

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de l'Ingénieur**

Département de Chimie Industrielle

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

En Chimie industrielle

Spécialité : Génie de l'Environnement

# OPTIMISATION DE LA BIODÉGRADATION DES ACIDES HUMIQUES PAR DES SOUCHES MICROBIENNES ISOLÉES À PARTIR DE DIFFÉRENTES NICHES ÉCOLOGIQUES DE L'ALGÉRIE

Par

**Fatma-Zohra FERRADJI**

Devant le jury :

H. Khalaf	Professeur, Université de Blida	Président
M. Abou Seaoud	Maître de conférences, C.U. Médéa	Examineur
A. Aouabed	Maître de conférences, Université de Blida	Examineur
A. Rouibi	Chargé de cours, Université de Blida	Invité
A. Badis	Maître de conférences, Université de Blida	Promoteur

Blida, Septembre 2008

## RESUME

Cette présente étude est axée sur la caractérisation et la biodégradation des acides humiques (AHs) extraits à partir de différents sols de la plaine de la Mitija. Notre préoccupation majeure était la sélection d'un biotope de souches microbiennes aptes à dégrader ce type de macromolécules. Par ailleurs, une comparaison a été aussi faite entre la biodégradation des AHs synthétiques et naturels.

Une morphologie d'agrégats globulaires et filamenteux observée par microscope électronique à balayage, un rapport  $E_{465}/E_{665} < 5$  calculé par spectrophotométrie UV-visible et une présence de groupements fonctionnels typiques détectés par IRTF, ont permis de confirmer l'exactitude de produit obtenu, d'assurer l'efficacité de la technique d'extraction employée et de caractériser les AHs naturels de sols locaux.

Dix neuf (19) actinomycètes et vingt deux (22) champignons ont été isolés à partir du sol de la surface ainsi qu'un consortium microbien issu de l'incubation de l'extrait de la betterave rouge. Une décoloration du milieu de culture (additionné à 0,5% d'AHs) a été bien visualisée en présence des souches de champignons, d'actinomycètes et d'un degré moindre avec le consortium microbien. Les souches performantes, sélectionnées pour la poursuite du travail, ont été identifiées comme suit : champignons (*Aspergillus* sp. CB2, *Fusarium solani* CM5 et Non-identified strain CH6), actinomycètes (*Streptomyces* sp. n°1 AB1, *Streptomyces* sp. n°2 AH4 et *Streptomyces* sp. n°3 AM2) et un consortium EXBRI<sub>30</sub>.

Le suivi de la cinétique d'élimination d'AHs (biosorption et/ou biodégradation) a révélé des meilleurs taux dans le milieu complet renfermant les sources de carbone et d'azote assimilables (varie entre 40 à 90%, 35 à 68% et 50 à 60% avec les souches de champignons, d'actinomycètes et de consortium EXBRI<sub>30</sub>, respectivement). L'utilisation des AHs comme seules sources du C et/ou N nécessiterait la présence d'une faible concentration des sources de C+N assimilables. Un effet positif de l'agitation sur l'amélioration de la biodégradation a été enregistré.

Les spectres IRTF ont révélé une modification de la structure des AHs à la fin de l'incubation témoignant ainsi le mode d'attaque microbien. A cet effet, une génération de métabolites de biodégradation a été détectée par CLHP dans le milieu de culture.

Mots clés : Biodégradation – Caractérisation - Acides Humiques – Biotope Souches microbiennes.

## ABSTRACT

This present study is axed on the characterization and biodegradation of humic acids (HAs) extracted from different soils of Mitija plain. Our major preoccupation was the selection of biotope of microbial strains able to degrade these macromolecules. In addition, a comparison was also made between synthetic and natural HAs biodegradation.

A globular and filamentous aggregates chaps observed by scanning electron microscope,  $E_{465}/E_{665} < 5$  report calculated by UV-visible spectrophotometer and presence of typical functional groups detected by FTIR, have confirmed the exactitude of obtained product, ensure the efficiency of the extraction technique used and to characterize the natural HAs from local soils.

Nineteen (19) actinomycetes and twenty two (22) fungus were isolated from surface soil and a microbial consortium from the incubated beet red extract. A discoloration of the culture medium (contained 0.5% HAs) was well displayed in the presence of fungal strains, actinomycets and with a least degree by the consortium. Performance strains selected for further work were identified as follows: fungus (*Aspergillus* sp. CB2, *Fusarium solani* CM5 and Non-identified strain CH6), actinomycetes (*Streptomyces* sp. AB1 n°1, *Streptomyces* sp. n°2 AH4 and *Streptomyces* sp. AM2 n° 3) and a consortium EXBRI<sub>30</sub>.

The flowing of removal HAs kinetic (biosorption and/or biodegradation) revealed the best rates in the completed medium containing easily carbon and nitrogen sources (varies between 40 to 90%, 35 to 68% and 50 to 60% with fungal strains, actinomycets and EXBRI<sub>30</sub>, respectively). The used of HAs as alone C and/or N sources require the presence of a low assimilated C+N concentration. A positive effect of agitation on improving the biodegradation has been registered.

The FTIR spectra revealed a change in the structure of HAs at the end of the incubation demonstrating the mode of microbial attack. To this effect, a generation of biodegradation metabolites was detected by HPLC in the culture medium.

Key words: Biodegradation - Characterization – Humic acids –Biotope Microbial strains.

## ملخص

ترتكز دراستنا هذه على وصف الأحماض الهيومية المستخلصة من مختلف الأتربة لسهل متيحة و انتقاء بيوتوب من سلالات ميكروبية قادرة على تفكيك هذا النوع من الجزيئات الضخمة. بالإضافة إلى مقارنة بين التفكيك البيولوجي للأحماض الهيومية المصنعة و الطبيعية

الحصول على تجمعات بشكل كروي و خيطي بواسطة المسح بالمجهر الالكتروني، نسبة  $E_{465}/E_{665} < 5$  المقاس بشدة الموجات أليفة للأشعة فوق البنفسجية و المرئية ووجود المجموعات الوظيفية بواسطة الأشعة تحت الحمراء ، مكنت من التأكيد على المادة المحصل عليها، و ضمان كفاءة تقنية الاستخلاص ووصف للأحماض الهيومية المحاي

تم عزل تسعة عشر (19) أكتينومييسات و اثنان و عشرون ( 22 ) فطر من التربة السطحية وكذا خليط ميكروبي من الشمندر السكري الأحمر. إن زوال اللون من الوسط الغذائي (مضافا إليه 0,5 أحماض هيومية) كان أكثر تجسيدا مع وجود الفطريات، الأكتينومييسات ودرجة اقل مع الخليط الميكروبي للشمندر السكري الأحمر. السلالات الأكثر كفاءة المنتقاة لمتابعة الدراسة تم تحديدها على النحو التالي: الفطريات Non-identified strain CH6, *Streptomyces* sp. n°3, *Aspergillus* sp. CB2, *Fusarium solani* CM5 و الخيط الميكروبي *Streptomyces* sp. n°1, *Streptomyces* sp. n°2 .EXBRI<sub>30</sub>.

إن متابعة حركية نزع الأحماض الهيومية (التفكيك و/أو الادمصاص) أعطت أحسن النسب في الوسط الكامل الحاوي على مصدر للكربون و الأزوت سهل الاستهلاك بوجود الفطريات، الأكتينومييسات و الخليط الميكروبي تباعا، 40 إلى 90 % ، 35 إلى 68 % و 50 إلى 60 % . إن استعمال الأحماض الهيومية كمصدر وحيد للكربون و الأزوت تحتاج إلى كمية قليلة من مصدري الكربون و الأزون السهلة الاستهلاك. و تجدر الإشارة إلى أنه تم تسجيل أثر ايجابي للتهوية في تحسين عملية التفكيك.

كشفت التحاليل الطيفية للأشعة تحت الحمراء عن تغيرات في تركيب الأحماض الهيومية في نهاية مرحلة التحضين. من أجل هذا، تولدت نواتج اسنقلابية من عملية التفكيك تم رصدها بواسطة HPLC في الوسط الغذائي.

**الكلمات المفتاحية:** التفكيك الحيوي - الوصف - الأحماض الهيومية - بيوتوب - سلالات ميكروبية.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier **DIEU** de m'avoir facilité la tâche pour réaliser ce mémoire.

Je tiens à remercier messieurs :

Le Professeur KHALAF Hocine qui m'a fait un grand honneur par sa présidence de mon jury de soutenance ;

Les Docteurs AOUABED Ali et ABOU-SEOUD Mahmoud d'avoir accepté d'examiner le présent travail.

A cette occasion, j'invite Monsieur ROUIBI Abdelhak de faire partie de la discussion de mon travail.

