podzol sur les trois substrats et nous constatons qu'il n'existe pas de différence notable dans la nature des acides aminés présents. Cependant, la planche 5 illustre une légère fluctuation quantitative des acides aminés pour un même composé humique provenant soit d'une extraction sodique, soit d'une solubilisation par le fluorure de sodium.

D'autre part, les hydrolysats de simples extraits aqueux de végétaux en décomposition contiennent une série d'acides aminés ; les éléments azotés de cette série présentent une grande similitude avec ceux rencontrés dans les hydrolysats de substances humiques obtenues dans les mêmes conditions d'incubation. Au cours de l'hydrolyse de ces extraits aqueux, il se forme un précipité brun analogue à celui décrit par CHAMPIGNY (*loc. cit.*) ; nous supposons qu'une fraction des acides aminés peut s'intégrer dans la formation de cet édifice plus complexe.

De toute façon, ces diverses comparaisons nous mettent en présence d'un fait que nous qualifierons d'essentiel : il nous faut admettre la similitude existant entre la nature des principaux acides aminés rencontrés dans tous les hydrolysats qu'ils proviennent de substances humiques ou d'acides fulviques libres. Leur commune identité ne varie pas s'ils sont obtenus à partir de substances *in vitro* ou résultent des différentes phases de condensation d'humus naturels.

C) Discussion.

L'étude des hydrolysats d'acides humiques fait l'objet du travail de COULSON, DAVIES et KHAN (1959 a), ces auteurs signalent dans les hydrolysats d'extraits aqueux ou d'acides humiques de tourbes, les mêmes acides aminés que ceux identifiés par nous-mêmes. Ils constatent que les variations quantitatives sont enregistrées surtout avec les acides aminés d'origine microbienne tel l'acide diamino-pimélique. KONONOVA et ALEXANDROVA (1959) rencontrent sensiblement les mêmes acides aminés dans les produits d'hydrolyse d'acides humiques de chernozem ou de ceux obtenus par culture pure de *Penicillium niger* sur milieu nutritif liquide.

Nos travaux résumés ici et déjà partiellement publiés (JACQUIN, 1960 a et 1960 b) confirment l'homogénéité des constituants aminés entrant dans la formation des acides humiques. Si, avec des substrats très différents, on obtient, après incubation par des microflores variées, diverses substances humiques ; celles-ci, après hydrolyse, révèlent des acides aminés identiques.

Dans la nature, à partir d'azote organique d'origine quelconque et, le cas échéant, à partir d'azote ammoniacal, on constate que l'action des microorganismes engendre sensiblement les mêmes acides aminés. Ceux-ci constituent la fraction aminée hydrolysable des acides humiques. Il existe certainement d'autres possibilités de combinaisons entre éléments simples azotés et divers composés organiques. Cependant, la présence de tous les acides aminés dans les extraits aqueux hydrolysés tend à démontrer une participation initiale de ces éléments à la formation de l'édifice moléculaire humique. Dans la partie suivante de ce travail, nous allons essayer de suivre l'évolution des acides aminés au cours de la décomposition de la matière organique.

III. - EVOLUTION DES ACIDES AMINES SOLUBLES AU COURS DE LA « DECOMPOSITION IN VITRO » DES MATIERES ORGANIQUES

Afin d'extraire les acides aminés libres ou faiblement liés à la matière organique, donc susceptibles de subir des transformations,

plusieurs procédés peuvent être envisagés. SCHMIDT, PUTMAM et PAUL (1960) utilisent l'alcool éthylique pour recueillir les acides aminés libres présents dans les sols. Ensuite, PAUL et SCHMIDT (1961), considérant comme peu efficaces les extractions par l'eau et l'alcool, préconisent l'emploi d'une solution d'acétate d'ammonium neutre. En ce qui nous concerne, nous préférons opérer une extraction à froid par l'acide chlorhydrique 0,5 N. Après cette hydrolyse légère, nous isolons les acides aminés libres plus une fraction des composés azotés faiblement liés à la matière organique ; notons que cet extrait correspond aux acides fulviques libres de TURIN (1951).

A) Résultats obtenus.

Nous désirons suivre l'évolution de certains acides aminés libres au cours de la dégradation de diverses matières organiques végétales ; aussi nous ne procédons pas à une étude systématique rigoureuse de tous les composés aminés présents dans les extraits, mais à une évaluation semi-quantitative des principaux éléments. Au départ, nous déterminons les composés azotés recueillis à partir des trois substrats témoins stérilisés par autoclavage, mais non inoculés. Ensuite, nous comparons l'évolution des composés azotés présents au cours de la décomposition de ces substrats provoquée par les inoculums suivants : souche pure de *Trechispora*, inoculums mixtes de podzol, mull acide et rendzine. Nous réalisons cette étude à deux périodes différentes d'incubation, soit après les délais de douze et vingt mois. Rappelons ici que chaque fiole contient initialement 8 g de matériel. À la suite des divers traitements, le contenu de chaque fiole subit une macération dans 100 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N. Après filtration, puis purification, 1/20 de l'extrait acide est concentré avant d'être déposé sur les chromatogrammes ; de cette façon, nous pouvons envisager ultérieurement une comparaison entre l'intensité des différents spots obtenus suivant les techniques décrites précédemment.

1°) ACIDES AMINÉS PRÉSENTS DANS LES EXTRAITS DE SUBSTRATS NON INOCULÉS.

Après identification, nous retrouvons, à deux exceptions près, les mêmes acides aminés libres que ceux signalés dans les sols par CARLES et DECAU (1960 a et 1960 b). Il s'agit des acides aspartique et glutamique, de la valine, leucine, arginine, lysine, histidine, cystine et alanine. Nous n'avons isolé de nos extraits, ni la phénylalanine, ni le tryptophane, mais ce dernier est susceptible d'être détruit par hydrolyse (LYNCH et *al.*, 1959).

Toutefois, il nous faut noter la présence d'acides aminés non identifiés dans les extraits de paille et sciure. Par contre, avec les

TABLEAU 18

Intensité des spots révélés par la ninhydrine (acides aminés et osamines)
sur des chromatogrammes obtenus à partir d'extraits acides
de substances végétales

| | Témoins | | | Après douze mois d'incubation | | | | | | Après vingt mois d'incubation | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---------|---|---|-------------------------------|---|---|----|---|---|-------------------------------|---|---|----|---|---|----|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S | P | T | S | | | P | | | T | | | S | | | P | | | T | | | | | | | | |
| | | | | Th | M | R | Th | M | R | Th | M | R | Th | M | R | Th | M | R | Th | M | R | | | | | | |
| Leucine | 4* | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Valine | 4 | 5 | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Alanine | 4 | 5 | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Acide glutamique... | 4 | 5 | 5 | 3 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| Acide aspartique .. | 5 | 4 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2 | 5 | 2 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| Lysine - Arginine .. | 4 | 5 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Osamines | 0 | 1 | 4 | 1 | 3 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2 | 4 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 5 |

* L'échelle des différentes intensités des spots révélés par la ninhydrine s'étale entre 0 et 5, ce dernier chiffre correspond à l'intensité maximum rencontrée pour un composé dans l'un ou l'autre des extraits.

extraits de Trèfle, nous remarquons une intensité réduite de nombreux spots, ce qui correspond à une faible teneur en acides aminés ; à l'opposé, il nous faut souligner la présence d'une quantité notable d'osamine.

2°) ACIDES AMINÉS PRÉSENTS DANS LES SUBSTRATS APRÈS INCUBATION.

Nous avons consigné l'ensemble de nos résultats dans un tableau schématique (n° 18). Nous y indiquons les variations d'intensité des spots caractéristiques des principaux composés azotés. Ceux-ci sont classés par ordre de Rf décroissant dans le solvant butanol, acide acétique, eau.

Il existe une première variation en fonction de la nature même des acides aminés. Nous constatons une diminution très rapide des acides aminés aliphatiques à longue chaîne carbonée (leucine et valine) ; un résultat identique se retrouve pour les acides aminés basiques (lysine et arginine). L'alanine, acide aminé neutre à courte chaîne carbonée, disparaît beaucoup plus lentement. Finalement, les acides monoamino-dicarboxyliques présentent une résistance marquée vis-à-vis des attaques microbiennes.

Nous examinons ensuite l'influence de la microflore et du substrat après un temps variable d'incubation :

a) Composés aminés présents dans les extraits obtenus après douze mois d'incubation :

La diminution progressive du taux de certains acides aminés s'accompagne d'une augmentation de la teneur en sucres aminés. L'influence de l'inoculum comparée à celle du substrat se montre prépondérante. Les variations enregistrées par rapport aux témoins non inoculés présentent une amplitude moyenne après attaque par *Trechispora*, elles augmentent au cours de l'incubation avec des microflores de mull et de podzol pour s'accroître encore davantage dans le cas d'un inoculum de rendzine. Notons que les différences maxima portent sur la quantité d'osamine rencontrée dans les divers extraits.

Néanmoins avec la sciure, en regard des résultats rencontrés avec les autres matériels, l'influence du substrat se traduit par une diminution légèrement plus rapide du taux des acides aminés ; ce fait peut être dû à l'existence d'un C/N très élevé.

b) Composés aminés présents dans les extraits obtenus après vingt mois d'incubation :

Mise à part une double exception concernant les acides glutamique et aspartique, il ne subsiste que des traces d'acides aminés solubles dans les produits de décomposition obtenus *in vitro* sous

l'influence des microflores mixtes. En présence du champignon lignivore, les acides aminés disparaissent beaucoup plus lentement. Après révélation par une solution de ninhydrine, la richesse des acides fulviques libres en osamines se traduit par une formation de spots intenses, ceci quel que soit l'inoculum employé. En outre, il nous faut mentionner en présence de microflores mixtes l'atténuation très nette des divergences constatées lors d'un délai d'incubation plus bref.

B) Discussion.

Des travaux plus récents (DECAU *et al.*, 1961), réalisés sur les variations des acides aminés libres lors de la fermentation de paille de Blé, confirment nos observations sur la résistance offerte par les différents acides aminés à l'attaque de microflores aérobies.

Par contre, nos résultats nécessitent une comparaison plus approfondie avec les travaux entrepris parallèlement aux nôtres par IVARSON et SOWDEN (1959 a et 1959 b). Ces auteurs notent les variations observées après incubation de deux litières forestières : l'une d'arbres à feuilles caduques, l'autre de conifères : la première soumise à l'influence d'un inoculum de mull, la seconde à celle d'une microflore de podzol. Au moment de la publication de nos premiers résultats (JACQUIN, 1960), ces deux chercheurs mentionnaient les variations observées pour une durée de 165 jours d'incubation. Celles-ci se traduisent par une légère diminution du taux des acides aminés et une augmentation constante du pourcentage de glucosamine et de galactosamine. Ces auteurs posent la question du devenir des hexosamines.

La durée beaucoup plus longue de nos expériences permet non seulement de déceler une diminution, mais une disparition complète de certains acides aminés. Une fraction de ceux-ci contribue à la formation d'osamines. Il paraît alors possible d'envisager l'évolution ultérieure de ces dernières : elles se transformeraient en composés plus complexes susceptibles de contribuer à la formation des composés fulviques.

Au cours de la phase initiale d'une décomposition *in vitro*, on remarque la présence d'une quantité importante d'osamines si l'inoculum correspond à une population riche en bactéries (rendzine). A l'opposé avec une microflore à prédominance fongique (podzol), la quantité d'amino-sucres existant dans les acides fulviques libres se révèle beaucoup plus faible. Si, par la suite dans nos expériences *in vitro*, les divergences s'atténuent, celles-ci peuvent persister dans la nature ; l'écart se maintiendrait par suite du renouvellement constant de la matière organique fraîche.

Terminons en soulignant l'influence primordiale de la microflore ; cependant, dans nos essais, tous les substrats présentent une teneur élevée en lignine.

IV. - EVOLUTION DES ACIDES AMINES DANS LES SOLS

Pour nous permettre d'avancer quelques hypothèses, sur le devenir des acides aminés, dont nous avons étudié une des premières phases de transformation, il nous faut placer nos résultats dans un contexte plus général.

A) Données bibliographiques.

Un rapide bilan sur l'état de l'azote dans le sol indique une large prépondérance de l'azote organique. D'après SCHEFFER et ULRICH (1960), cette forme peut subir une hydrolyse, avec libération d'acides aminés, dans des proportions variant entre un tiers et deux tiers. Une deuxième fraction moins importante existe sous forme de sucres aminés ; STEVENSON (1957 b) observe que 5 à 11 % de l'azote des couches superficielles du sol correspond à des osamines, principalement glucosamine et galactosamine. Une troisième fraction entrerait dans la constitution d'hétérocycles divers, susceptibles entre autres de participer à la formation des acides humiques.

L'étude des acides aminés présents dans les hydrolysats de sol a pris un réel essor depuis la mise au point de méthodes précises. Dès 1950, BREMNER identifie par chromatographie quatorze acides aminés dans les hydrolysats de plusieurs sols et observe qu'ils ne varient guère d'un échantillon à l'autre. SOWDEN (1955) étudie les acides aminés non basiques de trois sols et remarque que leurs proportions sont à peu près identiques. STEVENSON (1956) isole par chromatographie sur colonne trente-deux acides aminés. BREMNER et SCHAW (1954), puis STEVENSON (1957 a et 1957 b) procèdent à des études quantitatives sur la répartition de ces substances aminées dans les sols. CARLES et DECAU (1960 a et 1960 b) confirment la stabilité quant à la nature des acides aminés, mais ils enregistrent des différences quantitatives en fonction de la profondeur, du climat et du rapport C/N.

Depuis plusieurs années, on admet l'existence d'acides aminés libres dans les sols : PAUL (1958) en signale une quinzaine dans des proportions voisines de 0,5 µg par gramme de sol. PAUL et SCHMIDT (1961) remarquent que cette quantité peut atteindre 100 µg par augmentation de l'activité microbiologique du sol.

Que deviennent ces acides aminés libres ?

Une fraction est absorbée par les racines ; une seconde se fixe aux argiles : HUGH et *al.* (1959), EVERETT (1959), STEVENSON et DHARIVAL (1959), SIESKING (1960) ; la troisième, la plus importante, est utilisée par les micro-organismes. SIMONART et *al.* (dès 1956) observent la disparition d'acides aminés libres sous l'influence de la microflore. Une étude approfondie des processus de décomposition des amino-acides, tant en milieu anaérobie qu'aérobie a été entreprise par GREENWOOD et LEES (1960 a et 1960 b), SCHMIDT et *al.* (1960) indiquent que cette dégradation est complète et rapide. CARLES et DECAU (*loc. cit.*) mentionnent plusieurs possibilités de transformation : décarboxylation, désamination ou destruction complète de la molécule. HOFFMAN E. et G. (1955) notent que les noyaux aromatiques présentent une plus grande résistance aux attaques microbiennes que les chaînes aliphatiques.

En ce qui concerne les amino - sucres, deux conclusions intéressantes sont publiées respectivement par STEVENSON (1957 a et 1957 b) et SOWDEN (1959). Le premier auteur constate une augmentation du pourcentage d'osamines en corrélation avec la profondeur de l'horizon étudié ; le taux de sucres aminés peut représenter 24 % de N total dans un horizon B de podzol. Le second remarque l'existence d'une quantité beaucoup plus importante d'osamines dans les sols que dans les acides humiques correspondants.

B) Résumé de nos expériences.

In vitro, nous observons, quelle que soit la microflore ou le substrat, une diminution des acides aminés présents dans les acides fulviques libres. Parallèlement, cette fraction s'enrichit en osamines. Les résultats de l'étude chromatographique nous permettent donc d'envisager, dans les extraits acides, la formation de complexes unissant polysaccharides et acides aminés. Par contre, dans la nature, le renouvellement de la matière organique fraîche, lié à sa décomposition plus ou moins rapide, maintiendrait un taux constant d'acides aminés, ou, plus simplement, masquerait cette évolution en reconstituant le stock d'acides aminés du sol.

C) Discussion.

Par la confrontation de nos résultats avec certaines études bibliographiques, on peut supposer l'existence de plusieurs modes de participation de l'azote à l'édification des substances humiques.

1°) Les osamines résultant du métabolisme microbien constitueraient l'un des premiers maillons nécessaires à l'édification des substances humiques. Elles interviendraient vraisemblablement suivant des systèmes de réactions analogues à ceux décrits par HODGE

(1953) et KATO (1960) et se produisant lors des phénomènes de brunissement rencontrés chez des végétaux. Cette transformation des sucres aminés en molécules plus complexes, résistant à l'hydrolyse, justifierait le pourcentage relativement faible de ces éléments dans les hydrolysats d'acides humiques.

Dans les sols, le taux maximum d'osamines se situe dans les horizons d'accumulation de podzol. Or, c'est précisément en ce lieu que se rassemblent les acides humiques formés à partir des extraits solubles entraînés des horizons supérieurs. Il semble donc possible de suggérer que les osamines présentes dans les acides fulviques libres participent sous une forme ou l'autre à la constitution des acides humiques. Cette hypothèse, émise par nous-même au début de 1960, est également reprise, la même année, par STEVENSON.