Un grand merci au Docteur BADIS Abdelmalek de m'avoir fait confiance et surtout de m'a confié un sujet si exaltant et à lui exprimer toute ma gratitude "toujours disponible, d'une gentillesse non mesurable, d'un dévouement inégalable et d'une patience remarquable".

Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments, m'ont apporté leur aide et leur soutien.

Au risque de me répéter, encore MERCI à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin et pardon à ceux que j'aurais maladroitement oublié.

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1. 1	Différents types de l'humine issu de plusieurs mécanismes.	20
Figure 1. 2	Monomère constitutif des substances humiques.	23
Figure 1. 3	Modèle structural des acides humiques.	24
Figure 1. 4	Modèle structural des acides fulviques.	24
Figure 1. 5	Modèle d'acides humiques d'après SCHULTEN et LEINWEBER.	27
Figure 1. 6	Modèles d'acides humiques selon SCHULTEN et SCHNITZER.	28
Figure 1. 7	Modèle de structure des composés humiques.	30
Figure 2. 1	Schéma simplifiant les voies de formation des substances humiques.	35
Figure2.2.a	Structure moléculaire de la lignine.	36
Figure2.2.b	Trois unités phénylpropanoïdes de la lignine.	36
Figure 2. 3	Schéma simplifiant la théorie de polyphénols de formation des substances humiques.	38
Figure 2. 4	Schéma simplifiant la voie de condensation de sucres et des acides aminés.	39
Figure 2. 5 :	Mécanismes de la biodégradation des SHs et la lignine par les champignons.	47
Figure 2. 6	Mécanismes de la biodégradation et transformation des SHs par WRF et LDF.	48
Figure 3. 1	Biodégradation d'AHS par les souches performantes	62
Figure 3. 2	Biodégradation des AHs extraits du sol de Boufarik par les souches performantes isolées du même sol.	64
Figure 3. 3	Biodégradation des AHs extraits du sol de Hadjout par les souches performantes isolées du même sol.	64
Figure 3. 4	Biodégradation des AHs extraits du sol de Meftah par les souches performantes isolées du même sol.	64
Figure 4. 1	Spectre UV-visible de l'AHNB.	65

Figure 4. 2	Spectre UV-visible de l'AHNH	65
Figure 4. 3	Spectre UV-visible de l'AHNM.	66
Figure 4. 4	Spectre UV-visible de l'AHS.	66
Figure 4. 5	Spectre infrarouge de l'AHNB.	68
Figure 4. 6	Spectre infrarouge de l'AHNH.	68
Figure 4. 7	Spectre infrarouge de l'AHNM.	69
Figure 4. 8	Spectre infrarouge de l'AHS.	69
Figure 4. 9	Comparaison entre AHS (a`) et celui de référence (a) à faible grossissement.	73
Figure 4. 10	Comparaison entre AHS (b) et celui de référence (g) à fort grossissement.	74
Figure 4. 11	AHs extraits du sol à faible grossissement, AHNB (c), AHNH (d), AHNM (e).	75
Figure 4.12	Comparaison entre les AHs extraits du sol. AHNB (f), AHNH (g'), AHNM (h') et AHs du sol de référence (h) à fort grossissement.	76
Figure .13a	Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHNB.	77
Figure4.13b	Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHNH.	77
Figure 4.13c	Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHNM.	77
Figure 4.13d	Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHS	78
Figure 4.14	Réduction d'AHS par les champignons de Boufarik .	80
Figure 4.15	Réduction d'AHS par les champignons de Hadjout .	80
Figure 4.16	Réduction d'AHS par les champignons de Meftah.	81
Figure 4.17	Réduction d'AHS par les actinomycètes de Boufarik	81
Figure 4.18	Réduction d'AHS par les actinomycètes de Hadjout.	82
Figure 4.19	Réduction d'AHS par les actinomycètes de Meftah.	82
Figure 4. 20	Réduction d'AHS par des consortiums bactériens de la bettrave rouge.	84
Figure 4. 21	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC agité à 254 nm.	93
Figure 4. 22	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC statique à 254 nm.	94
Figure 4. 23	Réduction d'AHS par les champignons performants dans	94

	un MC agité à 350 nm.	
Figure 4. 24	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC statique à 350 nm.	95
Figure 4. 25	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>C</sub> agité à 254 nm.	96
Figure 4. 26	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PC</sub> statique à 254 nm.	97
Figure 4. 27	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PC</sub> agité à 350 nm.	97
Figure 4. 28	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PC</sub> statique à 350 nm.	98
Figure 4. 29	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PN</sub> agité à 254 nm.	99
Figure 4. 30	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PN</sub> statique à 254 nm	99
Figure 4. 31	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>N</sub> agité à 350 nm.	100
Figure 4. 32	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PN</sub> statique à 350 nm.	100
Figure 4. 33	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PCN</sub> agité à 254 nm.	101
Figure 4. 34	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PCN</sub> statique à 254 nm.	101
Figure 4. 35	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PCN</sub> agité à 350 nm.	102
Figure 4. 36	Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M <sub>PCN</sub> statique à 350 nm.	102
Figure 4. 37	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, agité, mesures à 254 nm.	104
Figure 4. 38	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, statique, mesures à 254 nm.	104



Figure 4. 39	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, agité, mesures à 350 nm.	105
Figure 4. 40	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, statique, mesures à 350 nm.	105
Figure 4. 41	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PC</sub> agité, mesures à 254 nm.	106
Figure 4. 42	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PC</sub> statique, mesures à 254 nm.	107
Figure 4. 43	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PC</sub> agité, mesures à 350 nm.	107
Figure 4. 44	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PC</sub> statique, mesures à 350 nm.	108
Figure 4. 45	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PN</sub> agité, mesures à 254 nm.	108
Figure 4. 46	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PN</sub> statique, mesures à 254 nm	109
Figure 4. 47	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PN</sub> agité, mesures à 350 nm.	109
Figure 4. 48	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PN</sub> statique, mesures à 350 nm.	110
Figure 4. 49	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M <sub>PCN</sub> agité, mesures à 254 nm.	111

Figure 4. 50	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu $M_{PCN}$ statique, mesures à 254 nm.	111
Figure 4. 51	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu $M_{PCN}$ agité, mesures à 350 nm.	112
Figure 4. 52	Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu $M_{PCN}$ statique, mesures à 350 nm.	112
Figure 4. 53	Réduction d'AHS par l'EBRI <sub>30</sub> sous l'effet d'agitation à 254 nm.	113
Figure 4. 54	Réduction d'AHS par l'EBRI <sub>30</sub> sous l'effet d'agitation à 350 nm.	114
Figure 4. 55	Chromatogrammes CLHP issus de la biodégradation en présence de champignons : milieu $M_{PCN}$ sous agitation à la fin de la quatrième semaine.	115
Figure 4.56	Chromatogrammes CLHP issus de la biodégradation en présence d'actinomycètes : milieu $M_{PCN}$ sous agitation à la fin de la quatrième semaine	115
Figure 4.57	Chromatogrammes CLHP issus de la biodégradation en présence d'EBRI <sub>30</sub> : sous agitation à la fin de la quatrième semaine	116
Figure 4. 58	Réduction d'AHNB dans $M_{PCN}$ sous agitation à 350nm.	117
Figure 4. 59	Réduction d'AHNH dans $M_{PCN}$ sous agitation à 350nm.	118
Figure 4. 60	Réduction d'AHNM dans $M_{PCN}$ sous agitation à 350nm.	119
Figure 4. 61	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNB par CB2.	120
Figure 4. 62	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNB par AB1.	120
Figure 4. 63	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNB par EBRI <sub>30</sub> .	121
Figure 4. 64	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNH par CH6.	121

Figure 4. 65	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNH par AH4.	122
Figure 4. 66	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNH par BRI <sub>30</sub> .	122
Figure 4. 67	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNM par CM5	123
Figure 4. 68	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNM par AM2.	123
Figure 4.69	Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNM par BRI <sub>30</sub> .	123
Photo 3.1	Acides humiques extraits du sol sous forme solide.	52
Photo 3.2	Acides humiques extraits du sol sous forme liquide.	52
Photo 4.1	Biodégradation de la Bétanine de l'extrait de la betterave rouge.	84
Photo 4.2	Aspect de MS du substrat de CB2.	85
Photo 4.3	Thalle de la souche CB2.	85
Photo 4. 4	Aspect de MS de la souche CH6.	85
Photo 4. 5	Thalle de la souche CH6.	85
Photo 4. 6	Aspect de MS de la souche CM5.	85
Photo 4. 7	Thalle de la souche CM5	85
Photo 4. 8	Observation microscopique à 100X de CB2.	86
Photo 4. 9	Observation microscopique à 100X de CH6.	86
Photo 4.10	Observation microscopique à 100X de CM5.	86
Photo 4.11	Mycélium du substrat de la souche AB1.	88
Photo 4.12	Mycélium aérien de la souche AB1.	89
Photo 4.13	Mycélium du substrat de la souche AH4	89
Photo 4.14	Mycélium du substrat de la souche AH4.	89
Photo 4.15	Mycélium du substrat de la souche AM2	90
Photo 4.16	Mycélium aérien de la souche AM2.	90
Photo 4.17	Spores exogènes sur le MA de la souche AB1.	91
Photo 4.18	Spores exogènes sur le MA de la souche AH4	91
Photo 4.19	Spores exogènes sur le MA de la souche AM2.	91
Tableau 2.1	Propriétés générales des SHs et leurs effets dans le sol	49