2°) La mise en évidence d'acides aminés de même nature dans les hydrolysats de substances humiques naturelles ou issues de végétaux en décomposition, milite en faveur de la présence d'acides aminés faiblement liés au noyau aromatique. Dans cette alternative, on retrouve le processus classique de l'incorporation d'acides aminés dans les chaînes latérales de l'édifice moléculaire des acides humiques.

RÉSULTATS

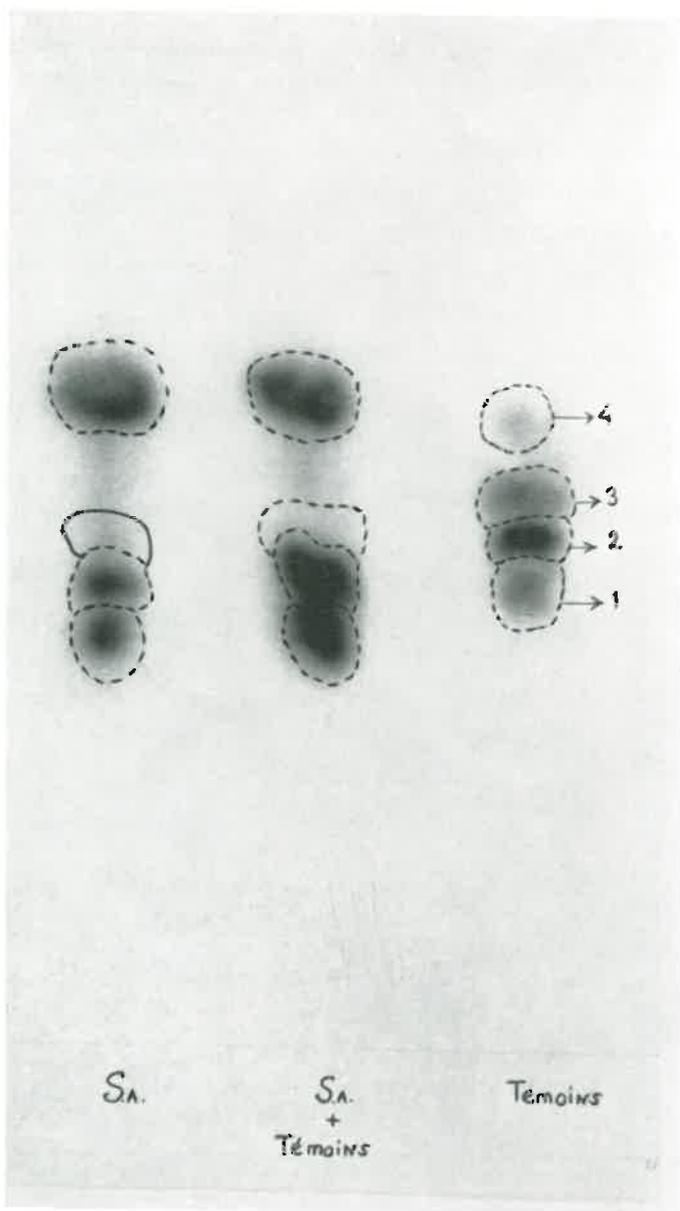
DE L'ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Après avoir rappelé quelques principes nécessaires à l'identification de composés phénoliques simples, nous établirons un tableau des réactions colorées caractéristiques de quelques-uns d'entre eux. Ensuite, nous déterminerons la nature des phénols présents dans certains extraits aqueux de végétaux avant ou après incubation par des microflore variées. Finalement, nous procéderons à une estimation quantitative des acides-phénols rencontrés dans les hydrolysats de substances humiques naturelles ou obtenues par décomposition *in vitro* de matières organiques végétales. De l'ensemble, nous essayerons de dégager un ou plusieurs schémas concernant l'évolution des polyphénols au cours de la formation d'acides humiques, en supposant que la lignine en est la matière première.

I. - IDENTIFICATION DE COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES

Au cours de la première partie de ce travail, nous étudions les composés phénoliques isolés par une extraction à l'éther ou à l'acétate d'éthyle et établissons une comparaison entre des hydrolysats de substances humiques et des extraits aqueux issus de végétaux en décomposition.

Si l'éther éthylique permet de séparer les composés phénoliques simples, l'acétate d'éthyle solubilise des phénols plus condensés. Il paraît donc logique, de prime abord, d'identifier les produits les plus simples et de suivre leur évolution au cours de la décomposition de matière organique végétale.



Acide acétique 2 %

p - nitraniline

PLANCHE 7

Différence de migration entre composés phénoliques employés isolément ou après surcharge d'un extrait issu de sciure (Sa)

- 1) Acide syringique.
- 2) Acide vanillique.
- 3) Acide p-hydroxybenzoïque.
- 4) Vanilline.

| COMPOSES PHENOLIQUES | R _F | Nitrate d'argent ammoniacal | | Lumière |
|--|----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | Observations immédiates | Observations sur fond brun | Observations directes |
| Phloroglucinol (OH) ₃ C ₆ H ₃ | 53 | brun léger | brun | |
| D - Catéchine (OH) ₄ (C ₁₅ H ₁₀ O ₂) | 38 | gris vert | gris bleu | violet foncé |
| Vanilline | 68 | | bleuté | |
| CH ₃ — OH — C ₆ H ₃ — CHO | | | | |
| Acide p-hydroxybenzoïque | 59 | | brun roux | |
| OH — C ₆ H ₄ — COOH | | | | |
| Acide p-coumarique | 39 | | brun clair | violet foncé |
| OH — C ₆ H ₄ — CH = CH — COOH | | | | |
| Acide protocatéchique | 48 | gris bleu | gris bleu | violet foncé |
| (OH) ₂ — C ₆ H ₃ — COOH | | | | |
| Acide gentisique | 53 | bleu gris | bleu gris | bleu lumineux |
| (OH) ₂ — C ₆ H ₃ — COOH | | | | |
| Acide caféique | 27 | bronze | bleu gris | bleu lumineux |
| (OH) ₂ - C ₆ H ₃ - CH = CH - COOH | | | | |
| Acide vanillique | 55 | | brun rosé | |
| CH ₃ O — OH — C ₆ H ₃ — COOH | | | | |
| Acide ferulique | 29 | brun rose | brun | bleu violet |
| CH ₃ O — OH — C ₆ H ₃ — CH = CH — COOH | | | | |
| Acide gallique | 38 | brun roux | roux violet | |
| (OH) ₃ — C ₆ H ₂ — COOH | | | | |
| Acide syringique | 47 | beige bleu | beige gris | |
| (CH ₃ O) ₂ — OH — C ₆ H ₂ — COOH | | | | |
| Acide chlorogénique | 56 | gris vert | bleu gris | bleu violet |
| (OH) ₂ C ₆ H ₃ — CH = CH — CO (C ₆ H ₉ O ₄) COOH | | | | |
| Acide ellagique | 0 | gris bleu | gris | |
| (OH) ₄ C ₁₃ H ₂ O ₄ | | | | |

TABLEAU
Teintes caractéristiques de quatorze composés phénoliques

| de Wood | P-Nitraniline diazotée | | Acide sulfanilique | | Dibromo-quinone avec NH ₃ | Chlorure ferrique |
|---------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------|
| | seule | + Na ₂ CO ₃ | seul | avec NH ₃ | | |
| | rouge pourpre | rouge brun | rouge or. | rouge brique | bleu vert | beige |
| | orange brun | brun roux | rouge vert | orange brun | bleu gris | brun vert |
| violet foncé | jaune | violet léger | | orange rose | bleu léger | |
| | jaune pâle | rose rouge | jaune brun | jaune orange | | jaune pâle |
| violet foncé | orange | gris noir | jaune pâle | rouge vif | bleu vert | orange léger |
| violet foncé | jaune brun | gris bleu | | magenta | gris argenté | vert bronze |
| bleu lumineux | blanc beige | brun jaune | jaune brun | blanc | gris beige | orange brun |
| bleu jaune | brun orangé | gris bleu | brun chocolat | mauve | violet gris | vert bleu |
| | jaune | violet intense | jaune chrome | rouge brique | bleu intense | jaune pâle |
| bleu violet | rouge vif | gris violet | brun rouge | violet | vert bleu | beige rose |
| bleu jaune | jaune or | jaune brun | jaune vert | blanc gris | bronze gris | beige gris |
| | jaune orangé | bleu vert | jaune orange | rouge brique | bleu intense | beige léger |
| bleu jaune | brun | brun jaune | jaune brun | blanc brun | vert bronze | vert gris |
| | jaune brun | brun léger | brun | brun | brun | gris bleu |

obtenues après migration à l'aide d'acide acétique à 2 %

La comparaison avec des Rf de référence publiés lors de travaux antérieurs permet d'opérer une première sélection quant à la nature des composés à identifier. L'emploi systématique des six solvants de REIO (1958 et 1960) indique l'absence d'une grande quantité de composés phénoliques. Nous expérimentons ensuite les autres solvants et obtenons une séparation particulièrement nette des composés phénoliques présents dans les extraits éthérés, en utilisant l'acide acétique à 2 % ou le solvant de COLOMBO (1961). Il existe cependant une différence entre les Rf de solutions-témoins et ceux observés pour les mêmes composés jouant le rôle de surcharge dans un extrait. La planche n° 7 illustre ce fait en concrétisant les variations de migration à l'aide d'acide acétique à 2 %, de trois acides-phénols : acide syringique (1), acide vanillique (2), acide p-hydroxybenzoïque (3), et de la vanilline (4). Les témoins 1, 2, 3 se retrouvent dans l'extrait éthéré de sciure (Sa), présence confirmée par la superposition des spots obtenus après dépôts successifs d'extrait de sciure et de solutions-témoins.

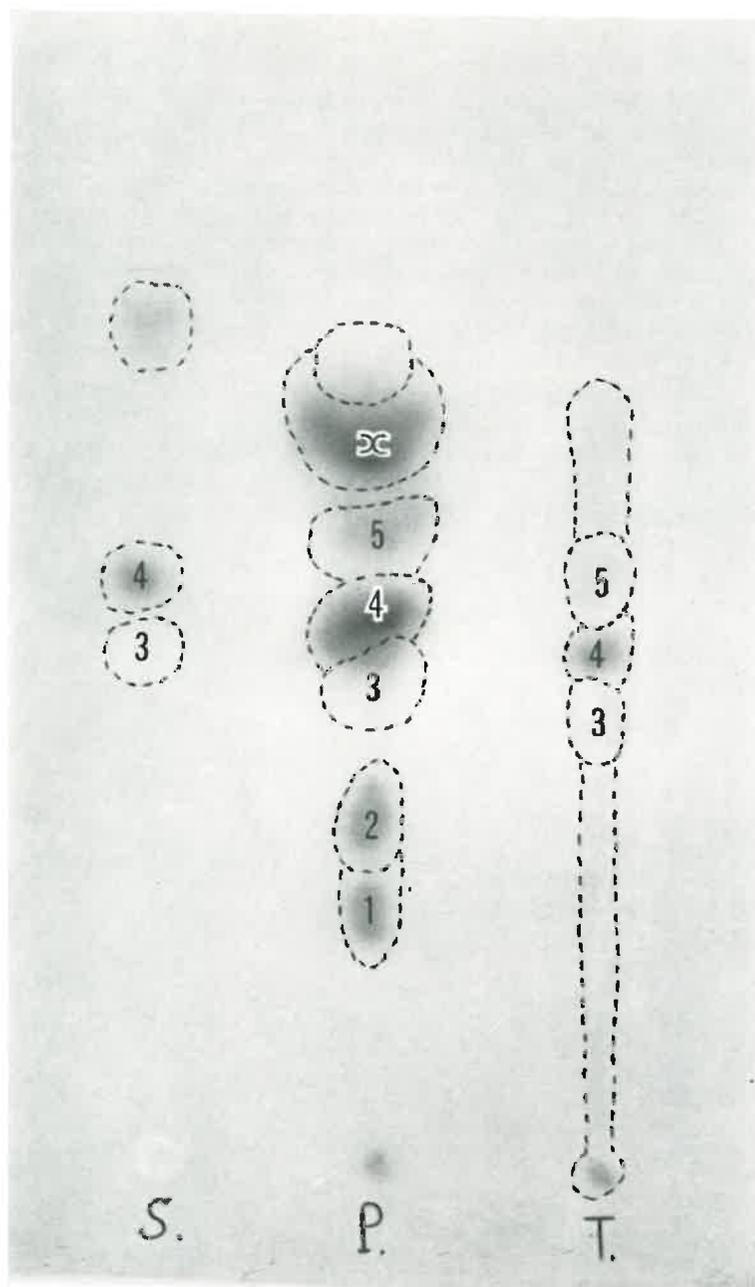
Il s'avère donc indispensable de confirmer l'identification d'un constituant par l'emploi de plusieurs réactions colorées caractéristiques. Cependant, certaines teintes obtenues sont fugaces, d'autres présentent des nuances différentes, en fonction du pH. Aussi, avons-nous été amenés à comparer, après migration à l'aide d'acide acétique à 2 %, les colorations obtenues avec quelques composés phénoliques susceptibles de se trouver dans nos extraits éthérés. Les résultats consignés dans le tableau 19 nous serviront de référence en vue des identifications ultérieures.

II. - COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LES EXTRAITS AQUEUX DE VEGETAUX FRAIS

Nous avons essayé de caractériser les phénols simples présents dans les extraits de certains végétaux. Comme matériel, nous utilisons les trois substrats suivants : sciure de Hêtre, paille de Blé, tiges et feuilles de Trèfle violet. Afin de créer des conditions identiques à celles de nos expériences, les substances sont stérilisées par autoclavage, mais non inoculées. Après simple macération dans l'eau chloroformée, puis concentration, les filtrats subissent une extraction à l'éther éthylique. Nous constatons dans les trois cas des résultats positifs malgré l'absence d'hydrolyse préalable.

A) Résultats.

L'observation de la planche 8 permet de saisir immédiatement les principales différences existant entre les trois substrats. En effet, chaque dépose correspond à l'extrait éthéré issu du produit de macération de quatre grammes de matière sèche. Après migration



Acide acétique 2 %

PLANCHE 8

p - nitraniline

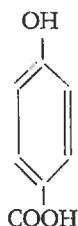
Composés phénoliques présents dans les extraits aqueux
de substances végétales.

S = Sciure de Hêtre.
P = Paille de Blé.
T = Trèfle violet.

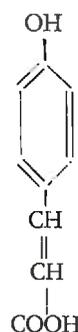
1) Acide férulique.
2) Acide coumarique.
3) Acide syringique.
4) Acide vanillique.
5) Acide p-hydroxybenzoïque.

à l'aide d'acide acétique à 2 %, nous avons pulvérisé sur le papier une solution de p-nitraniline diazotée. Si l'étude du chromatogramme permet de déterminer l'importance relative des divers composés phénoliques, il nous faut néanmoins recourir à la chromatographie bidimensionnelle pour procéder à une identification certaine. En outre, l'usage de ce dernier procédé permet une séparation plus complète entre les constituants d'un extrait et nous relevons alors la présence de onze composés phénoliques dans l'extrait étheré de paille, sept dans celui de Trèfle et seulement cinq dans celui de sciure.

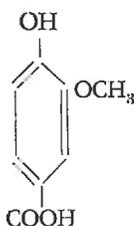
Parmi les corps décelés, cinq acides-phénols sont identifiés avec certitude dans l'un ou l'autre des extraits aqueux. Il s'agit des composés suivants : acide p-hydroxybenzoïque, acide p-coumarique, acide vanillique, acide ferulique et acide syringique, dont les formules sont indiquées ci-dessous.



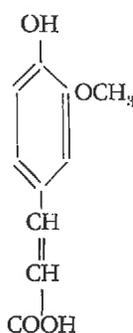
a. p - hydroxybenzoïque



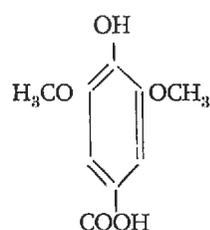
a. p - coumarique



a. vanillique



a. ferulique



a. syringique

Deux autres composés ont été identifiés, sous réserve, ils fournissent en effet des réactions à la 2 - 4 - dinitrophénylhydrazine et à la benzidine semblables à celles observées avec des composés

à fonction aldéhyde ou cétone. Un de ces corps correspondrait à l'aldéhyde syringique, mais en l'absence de témoin, il n'a pas été possible de vérifier cette hypothèse. Un deuxième spot donne toutes les réactions caractéristiques de la vanilline, mais les R_f avec plusieurs solvants ne sont pas identiques à ceux décrits dans la littérature. La superposition d'un témoin interne provoque un léger décalage entre le spot de vanilline et celui de la substance non identifiée. Dès 1949, BLAND constate la présence de vanilline et d'aldéhyde syringique dans les produits d'oxydation de la lignine. PEARL et BEYER (1954) déterminent dans des conditions expérimentales voisines les corps suivants : vanilline, déhydrodivanilline, 5-formyl-vanilline et acide vanilline-5-carboxylique. Nous pourrions donc être en présence de l'un ou l'autre de ces dérivés.