Tableau 4.1	Rapports $E_{465}/E_{665}$ calculés pour les différents AHs analysés.	66
Tableau 4.2	Bandes d'absorption (en $\text{cm}^{-1}$ ) et vibrateurs associés des acides humiques étudiés.	72
Tableau 4.3	Pourcentage atomique approximatif des éléments majeurs.	78
Tableau 4.4	Caractérisation macroscopique des champignons.	87

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AFs	Acides Fulviques.
AHN	Acides Humiques Naturels.
AHNB	Acides Humiques Naturels de Boufarik.
AHNH	Acides Humiques Naturels de Hadjout.
AHNM	Acides Humiques Naturels de Meftah.
AHS	Acides Humiques Synthétiques.
AHs	Acides Humiques.
AB1	Actinomycètes de Boufarik numéro 1.
AB2	Actinomycètes de Boufarik numéro 2.
AB3	Actinomycètes de Boufarik numéro 3.
AB4	Actinomycètes de Boufarik numéro 4.
AB5	Actinomycètes de Boufarik numéro 5.
AB6	Actinomycètes de Boufarik numéro 6.
AH1	Actinomycètes de Hadjout numéro 1.
AH2	Actinomycètes de Hadjout numéro 2.
AH3	Actinomycètes de Hadjout numéro 3.
AH4	Actinomycètes de Hadjout numéro 4.
AH5	Actinomycètes de Hadjout numéro 5.
AH6	Actinomycètes de Hadjout numéro 6.
AH7	Actinomycètes de Hadjout numéro 7.
AH8	Actinomycètes de Hadjout numéro 8.
AM1	Actinomycètes de Meftah numéro 1.
AM2	Actinomycètes de Meftah numéro 2.
AM3	Actinomycètes de Meftah numéro 3.
AM4	Actinomycètes de Meftah numéro 4.
AM5	Actinomycètes de Meftah numéro 5.
C	Carbone.
CB1	Champignon de Boufarik numéro 1.
CB2	Champignon de Boufarik numéro 2.
CB3	Champignon de Boufarik numéro 3.

CB4	Champignon de Boufarik numéro 4.
CB5	Champignon de Boufarik numéro 5.
CB6	Champignon de Boufarik numéro 6.
CB7	Champignon de Boufarik numéro 7.
CH1	Champignon de Hadjout numéro 1.
CH2	Champignon de Hadjout numéro 2.
CH3	Champignon de Hadjout numéro 3.
CH4	Champignon de Hadjout numéro 4.
CH5	Champignon de Hadjout numéro 5.
CH6	Champignon de Hadjout numéro 6.
CH7	Champignon de Hadjout numéro 7.
CH8	Champignon de Hadjout numéro 8.
CM1	Champignon de Meftah numéro 1.
CM2	Champignon de Meftah numéro 2.
CM3	Champignon de Meftah numéro 3.
CM4	Champignon de Meftah numéro 4.
CM5	Champignon de Meftah numéro 5.
CM6	Champignon de Meftah numéro 6.
CM7	Champignon de Meftah numéro 7.
Cm	Centimètre.
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de Carbone.
DAP	Acide Diaminopimilique.
EBR	Extrait de Betterave Rouge.
EBRI <sub>7</sub>	Extrait de Betterave Rouge Incubé 7 jours.
EBRI <sub>30</sub>	Extrait de Betterave Rouge Incubé 30 jours.
EBRI <sub>60</sub>	Extrait de Betterave Rouge Incubé 60 jours.
IRTF	Infra Rouge Transformée à Fourier.
H	Hydrogène.
HCl	Acide Chlorhydrique.
IHSS	Société Internationale des Substances Humiques.
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance.
ISP2	International Streptomyces Project 2.
ISP3	International Streptomyces Project 3.

ISP4	International Streptomyces Project 4.
ISP9	International Streptomyces Project 9.
KBr	Bromure de potassium.
Kev	Kiloélectro volts.
Kg	Kilogramme.
L	Litre.
LDF	Lignine Dégradation Fungi
M	Molarité.
MA	Mycélium aérien.
MC	Milieu Complet.
M <sub>PC</sub>	Milieu pauvre en carbone assimilable.
M <sub>PCN</sub>	Milieu pauvre en carbone et azote assimilables.
M <sub>PN</sub>	Milieu pauvre en azote assimilable.
MEB	Microscope Electronique à Balayage.
MS	Mycélium du Substrat.
MOF	Matière Organique Fraîche.
MO	Matière Organique.
N	Azote.
NaNO <sub>3</sub>	Nitrate de Sodium.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfate d'Ammoniaque.
NaOH	Soude.
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Pyrophosphates de Sodium.
O	Oxygène.
OH	Hydroxyde.
P	Poids.
PM	Poids Moléculaire.
SD	Suspension Dilution.
SHs	Substances Humiques.
UV	Ultra Voilet.
V	Volume.
Abs	Absorbance.
Abs <sub>f</sub>	Absorbance finale.
Abs <sub>i</sub>	Absorbance initiale.

h	Heur.
g	Gramme.
min	Minute.
mg	Milligramme.
ml	Millilitre.
mm	Millimètre.
nm	Nanomètre.
pH	Potentiel Hydrogène.
sp	Sans spécification.
tr	Tour.
<sup>14</sup> C	Carbone 14.
°C	Degré Celsius.
µl	Microlitre.
Λ	Longueur d'onde.
Γ	nombre d'onde.
Φ	Diamètre.
%	Pourcentage.



## TABLE DES MATIERS

RESUME.....	1
REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	7
INTRODUCTION.....	14
1 SUBSTANCES HUMIQUES: CLASSIFICATION, STRUCTURE ET EXTRACTION.....	17
1. 1 Introduction.....	17
1. 2 Description générale des substances humiques.....	18
1. 3 Classification des substances humiques.....	19
1. 4 Modèles structuraux de composés humiques.....	22
1. 5 Extraction et Purification des substances humiques.....	30
2 HUMIFICATION, BIODEGRADATION ET ROLE DES ACIDES HUMIQUES.....	34
2. 1 Introduction.....	34
2. 2 Humification.....	34
2. 3 Résistances des composés humiques.....	43
2. 4 Biodégradabilité des substances humiques.....	45
2. 5 Rôle de substances humiques.....	48
3 PARTIE EXPERIMENTALE.....	50
3. 1 Introduction.....	50
3. 2 Extraction, purification et caractérisation des acides humiques.....	50
3. 3 Isolement et sélection des souches performantes.....	55
3.4 Identification préliminaire des souches performantes.....	58
3. 5 Biodegradation des acides humiques.....	60
4 RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	65
4.1 Caractérisations des acides humiques.....	65
4. 2 Isolement et sélection des souches performantes.....	79
4. 3 Identification des souches performantes.....	86

4. 4 Biodégradation des acides humiques synthétiques.....	92
4. 5 Biodégradation des acides humiques naturels.....	116
4.6 Discussion générale .....	124
CONCLUSION.....	129
LISTE DES SYMBOLES .....	132
APPENDICE .....	136
GLOSSAIRE.....	153
REFERENCES.....	158

## INTRODUCTION

La matière organique naturel (MON) qui reflète mieux les interactions entre "sol, biosphère et atmosphère" car elle dépend à la fois de la nature du sol et de l'environnement bioclimatique. Les substances humiques (SHs) (ou humus) constituent une part importante de la MO des sols Elles sont définies comme éléments et produits majeurs des processus biogéochimiques qui contrôlent la biodisponibilité du carbone dans les milieux naturels [1, 2]. De plus, elles tiennent un rôle primordial de l'activité microbienne dans le sol et les milieux aquatiques [3, 4].

Les transformations que subit la MO dans les sols ont fait l'objet de nombreux travaux [5, 6, 7]. Ces transformations organiques, conduisant aux SHs, varient quantitativement et qualitativement en fonction de nombreux facteurs physico-chimiques (du sol) ou climatiques (humidité, température, aération) [4, 8].

La fraction majeure de SHs est représentée par les acides humiques (AHs). Ces macromolécules organiques peuvent être définies comme un ensemble de composés électronégatifs, riches en carbone, de taille variable, de nature polycondensée et résistante à la biodégradation [4]. Ils sont connus par leurs effets physiques, chimiques et biologiques sur le sol et l'ensemble des écosystèmes [7]. La conformation spatiale de la structure harmonieuse des AHs détermine leurs caractéristiques chimiques et physiques [9, 10].

Cependant, la nature de cette structure ainsi que la compréhension de détails des processus responsables à leur biodégradation est encore fait l'objet de plusieurs débats scientifiques [11, 12].

La présence des AHs dans les eaux potables est à l'origine de sérieux problèmes car ils peuvent réagir et former des complexes avec les métaux lourds et les produits organiques hydrophobes (polychlorés), influençant ainsi leur devenir et leur transport. Il est possible qu'ils aient un impact négatif sur la santé humaine par la formation des composés carcinogènes [13].

Plusieurs techniques physico-chimiques de traitement des eaux, à savoir, la filtration membranaire et l'adsorption sur charbon actif, ont été développées et appliquées avec succès dans le but de réduire les MO de l'eau [14]. Néanmoins, l'application de telles techniques exigeraient des coûts élevés et présenteraient des capacités de réduction limitées et le plus souvent conduisant à une pollution secondaire.

Par ailleurs, il a été développé récemment un processus biophysico-chimique pour l'élimination des polluants chimiques. Il est basé sur la fixation de contaminants sur des surfaces microbiennes par le biais d'un phénomène de "biosorption" [15, 16]. En effet, plusieurs métaux lourds et contaminants organiques ont été éliminés par cette nouvelle technique [17, 18]. Bien que certaines investigations sur la biosorption des AHs dans les eaux ont été réalisées par l'utilisation des adsorbants biologiques secs ou immobilisés [16, 19, 20]. Mais peu d'études ont rapporté la biosorption des AHs par l'emploi des boues activées car ces dernières ont un avantage de produire des fertilisants après traitement des eaux usées riches en AHs [13, 20].

Les processus responsables de la minéralisation et la biodégradation des AHs sont presque totalement méconnus. Les premières recherches concernant la biodégradabilité des AHs ont été réalisées à l'aide des champignons [12]. Des travaux plus récents ont été aussi effectués sur les mécanismes et les paramètres qui influent sur la biodégradation dans différents milieux [12]. Par contre, peu d'études ont été publiées sur l'emploi des souches bactériennes et d'actinomycètes dans le domaine de la dégradation des AHs [21].

Au fait, les thématiques de recherche sur les AHs se résument sur deux points essentiels, l'étude de la structure, d'une part et, de comprendre les processus de leur biodégradation, d'autre part.

Suite à la lumière de ces justifications chronologiques et vu le peu de travaux concernant la biodégradation des AHs locaux, il a été fixé l'objectif principal de cette étude. Il est basé sur la sélection d'un biotope de souches microbiennes locales capables de dégrader les AHs.

Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à la caractérisation des AHs extraits à partir de sol de surface de la plaine de la Mitija. En deuxième lieu nous avons consacré une partie colossale du travail pour la mise en évidence de la biodégradabilité, la sélection des souches performantes et déterminer les conditions de la biodégradation des AHs afin de placer notre contribution sur ce sujet de recherche.

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties :

La première partie est une approche bibliographique permettant de replacer les connaissances de bases et le contexte de l'étude. A cet effet, de nombreux points de la thématique des substances humiques et leur biodégradabilité a été abordés aussi bien sur leur aspect fondamental qu'appliqué. Cette partie se subdivise en deux chapitres :

- Dans le premier chapitre, on essayera de faire la synthèse des connaissances sur l'évolution des idées concernant les SHs, leurs structures et leurs propriétés.
- Le second chapitre a été réservé pour l'étude de la biodégradation des AHs, leurs mécanismes de formation, ainsi que leur rôle dans la dépollution de l'environnement.

Seront présentés dans la deuxième partie du mémoire les principaux matériels et méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation.

La troisième partie présentera les résultats obtenus ainsi que les interprétations et discussions qu'ils peuvent susciter.

Enfin, en guise de conclusion générale nous proposerons une synthèse des résultats acquis, et dégagerons les perspectives de la poursuite de ce travail de recherche.

# CHAPITRE 1

## SUBSTANCES HUMIQUES: CLASSIFICATION, STRUCTURE ET EXTRACTION

### 1. 1 Introduction

La compréhension des relations existantes entre la structure chimique des substances humiques et leurs propriétés biochimiques, nécessite une approche globale présentant le contexte et leurs mécanismes de formation.

La difficulté dans l'étude des substances humiques provient de la complexité de ce matériel, qui ne peut être séparé en composants purs. Malgré l'impossibilité de représenter une structure macromoléculaire des substances humiques, il est cependant possible de comprendre leurs propriétés et leurs effets sur les sols et les plantes. L'approche bibliographique suivante s'attache à présenter les SHs naturelles de sol et de l'eau.

Les substances macromoléculaires naturelles qui constituent ce qu'il convient d'appeler la MO, sont formées essentiellement par les processus de biodégradation des molécules biologiques d'origine végétale ou animale. Elles sont probablement considérées comme les macromolécules organiques naturellement les plus abondantes sur terre (2-  $3 \cdot 10^{10}$  tonne) [1, 22]. Cette fraction de la MO, constituée par une grande part des substances humiques (SHs), est composée de mélanges hétérogènes de biopolymères de masses moléculaires comprises entre 500 et 300000 Daltons [1, 22].

La formation des substances humiques implique des processus d'humification qu'ont lieu dans les sols, dans les sédiments et dans les eaux naturelles. Plusieurs mécanismes d'humification ont été proposés dont les réactions impliquant la lignine [22, 23], les réactions de condensation des polyphénols [23, 24] et des acides aminés [7, 22]. Les différentes combinaisons possibles sont presque illimitées et ceci explique le caractère hétérogène des substances humiques qui en résultent [25].

## 1. 2 Description générale des substances humiques

Les substances humiques sont des composés organiques polyelectrolytes formés à partir des plantes et des animaux par des voies biochimiques très diverses [1]. Ce sont les principaux composants organiques extrêmement répandus dans les milieux naturels (sol, eau et sédiment) [22, 26].

Les substances humiques ne peuvent pas être définies en tant que composés chimiques uniques. Il est difficile de les décrire avec des termes chimiques exacts. AIKEN et COLL, donnent la définition suivante de ces substances : "**Les substances humiques appartiennent à la catégorie des substances organiques naturelles, hétérogènes, à haut poids moléculaire, qui sont isolées de l'environnement et qui se définissent par leur solubilité**" [22, 27].

Dans les sols, l'origine d'humus lié à la transformation de composés précurseurs représentés essentiellement par la lignine, la cellulose, les hémicelluloses et les tannins. Lors de la décomposition des végétaux, ces composés à poids moléculaire élevé, se dépolymérisent et libèrent des petites fractions moléculaires dont certaines, en présence des conditions environnementales favorables (pH, potentiel redox, etc.), acquièrent une "réactivité" qui concourt, en association avec d'autres molécules azotées, à la formation de dérivés préhumiques qui donneront après une longue période de maturation les composés dites humique. Au cours de ce processus d'humification, interviennent aussi bien des réactions autooxydatives qu'enzymatiques [28, 29].

Dans les eaux, les modalités de formation de l'humus sont très voisines de celles des sols, mais les précurseurs sont différents : ces sont en général : les hémicelluloses, les lipides complexes, les polysaccharides et les protéines.

L'humus, au sens large, est constitué d'humus libre (= matière organique non-humifiée) et d'humus lié (= matière organique humifiée) [30]. L'humus libre est une fraction légère, de la litière en cours de décomposition,

à C/N élevé, facilement biodégradable et faiblement liée aux argiles. L'humus lié, ou l'humus au sens strict, est constitué d'une fraction dense à C/N voisin de 10, difficilement biodégradable et fortement liée aux argiles [31].

### 1. 3 Classification des substances humiques

En 1861, BERZELIUS propose la première classification des composés humiques, sur la base de leur solubilité dans différentes solutions acides et basiques [29] qui sont classiquement fractionnées en :

1. Fraction non extractible : l'humine, fortement associée avec les fraction minérales du sol et insoluble dans les solutions alcalines couramment utilisées pour solubiliser la matière organique du sol : sa composition chimique est encore discutée;
2. Fraction extractible qui est composée de deux groupes de substances:
  - Les acides fulviques qui sont solubles aux pH acides;
  - Les acides humiques qui correspondent aux molécules qui précipitent à pH acide ( $\text{pH} \leq 2$ ).