En résumé, une simple macération aqueuse de nos trois substrats avant incubation renferme des composés variables qualitativement et quantitativement en fonction du matériel étudié. Il nous faut mentionner ici l'influence d'une stérilisation par autoclavage. En effet, en comparant les résultats obtenus avec des produits frais et des produits autoclavés, nous constatons qu'un chauffage à 125° pendant une demi-heure entraîne une diminution, sinon une disparition de certains composés, tel l'acide p-hydroxybenzoïque. L'addition de carbonate de calcium renforce encore ce fait, ceci en accord avec la théorie de COULSON et *al.* (1960 a) sur la condensation des polyphénols dans la nature.

B) Discussion.

L'étude des polyphénols des végétaux a fait récemment l'objet de nombreuses recherches, citons entre autres les travaux de : BATE-SMITH (1958), MIKAILOV (1958), PRIDHAM (1959), SWAIN et HILLIS (1959), COULSON, DAVIES et LEWIS (1960 a et 1960 b), PICTET et BRANDENBERGER (1960), WRIGHT et *al.* (1960), LOVE et BROWN (1960). La bibliographie peut être résumée par les résultats d'IBRAHIM et TOWERS (1960) : ces auteurs signalent que l'hydrolyse d'un végétal quelconque libre, en quantité plus ou moins abondante, les acides p-hydroxybenzoïque - protocatéchique - vanillique - gentisique et caféique.

Les travaux concernant les composés phénoliques simples, rencontrés dans les extraits aqueux non hydrolysés de végétaux, sont moins nombreux : LEWIS (1958) signale quelques-uns de ces corps dans l'extrait d'une litière forestière de mor et ceci uniquement au cours des six premiers mois suivant la chute des feuilles. Avec une litière sur mull et quelle que soit l'époque, il n'existe plus, dans l'extrait aqueux, de composés phénoliques migrant dans l'acide acétique à 2 %. Plus récemment BÖRNER (1960) identifie dans des extraits de paille de Seigle et d'Orge plusieurs acides-phénols susceptibles de jouer le rôle d'inhibiteur de croissance.

Nos recherches nous conduisent aux constatations suivantes :

1°) L'extrait étheré d'une macération aqueuse de sciure de Hêtre accuse une prédominance très marquée des acides syringique, vanillique et d'un composé voisin de la vanilline ;

2°) Le même extrait à partir de paille de Blé fournit un mélange plus complexe, en dehors des trois composés précédents, nous remarquons encore les acides p-hydroxybenzoïque, p-coumarique et ferulique ;

3°) Dans le cas du Trèfle, les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique existent en faible quantité, mais nous observons plusieurs composés phénoliques peu mobiles, ce qui pourrait indiquer une structure plus complexe.

En résumé, une estimation semi-quantitative indique une teneur et une complexité élevées des composés phénoliques isolés des extraits aqueux de paille et surtout de Trèfle. A l'opposé, un extrait de sciure témoigne d'une simplicité beaucoup plus grande se traduisant par la présence de trois éléments principaux.

III. — ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LES EXTRAITS AQUEUX DE VEGETAUX EN COURS DE DECOMPOSITION

Nous choisissons la sciure comme matériel d'étude, en effet, comme nous venons de le signaler dans le paragraphe précédent, il existe dans les extraits aqueux de cette substance une prédominance très nette de composés phénoliques simples. Le substrat subit, pendant trente mois, l'activité de l'un ou l'autre des inoculums suivants : souche pure de *Trechispora*, inoculums mixtes de podzol, de mull, de rendzine et I₂ et ceci dans les conditions décrites au chapitre I.

L'obtention des extraits à chromatographier comporte une variante sur le procédé employé en vue d'une simple identification : on remplace l'éther éthylique par un mélange, volume à volume, de ce composé et d'acétate d'éthyle. Comme nous l'avons déjà mentionné, on recueille, par cette méthode, une fraction supplémentaire essentiellement formée de composés phénoliques plus condensés. L'extraction est effectuée sur les extraits aqueux avant ou après une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N pendant douze heures.

Nous comparons les chromatogrammes d'extraits de sciure fraîche ou de ce même substrat dégradé par différents inoculums. Dans tous les cas, la fraction de matériel employée pour la macération correspond à 4 g de matière sèche.

A) Résultats.

1°) EXTRAITS AQUEUX, NON HYDROLYSÉS, DE SCIURE EN COURS DE DÉCOMPOSITION :

Les images chromatographiques obtenues avec les extraits aqueux de sciure en voie de décomposition sont, en général, très différentes de celles obtenues avec des extraits de sciure autoclavée, mais non inoculée. La seule exception concerne le produit attaqué par une microflore de podzol ; l'intensité des taches formées par les trois composés phénoliques est alors identique à celle du témoin. Après attaque de la souche lignivore (Th), les spots révélés par une solution de p - nitraniline diazotée sont beaucoup plus importants. À l'opposé, pour les inoculum mixtes, quelle que soit leur nature, les extraits aqueux non hydrolysés ne renferment plus aucun composé phénolique simple ; cependant sur les chromatogrammes, on remarque la présence de composés phénoliques très peu mobiles, donc certainement plus complexes.

2°) EXTRAITS AQUEUX HYDROLYSÉS DE SCIURE EN COURS DE DÉCOMPOSITION :

Après hydrolyse, les extraits aqueux des fiolesensemencées à l'aide d'inoculum mixtes (sauf P) montrent sur les chromatogrammes des traces d'acides-phénols ; il s'agit d'acides p - hydroxybenzoïque, vanillique, syringique. Avec les extraits provenant de podzol ou de *Trechispora*, on assiste à une augmentation de l'intensité des spots par rapport à celle rencontrée pour les extraits non hydrolysés. Enfin, quel que soit l'inoculum, on note un accroissement important des composés phénoliques peu mobiles.

B) Discussion.

L'opposition marquée entre les divers résultats ci-dessus est telle que, même sans dosage précis, on peut tenir pour acquis le fait essentiel suivant : les produits de dégradation rencontrés sous l'influence d'un inoculum mixte (à l'exception d'une microflore de podzol) et ceux formés par action d'une souche pure de *Trechispora* sont bien différents. Dans la première alternative, on constate l'absence de composés phénoliques simples, dans la seconde, une augmentation de ces mêmes éléments ; ceci parallèlement à un taux de décomposition nettement plus élevé dans le deuxième cas (28,6 %) que dans le premier (de 8,75 à 14,2 %) (cf. chapitre II). Les variations quantitatives des composés phénoliques simples présents dans les extraits aqueux semblent correspondre à deux comportements différents.

1°) En présence du champignon lignivore, si l'on constate une forte décomposition du substrat accompagnée d'une baisse du taux de substances non hydrolysables, nous observons, dans les extraits

aqueux, à une très forte augmentation des composés phénoliques libres.

2°) A l'opposé, la diminution ou la disparition des composés phénoliques simples au cours de la dégradation par des inoculums mixtes est un fait indiscutable. Dans le cas d'humus naturels, elle pourrait résulter du lessivage : BLOMFIELD (1957), puis COULSON, DAVIES et LEWIS (1960 b) signalent l'entraînement de phénols simples par l'eau de pluie, mais dans nos expériences, le lessivage est évidemment exclu.

Il est également plausible de considérer les composés phénoliques simples comme une source de carbone pour les micro-organismes du sol [HENDERSON et FARMER (1955), MOREAU et AUGIER (1962)]. FLAIG et HAIDER (1961) signalent une possibilité identique pour les champignons de pourriture blanche. Cependant, à l'opposé, certains auteurs, tel GADD (1957) attribuent aux mêmes composés un rôle toxique. Il semble que les travaux de KNÖSEL (1959) apportent une réponse à ces divergences. À concentration moyenne, les acides-phénols libérés par la décomposition des plantes exerceraient un effet stimulant sur les micro-organismes du sol, à dose plus élevée, leur action deviendrait inhibitrice.

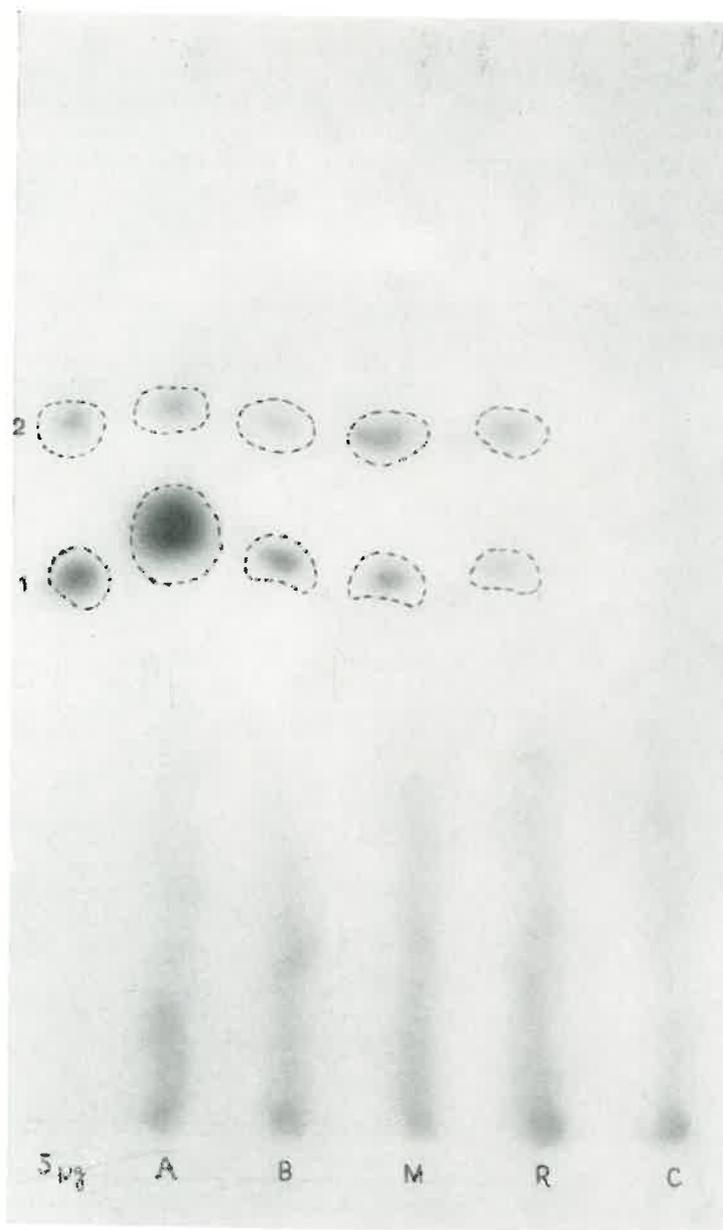
Dans une troisième hypothèse, la diminution de composés phénoliques simples découlerait d'un processus d'insolubilisation avec formation de substances plus complexes. L'augmentation du taux de substances humiques constatée lors des diverses incubations (cf. chapitre II), nous incite à pencher en faveur de cette synthèse humique due à une polymérisation d'unités aromatiques comme le note GADD (*loc. cit.*). Si cette évolution présente un rythme plus rapide en présence de microflore mixtes, elle existe certainement aussi au cours de l'activité d'un champignon lignivore ; une forte production de composés fulviques ou humiques peu polymérisés (cf. chapitre II) témoigne de ce phénomène. Au cours d'une hydrolyse acide, les édifices moléculaires néoformés seraient partiellement dégradés avec libération des éléments phénoliques initiaux ou de produits intermédiaires. Cependant, il est très intéressant de noter la présence d'un résidu non hydrolysable précipitant en milieu chlorhydrique. Ce précipité brun issu des extraits aqueux correspondrait plus spécialement à une fraction de substances du type « acides humiques ».

IV. - ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES LIBERES PAR HYDROLYSE DES SUBSTANCES HUMIQUES

A) Acides humiques naturels.

1°) RÉSULTATS.

Si l'on observe les chromatogrammes obtenus à partir d'une fraction étherée correspondant à 10 mg d'acides humiques hydrolysés,



Acide acétique 2 %

PLANCHE 9

p - nitraniline

Comparaison entre composés phénoliques présents dans les hydrolysats
issus de 10 mg de plusieurs acides humiques
et 5 µg d'acides vanillique (1) et p-hydroxybenzoïque (2)

- | | | | |
|-----------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| A) Podzol | - horizon A ₀ | R) Rendzine | - horizon A ₁ |
| B) Podzol | - horizon B ₁ | C) Chernozem | - horizon A ₁ |
| M) Mull | - horizon A ₁ | | |

on remarque aussitôt des divergences très nettes entre les types d'humus étudiés (planche 9). Avec tous les échantillons, l'emplacement de la dépose se matérialise par une tache correspondant à des composés phénoliques complexes. Par contre, chaque type d'humus libère une quantité différente et caractéristique de phénols simples : la dégradation des acides humiques de chernozem produit de faibles traces, tandis que les quatre autres hydrolysats contiennent des quantités beaucoup plus importantes, particulièrement d'acides vanillique et p-hydroxybenzoïque.

Une gamme témoin appropriée pour chacun de ces deux composés nous permet d'obtenir des résultats quantitatifs (JACQUIN, 1962). Les courbes ci-dessous fournies par le photomètre enregistreur ZEISS II montrent les résultats enregistrés pour les taches d'acide

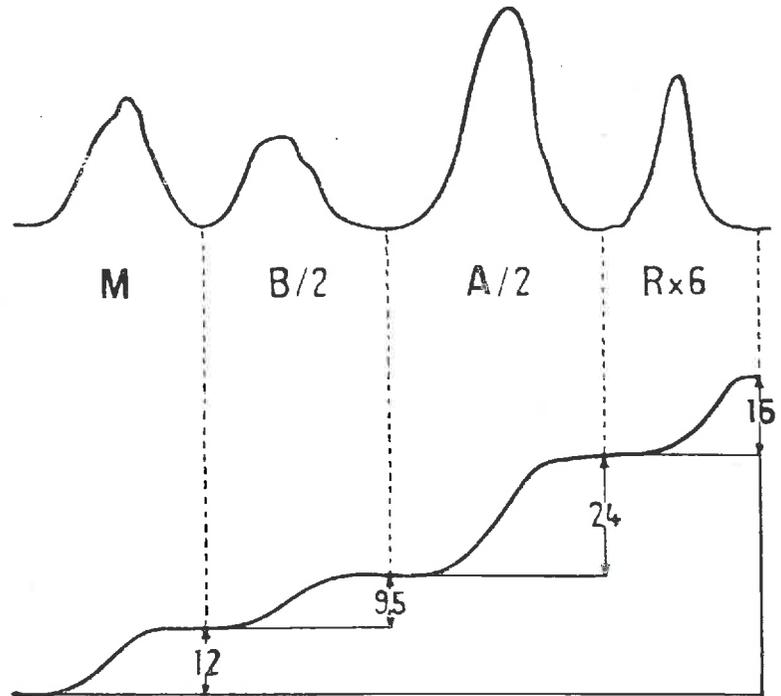


FIGURE 7

Courbes enregistrées après passage au photodensimètre des spots d'acide vanillique obtenus à partir d'hydrolysats d'acides humiques naturels.

- M : Extrait étheré de l'hydrolysats de 10 mg d'acides humiques d'un mull.
- B/2 : Extrait étheré de l'hydrolysats de 5 mg d'acides humiques de l'horizon B₁ d'un podzol.
- A/2 : Extrait étheré de l'hydrolysats de 5 mg d'acides humiques de l'horizon A₀ du même podzol.
- Rx6 : Extrait étheré de l'hydrolysats de 60 mg d'acides humiques de l'horizon A₁ d'une rendzine forestière.

vanillique issues d'extraits étherés de concentrations différentes (fig. 7).

La fraction des courbes correspondant aux acides humiques de chernozem n'est pas représentée ; ceux-ci contenant une quantité d'acide vanillique trop faible, pour être enregistrée par l'appareil, même dans le cas d'une fraction équivalant à 100 mg d'acides humiques.

Les surfaces de la courbe d'extinction n° 1 varient proportionnellement à la quantité d'acide vanillique présente dans chaque extrait étheré. La courbe n° 2 est tracée par l'intégrateur électronique sur papier millimétré. Elle permet de chiffrer l'intensité de chaque spot d'acide vanillique. Nous comparons ensuite les diverses intensités obtenues après emploi de méthodes chromatographiques rigoureusement identiques. A partir de concentrations connues et bien définies, nous déterminons la teneur de chaque extrait étheré en acides-phénols. L'ensemble de nos résultats pour les deux composés principaux est exprimé dans le tableau 20.

TABLEAU 20
Acides-phénols libérés par hydrolyse d'acides humiques naturels

| Horizons étudiés | Acide vanillique ‰ /00 | Acide p-hydroxybenzoïque ‰ /00 | Somme ‰ /00 |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| A ₀ podzol | 1,2 | 0,55 | 1,75 |
| B ₁ podzol | 0,45 | 0,425 | 0,875 |
| Mull | 0,26 | 0,83 | 1,09 |
| Rendzine | 0,06 | 0,45 | 0,51 |
| Chernozem | Traces | Traces | Traces |

a) *Acide vanillique* :

On note une relation inverse entre la teneur en acide vanillique et le degré de polymérisation des acides humiques étudiés, ce dernier croit, en effet, d'une façon régulière depuis le mor de podzol (riche en éléments précurseurs) jusqu'à un mull forestier (acides humiques bruns) et au mull calcique de chernozem (acides humiques gris). Les acides humiques gris libérant très peu d'acide vanillique à l'hydrolyse sont, on le sait, fortement polymérisés.

b) *Acide p-hydroxybenzoïque* :

Les variations dans le pourcentage en acide p-hydroxybenzoïque présentent beaucoup moins d'amplitude. Cependant, nous relevons une teneur plus élevée en cet élément pour le mull forestier.

c) *La somme des deux composés phénoliques* diminue des acides bruns de podzol et mull forestier, aux acides humiques gris polymérisés de rendzine et de chernozem.