#### 1. 3. 1 Humine

L'humine est la fraction insoluble à l'extractif alcalin. Il s'agit d'un constituant important à la fois par la masse de carbone organique qu'il représente et par son rôle dans le cycle biogéochimique du carbone. L'humine, représente souvent plus de 50% du carbone organique des sols et plus 70% du carbone organique des sédiments non consolidés. Par ailleurs, c'est un constituant qui se situe à l'interface entre la biosphère et qui occupe une place clé dans le cycle du carbone. Ce constituant intervient de façon déterminante dans le devenir de nombreuses substances, les polluants en particulier (figure 1. 1) [1, 32, 33].



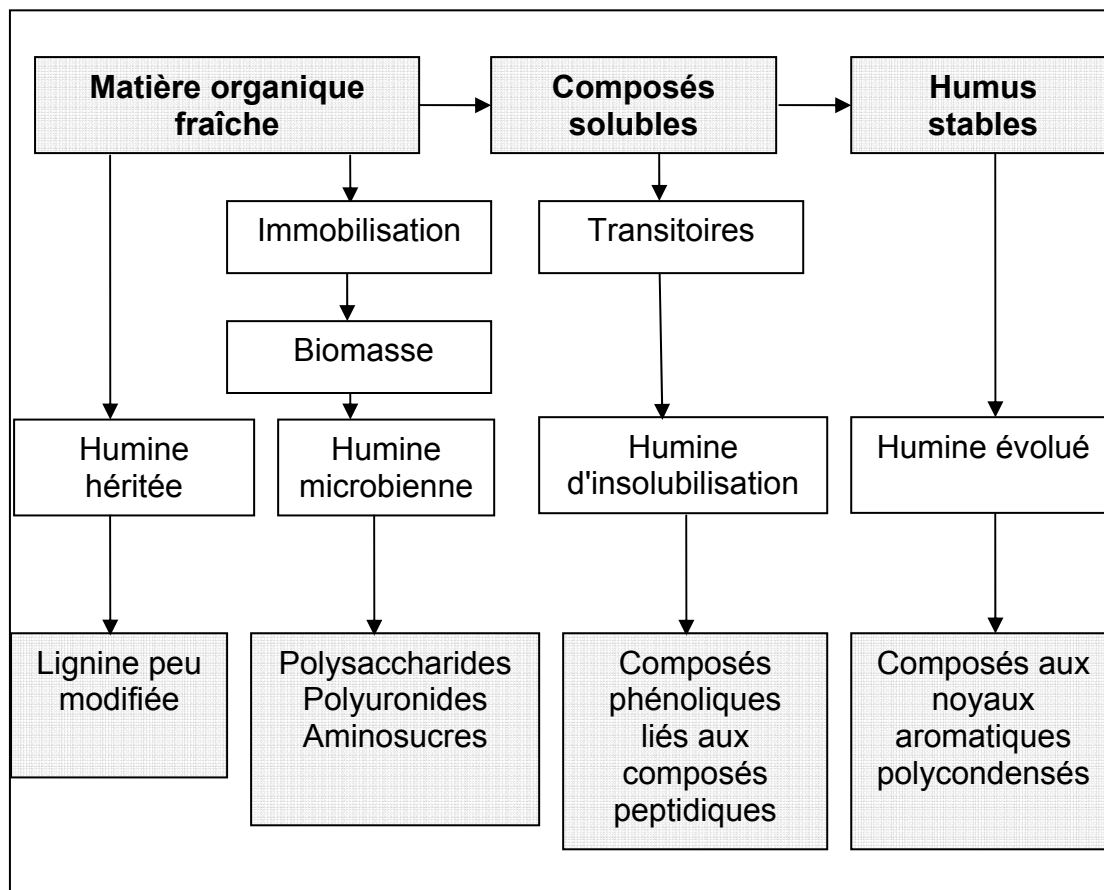


Figure 1. 1 : Différents types de l'humine issu de plusieurs mécanismes.

### 1. 3. 2 Acides fulviques

Les acides fulviques sont considérés comme des polymères macromoléculaires, dont la structure et les caractéristiques sont variables en fonction de leurs origines et du processus d'humification. Comme les AHs, les AFs peuvent être retrouvés en milieu naturel, dans l'eau, dans le sol. Ils sont produits, dans le processus d'humification, par la décomposition chimique et microbienne des plantes. Dans le temps, les AFs sont probablement formés après les AHs [33].

Les AHs et les AFs sont, en général, considérés comme deux produits différents et leurs caractéristiques sont décrites comme tels : les AFs sont normalement plus riches en oxygène, et moins riches en carbone que les AHs. Les AFs contiennent également de nombreux groupes fonctionnels qui sont prêts à réagir, entre autres des groupes carboxyliques, hydroxyliques, carbonyliques, phénols, quinones et semiquinones. En général, le poids moléculaire des AFs doit être plus petit que celui des AHs [11, 34, 35, 36].

### 1. 3. 3 Acides humiques : Caractéristiques structurales et chimiques

Les acides humiques sont structurellement de larges complexes macromoléculaires ayant une apparence brune-noire en solution de pH supérieur à 2, ils sont généralement hétérogènes et sont principalement constitués de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote et occasionnellement de soufre et de phosphore.

Malgré plusieurs décennies de recherche, la structure des acides humiques reste jusqu'à présent mal définie. Les connaissances actuelles se limitent à des études comportementales, à des hypothèses de structure de ces macromolécules (modélisation, mise en évidence de fragments) mais la biochimie de formation de ces composés reste l'un des aspects les moins connus [22, 33, 36].

Le concept général des acides humiques est que ce sont des macromolécules complexes dans les quelles sont liés des acides aminés, des aminoglycoses, des peptides, des cycles aromatiques et des composés aliphatiques. Les ponts entre les différentes entités sont des groupes OH phénoliques libres ou fixés, des structures quinoniques, des atomes d'azote et d'oxygène, et des groupes carboxyliques liés à des anneaux aromatiques [22, 33, 36].

Cependant, malgré cette difficulté de définir une structure spécifique de l'acide humique, il est indispensable de reconnaître les principales classes des groupements fonctionnels présentes dans l'acide humique responsables de sa réactivité. Ce sont essentiellement des groupements carboxyliques (COOH), phénoliques et alcooliques (OH), groupements carbonyles des quinones et des cétones et des groupements amines.

SPOSITO [11] souligne que quatre propriétés dominent le comportement d'acides humiques :

- Polyfonctionnalité : l'existence d'une variété de groupements fonctionnels et leur large réactivité typique aux mélanges de polymères hétérogènes;

- Charge macromoléculaire : le développement d'une charge négative sur le squelette macromoléculaire qu'affecte la réactivité des groupements fonctionnels et la conformation de la macromolécule;
- Hydrophilicité : la tendance à former des fortes liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau solvatant les groupes polaires comme COOH et OH, etc;
- Labilité structurale : la capacité à former des associations intermoléculaires et à changer de conformation moléculaire en réponse aux changements des conditions de pH, d'oxydoréduction, de concentration d'électrolyte et de complexation de ses groupes fonctionnels.

Les résultats de ces recherches ont montré l'existence de deux groupes d'acides humiques à propriétés entièrement différentes :

1. Les AHs « jeunes », encore peu polymérisés, donc encore proches des AFs qui sont peu résistants à la biodégradation microbienne (AHs « bruns »). Ces AHs jeunes peuvent provenir de deux sources :
  - Dans les milieux biologiquement actifs, ils résultent de la polymérisation rapide de composés hydrosolubles par oxydation enzymatique [37].
  - Dans les milieux acides et peu actifs, ils proviennent d'une fragmentation progressive des molécules de lignine [33, 37].
2. Les AHs « évolués », à grosse molécule, à des noyaux phénoliques très important par rapport aux chaînes aliphatiques (AHs « gris »). Leur liaison avec les argiles est très intime et ils sont résistants à la biodégradation microbienne : ceci explique « l'âge moyen » (mesuré au  $^{14}\text{C}$ ) [33, 38].

#### 1. 4 Modèles structuraux des substances humiques

Dans les années 1970, les idées sur la chimie de l'humus tendent à considérer les diverses fractions qui le constituent comme bâties sur le même

modèle, les différences portant sur la taille des molécules et l'abondance relative des différents groupements fonctionnels. La « molécule » de composé humique comprendrait un « nucleus » formé d'éléments de nature plutôt aromatique et des chaînes latérales aliphatiques. Les groupements fonctionnels qui confèrent aux substances humiques l'essentiel de leurs propriétés sont les fonctions carboxyliques et phénoliques et, dans une moindre mesure, les groupements aminés [39].

Dans ces travaux, quelques modèles structuraux, parmi les plus couramment cités, y sont présentés. D'après le modèle de SCHNITZER et KHAN (Figure 1. 2) [40], le motif structural de base serait constitué d'un monomère aromatique sur le noyau du quel peuvent être substitués différents radicaux [40].