2°) DISCUSSION.

Il est encore difficile d'expliquer ces faits, compte tenu des connaissances actuelles sur la biochimie de l'humus, on peut cependant avancer deux hypothèses :

Il est démontré que les acides vanillique et p-hydroxybenzoïque résultent au moins en majeure partie de la dégradation des lignines. On peut supposer qu'un processus de polymérisation intense masque ces corps dans les acides humiques gris et ne permet pas leur libération par hydrolyse.

L'acide vanillique peut aussi être métabolisé par la microflore et disparaître entièrement dans les milieux biologiquement très actifs tels les chernozems. Le problème de la transformation de certains composés phénoliques simples par les champignons du sol a été longuement étudié par HENDERSON (1956 et 1961 a et b). Se basant sur ces travaux, MOREAU et AUGIER (1962) indiquent que la vanilline employée comme source de carbone se transforme en acide vanillique lequel, à son tour, subit une déméthoxylation. Ils signalent que ce processus est beaucoup plus rapide avec une population issue d'une rendzine forestière qu'avec celle provenant d'un humus brut.

B) Produits de décomposition « in vitro ».

Nous envisageons une étude séparée des influences relatives du substrat et de la nature de la microflore.

1°) INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT.

Les substances humiques hydrolysées résultent d'un mélange, à parties égales, des produits de décomposition obtenus sous l'action d'une microflore de podzol et de mull après une incubation de trente mois.

a) Résultats :

La planche 10 représente les principaux spots révélés par une solution de p-nitraniline après migration à l'aide d'acide acétique à 2 %. Les déposes correspondent à l'extrait étheré d'hydrolysats de 15 mg de substances humiques.

Nous constatons dans les trois hydrolysats de composés humiques issus de sciure, paille, Trèfle, la présence presque exclusive

de trois composés phénoliques. L'identification suivant le processus classique permet de déterminer les trois acides-phénols suivants : acides p-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique.

Nous procédons alors à une estimation des variations quantitatives de ces trois composés en fonction du substrat.

● Acide syringique : ce composé existe en grande quantité dans les substances humiques issues de sciure, mais diminue dans les extraits sodiques de Trèfle. Le spot d'acide syringique ne se rencontre pas avec les hydrolysats de substances humiques résultant de la dégradation de paille de Blé. Une telle absence n'implique pas obligatoirement une carence de cet élément. En effet, la réaction de cet acide-phénol avec la p - nitraniline, suivie d'une pulvérisation de carbonate de sodium est peu sensible ; seule une concentration assez élevée permet l'obtention de la teinte vert-bleu caractéristique de l'acide syringique. Ce fait nous conduit à hydrolyser des quantités plus importantes de substances humiques afin d'obtenir un spot d'acide syringique appréciable quantitativement.

Nous évaluons ensuite approximativement l'importance des spots d'acides vanillique et syringique en les comparant aux intensités de taches obtenues à partir de quantités déterminées de substances pures. Cette estimation peut se chiffrer par les rapports suivants :

$$\text{Rapports acide syringique/ acide vanillique :}$$

$$\text{Sciure} = \frac{25}{15} \quad \text{Paille} = \frac{3}{15} \quad \text{Trèfle} = \frac{10}{15}$$

● Acides vanillique et p - hydroxybenzoïque : pour ces deux composés, le dosage quantitatif est effectué suivant la méthode préconisée pour les acides humiques naturels. Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU 21

Influence de la nature du substrat sur la quantité de composés phénoliques libérée par hydrolyse d'acides humiques *in vitro*

| Substrats | Acide vanillique ‰ | Acide p-hydroxybenzoïque ‰ | Somme ‰ |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|------------|
| Sciure | 4,95 | 0,12 | 5,07 |
| Paille | 3,55 | 0,51 | 4,06 |
| Trèfle | 2,25 | 0,45 | 2,7 |

— Les quantités d'acide vanillique libérées par hydrolyse varient suivant la nature de la matière organique.

— Les teneurs en acide p-hydroxybenzoïque sont sensiblement voisines pour la paille et le Trèfle ; avec la sciure, nous enregistrons un taux nettement moins élevé.

b) *Discussion* :

En observant l'hydrolysats de substances humiques issues de sciure, nous constatons une libération maximum de composés phénoliques avec dominance d'acide syringique. Toutefois, nous constatons aussi la présence d'un très faible pourcentage d'acide p-hydroxybenzoïque ; celui-ci s'accroît dans les hydrolysats de Trèfle et de paille. Or, ISHERWOOD (1959) signale dans les produits de dégradation de bois durs une prédominance très marquée de l'aldéhyde syringique ; par contre, dans le cas de Sphaignes, l'élément majeur correspond au p-hydroxybenzaldéhyde.

Il est possible d'effectuer un rapprochement entre nos résultats et les produits rencontrés après dégradation chimique des diverses lignines. SWAIN (1959) étudie les variations de ces derniers en fonction de la nature du végétal et note les caractéristiques suivantes : il existe exclusivement de la vanilline dans les produits de dégradation de lignine de Gymnospermes, par contre chez les Angiospermes Dicotylédones l'aldéhyde syringique et la vanilline prédominent, finalement l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque se rencontre surtout chez les Monocotylédones. Mise à part une richesse élevée en acide p-hydroxybenzoïque dans les substances humiques issues du Trèfle, nous constatons une bonne concordance entre nos résultats et ceux de SWAIN.

La présence d'acides-phénols libérés en plus ou moins grande quantité suivant la nature du substrat attire notre attention sur un fait remarquable. En effet, l'examen du taux de substances non hydrolysables (cf. chapitre II) calculé après action de la souche lignivore montre un indice L croissant dans l'ordre sciure, paille, Trèfle et les valeurs enregistrées sont les suivantes : 46 - 76 - 107. Or, nous observons un classement exactement inverse pour la somme des acides vanillique et p-hydroxybenzoïque trouvés dans les hydrolysats de substances humiques. L'hydrolyse de ces dernières substances permettrait donc de saisir les produits de dégradation de la lignine avant leur incorporation irréversible au sein d'une molécule humique.

En résumé, la nature du substrat influe sur la quantité d'acides-phénols présents dans les hydrolysats des produits de décomposition *in vitro*.

2°) INFLUENCE DE LA NATURE DE LA MICROFLORE.

Les variations dans la composition des produits d'hydrolyse, en fonction de la microflore, sont étudiées sur les substances humi-

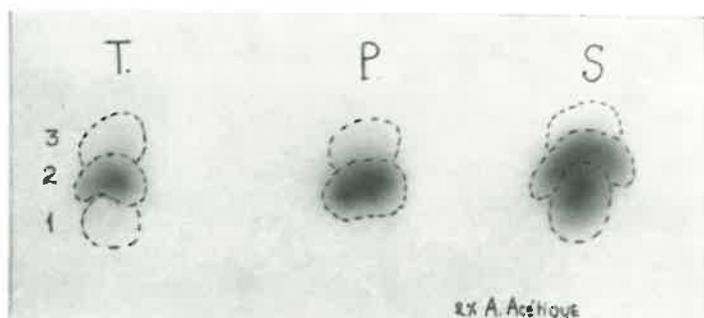


PLANCHE 10

p - nitraniline

Chromatogrammes d'hydrolysats de substances humiques obtenues « *in vitro* »

- | | |
|---|------------------------------|
| T = Substances humiques issues de Trèfle. | 1) acide syringique. |
| P = Substances humiques issues de paille. | 2) acide vanillique. |
| S = Substances humiques issues de sciure. | 3) acide p-hydroxybenzoïque. |

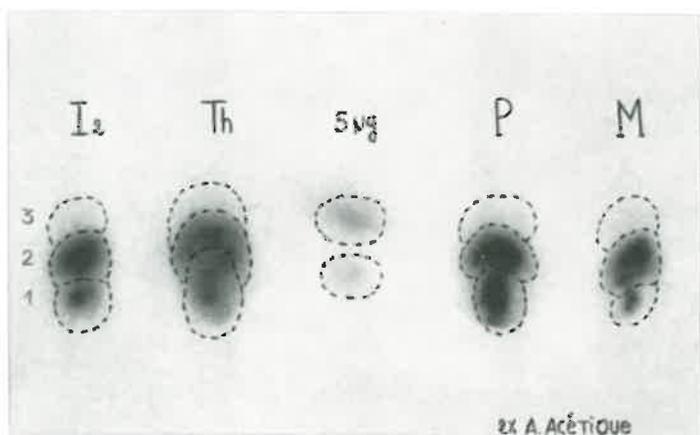


PLANCHE 11

p - nitraniline

Comparaison entre les produits d'hydrolyse de substances humiques « *in vitro* » obtenues après incubation par différentes microflores.

- | | |
|----------------------------------|------------------------------|
| I ₂ = Inoculum mixte. | 1) acide syringique. |
| Th = <i>Trechispora</i> . | 2) acide vanillique. |
| 5 µg = Solutions témoins. | 3) acide p-hydroxybenzoïque. |
| P = Podzol. | |
| M = Mull. | |

ques provenant de la décomposition du Trèfle ; notre choix s'est fixé sur ce substrat parce qu'il fournit les trois acides-phénols à des concentrations suffisantes et non disproportionnées entre elles.

Résultats :

La planche 11 illustre les différences observables entre les spots obtenus à partir de l'hydrolysate de 20 mg de substances humiques, d'une part, et ceux fournis par 5 µg d'acides-phénols témoins. La migration et la révélation sont effectuées respectivement par l'acide acétique et la p-nitraniline.

● Acide syringique : parmi les trois spots témoins, celui de l'acide syringique est à peine révélé par la p-nitraniline. Par contre, on peut obtenir une évaluation semi-quantitative en comparant entre eux les spots d'acide syringique et ceux d'acide vanillique obtenus pour les différentes substances humiques.

Les rapports acide syringique/acide vanillique correspondent alors aux valeurs suivantes :

$$\text{Th} = \frac{18}{15} - \text{P} = \frac{20}{15} - \text{I}_2 = \frac{8}{15} - \text{M} = \frac{4}{15}$$

Il existe donc un écart très net entre les produits issus de l'incubation avec *Trechispora* et podzol, et ceux résultant d'une dégradation sous l'influence des inoculums mixtes I₂ et de mull.

● Acides vanillique et p-hydroxybenzoïque : les dosages effectués à l'aide du photomètre enregistreur donnent les résultats suivants :

TABLEAU 22

Influence de la microflore sur la quantité de composés phénoliques libérés par hydrolyse de substances humiques issues de la dégradation du Trèfle

| Microflore | pH du substrat en fin d'observation | A. vanillique ‰ | A. p-hydroxybenzoïque ‰ | Rapport a. vanillique / a. p-hydroxybenzoïque | Somme |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------------|---|-------|
| Th | 5,49 | 3,35 | 0,38 | 8,81 | 3,73 |
| P | 7,62 | 2,5 | 0,43 | 5,81 | 2,93 |
| M | 8,4 | 2,15 | 0,38 | 5,65 | 2,53 |
| I ₂ | 9,28 | 1,35 | 0,25 | 5,4 | 1,6 |

C) Comparaison entre acides humiques naturels et produits de décomposition « *in vitro* ».

Par l'étude des propriétés physico-chimiques (cf. chapitre II et III), nous avons montré que les substances humiques *in vitro* possèdent un degré de polymérisation peu élevé par rapport à celui des acides humiques naturels. Notons ici les principales relations existant entre le degré d'évolution des substances humiques et la présence de composés phénoliques simples dans leurs hydrolysats :

● Acide syringique : cet acide-phénol se rencontre uniquement dans les hydrolysats de substances humiques formées *in vitro*. Il peut être considéré comme un intermédiaire entre une lignine plus ou moins dégradée et les noyaux aromatiques présents dans les molécules humiques. ISHERWOOD (1959) signale une variation quantitative des phénols rencontrés chez certains végétaux ; après oxydation alcaline de leur lignine : en fonction de l'âge, si la quantité de p-hydroxybenzaldéhyde varie peu, on assiste à une légère augmentation de la concentration en vanilline et à un fort accroissement de la teneur en acide syringique. Cette fluctuation observée au cours du vieillissement des tissus végétaux pourrait laisser supposer le déroulement d'un phénomène analogue lors de la dégradation d'une lignine. L'acide syringique représenterait donc un fragment de la lignine susceptible de subir ultérieurement une déméthoxylation. D'ailleurs, tout récemment, SHRIVINA (1962) vient de confirmer l'évolution des groupements méthoxyles lors de la formation de composés humiques après décomposition de lignine de Bouleau par *Inonotus obliquus* (Pers.). D'après cet auteur, on assiste à une augmentation, puis à une diminution des groupements OCH_3 ; cette variation étant apparemment liée à la teneur en composés syringyles, SHRIVINA suppose que l'inclusion, dans les molécules humiques, des monomères de la lignine du type syringyle se produit plus lentement que celle des monomères du type guaïacyle ; dans un premier temps, le noyau syringyle se transformerait en noyau guaïacyle ;

● La teneur en acide vanillique varie d'une façon régulière mais importante : elle passe de 3,35 ‰ à 1,35 ‰ suivant la nature des hydrolysats de substances humiques *in vitro* ; dans la série des humus naturels, le taux de 1,2 ‰ rencontré avec un humus brut diminue progressivement pour ne plus être chiffrable dans le cas d'un chernozem. Or, cette variation correspond à une augmentation constante du degré de polymérisation des diverses substances humiques, degré déterminé par d'autres caractéristiques physico-chimiques ;

● Les taux d'acide p-hydroxybenzoïque des différents hydrolysats s'avèrent plus constants à l'exception de ceux d'un mull

acide et d'un chernozem. L'acide p-hydroxybenzoïque pourrait correspondre à l'un des termes de dégradation de la lignine avant une ouverture possible du cycle ou précédant une incorporation directe dans des molécules plus complexes.

En résumé, dans nos conditions de travail, il est indéniable que l'hydrolyse acide des substances humiques libère des acides-phénols en quantité d'autant plus importante qu'elle est appliquée à des produits peu évolués, donc moins polymérisés.

D'autre part, l'hydrolyse d'acides humiques formés *in vitro* et peu condensés met en évidence la présence d'acide syringique. Cet acide-phénol est particulièrement abondant dans les acides humiques de *Trechispora* dont le pouvoir de synthèse est faible. Par contre, on ne le rencontre jamais dans les hydrolysats d'humus naturels.

Il existe une diminution progressive de la teneur en acide vanillique dans l'ordre Th - P - M - I₂. Le développement d'une flore franchement acidiphile s'accompagne de la néoformation de substances humiques peu condensées dont l'hydrolyse libère une quantité importante d'acide vanillique.

Le rapport acide vanillique - acide p-hydroxybenzoïque demeure constant en présence des trois microflores mixtes. Au contraire, la souche lignivore entraîne une prédominance nette d'acide vanillique dans l'hydrolysats de substances humiques issues de son développement.

● Discussion : Après incubation en présence d'une souche de *Trechispora* ou d'une microflore de podzol, les teneurs en acide syringique dans les hydrolysats de substances humiques sont très voisines. Par contre, la divergence, observée entre les rapports acide vanillique - acide p-hydroxybenzoïque, pourrait s'expliquer par la présence de deux métabolismes complémentaires dans le cas de la microflore de podzol. Une activité fongique lignivore précéderait une déméthoxylation provoquée par d'autres micro-organismes.

Conjointement à ce procédé de dégradation biologique de la lignine, il existe une polymérisation abiologique des composés phénoliques simples. En effet, une diminution de la somme des acides vanillique et p-hydroxybenzoïque dans les hydrolysats s'accompagne d'une production croissante de substances humiques de plus en plus polymérisées (cf. chapitre II) et pour ces deux phénomènes, on observe une intensité variant toujours dans l'ordre Th - P - M - I₂. En outre, il nous faut mentionner la relation entre ces observations et les valeurs des pH mesurées en fin d'incubation (cf. tableau 22), or, on le sait une augmentation de l'alcalinité favorise la condensation des composés phénoliques simples.

RÉCAPITULATION ET CONCLUSION

L'essentiel de ce travail consiste en une étude de divers composés humiques suivant des méthodes d'investigation très variées nous permettant ainsi d'obtenir des renseignements sur leur composition, leurs propriétés, leur évolution et, dans une certaine mesure, leur origine à partir de la matière organique fraîche.

A) Etude de divers composés humiques.

Nous avons étudié et comparé les composés humiques provenant de deux origines différentes :

1°) COMPOSÉS ISSUS D'HUMUS NATURELS. — Afin de permettre des comparaisons assez étendues, nous avons choisi cinq humus naturels considérés comme représentant un degré de polymérisation croissant et ceci dans l'ordre mor, mull acide, horizon B₁ de podzol, mulls calciques (rendzine et chernozem).

2°) COMPOSÉS PROVENANT DE TROIS SUBSTANCES (paille - sciure - Trèfle) soumises à l'activité de microflore variées. — Ces dernières correspondent, d'une part, à des inoculum mixtes prélevés dans les horizons biologiquement actifs d'un humus brut, d'un mull acide, d'une rendzine agricole ; d'autre part, nous avons employé un inoculum (N° 2) isolé à partir de copeaux de Hêtre en décomposition et une souche pure d'un champignon lignivore : *Trechispora* sp.

B) Extraction des composés humiques.

Le choix d'un réactif d'extraction, capable de réaliser une solubilisation exclusive et complète de la fraction humifiée, pose un problème complexe. En effet, si l'on veut comparer, de façon

valable, différents humus, on se heurte à deux difficultés principales, mais contradictoires :

- 1° L'emploi d'un réactif alcalin entraîne toujours une transformation des substances végétales fraîches ou faiblement altérées. Les composés humiques ainsi néoformés se révèlent d'autant plus abondants que l'humus considéré est peu évolué.
- 2° A l'inverse, les horizons riches en matière organique transformée ne permettent une solubilisation de l'humus qu'après dissociation du complexe organo-minéral. L'emploi du pyrophosphate de sodium libère les acides humiques liés aux cations (Ca - Fe - Al), mais la solubilisation de la fraction humifiée reste partielle ; KONONOVA et BELCHIKOVA (1961) ont essayé de pallier cet inconvénient en augmentant l'alcalinité du réactif, ce qui entraîne alors la néoformation d'acides humiques bruns sans toutefois dissocier l'humine du complexe organo-minéral.

Notre travail, concernant l'étude des produits issus de la transformation de matières organiques fraîches, nous met en présence d'un problème délicat. En effet, la formation de substances humiques artificielles par oxydation alcaline, entraîne exclusivement une augmentation quantitative des acides humiques bruns. Par ailleurs VON BUCH (1962) signale que l'extraction au pyrophosphate de sodium augmente également les quantités d'acides humiques extraits de matières organiques peu évoluées. Or, cette néoformation engendre des substances qu'il est pratiquement impossible de distinguer au point de vue qualitatif des acides humiques bruns peu polymérisés (DUCHAUFOR et JACQUIN, 1963). Ceci confirme les résultats de l'étude comparative des extraits de substances végétales en décomposition (MANGENOT et JACQUIN, 1960) où nous obtenions le même ordre de classement après une solubilisation par NaF ou NaOH N/10.

En fait, l'extraction sodique solubilise des composés humiques et une fraction de la matière organique plus ou moins transformée. Une extraction témoin dans des conditions identiques, mais à partir d'un matériel frais, permet de distinguer les composés solubles initialement présents dans le substrat, de ceux engendrés au cours de la dégradation par les divers inoculum ; nous pensons avoir, par cette comparaison avec un tel « témoin », remédié au principal inconvénient apporté par l'utilisation de la soude comme réactif d'extraction ; en somme, l'extraction sodique peut fournir des indications utiles sur la dégradation d'un substrat organique et la formation de substances humiques peu polymérisées, à condition d'observer certaines précautions indispensables que nous venons de mentionner.

C) Degré de polymérisation des humus naturels.

Il est intéressant d'établir des points de comparaison entre les diverses substances composant la fraction humifiée des sols ; ces substances diffèrent essentiellement par une propriété fondamentale : *le degré de polymérisation*. Pour évaluer celui-ci, nous comparons les résultats fournis par les méthodes classiques (densité optique - taux de floculation - pouvoir réducteur) et une technique plus récente (électrophorèse sur papier) ; nous faisons intervenir enfin un critère inédit : le dosage des acides-phénols libérés par hydrolyse acide des composés humiques.

1. — MÉTHODES CLASSIQUES.

Nos expériences mettent en relief un parallélisme constant entre la densité optique et l'aptitude à la floculation. On savait déjà que ces deux valeurs augmentaient en fonction du degré d'humification, mais les produits extraits d'un mull acide font exception à cette règle et nous essayerons plus loin d'expliquer ce fait remarquable. Le pouvoir réducteur des substances humiques semble diminuer régulièrement si leur degré de polymérisation augmente. Il faut d'ailleurs signaler qu'actuellement la meilleure méthode de détermination quantitative de l'humus consiste en un dosage du carbone de la fraction humique. Toutefois, une sérieuse réserve s'impose pour les horizons où il existe une interpénétration des colloïdes organiques et minéraux avec inclusion de ces derniers dans l'édifice moléculaire. En effet, après électrophorèse, DUCHAUFOUR (1963) signale la présence d'une quantité de fer complexé supérieure à 30 %, dans la fraction non mobile des acides humiques d'un mull forestier.

2. — L'ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE permet un fractionnement très intéressant puisqu'elle sépare les substances humiques en fonction de leur mobilité dans un champ électrique, mobilité liée au degré de polymérisation. De cette étude, il ressort indiscutablement que les composés peu polymérisés et très mobiles correspondent à la fraction brune des substances humiques. Par contre, la fraction non mobile présente des teintes différentes suivant les humus étudiés : généralement gris-noir plus ou moins foncé, elle est brun-ocre dans le cas du mull acide ; nous retrouvons encore ici un comportement spécial de ce type d'humus en relation vraisemblablement avec un mode de formation distinct.

3. — LA DÉTERMINATION DU POURCENTAGE D'ACIDES-PHÉNOLS libérés par hydrolyse donne une indication nouvelle et précieuse permettant d'établir une hiérarchie dans le degré de polymérisation ; en effet, la quantité d'acides-phénols se révèle d'autant plus importante que le degré de condensation diminue. Ce procédé d'investi-

gation s'avère plus précis s'il s'agit d'humus peu évolués où l'on observe des variations qualitatives et quantitatives beaucoup plus importantes ; notamment, l'acide syringique peut être mis en évidence uniquement dans les composés humiques faiblement polymérisés.

Lors de l'emploi de l'électrophorèse ou de l'étude de la densité optique et de la floculation, nous avons comparé l'influence de trois réactifs d'extraction (solutions de NaF, NaOH, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) sur les caractéristiques des produits obtenus à partir de cinq humus. Sans doute, les caractéristiques sont-elles différentes suivant le réactif utilisé, mais les divergences n'influent pas de façon notable sur le classement des humus naturels.

Ajoutons enfin que l'utilisation conjointe d'un fractionnement chimique et électrophorétique offre la possibilité de caractériser, d'une façon satisfaisante, les humus naturels en fonction de leur degré de polymérisation (DUCHAUFOR et JACQUIN, 1963). Néanmoins, cette méthode rigoureuse dans le cas des humus évolués, convient moins bien pour les humus bruts comprenant exclusivement des acides humiques bruns mobiles.

En résumé, l'emploi de ces diverses méthodes d'investigation confirme, pour les humus naturels, un degré de polymérisation croissant du mor aux mulls calciques (rendzine et chernozem) avec comme étapes intermédiaires le mull acide et les acides humiques de l'horizon B_1 de podzol.

D) Humification après incubation « in vitro » de substances végétales.

Les composés humiques obtenus après dégradation de substances végétales présentent également des fluctuations dans leurs caractéristiques physico-chimiques, électrophorétiques et chromatographiques. Celles-ci, comme nous le mentionnons pour les acides humiques naturels, évoluent en fonction du degré de polymérisation. Néanmoins, même après une incubation de trente mois, aucun composé humique « *in vitro* » n'atteint le stade de condensation rencontré dans les acides humiques d'un humus brut.

E) Influence de quelques facteurs sur l'humification « in vitro » de substances végétales.

1) RÔLE DU SUBSTRAT. — Notons tout d'abord que les trois substances utilisées possèdent une forte teneur en lignine :

— il est curieux de constater que, malgré des rapports C/N très différents (paille : 65,9 - Trèfle : 11,4), nous enre-

gistrans, après quinze mois d'incubation de ces deux substances, des taux de décomposition (perte de poids en % du poids initial) sensiblement voisins et de l'ordre de 40 à 50 % ;

- par contre, le taux d'humification et surtout le degré de polymérisation des composés humiques se révèlent beaucoup plus importants dans le cas du Trèfle ; ces faits résultent certainement de l'influence favorable d'un taux élevé d'azote sur ces deux mécanismes ;
- à l'opposé, la très faible décomposition de la sciure (sensiblement 10 %) peut être la conséquence d'une nature ou d'une répartition différente de la lignine dans les tissus végétaux. La lignification de la grande majorité des cellules les protégerait d'une dégradation rapide ;
- enfin, il semble exister une relation entre la nature des composés phénoliques présents dans les extraits aqueux des trois substrats frais et le degré de condensation des composés humiques obtenus après incubation. En effet, les composés phénoliques les plus condensés existent dans l'extrait aqueux de Trèfle ; à l'opposé, les acides-phénols les plus simples se rencontrent dans l'extrait de sciure ; il résulte certainement de cette diversité initiale, une formation de complexes de nature et de propriétés différentes.

2) RÔLE DU MILIEU. — Un apport supplémentaire d'azote dans le cas de substrat pauvre en cet élément confirme l'influence de ce dernier sur le degré de polymérisation des composés humiques ; cette addition se traduit par une augmentation de la densité optique. Un phénomène analogue se reproduit, à un degré moindre, il est vrai, après adjonction de carbonate de calcium.

Nous avons déjà signalé (JACQUIN, 1959 ; DUCHAUFOUR et JACQUIN, 1959) l'action de variations microclimatiques sur l'humification. Dans ce travail, la partie des expériences ayant porté sur l'influence de la dessiccation artificielle montre que cet état conduit effectivement, d'une part, à la transformation de certains acides fulviques en acides humiques et, d'autre part, à une diminution de la mobilité électrophorétique d'une fraction des acides humiques bruns. Ces observations peuvent expliquer partiellement le faible degré de polymérisation des composés humiques obtenus « *in vitro* » ; en effet, lors de nos expériences, les substrats n'ont jamais subi de dessiccation. Un cas analogue vient d'ailleurs d'être mentionné par SITTLER et LOSSAINT (1961).

3) RÔLE DE LA MICROFLORE. — Les divers résultats font ressortir deux modes d'action bien différents et plusieurs cas particuliers :

a) *Dégradation d'une substance végétale par un champignon lignivore.*

Après activité de la souche de *Trechispora*, il résulte une baisse sensible du taux de substances non hydrolysables ; nous constatons une disparition des composés assimilés à la lignine dans des proportions d'un quart avec la paille et de moitié avec la sciure.

En relation avec cette disparition de la lignine, nous assistons à une forte production de composés fulviques et humiques. Néanmoins, les composés humiques présentent un faible degré de condensation comme en témoignent les valeurs de la densité optique et du seuil de floculation ; ce dernier n'est atteint que pour une concentration en calcium supérieure à 20 m. eq. par litre, alors qu'avec cette même concentration, les deux tiers des acides humiques d'un humus brut floculent.

L'électrophorèse des composés humiques de néoformation indique la disparition complète de la fraction brune mobile dont les propriétés se révélaient très voisines de celles de la lignine native ; l'élimination de la fluorescence violette, caractéristique de la lignine, confirme l'absence de cette substance.

L'hydrolyse des composés humiques libère une grande quantité de dérivés phénoliques simples. Mais un fait encore plus significatif réside dans la présence des mêmes acides-phénols dans de simples extraits aqueux obtenus en cours de décomposition : c'est-à-dire les acides p-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique. Il semble donc possible d'admettre une participation de ces composés phénoliques à la synthèse des molécules humiques.

b) *Dégradation des substances végétales par des microflores mixtes.*

Si l'on constate une décomposition de la paille et du Trèfle de l'ordre de 40 à 50 %, celle de la sciure ne dépasse guère 10 %. Il semble, comme nous l'avons déjà signalé, qu'une certaine variabilité dans la nature et la répartition de la lignine dans les tissus végétaux, freine plus ou moins les activités microbiennes non spécifiques.

Le taux de substances non hydrolysables varie très peu, comme en témoignent les valeurs de l'indice L oscillant aux environs de 100 % ; cette uniformité peut s'expliquer soit par la persistance de la lignine sous une forme plus ou moins altérée et se transformant progressivement en composés humiques, soit par l'apparition

de composés humiques non hydrolysables résultant de synthèses microbiennes variées.

Corrélativement, la densité optique et le taux de floculation des composés humiques s'élèvent, indiquant un plus grand degré de polymérisation de ces substances par rapport à celui obtenu après une attaque par *Trechispora*.

Si, au cours de l'électrophorèse des composés humiques de néoformation, une fraction brune mobile persiste, nous notons une diminution très nette de la fluorescence violette caractéristique de la lignine. Par contre, des substances intermédiaires, moins mobiles, apparaissent ; toutefois, nous n'obtenons jamais d'acides humiques gris.

Pour les composés phénoliques, à l'inverse des résultats obtenus dans le cas d'une souche lignivore, il n'existe plus aucun composé phénolique simple dans les extraits aqueux recueillis au cours de la dégradation des substances végétales. Une hydrolyse acide de ces mêmes extraits libère seulement une petite quantité d'acides-phénols. Il paraît donc certain que ces composés simples sont incorporés dans des molécules plus complexes analogues à des composés humiques. En outre, l'hydrolyse de ces substances de néoformation libère une quantité d'acides-phénols deux fois moindre que celle rencontrée chez des composés humiques issus de l'activité de *Trechispora*.

c) Cas particuliers.

Dès le début de son action, la microflore de podzol entraîne la formation de composés humiques dont les caractéristiques se révèlent intermédiaires entre celles des produits issus des deux groupes ci-dessus ; ce fait pourrait traduire la coexistence des deux processus précédents.

L'activité de la microflore de rendzine agricole offre deux phases successives. Dans une première phase, cette flore très active provoque la formation des substances humiques les plus polymérisées que nous ayons jamais rencontrées dans nos cultures artificielles ; cependant, si la perte de poids du substrat se révèle importante, elle n'affecte nullement le taux de substances non hydrolysables. Au cours de la deuxième phase, on note une nette décoloration du milieu, accompagnée d'une forte acidification comme si on assistait au développement d'une souche lignivore. On peut admettre qu'initialement la concurrence vitale de formes non spécialisées suspend l'activité des lignivores présents dans le sol et que ces derniers se manifestent seulement après épuisement du milieu (cf. à ce sujet MANGENOT et REYMOND, 1963).

F) Evolution des composés azotés au cours de la dégradation de matière organique fraîche.

Nous avons mis en évidence toute une série d'acides aminés au sein des composés humiques et de leurs « précurseurs ». Il s'agit des corps suivants : acides aspartique et glutamique - alanine - arginine - histidine - leucine - lysine - proline - sérine - thréonine - valine. Ces acides aminés sont susceptibles d'intervenir au cours de la formation des acides humiques suivant plusieurs processus.

1) Il est possible que des acides aminés participent à la formation de chaînes latérales ; cette hypothèse est justifiée par la facilité de régénération des acides aminés par simple hydrolyse. D'ailleurs, SCHARPENSEEL et KRAUSSE (1962) signalent que cette participation se révèle beaucoup plus importante pour les acides humiques bruns que pour les acides humiques gris.

2) Les composés aminés peuvent aussi se transformer par condensation en osamines avec possibilité éventuelle, mais non encore prouvée, d'une évolution ultérieure en composés de type humique. La formation d'osamines par union de sucres réducteurs et de composés aminés pourrait correspondre à l'une des premières étapes de la synthèse des « précurseurs » humiques. On admet, en effet (HODGE, 1953) que les sucres aminés seraient des intermédiaires initiaux apparaissant au cours des réactions de brunissement chez les végétaux ; ensuite, des transformations variables donneraient naissance à des polymères renfermant des noyaux aromatiques et des hétérocycles azotés.

Au cours de ces transformations, il se forme des substances intermédiaires absorbant les rayons ultra-violet. Or, précisément, l'examen d'électrophorogrammes d'humus naturels montre une bande fortement fluorescente correspondant à une zone de grande mobilité située au-delà des acides humiques bruns, du côté de l'anode. Les réductones qui représentent un autre stade intermédiaire des réactions de brunissement offrent des propriétés très semblables à celles des acides humiques : double liaison conjuguée révélée à l'infra-rouge, réduction du nitrate d'argent et de la liqueur de Fehling à froid ; d'aussi remarquables analogies ne sont peut-être pas que superficielles. D'autre part, si nous examinons l'influence des divers inoculums, nous constatons que les populations à prédominance bactérienne et surtout celle de rendzine, présentent une aptitude maximum à engendrer des osamines.

Il est donc possible d'admettre que des matières premières différentes de la lignine jouent le rôle de constituants de base des acides humiques.

3) La présence d'une quantité importante d'azote dans la fraction non hydrolysable des substances humiques mérite une

attention toute particulière ; elle résulte certainement d'une condensation entre phénols et composés azotés. Après attaque d'une sciure par *Trechispora*, cas où la lignine se dégrade en monomères, la participation des composés azotés à la formation de substances non hydrolysables se montre beaucoup plus importante que lors d'une transformation moins complète de la lignine (cas des inoculums mixtes). En effet, le pourcentage d'azote total dans les substances non hydrolysables se révèle trois fois plus élevé, dans la première hypothèse que dans la seconde (2,3 % contre 0,8 %). Ceci explique et confirme certaines observations faites par MANGENOT et REYMOND (1963).

G) Evolution de la lignine au cours de l'humification.