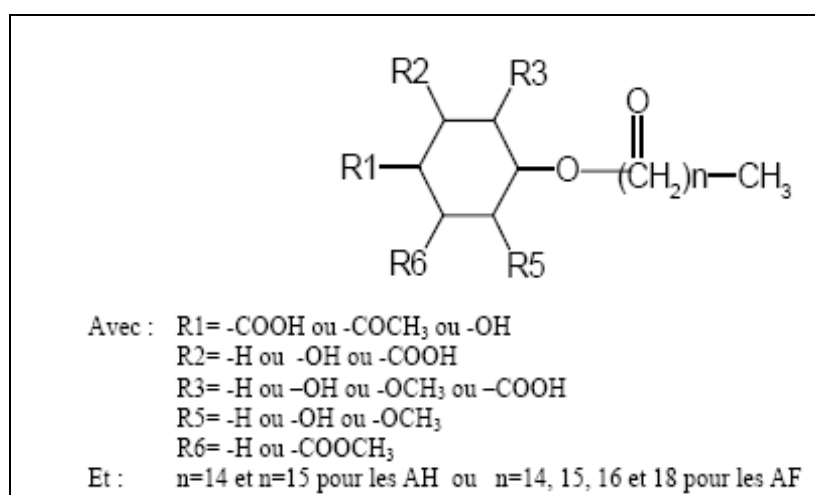


Figure 1. 2 : Monomère constitutif des substances humiques [40].

La structure tridimensionnelle (3 D) des SHs serait le résultat de polymérisations et d'assemblages aléatoires complexes de ces unités structurales, consolidé par des liaisons hydrogènes, de forces de Van der Waal, et des interactions entre les électrons  $\pi$  de noyaux aromatiques voisins. Ce modèle privilégie les réactions d'estérification entre des acides gras et les groupements OH phénoliques. Sur ces constatations a été basée l'hypothèse *des briques constitutives*. Les cycles aromatiques seraient moins

abondants que les acides gras dans les AFs, à l'inverse, ils seraient plus nombreux dans les AHs [39, 41].

Parmi ces modèles, celui de STEVENSON (Figure 1. 3), représente les AHs comme des macromolécules aromatiques complexes. Les groupes aromatiques sont substitués par des composés aliphatiques et la liaison avec de peptides et de sucres aminés explique la présence d'azote dans ces structures [7].

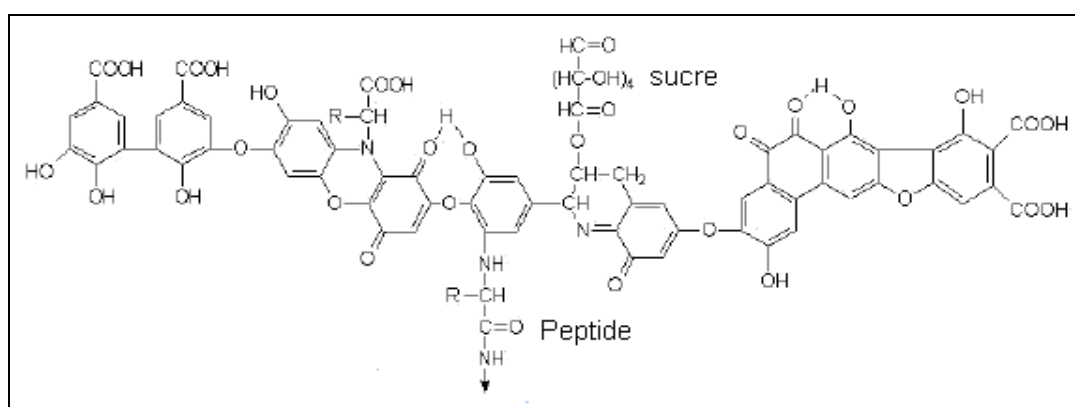


Figure 1.3 : Modèle structural des acides humiques (selon STEVENSON) [7].

Le modèle de BUFFLE (Figure 1. 4), représentant les AFs, contient des structures aromatiques et aliphatiques fortement substituées par des groupes fonctionnels [42].

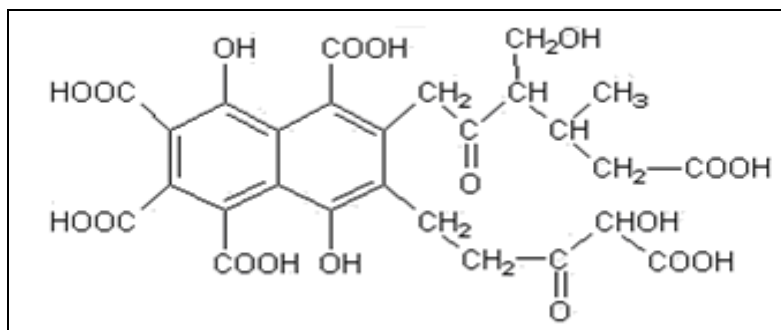


Figure 1. 4 : Modèle structural des acides fulviques (selon BUFFLE) [42].

Le modèle de structure des composés humiques proposé par BUFFLE différencie la structure des acides humiques et celle des AFs. Cette représentation propose une structure globale avec un noyau central aromatique et sur lequel sont fixées des chaînes latérales aliphatiques ramifiées. Les principales variations résident plus dans le ratio (ou proportion) des carbones aromatiques et aliphatiques et le nombre de fonctions acides que dans la nature des constituants. Il y a plus de noyaux aromatiques dans les structures humiques alors que les molécules d'AF se distinguent par une acidité carboxylique plus importante [39].

#### 1. 4. 1 Morphologie moléculaire des SHs

Depuis plusieurs dizaines d'années, de nombreuses recherches ont été entreprises, par des méthodes très diverses, pour déterminer la structure des SHs [7, 43, 44, 45, 46]. Pourtant, malgré la modernisation des techniques d'investigation, leur structure chimique n'est toujours pas complètement éclaircie [45, 47, 48, 49].

Les modèles proposés tiennent compte de la nature hétéropolycondensée, aromatique et phénolique des molécules, de la présence d'acides hydroxybenzoïques liés par des liaisons hydrogènes impliquant des groupes, -O-, -NH<sub>2</sub>-, -N= et -S-, et de la présence de groupements carboxyliques, de dérivés aminés et peptidiques. La plupart de ces modèles diffèrent par la distribution des groupements fonctionnels et leur arrangement mais peuvent rendre compte de quelques propriétés observées.

De tels modèles ne représentent pas des structures réelles mais ils reflètent surtout la diversité de conceptions de leur auteur et il n'existe pas d'arguments permettant de dire que ces modèles représentent correctement les SHs [50, 51, 52].

Les modèles de structures de composés humiques proposés précédemment ont conduit SENESI à voir une structure fractale. Pour cet auteur, la représentation fractale, contenant un large degré d'autosimilarité, est également possible [39, 53].

Les SHs représentent une classe typique des composés qui peuvent être favorables à une description fractale en raison de leur hétérogénéité physique et chimique et de leur complexité moléculaire bien connue [54]. Comme précédemment, la structure des SHs se présente sous la forme d'un agrégat moléculaire complexe et ramifié.

#### 1. 4. 2 Structure des SHs et leur conformation tridimensionnelle

Il est supposé que les SHs peuvent se trouver sous différentes conformations selon les conditions du milieu en fonction de la force ionique et du pH. En effet, de nombreux travaux montrent que la force ionique et le pH du milieu provoquent des effets comparables. En augmentant la salinité de la solution de 0,001 à 0,1 mole/L, les molécules se regroupent pour former des agrégats [39]. En solution concentrée, les SHs adoptent une structure condensée qui limite le nombre de groupements acides libres pour la complexation. Cette conformation se ramifie lorsque la concentration en SHs diminue [39, 22]. Le pH des solutions influe également sur le pouvoir complexant des SHs. A pH acide, les SHs présentent une structure repliée qui va se dérouler en cas d'alcalinisation du milieu [39]. Donc, suivant le pH et la teneur en sels, le volume des molécules varie bien que le poids moléculaire soit constant.

#### 1. 4. 3 De la structure moléculaire à la structure supramoléculaire

Dans le modèle polymérique, les réarrangements structuraux se produisent comme dans les autres macromolécules biologiques telles que les protéines, polysaccharides, acides nucléiques, ou la lignine [39]. Dans ce cas, les agrégats humiques sont retenus entre eux par des liaisons faibles comme les ponts hydrogènes et les interactions hydrophobes. En prenant en considération un concept micellaire [39], suggère que l'intérieur des micelles humiques serait constitué par une zone hydrophobe, les composés très chargés ou polaires se trouvant à la surface extérieure.