Plusieurs théories concernant le mode de participation de la lignine à l'élaboration des composés humiques, s'affrontent. Pour LYNCH et *al.* (1958), JENKISON et TINSLEY (1960), les composés ligno-protéines seraient des intermédiaires effectifs et importants. JANSON (1960) décrit des phénomènes d'autooxydation de la lignine accompagnés d'une fixation de NH_3 . Cependant, certains auteurs (HENIN, 1958 ; KONONOVA, 1961) suggèrent qu'une dégradation profonde de la lignine précède la participation de ce composé à l'édification des molécules humiques. Afin de contrôler cette dernière hypothèse, nous avons comparé, au cours de nos travaux, non seulement les produits de dégradation issus du métabolisme de champignons lignivores, mais les produits de synthèse en dérivant. Par l'application de ces mêmes méthodes d'investigation, à des produits formés sous l'action d'inoculums naturels, nous avons essayé de saisir les phénomènes complexes se déroulant dans les horizons biologiquement actifs des sols. L'ensemble de nos résultats confirme les processus décrits partiellement en 1959 et 1960 par JACQUIN et MANGENOT.

1) EVOLUTION DU SUBSTRAT EN PRÉSENCE D'UN CHAMPIGNON LIGNIVORE.

Nous constatons, après attaque d'un champignon lignivore, c'est-à-dire d'un Basidiomycète agent de pourriture blanche, un abaissement de la valeur du pH et du taux de substances non hydrolysables ; corrélativement, il apparaît des composés fulviques et humiques. L'évolution de la lignine au cours de ce processus peut être schématisée en quelques points :

a) Il existe une dégradation certaine de la lignine comme en témoignent non seulement la diminution du taux de cet élément dans le milieu, mais un abaissement des valeurs de l'indice L ;

b) Nous constatons l'apparition dans les extraits aqueux obtenus en cours d'incubation, d'une grande quantité de composés phénoliques simples, tels les acides syringique, vanillique et p-hydroxybenzoïque. Or, ces corps se forment couramment lors de la dégradation chimique de la lignine ;

c) L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N, de ces mêmes extraits aqueux libère en quantité encore plus importante ces acides-phénols. Ce fait laisse présumer la présence de substances solubles et facilement hydrolysables. Il peut s'agir soit de produits résultant d'une dégradation incomplète de la lignine, soit de substances de néoformation faiblement polymérisées.

d) Consécutivement à cette évolution, on remarque la formation de substances fulviques et humiques. Une étude électrophorétique de ces dernières confirme l'absence totale de lignine. En outre, ces composés humiques présentent toujours un degré de polymérisation très faible, inexplicable si leur formation n'était pas précédée du clivage des molécules de lignine.

2) EVOLUTION DU SUBSTRAT EN PRÉSENCE D'INOCULUMS MIXTES.

a) A l'inverse des faits précédemment cités, la valeur du pH s'élève et la teneur en substances non hydrolysables demeure stationnaire.

b) Par contre, lors d'une extraction par NaOH N/10, nous constatons la solubilisation d'une grande quantité de composés humiques. Ces produits de néoformation correspondent à des acides humiques bruns dont les propriétés électrophorétiques sont voisines de celles de la lignine. Toutefois, on note une diminution très marquée de la fluorescence violette, fluorescence qui n'existe jamais dans les humus naturels.

c) Dans les produits d'hydrolyse, on constate une diminution des groupements méthoxyles se traduisant par une baisse des pourcentages d'acide vanillique et surtout d'acide syringique. D'ailleurs, les hydrolysats d'acides humiques naturels ne contiennent pour ainsi dire plus d'acide-phénol diméthoxylé, or, comme l'indique SHIVRINA et *al.* (1961), la diminution des groupements OCH₃ correspond à une augmentation du degré de condensation.

3) DISCUSSION.

A partir des trois substrats, nos expériences montrent incontestablement la part prépondérante de la lignine comme matière première des composés humiques formés « *in vitro* ». Mais nos expériences ne permettent d'obtenir que des composés humiques

bruns peu polymérisés, elles ne présagent donc en rien de l'origine des acides humiques gris qui n'a pas été étudiée ici. Il nous paraît possible de suggérer deux processus d'évolution de la lignine lors de l'humification :

a) En présence d'une pourriture blanche, nous assistons à la synthèse humique après une fragmentation très poussée de la lignine. L'acide syringique constitue un des éléments libérés servant de matériau à cette synthèse ; les noyaux syringyles pouvant se transformer en noyaux guaïacyles avant la phase de condensation. La polymérisation des monomères aromatiques serait favorisée par une teneur élevée du milieu en carbonate de calcium et en azote.

b) Après attaque d'une population complexe, l'évolution de la lignine se traduirait par une transformation plus ou moins importante avec possibilité d'une formation directe d'acides humiques bruns.

Dans les sols, les deux processus de décomposition de la lignine peuvent se rencontrer concurremment. Mais l'un ou l'autre l'emporte généralement en fonction des conditions du milieu agissant sur la nature et l'activité de la microflore. En milieu acide et en présence d'une grande quantité de lignine, de débris végétaux pauvres en azote et riches en acides-phénols solubles, les lignivores sont favorisés. Au contraire, en milieu riche en bases et en azote, en conditions microclimatiques très favorables, ce sont les microflores mixtes qui l'emportent.

La mise en évidence de ces deux processus revêt une importance capitale quant aux possibilités d'évolution des sols : le passage des dérivés de lignine par un état soluble précédant leur polymérisation, favoriserait le processus d'entraînement du fer (COULSON et *al*, 1960) par formation de complexes pseudo-solubles (podzolisation) ; dans un second cas, au contraire, la transformation directe de la lignine en acides humiques insolubles, sans passer par une forme soluble, permettrait l'édification d'un complexe argilo-humique stable englobant le fer (DUCHAUFOR, 1963) et freinerait le phénomène de lessivage (sols à mull, rendzine et chernozem).

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDROVA L. N. (1960 a). — On the use of sodium pyrophosphate for isolating free humic substances and their organo-mineral compounds from the soil.
Pochvovedenie (Soviet Soil Sci.), **2**, 90-97.
- ALEXANDROVA L. N. (1960 b). — On the composition of humic substances and the nature of organo-mineral colloids in soil.
VII^e Congr. Inter. Soil Sci., Madison, **II**, 11, 74-81.
- ALEXANDROVA L. N. (1960 c) (en Russe). — Une méthode d'étude de la composition qualitative de la matière organique du sol.
Pochvovedenie, **11**, 85-87.
- ANNE P. (1945). — Dosage rapide du carbone organique dans les sols.
Ann. Agro., **2**, 161-172.
- ANSTETT A. (1950). — Adaptation de la méthode Schollenberger-Anne, au dosage rapide du carbone organique dans les fumiers et végétaux.
Ann. Inst. Agric. Algérie, **5**, 1-7.
- ANSTETT A. (1956). — Sur une méthode rapide de détermination du rapport C/N dans les sols, les amendements organiques et les végétaux.
VI^e Congr. Inter. Sci. Sol Paris, **II**, 40, 693-700.
- ARCHER R., FROMAGEOT C., JUSTISZ M. (1950). — Séparation chromatographique d'acides aminés et peptides.
Biochim. Biophys. Acta, **5**, 81-88.
- ARCHER R., CROCKER C. (1952). — Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine.
Biochim. Biophys. Acta, **9**, 704-705.
- ARMSTRONG M. D., SCHAW N. F., WALL P. E. (1956). — The phenolic acids of human urines : paper chromatography of phenolic acids.
J. Biolog. Chem., **218**, 293-303.
- AUBERT G. (1959). — Influence des divers types de végétation sur les caractères de l'évolution des sols en régions équatoriales et sub-équatoriales, ainsi que leurs hordures tropicales semi-humides.
Tropical Soils and Veget. Symposium Abidjan, U. N. E. S. C. O., Paris, 1961, 41-47.
- AUCLAIR J. L., MALTAIS J. B. (1952). — Occurrence of γ -amino-butyric acid in extracts of *Pisum sativum*.
Nature, G. B., **170**, 1114-1115.
- BACHELIER G. (1960). — Sur l'orientation différente des processus d'humification dans les sols bruns tempérés et les sols ferrallitiques des régions équatoriales.
Agro. Trop., **XV**, n^o 3, 320-324.
- BARBIER M., LEDERER E. (1957). — Sur les benzoquinones du venin de trois espèces de Myriapodes.
Biochimica, **22**, 1-2, 236-240.
- BARTON G. M., EVANS R. S., GARDNER J. A. F. (1952). — Paper chromatography of phenolic substances.
Nature, G. B., **170**, 249.

- BATE-SMITH E. C. (1958). — Plant phenolics in foods in *The pharmacology of plant phenolics*, 133-149. *Academic Press, L. T. D. London.*
- BATURO V. A., RAKOVSKIJ V. E. (1957) (en Russe). — Chimie des plantes productrices de tourbe; hydrolyse et libération d'acides humiques. *Akad. Nauk. Belorussk. S. S. R. Trudy Inst. Torfa*, 6, 38, 51.
- BERES T., KIRALY I. (1957) (en Hongrois). — Examen chromatographique et réactions réductrices des acides fulviques. *Agrokemia es Talajtan*, 6, 1, 55-65.
- BERNIER B. (1958). — La production de polysaccharides par des champignons lors de la décomposition des bois et des litières forestières. *Canada J. Microbiol.*, 4, 195-204.
- BISERTE C., PLAQUET-SCHOONAERT T., BOULANGER P., PAYSANT P. (1960). — Séparation des acides aminés des milieux biologiques complexes. *J. Chromatog.*, 3, 25-47.
- BLAND D. E. (1949). — Séparation of vanillin and syringaldehyde by paper-partition chromatography. *Nature, G. B.*, 164, 1093.
- BLOCK R. J., DURRUM E. L., ZWEIG G. (1958). — Paper chromatography and paper electrophoresis, 720 p. *Acad. Press. Inc. New-York.*
- BLOMFIELD C. (1957). — The possible significance of polyphenols in soil formation. *J. Sci. Food Agric.*, 8, 7, 389-392.
- BÖRNER H. (1960). — Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. *Botan. Review*, 26, 3, 393-424.
- BOULANGER P., BISERTE C. (1951). — Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 1930-1939.
- BRAUNS F. E. (1952). — The chemistry of lignin. *New York, Academic Press.*
- BRAY H. G., THORPE W. V., WHITE K. (1950). — The application of paper chromatography to metabolic studies of hydroxybenzoic acid and amides. *Biochem. J.*, 46, 271-275.
- BRAY H. G., THORPE W. V. (1954). — Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Meth. Biochem. Analysis*, 1, 27.
- BREMNER J. M. (1950). — Amino-acids in soils. *Nature, G. B.*, 165, 367.
- BREMNER J. M. (1958). — Amino-sugars in soils. *J. Sci. Food Agric.*, 9, 8, 528-532.
- BREMNER J. M., SCHAW K. (1954). — Studies on the estimation and decomposition of amino-sugars in soil. *J. Agric. Sci.*, 44, 152-159.
- BREMNER J. M., JENKISON D. S. (1960). — Determination of organic carbon in soil : 1°) Oxidation by dichromate of organic matter in soil and plant materials. *J. Soil Sci., G. B.*, 11, 2, 394-402.
- BROMFIELD A. R., COULSON C. B., DAVIES R. I. (1959). — Humic acid investigations : Fractionation studies. *Chem. and Ind.*, 1, 601-602.
- BRUNEL A. (1948). — *Traité pratique de chimie végétale. Imp. Georges, Tourcoing (Fr.)*, 4 vol.

- BUCH (Max Von) (1962). — Vergleichende chemische und mikromorphologische Untersuchungen bei der Extrahierung von Huminstoffen aus Waldböden.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **97**, 3, 255-265.
- BURGES A. (1960 a). — Physico-chemical investigations of humic acid.
VII^e Congr. Inter. Soil Sci., Madison, **II**, 18, 128-133.
- BURGES A. (1960 b). — The nature and distribution of humic acid.
Sci. Proceed. Royal Dublin Soc., Série A, I, 4, 53-58.
- BURGES A., LATTER P. (1960). — Decomposition of humic acid by Fungi.
Nature, G. B., **186**, 404-405.
- BURKE W. I., POTTER A. D., PARKHURST R. M. (1960). — Neutral silver nitrate as a reagent in the chromatographic characterisation of phenolic compounds.
Anal. Chemist., **23**, 6, 727-728.
- BUSCHE L. R. (1960). — The Klason lignin determination as applied to aspenwood with special reference to acid soluble lignin.
Dissert. Abstracts, **XXI**, 1, 34.
- CARLES J., SCHNEIDER A., LACOSTE A. M. (1958). — Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., **XI**, I, 221-232.
- CARLES J., DECAU J. (1960 a). — Variations in the amino-acids of soil hydrolysates.
Sci. Proceed. Royal Dublin Soc., Série A, I, 4, 177-182.
- CARLES J., DECAU J. (1960 b). — De quelques conditions susceptibles de modifier les proportions des acides aminés du sol.
Ann. Agro., **11**, 557-575.
- CARTWRIGHT R. A., ROBERTS E. A. H. (1954). — Theogallin a polyphenol occurring in tea extraction.
J. Sci. Food Agric., **5**, 573.
- CHAMINADE R. (1946). — Sur une méthode de dosage de l'humus dans les sols.
Ann. Agro., **2**, 119-132.
- CHAMINADE R. (1960). — Action stimulante de substances organiques sur la croissance de l'*Aspergillus niger*.
Ann. Agro., **11**, 365-395.
- CHAMPIGNY M. L. (1960). — Influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de *Briophyllum Daigremontianum* B.
Rev. Gén. Bota., **67**, 790, 65-217.
- COFFIN D. E., DE LONG W. A. (1960). — Extraction and characterisation of organic matter of a podzol B horizon.
VII^e Congr. Inter. Soil Sci., Madison, **II**, 13, 91-97.
- COLOMBO P., CORBETTA D., PIROTTA A., RUFFINI G. (1961). — Paper chromatography of mixtures of phenolic compounds.
J. Chromatog., **6**, 467-474.
- CORNFIELD A. H. (1960). — Studies on straw and composts : 1°) Characterising straw composts and bulky organic manures by optical extinction of alkaline extracts and cation-exchange capacity measurements.
J. Sci. Food Agric., **11**, 3, 125-128.
- COULSON C. B., EVANS W. C. (1958). — Paper chromatography and paper electrophoresis of phenols and glycosides.
J. Chromatog., **I**, 374-379.
- COULSON C. B., DAVIES R. I., KHAN E. J. A. (1959 a). — Chemical studies on upland peat in North-Wales.
J. Sci. Food Agric., **10**, 4, 209-217.
- COULSON C. B., DAVIES R. I., KHAN E. J. A. (1959 b). — Humic acid investigations. II. Studies in the fractionation of humic acid.
J. Soil Sci., G. B., **10**, 271-283.

- COULSON C. B., DAVIES R. I., KHAN E. J. A. (1959 c). — Humic acid investigations. III. Studies on the chemical properties of certain humic acid preparations.
Soil Sci., **88**, 4, 191 - 195.
- COULSON C. B., DAVIES R. I., LEWIS D. A. (1960 a). — Polyphenols in plant, humus and soil. I. Polyphenols of leaves, litter and superficial humus, from mull and mor sites.
J. Soil Sci., G. B., **11**, 1, 20 - 29.
- COULSON C. B., DAVIES R. I., LEWIS D. A. (1960 b). — Polyphenols in plant, humus and soil. II. Reduction and transport by polyphenols of iron in model soil columns.
J. Soil Sci., G. B., **11**, 1, 30 - 44.
- CRUMPTON M. J. (1959). — Identification of amino-sugars.
Biochem. J., **72**, 479 - 486.
- DAVIES R. I., COULSON C. B. (1959). — Humic acid.
Soils and Fertilizers, **XXII**, p. 159.
- DECAU J., PUJOL B., CARLES J. (1961). — Variation des acides aminés libres, lors de la fermentation des pailles de blé, dans différentes conditions.
C. R. Acad. Sci., **252**, 3505 - 3057.
- DE FOREST (1946). — Dans « Analyse immédiate des bois », par Lévy-Hulot, 198 - 203.
Masson, Paris.
- DENT C. E. (1947). — The amino acids in Franconi Syndrome a study making extensive use of techniques based on paper partition chromatography.
Biochem. J., **41**, 240 - 253.
- DROUINEAU G. (1943). — Méthode rapide d'appréciation du pouvoir chlorosant de sols calcaires.
Ann. Agro., **1**, 16 - 18.
- DUBACH P., MEHTA N. C., DEUEL H. (1961). — Extraktion von Huminstoffen aus dem B-Horizont eines Podzols mit Athylendiamintetraessigsäure.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **95**, 2, 119 - 123.
- DUCHAUFOR P. (1954). — Propriétés des complexes humiques dans différents types de sols.
Ann. Ec. Nat. Eaux et Forêts, **XIV**, n° 1, 7 - 29.
- DUCHAUFOR P. (1957). — Tableaux descriptifs et analytiques des sols, 88 p.
Ecole Nat. Eaux et Forêts, Nancy.
- DUCHAUFOR P. (1960 a). — Précis de Pédologie, 438 p.
Masson, Paris.
- DUCHAUFOR P. (1960 b). — Note sur l'influence des variations du microclimat du sol dans les processus d'humification.
C. R. Acad. Sci., **250**, 4422 - 4424.
- DUCHAUFOR P. (1963). — Note sur le rôle du fer dans les complexes argilo-humiques.
C. R. Acad. Sci., sous presse.
- DUCHAUFOR P., MANGENOT F. (1956 et 1957). — Recherches sur l'évolution expérimentale de certains humus. I et II - humification biologique et abiologique.
Ann. Agro., **2**, 159 - 181 et **4**, 573 - 583.
- DUCHAUFOR P., JACQUIN F. (1959). — Note sur l'évolution de la matière organique dans les sols.
C. R. Acad. Agric., **45**, 10, 516 - 519.
- DUCHAUFOR P., JACQUIN F. (1963). — Recherche d'une méthode d'extraction et de fractionnement des composés humiques, contrôlée par l'électrophorèse.
Ann. Agro., sous presse.

- EVANS L. T. (1959). — The use of chelating reagents and alkaline solutions in soil organic-matter extraction.
J. Soil Sci., G. B., **10**, 1, 110-118.
- EVELYN S. R., MAÏHS E. A., ROUX D. C. (1960). — Condensed tannins ; 5) Oxidative condensation of (+) catechin.
Biochem. J., **76**, 23-27.
- EVERETT P. H. (1959). — The influence of clay type on organic matter retention, and on uronic acid and amino-acid formation during the decomposition of organic materials.
Dissert. Abstracts, **XIX**, 1881-1882.
- FLAIG W. (1960). — Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances.
Sci. Proceed. Royal Dublin Soc., Série A, I, **4**, 149-163.
- FLAIG W., HAIDER K. (1961). — Die Verwertung phenolischer Verbindungen durch Weissfäulepilze.
Archiv. für Mikrobiologie, **40**, 212-223.
- FRENTZ R. (1960). — Contribution à l'étude biochimique du milieu intérieur de *Carcinus maenas* Linné.
Bull. Soc. Sci. Nancy, **1**, 2, 119-126.
- FREYTAG H. E. (1955). — Absorptions photometrische Änderungen der Huminstoffe im Verlaufe des Wurzelabbaues.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **71**, 1, 67-76.
- FREYTAG H. E. (1961). — A contribution to the knowledge of humic-acid synthesis. II. - Transition fractions of synthetic humic substances. III - Transition fractions of natural humic substances.
Albrecht - Thaer - Arch., **5**, 643-654 et 729-743 d'après *Soils and Fertilizers*, 1962, **XXV** (1343).
- GADD O. (1957). — Wood decay resulting from rot fungi.
Paper ja Pun, **39**, 363-374.
- GREENE G., STEELINK C. (1962). — Structure of soil humic acid. II. - Some copper oxide oxidation products.
J. Org. Chemistry, **27**, 170-174.
- GREENWOOD D. J., LEES H. (1960 a). — Studies on the decomposition of amino-acids in soils. II. - The anaerobic metabolism.
Plant and Soil, **XII**, 1, 69-80.
- GREENWOOD D. J., LEES H. (1960 b). — Studies on the decomposition of amino-acids in soils. III. - The process of amino-acid aerobic decomposition and some properties of amino-acid oxidizing organisms.
Plant and Soil, **XII**, 2, 175-198.
- GRIFFITHS L. A. (1958). — Occurrence of gentisic acid in plant tissues.
Nature, G. B., **182**, 733-734.
- GROBBELAAR N., POLLARD J. K., STEWARD F. C. (1955). — New soluble nitrogen compounds in plants.
Nature, G. B., **175**, 703-708.
- GSTIRNER F., BOPP A. (1957). — Über den Gerbstoff in den Blättern.
Arch. Pharm. Dtsch., **290**, 7, 330.
- HACKMAN R. H., LAZARUS M. (1955). — Paper chromatography of mixtures of amino-acids containing glutamic or aspartic acid.
Biochim. Biophys. Acta, **17**, 147-148.
- HANDLEY W. R. C. (1954). — Mull and Mor formation in relation to forest soils.
(*Forestry Commission*, 23, Londres : Her Majesty's Stationery Office 115 p.).
- HARDY T. L., HOLLAND D. O., NAYLER J. H. C. (1955). — *Analyt. chem.*, **27**, 971-974,
d'après LEDERER (1960) : *Chromatographie II*, p. 358.

- HATHWAY D. E. (1958). — Oak bark tannins.
Biochem. J., **70**, 1, 34.
- HENDERSON M. E. K. (1955). — Release of aromatic compounds from birch and spruce sawdusts during decomposition by white-rot fungi.
Nature, G. B., **175**, 634-635.
- HENDERSON M. E. K. (1956). — A study of the metabolism of phenolic compounds by soil fungi using spore suspensions.
J. Gen. Microbiol., **14**, 684-691.
- HENDERSON M. E. K. (1961 a). — Isolation, identification and growth of some soil. Hyphomycetes and Yeast-like fungi which utilize aromatic compounds related to lignin.
J. Gen. Microbiol., **26**, 149-154.
- HENDERSON M. E. K. (1961 b). — The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some Hyphomycetes and Yeast-like fungi of soil.
J. Gen. Microbiol., **25**, 155-165.
- HENDERSON M. E. K., FARMER V. C. (1955). — Utilisation by soil fungi of p-hydroxybenzaldehyde, ferulic acid, syringaldehyde and vanillin.
J. Gen. Microbiol., **12**, 37-46.
- HENIN S. (1958). — Remarques sur l'humus et la matière organique des sols.
C. R. Acad. Agric., **44**, 36-41.
- HENIN S., TURC L. (1950). — Essai de fractionnement des matières organiques du sol.
IV^e Congr. Inter. Sci. Sol Amsterdam, **1**, 152-154.
- HODGE J. E. (1953). — Chemistry of browning reactions in model systems.
Agric. and Food Chem., **1**, 15, 928-943.
- HOFFMAN E., HOFFMAN G. (1955). — Über Herkunft, Bestimmung und Bedeutung der Enzyme im Boden.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **70**, 1, 9-16.
- HUGÉ P. (1960). — Production contrôlée d'un composé du type humique.
Bull. Inst. Agro. Gembloux, **28**, 2, 177-179.
- HUGH D., PUTNAM H. O., SCHMIDT E. L. (1959). — Studies on the free amino acid fraction of soils.
Soil Sci., **87**, 1, 22-27.
- IBRAHIM R. K., TOWERS C. H. N. (1960). — The identification by chromatography of plant phenolic acids.
Arch. Biochem. Biophys., **87**, 125-128.
- ISHERWOOD F. A. (1959). — The formation of lignin in plant tissues, 57-65.
In Phenolics in plants in health and disease.
Pergamon. Press. London.
- IVARSON K. C., SOWDEN F. J. (1959 a). — Decomposition of forest litters. I. - Production of ammonia and nitrate nitrogen changes in microbial population, and rate decomposition.
Plant and Soil, **XI**, 3, 237-248.
- JACQUIN F. (1959). — Contribution à l'étude chromatographique des extraits de sols.
C. R. Acad. Sci., **248**, 3019-3020.
- JACQUIN F. (1960 a). — Etude chromatographique de plusieurs types d'humus.
C. R. Acad. Sci., **250**, 1892-1893.
- JACQUIN F. (1960 b). — Evolution des acides aminés lors de la décomposition de la matière organique du sol.
C. R. Acad. Sci., **251**, 1810-1811.
- JACQUIN F. (1961). — Contribution à l'étude d'humus naturels par électrophorèse sur papier.
Bull. E. N. S. A. N., **IV**, 2, 106-113.
- JACQUIN F. (1962). — Etude quantitative de deux phénols issus de l'hydrolyse d'acides humiques naturels.
C. R. Acad. Sci., **254**, 2623-2625.

- JACQUIN F., MANGENOT F. (1959). — Populations microbiennes des bois. III. - Humification *in vitro* d'une sciure de hêtre. *Plant and Soil*, **LX**, 4, 377-391.
- JACQUIN F., MANGENOT F., VAUTRIN M. (1959). — Quelques aspects microbiologiques et chimiques de l'humification des déchets de bois. *Bull. E. N. S. A. N.*, **I**, 2, 19-34.
- JACQUIN F., MANGENOT F. (1960). — Populations microbiennes des bois. IV. - Humification de copeaux dans la nature. *Plant and Soil*, **XII**, 3, 276-284.
- JACQUIN F., PAYEN J. (1961). — Remarque sur l'influence du mode de minéralisation lors du dosage de l'azote d'un sol fortement calcaire. *Bull. E. N. S. A. N.*, **III**, 1, 23-28.
- JAKAB T., DUBACH P., MEHTA N. C., DEUEL H. (1962). — Abbau von Huminstoffen. I. - Hydrolyse mit Wasser und Mineralsäuren. *Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde*, **96**, 3, 213-217.
- JANSON S. L. (1960). — On the humus properties of organic manures. I. - Actual humus properties. II. - Potential humus properties. *H. Lantbröögök, Ann.*, **26**, 51-75 et 135-172 *d'après Soils and Fertilizers*, 1961, **XXIV** (1550).
- JENKINSON D. S., TINSLEY G. (1960). — A comparaison of the ligno-protein isolated from a mineral soil and from a straw compost. *Sci. Proceed. Royal Dublin Soc.*, Série A, **I**, 4, 141-148.
- JOHNSTON H. H. (1959). — Soil organic matter : I. - Electrophoretic separation of acid-resistant components. *Soil Sci. Soc. Amer. Proceed.*, **23**, 293-295.
- JOHNSTON H. H. (1961). — Soil organic matter : II. - Studies of the origin and chemical structure of soil humic acids. *Soil Sci. Soc. Amer. Proceed.*, **25**, 32-35.
- KATU H. (1960). — Studies on browning reactions between sugars and amino-compounds. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 1, 1-12.
- KAURITCHEV I. C., FEDOROV E. A., SCHNABEL I. A. (1960) (en Russe). — Séparation des acides humiques à l'aide de l'électrophorèse sur papier. *Pochvovedenie*, **10**, 31-36.
- KIENTZLER L., DENANTES A. M., FABERT C. (1959). — Etude chromatographique qualitative des sucres et des acides aminés de *Craterellus cornucopioides*. *Bull. Soc. Sci., Nancy*, **XVIII**, 4, 343-371.
- KLINKHAMMER F. (1958). — Ein neues Nachweisreagenz auf Phénole für die Papierchromatographie. *Naturwissenschaften*, **45**, 23.
- KNÖSEL D. (1959). — Über die Wirkung aus Pflanzenresten freiwerdender, phenolischer Substanzen auf Mikroorganismen des Bodens. *Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde*, **85**, 1, 58-66.
- KONONOVA M. M. (1958). — Die Humusstoffe des Bodens, 342 p. *Verb. Deutsch. Verlag der Wissenschaften, Berlin*.
- KONONOVA M. M. (1961). — Soil Organic Matter : its nature, its role in soil formation and in soil fertility, 450 p. *Pergamon Press., London*.
- KONONOVA M. M., BELCHIKOVA N. P. (1956). — Humus der Böden der U. D. S. R. R. seine Natur und Rolle in Bodenbildungsprozessen. *VI^e Congr. Inter. Sci. Soil Paris*, **II**, 22, 557-565.
- KONONOVA M. M., BELCHIKOVA N. P., NIKIFOROV V. K. (1958) (en Russe). — Emploi d'une méthode chromatographique pour l'étude de la nature des substances humiques. *Pochvovedenie*, **3**, 83-88.

- KONONOVA M. M., ALEXANDROVA I. V. (1959). — The biochemistry of humus formation and some problems of plant nutrition.
Soils and Fertilizers, **XXII**, 2, 77-83.
- KONONOVA M. M., BELCHIKOVA N. P. (1960) (en Russe). — Contribution à l'étude de la nature des substances humiques du sol par méthode de fractionnement.
Pochvovedenie, **11**, 1-9.
- KONONOVA M. M., BELCHIKOVA N. P. (1961). — Rapid methods for determining the composition of the humus of mineral soils.
Pochvovedenie (Soviet Soil Sci.), **10**, 75-87.
- KONONOVA M. M., BELCHIKOVA N. P., ALEXANDROVA I. V. (1960). — Conference on methods of studying humus.
Pochvovedenie (Soviet Soil Sci.), **11**, 110-113.
- KONONOVA M. M., TITOVA N. A. (1961). — The use of paper electrophoresis for soil humus substances fractionation and the study of their complex compounds with iron.
Pochvovedenie (Soviet Soil Sci.), **11**, 81-88.
- KUKHARENKO T. A., YEKATERININA (1960). — Hymatomelanin acids of fossil coals.
Pochvovedenie (Soviet Soil Sci.), **12**, 64-71.
- LARINA N. K., KASSATOCHKIN V. I. (1957) (en Russe). — Echange ionique et structure des acides humiques.
Pochvovedenie, **9**, 28-32.
- LAURENT S. (1961). — Etude chromatographique du contenu phénolique des prothalles de Filicinées.
C. R. Acad. Sci., **253**, 703-705.
- LAURENT S. (1962). — Essai d'identification des composés phénoliques des prothalles de Filicinées par la méthode de chromatographie sur papier.
Rev. Gén. Bot., **69**, 812, 15-25.
- LEDERER E. (1960). — Chromatographie en chimie organique et biologique. Vol. II, 876 p.
Masson et Cie, Paris.
- LEWIS D. A. (1958). — The organic matter of leaves - Humus of mull, mor sites - The role of polyphenols in humification.
M. Sc. Thesis. Univ. Wales, 1-94.
- LINSKENS H. F. (1959). — Papierchromatographie in der Botanik, 408 p.
Springer Verlag, Berlin.
- LISON L. (1953). — Histochimie et cytochimie végétales, 416 p.
Gauthier et Villars, Paris.
- LOVE C. W., BROWN B. R. (1960). — Substances in leaves affecting the decomposition of litter.
Report on forest research, 104-109.
London Her Majesty's Stationery Office.
- LYNCH D. L., LYNCH C. C. (1958). — Resistance of protein-lignin complexes, lignins and humic acids to microbial attack.
Nature, G. B., **181**, 1478-1479.
- LYNCH D. L., HUGHES D. H., RHODES J. (1959). — Pressure and gradient elution in ion exchange chromatography of the amino-acids in soils.
Soil Sci., **876**, 339-343.
- LYNCH B. M., BROOKS J. D., DURIE R. A., STERNHELL S. (1960). — Chemistry of humic acids formed by alkali treatment of brown coals.
Sci. Proceed. Royal Dublin Soc., Série A, 1, **4**, 123-132.
- MANGENOT F. (1952). — Recherches méthodiques sur les champignons de certains bois en décomposition.
Thèse Fac. Sci., Nancy, 115 p.

- MANGENOT F., JACQUIN F. (1960). — Produits d'humification des sciures. Quelques caractéristiques physiques et chimiques.
Plant and Soil, **XIII**, 3, 291-296.
- MANGENOT F., REYMOND (1963). — Populations microbiennes des bois : V. - Influence de quelques sources de carbone et d'azote sur la décomposition d'une sciure.
Rev. Gén. Bot. Fr., **70**, 107-129.
- MANIL G. (1961). — Quelques aspects actuels du problème de la matière organique des sols.
Overdruk mit de mededelingen van de landbouwhogeschool en de opzoekingsstations van de staat te Gent, **1**, 50-83.
- MARTIN J. A. (1962). — Fixation et transport de l'uranium par les substances humiques, 144 p.
Thèse Fac. Sci., Nancy.
- MAYAUDON J., SIMONART P. (1959 a). — Etude de la décomposition de la matière organique dans le sol au moyen du carbone radioactif. III. - Décomposition des substances solubles et dialysables des protéines et des hemicelluloses.
Plant and Soil, **XI**, 2, 170-175.
- MAYAUDON J., SIMONART P. (1959 b). — Etude de la décomposition de la matière organique dans le sol au moyen du carbone radioactif. V. - Décomposition de la cellulose et de la lignine.
Plant and Soil, **XI**, 2, 181-192.
- METCHE M., JACQUIN F., NGUYEN Q. H., URION E. (1962). — Détermination quantitative d'acides-phénols par chromatographie sur papier.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1763-1765.
- MIKAÏLOV M. K. (1958). — A study of polyphenols in tobacco by filter paper chromatography.
C. R. Acad. Sci. Bulg., **11**, 4, 291-294.
- MIKOLA P. (1956 publié 1958). — Studies on the decomposition of forest litter by Basidiomycètes.
Commun. Inst. Forest Fennix, **48**, 2, 1-22.
- MISTERKI W., LOGINOV W. (1959) (en Russe). — Etude de quelques caractères physico-chimiques des acides humiques.
Pochvovedenie, **2**, 39-51.
- MISTERKI W., LOGINOV W. (1960). — Badania nad własnościami fizykochemicznymi prochnicy (résumé All.).
Acta. Agro. Pologne, **9**, 1, 189-193.
- MONNIER G., TURC L., JEANSON-LUUSINANG C. (1962). — Une méthode de fractionnement densimétrique par centrifugation des matières organiques du sol.
Ann. Agro., **13**, 55-63.
- MOREAU R., AUGIER J. (1962). — Sur l'utilisation de la vanilline par les micro-organismes du sol.
C. R. Acad. Sci., **254**, 555-557.
- MUIR H. (1957). — A new amino-sugar in acid hydrolysates of chondroïtin sulphate from hyaline cartilage.
Biochem. J., **65**, 33 P.
- MUKHERJEE S., STRIVASTAVA H. C. (1952). — Improved spray reagent for the detection of sugars.
Nature, G. B., **169**, 330.
- MURPHY D., MOORE A. W. (1960). — A possible structural basis of natural humic acid.
Sci. Proceed. Royal. Dublin Soc., Série A, **1**, **4**, 191-195.
- NODA M., IBA T. (1958). — Studies on humic-acid by paper electrophoresis.
J. Sci. Soil Tokyo, **29**, 32-34.