Parallèlement, SCHULTEN et LEINWEBER (Figure 1. 5) [55] et SCHULTEN et SCHNITZER (Figure 1. 6) [56] proposent l'existence d'une structure tridimensionnelle des AHs comportant des vides, qui peuvent être d'excellents sites d'adsorption de composés hydrophobes tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) [39]. ENGEBRETSON et WANDRUSKA [57], utilisant un pyrène marqué par fluorescence, ont apporté expérimentalement des preuves en faveur de ce modèle micellaire [22, 39].

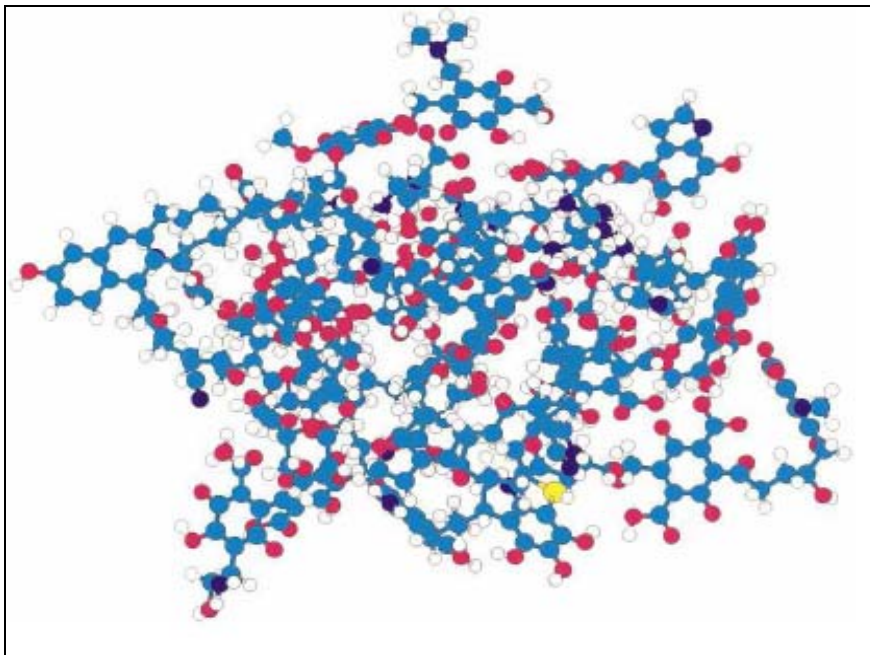


Figure 1. 5 : Modèle d'acides humiques d'après SCHULTEN et LEINWEBER [55].  
Les éléments colorés sont : H (blanc), C (cyan), O (rouge), N (bleu) et S (jaune).



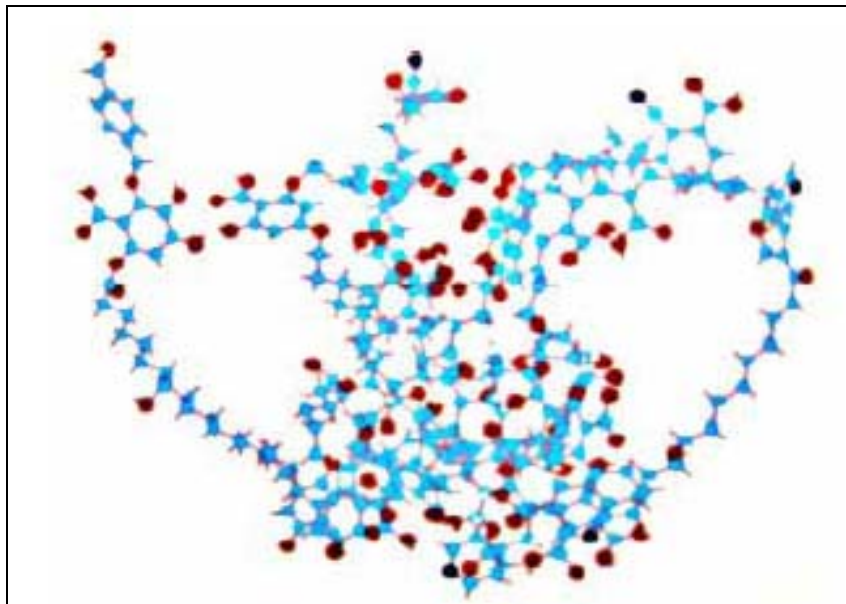


Figure 1.6: Modèles d'acides humiques selon SCHULTEN et SCHNITZER [56].

Ce modèle de structures en trois dimensions de l'AH proposé par SCHULTEN et SCHNITZER [56] est basé sur un réseau formé de noyaux aromatiques (benzène, phénols, méthoxyphénols, furans, pyrroles et pyridine) et des chaînes aliphatiques comportant ainsi de nombreuses fonctions acides, alcools, esters [58].

PICCOLO [59], KENWORTHY et HAYES [60] montrent quant à eux que l'assemblage macromoléculaire des SHs n'est pas entièrement dépendant des structures polymériques. Une taille moléculaire élevée est considérée comme issue de l'association de molécules plus petites interliées par des forces faibles ou facilement annihilables. Cette conception plus globale des SHs a récemment été exposée et discutée par PICCOLO [59]. Il estime que la structure des SHs n'est pas, comme précédemment, macropolymérique mais supramoléculaire [39].

Les SHs seraient des associations de polymères polydispersés, c'est-à-dire, de tailles variées, formés par l'association de molécules relativement petites faisant intervenir des liaisons  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$  et des liaisons hydrogène. Selon cette conception, les AFs seraient des associations de molécules

hydrophiles et riches en groupes carboxyliques. En revanche, les AHs seraient essentiellement constitués de composés hydrophobes possédant de chaînes aliphatiques. Les forces dispersives hydrophobes assureraient leur dispersion en milieux neutres et la formation de liaisons hydrogène conduirait à leur floculation en milieux acides [4, 39, 50]. Selon la théorie des supramolécules, à pH neutre, des petites molécules hétérogènes (<1000 Dalton) s'assemblent par des interactions faibles (forces de Van der Waals, liaisons  $\pi$ - $\pi$ , liaisons CH- $\pi$ ) en de larges conformations de haut poids moléculaire apparent. Ces superstructures pouvant facilement se désintégrer en plus petites associations sous l'action d'acides organiques. Cette théorie repose aussi sur le principe que les supramolécules peuvent s'associer en véritables structures polymériques par des liaisons covalentes lors de réactions d'oxydation enzymatiques pour donner des SHs [4, 39, 59].

L'observation microscopique des SHs semble confirmer cette hypothèse. La structure des AHs se présente sous forme d'un agrégat de corpuscules globulaires complets et ramifiés [4, 61]. Cette approche innovatrice de la chimie « humique » a été employée pour essayer de comprendre les mécanismes de stabilisation du carbone organique dans les sols par protection hydrophobe et par polymérisation in situ [4, 59].

En résumé, il est actuellement généralement admis que les SHs ont des structures analogues et sont formées de noyaux aromatiques, essentiellement des acides carboxyliques et des acides phénoliques, liés par des chaînes aliphatiques et des groupements acides et alcools. Le degré de polymérisation varie au sein des composés humiques, mais PICCOLO [59] rapporte que les nombreuses tentatives de mesure du poids moléculaire des SHs ont abouti à des résultats présentant de très grandes différences. Il est tout de même accepté que le poids moléculaire soit plus élevé dans l'humine que dans les AHs (10000 et 100000 Dalton) et les AFs (1000 à 30000 Dalton). Il est aussi couramment admis que les AFs possèdent d'avantage de groupements carboxyliques et phénoliques [56].

Parmi les modèles proposés, celui de SCHULTEN et LEINWEBER [62] est généralement préféré (Figure 1. 5). Dans ce modèle, les AHs possèdent

des « vides » pouvant piéger ou lier d'autres composants organiques tels que des glucides, des protéines, des lipides ou des éléments inorganiques.

La représentation d'ANDREUX et MNIER-LAMY [63] permet de comparer la structure des AHs et AFs. Elle propose une structure globale des SHs avec un noyau central aromatique sur lequel sont fixées des chaînes latérales aliphatiques ramifiées (Figure 1. 7).