- PARSONS J. W., TINSLEY J. (1960). — Extraction of soil organic matter with anhydrous formic acid.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **24**, 3, 198-201.
- PARTRIDGE S. M., WESTALL R. G. (1948). — General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg, white and foetal blood of sheep.
Biochem. J., **42**, 238-248.
- PAUL E. A. (1958). — The extraction and quantitative estimation of free amino-acids in soils.
Dissert. Abstracts XIX, 2419.
- PAUL E. A., SCHMIDT E. L. (1961). — Formation of free amino-acids in rhizosphere and non rhizosphere soil.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **25**, 5, 359-362.
- PEARL I. A., BEYER D. L. (1954). — Studies on lignin and related products.
J. Amer. Chem. Soc., **76**, 22, 6106-6108.
- PEARL I. A., Mc COY P. F. (1961). — Rf values of some phenols and related compounds.
J. Chromatog., **6**, D 20 - D 21.
- PICHARD G. (1931). — Méthode de séparation et de dosage des principes immédiats contenus dans les tissus lignifiés et dans les produits de décomposition.
Ann. Agro., **4**, 505-530.
- PICTET G., BRANDENBERGER H. (1960). — Substances polyphénoliques des plantes. II. - Séparation des acides phénoliques du café vert et café roti.
J. Chromatog., **4**, 396-409.
- POMMER A. M., BREGER I. A. (1960). — Potentiometric titration and equivalent weight of humic acid.
Geochim. Cosmochim., G. B., **20**, 1, 45-50.
- PRIDHAM J. B. (1957). — Determination of phenolic glycosides and aglycones on paper chromatograms.
Anal. Chemist., **29**, 8, 1167-1169.
- PRIDHAM J. B. (1959). — The formation and possible function of phenolic glycosides.
In phenolics in plants in health and disease, 9-15.
Pergamon. Press. London.
- RAUDNITZ H. (1957). — Occurrence of humic acids in the leaves.
Chemical, Industry, G. B., **51**, 1650-1651.
- REIØ L. (1958). — A method for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives, mould metabolites and related compounds of biochemical interest, using a « reference system ».
J. Chromatog., **I**, 338-373.
- REIØ L. (1960). — Supplementary data for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives and related compounds of biochemical interest, using a « reference system ».
J. Chromatog., **I**, 458-476.
- RESPLANDY M. A. (1959). — Remarques sur la chromatographie de substances phénoliques avec des solutions aqueuses d'électrolytes.
Ann. Pharmacie Fr., **17**, 6, 435-441.
- RIBEREAU-GAYON P. (1959). — Recherches sur les anthocyanes des végétaux, application au genre *Vitis*.
Revue Gen. Bot., **66**, 778, 531-635.
- ROBERTS E. A. H. (1956). — Detection and identification of phenols by paper chromatography. Water as chromatographic solvent.
XV^e Congr. Chim. Anal., 221-222.
Ramos et Cie, Lisboa.

- ROBERTS E. A. H. (1960). — Effect of glycosylation on the enzymic oxidation and translocation of flavonoids.
Nature, G. B., **185**, 536-537.
- ROBERTS E. A. H., CARTWRIGHT R. A., WOOD D. J. (1956). — The flavonols of tea.
J. Sci. Food. Agric., **7**, 253.
- ROMANKOVA A. G., NAGABYUK E. A. (1959). — The conditions of formation of humin-like compounds by mould fungi.
Pochvovedenie, **8**, 8-14.
- ROUX D. G., MAÏHS A. E. (1960). — Selective spray reagents for the identification and estimation of flavonoid compounds associated with condensed tannins.
J. Chromatog., **4**, 65-74.
- SAEKI H., AZUMA J. (1960). — The oxidation stability light absorbing power and component of humic acids from different origins and mutual relations.
Soil Plant, Food, **6**, 49-58.
- SALO M. L. (1957). — Lignin Studies. I. - Investigations concerning lignin determination.
J. Sci. Agricult. Soc. Finland, **29**, 4, 185-193.
- SAVAGE J. M., STEVENSON F. J. (1961). — Behavior of soil humic acids towards oxidation with hydrogen peroxide.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **25**, 1, 35-39.
- SCHARPENSEEL H. W. (1960). — Papierchromatographische Untersuchungen an Humussubstanzen sowie Huminsäureaufschlüssen und Modellsubstanzen.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **88**, 2, 97-115.
- SCHARPENSEEL H. W., KRAUSSE R. (1962). — Aminosäureuntersuchungen an verschiedenen organischen Sedimenten, besonders Grau- und Braunhuminsäurefraktionen verschiedener Bodentypen.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **96**, 1, 11-34.
- SCHAEFFER F., ZIECKMANN W., SCHLUTER H. (1955). — Die Papierelektrophorese als Möglichkeit der Auftrennung von Huminsäuren.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **70**, 3, 260-274.
- SCHAEFFER F., ZIECKMANN W., SCHLUTER H. (1959 a). — Die präparative Trennung von Huminsäuren im Schwerfeld der Ultrazentrifuge.
Naturwissenschaften, Dtsch., **46**, 4, 143-144.
- SCHAEFFER F., ZIECKMANN W., SCHOLZ H. (1959 b). — Die Anwendung der Säulenadsorptionschromatographie zur Trennung von Huminsäuren.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **85**, 1, 50-58.
- SCHAEFFER F., ULRICH B. (1960). — Humus und Humus Düngung, 266 p.
P. F. Enke, Verlag. Stuttgart.
- SCHAEFFER F., ZIECKMANN W., PAWELKE G. (1960). — Über die schonende Gewinnung natürlichen Huminstoffe mit Hilfe milder organischer Lösungsmittel.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **90**, 1, 58-69.
- SCHAEFFER F., KICKUTH R. (1961). — Chemische Abbauprobe an einer natürlichen Huminsäure. II. - Mitteilung.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, **94**, 2-3, 190-197.
- SCHMIDT E. L., PUTNAM H. O., PAUL E. A. (1960). — Behavior of free amino-acids in soils.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **24**, 2, 107-109.
- SCHNITZER M., SHEARER D. A., WRIGHT J. R. (1959). — A study in the infrared of high-molecular weight organic matter extracted by various reagents from a podzolic B horizon.
Soil Sci., **87**, 252-257.

- SCHNITZER M., WRIGHT J. R. (1960 a). — Studies on the oxidation of the organic matter of the A₀ and B₁ horizons of a podzol.
VII^e Congr. Inter. Soil Sci., Madison, II, 16, 112-118.
- SCHNITZER M., WRIGHT J. R. (1960 b). — Nitric acid oxidation of the organic matter of a podzol.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., 24, 4, 273-276.
- SCHOENEMANN C., JESCHEK C., FROMENHOLD K. (1961). — Eine Methode zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von Zucker und Zuckeralkoholen.
Anal. Chem. Disch., 181, 338-350
- SCHOLZ H. (1959). — Die adsorptionschromatographische Auftrennung von Huminsäure.
Z. Pflanz. Düngung Bodenkunde, 84, 1-3, 159-169.
- SCHRAM E., DUSTIN J. P., MOORE S., BIGWOOD F. S. (1953). — Application de la chromatographie sur échangeurs d'ions à l'étude de la composition des aliments en acides aminés.
Anal. Chimica, Acta, 9, 149-152.
- SHIVRINA A. N., LOVJAGINA E. V., PLATONOVA E. G. (1961) (en Russe). — Sur les questions de la composition qualitative des composés analogues à l'humus fournis par les champignons lignivores.
Et. Subst. physiologiquement actives végét. inf., 70-77.
- SHIVRINA A. N. (1962) (en Russe). — Caractères chimiques et spectrophotométriques des composés hydrosolubles analogues à l'humus et formés par le champignon *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil.
Pochvovedenie, 11, 51-60.
- SIESKING O. (1960). — Etude des complexes d'absorption formés entre la montmorillonite H et certains acides aminés.
C. R. Acad. Sci., 250, 2228-2230.
- SIMAKOV V. N., TSYPLENKOV V. P. (1960). — A modification of humus determination by the volumetric method.
Pochvovedenie (Soviet. Soil Sci.), 4, 113-119.
- SIMONART P., POFFLE R., MAYAUDON J. (1956). — Détermination quantitative d'acides aminés dans le sol.
VI^e Congr. Inter. Sol Sci. Paris, A, III, 230-231.
- SIMONART P., VIAUX A. (1959). — Etude biochimique de *Penicillium griseofulvum* D. I. - Formation des acides o.m. et p-hydroxybenzoïques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 41, 4, 537-544.
- SITTLER B., LOSSAINT P. (1961). — Humification du bois dans les troncs creux de *Salix alba* L.
Bull. Assoc. Philomatique, XI, 2, 74-88.
- SMITH I. (1960 a). — Phenolic acids.
In chromatographic and electrophoretic techniques, 291-307.
I. Publishers Inc. New York.
- SMITH I. (1960 b). — Plant phenols and tannins.
In chromatographic and electrophoretic techniques, 308-354.
I. Publishers Inc. New York.
- SOKOLOV D. F., SUDNICZYNA T. N. (1961) (en Russe). — Composition et propriétés optiques des acides humiques de certains sols forestiers.
Dokl Akad. Nauk., 138, 931-934.
d'après *Soils and Fertilizers*, XXIV (2369).
- SORENSEN H. (1962). — Decomposition of lignin by soil Bacteria and complex formation between autoxidized lignin and organic nitrogen compounds.
J. Gen. Microbiol., 27, 1, 21-34.
- SOWDEN F. J. (1955). — Estimation of amino-acids in soils hydrolysates by the Moore and Stein method.
Soil Sci., 80, 181-182.

- SOWDEN F. J. (1959). — Investigations on the amounts of hexosamines found in various soils and methods for their determination.
Soil Sci., **88**, 138-143.
- SOWDEN F. J., IVARSON K. C. (1959 b). — Decomposition of forest litters. II. - Changes in the nitrogenous constituents.
Plant and Soil, **XI**, 3, 249-261.
- SOWDEN F. J., IVARSON K. C. (1962). — Decomposition of forest litters. III. - Changes in the carbohydrate constituents.
Plant and Soil, **XVI**, 3, 389-400.
- SPRENGEL C. (1826). — Kastner's Arch. Čes.
Naturlebre, **8**, 145.
d'après Tinsley and Salam (1961 b).
Soils and Fertilizers, **XXIV**, 2, 81-84.
- SPRINGER U. (1952). — Humus und Bodenfruchtbarkeit.
Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz, 58-63.
- STEELINK C., BERRY J. W., NORDBY E., HO A. (1960). — Alkaline degradation products of soil humic acid.
Sci. Proceed. Royal Dublin, Soc., Série A, 1, 4, 59-68.
- STEIN H. N., TENDELOO H. J. C. (1959). — The oxidation of phloroglucinol as a model for humification processes.
Plant and Soil, **XI**, 2, 131-138.
- STEVENSON F. J. (1954). — Ion exchange chromatography of the amino-acids in soils hydrolysates.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **18**, 373-377.
- STEVENSON F. J. (1956). — Isolation and identification of some amino-compounds in soils.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **20**, 201-204.
- STEVENSON F. J. (1957 a). — Investigations of amino-polysaccharides in soils. I. - Colorimetric determination of hexosamines in soils hydrolysates.
Soil Sci., **83**, 113-122.
- STEVENSON F. J. (1957 b). — Investigations of amino-polysaccharides in soils. II. - Distribution of hexosamines in some soil profiles.
Soil Sci., **84**, 99-106.
- STEVENSON F. J. (1960). — Chemical nature of the nitrogen in the fulvic fraction of soil organic matter.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **24**, 472-477.
- STEVENSON F. J., DHARIVAL A. P. S. (1959). — Distribution of fixed ammonium in soils.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed., **23**, 121-125.
- STOFFYN P. J., JEANLOZ R. N. (1954). — Identification of amino-sugars by paper chromatography.
Arch. Biochem. Biophys., **52**, 373-379.
- SWAIN T. (1959). — Some interrelationships between leuco-anthocyanins and lignin in plants.
In Phenolics in plants in health and disease, 45-55.
Pergamon Press. London.
- SWAIN T., HILLIS W. E. (1959). — The phenolics constituents of *Prunus domestica*. I. - The quantitative analysis of phenolic constituents.
J. Sci. Food Agric., **10**, 1, 63-68.
- TAN K. H., VAN SCHUYLENBORGH J. (1961). — On the organic matter in tropical soils.
Netherl. J. Agric. Sci., **9**, 3, 174-180.
- TEPPER E. Z., SANDRAK N. A. (1960). — Brown products of the vital activity of *Actinomyces albidus* as possible sources of humic substances.
Dokl Akad. Timiryazwa, **57**, 183-191.
d'après *Soils and Fertilizers*, **XXIV** (2953).

- TINSLEY J., SALAM, (1961 a). — Extraction of soil organic matter with aqueous solvents.
Soils and Fertilizers, **XXIV**, 2, 81-84.
- TINSLEY J., SALAM A. (1961 b). — Chemical studies of soil organic matter. I. - Extraction with aqueous solutions.
J. Soil Sci., G. B., **12**, 259-268.
- TIURIN T. V. (1951) (en Russe). — Vers une méthode d'analyse par l'étude comparative des constituants de l'humus du sol.
Trav. Inst. des sol. Dokutchàïev, **XXXVIII**, 32 p.
- TRONCHET J. (1960). — Etude par chromatographie sur papier des modifications biochimiques réversibles induites par la stimulation de contact dans les vrilles d'*Echinocystis Wrightii*.
Ann. Sci. Besançon, Deuxième série, **15**, 75-80.
- TROUT G. E. (1958). — Preliminary report of an improved technique for the estimation of amino-sugars.
South Agric. J. Medic. Sci., **23**, 3-4, 282-283.
- VAN SUMERE C. F., TEUCHY H., PARMENTIER F. (1961 a). — Quantitative paper chromatographic determinations. I. - Coumarins and phenolic acids, especially esculetin, daphnetin and ferulic acid.
J. Chromatog., **4**, 481-484.
- VAN SUMERE C. F., PARMENTIER F., TEUCHY H. (1961 b). — Quantitative paper chromatographic determinations. II. - Phenolic acids, especially vanillic acid and p-hydroxybenzoic acid.
J. Chromatog., **4**, 484-485.
- WARCUP J. H., TALBOT P. H. B. (1962). — Ecology and identity of mycelia isolated from soil.
Trans. Brit. Myc. Soc., **45**, 4, 495-518.
- WALDRON A. C., MORTENSEN J. L. (1961). — Soil nitrogen complexes. II. - Electrophoretic separation of organic components.
Soil Sci. Soc. Amer. Proceed, **25**, 1, 29-32.
- WELTE E. (1955). — Neue Ergebnisse der Humus Forschung.
Z. Angew. Chem., **67**, 5, 153-155.
- WRIGHT J. R., SCHNITZER M., LEVICK A. R. (1958). — Some characteristics of the organic matter extracted by dilute inorganic acids from a podzolic B horizon.
Canad. J. Soil Sci., **38**, 14-23.
- WRIGHT J. R., SCHNITZER M. (1959). — Oxygen-containing functional groups in the organic matter of a podzol soil.
Nature, G. B., **184**, 1462-1463.
- WRIGHT H. E., BURTON W. W., BERRY R. C. (1960). — Soluble browning reaction pigments of aged burley tobacco.
Arch. Biochem. Biophys., **86**, 94-101.
- YANG C. H., WENDER S. (1962). — Free phenolic acids in cigarette smoke and tobacco paper chromatography: separation and identification.
J. Chromatog., **8**, 82-89.
- ZACCHARIUS R. M., TALLEY E. A. (1960). — Identification of a nitrogenous ninhydrin positive compound in hydrolysed plant fractions.
Plant. Physiol., 35 suppl. **XXIX**.
- ZACCHARIUS R. M., TALLEY E. A. (1962). — Non nitrogenous ninhydrin positive compounds in ion — exchange chromatography. Identification of levulinic acid in hydrolysed plant fractions.
J. Chromatog., **7**, 51-55.
- ZIECKMANN W., MEYER B. (1960). — Zur Chemie der Huminsäure-Vorstufen.
VII° Congr. Inter. Soil Sci., Madison, **II**, 15, 101-105.

Deuxième Thèse :

NOTIONS RECENTES
CONCERNANT LE BILAN HUMIQUE
D'UN SOL CULTIVÉ

VU ET APPROUVÉ :

Nancy, le 8 mars 1962,

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

M. ROUBAULT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Nancy, le 9 mars 1962,

Le Recteur

Président du Conseil de l'Université :

P. IMBS.