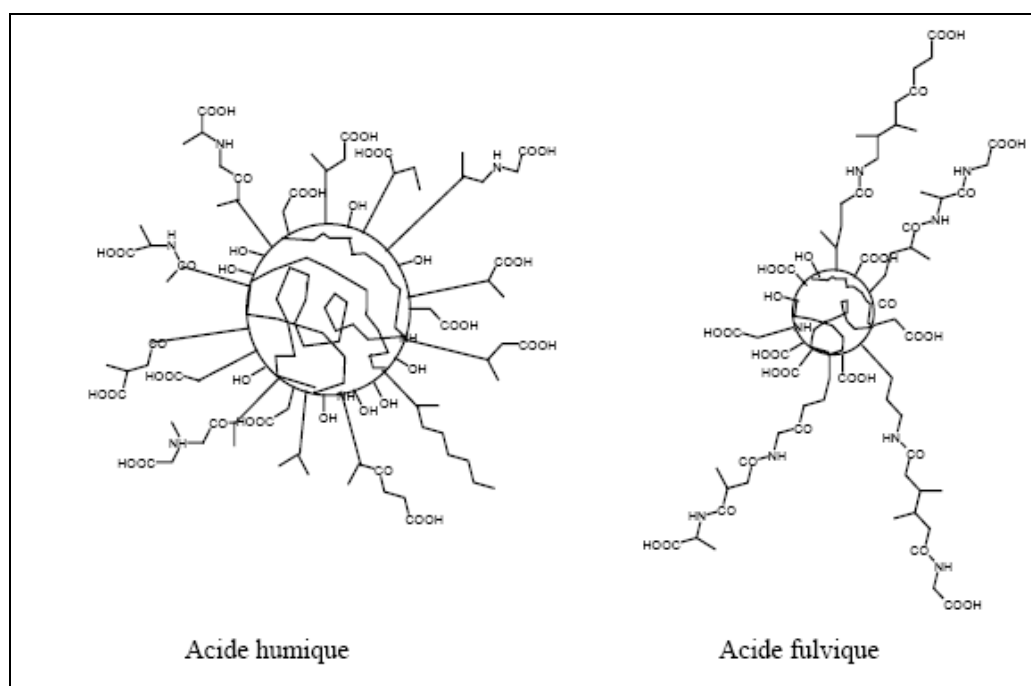


Figure 1. 7 : Modèle structurel des composés humiques selon ANDREUX et al [63].

### 1. 5 Extraction et purification des substances humiques

La caractérisation des matières humiques du sol n'a pas encore été parfaitement résolue, du moins d'une façon simple, par des méthodes facilement adaptables à l'analyse en série.

Cependant, de nombreuses tentatives ont été faites dans ce but, et les dernières en date s'inspirent toutes plus ou moins de la méthode de KONONOVA, utilisant le pyrophosphate de sodium ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ) comme solvants [64]. Il y a deux possibilités : d'une part, extraire globalement les composés humiques solubles et étudier leur composition et leurs propriétés par différentes techniques. Ou bien, réaliser un premier

fractionnement dès la phase d'extraction et étudier les propriétés et la composition des fractions extraites.

Il est certain que ces techniques chimiques ne permettent pas de résoudre tous les problèmes concernant la matière organique, en particulier, l'aspect biologique de dégradation et de synthèse à partir des résidus végétaux, demeure primordial mais fait appel à des techniques qui sont d'avantages du domaine de la microbiologie des sols.

Le pédologue cherche davantage à dresser un bilan des produits résultants de cette activité, et à étudier leur action sur l'évolution du profil de sol ou sur les facteurs de fertilité. Cet essai de fractionnement pourrait être comparé (avec beaucoup de réserves) à celui qui a été fait dans un autre domaine pour les particules minérales, et qui malgré l'aspect également conventionnel, a permis d'aboutir à la séparation des fractions argileuses, facilitant ainsi leur étude, mais à la comparaison s'arrête là, car une des caractéristiques des fractions organiques, est l'évolution saisonnière qui s'ajoute encore à la difficulté de cette étude.

Cependant, il est apparu qu'une standardisation de la technique d'extraction des matières humiques était nécessaire pour aboutir à des résultats comparatifs sur les divers milieux étudiés.

#### 1. 5. 1 Aperçu sur les méthodes d'extraction d'acides humiques

Les propriétés de la matière organique du sol et plus particulièrement des SHs, ne peuvent être bien étudiées qu'à l'état libre, donc débarrassées de ses composants inorganiques (sable, argile et autres constituants inorganiques). De ce fait, l'isolation de la matière humique de sa matrice inorganique constitue une première étape dans l'étude de ses propriétés acide-base et de complexation [22, 64].

L'extraction des matières humiques des sols a fait l'objet de nombreuses recherches. On ne passera pas ici en revue les différentes techniques qui ont été proposées, car d'autres auteurs et en particulier WIESEMULLE, cité par FLAIG [65] et STEVENSON [27], ont fait des

comparaisons concernant les extractions d'acides humiques et fulviques par différents solvants. Ces solvants sont principalement : la soude 1%, employée soit à chaud, soit à froid et précédée d'un traitement à l'acide chlorhydrique de concentration 2 à 5% soit à chaud, soit à froid, un autre réactif est le pyrophosphate de sodium 0,1M employé seul à chaud ou à froid, enfin, les solvants pyrophosphate et soude peuvent être utilisés en mélange.

Les résultats des extractions et des fractionnements varient selon la nature des solvants et le procédé d'extraction. En particulier, l'utilisation des liqueurs acides et alcalines à forte concentration et à chaud, provoque une dégradation importante des substances humiques. Cette dégradation se manifeste par une diminution importante du résidu non extractible ou humine et par une augmentation d'une fraction d'acides fulviques. Les différentes méthodes à froid présentent davantage d'analogie entre elles dans les résultats obtenus : en particulier le résidu non extractible est plus élevé et plus constant.

FLAIG préconise l'emploi de la méthode de KONONOVA et BELCHIKOVA [64] qui utilise un mélange  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (0,1M) + NaOH (0,1M) avec un rapport sol/liquide de 5/100. D'autres auteurs notamment THOMANN [64], ont utilisé le pyrophosphate de sodium seul. Quant à DUCHAUFOR et JACQUIN [22], ils ont présenté une méthode basée sur plusieurs extractions successives : d'abord une élimination des matières végétales légères par des liqueurs organiques lourdes (mélange alcool bromoforme), puis extraction des produits humiques solubles par des solutions à pH croissant, employées successivement sur le même échantillon :

- Pyrophosphate tamponné à pH 7 par  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
- Pyrophosphate 0,1M à pH 9,8;
- Soude 0,1M à pH 12;

Cette méthode permet une extraction assez complète et reproductible de la matière humique du sol mais elle est un peu longue, et le bromoforme est un produit assez toxique.

La méthode idéale d'extraction de la matière humique est celle qui remplit les conditions suivantes :

- la méthode doit donner un matériel humique non altéré;
- la matière humique obtenue ne doit pas contenir des impuretés inorganiques comme les cations polyvalents;
- la méthode doit être universelle c'est-à-dire applicable à tous les types d'échantillons de sol.

Suite à un grand nombre de techniques d'extraction, la Société Internationale des Substances Humiques (IHSS) a proposé un protocole qui s'avère être un des plus efficace. Ce protocole a été mis en place afin d'uniformiser et d'apporter une base commune aux chercheurs amenés à travailler dans ce domaine. Le protocole détaillé de IHSS sera présenté dans le chapitre matériel et méthodes.

La plupart des laboratoires utilisent, depuis longtemps, les solutions alcalines (pyrophosphates de sodium, 0,1M) pour l'extraction des composés humiques, on obtient ainsi une solution foncée, qui après acidification, donne un précipité floconneux brun (acides humiques), alors que les AFs restent insolubles. Les AHs peuvent être eux-mêmes subdivisés en fractions, plus ou moins "condensées": acides humatomélaniques, AHs brunes, peu condensés et très stables [22, 66].

## **CHAPITRE 2**

### **HUMIFICATION, BIODEGRADATION ET RÔLE DES SUBSTANCES HUMIQUES**

#### 2.1 Introduction

La matière organique s'incorpore lentement dans les sols par le processus d'humification qui conduit à la formation d'une MO stable appelée "humus" [67].

Les matières humiques proviennent de la décomposition et de la réorganisation des matières organiques contenues dans les sols [1]. Les agents microbiens présents dans le sol jouent un rôle important dans la dégradation des matières organiques [1, 39]. La matière organique fraîche (MOF) constitue la matière première de l'humus. Elle est formée de déchets végétaux et animaux présents dans les sols. Ces biomolécules de types polyphénols, carbohydrates, protéines et lipides se décomposent tout d'abord sous l'action de microorganismes puis se condensent sous la forme de macromolécules qui constituent l'humus.

#### 2. 2 Humification

Les SHs sont le résultat de l'humification qu'est simplifiée par le schéma représenté dans la figure (2. 1). Celle-ci résulte soit de la néoformation de composés humiques à partir des composés organiques du sol, soit de l'héritage et de la transformation des biomolécules du sol.

Pour les pédologues, l'humification c'est la transformation de l'humus libre en humus lié. Pour les biochimistes, c'est un phénomène de polycondensation oxydative conduisant à des substances brunes, présentes aussi bien dans l'humus libre que dans l'humus lié [30, 68, 69].

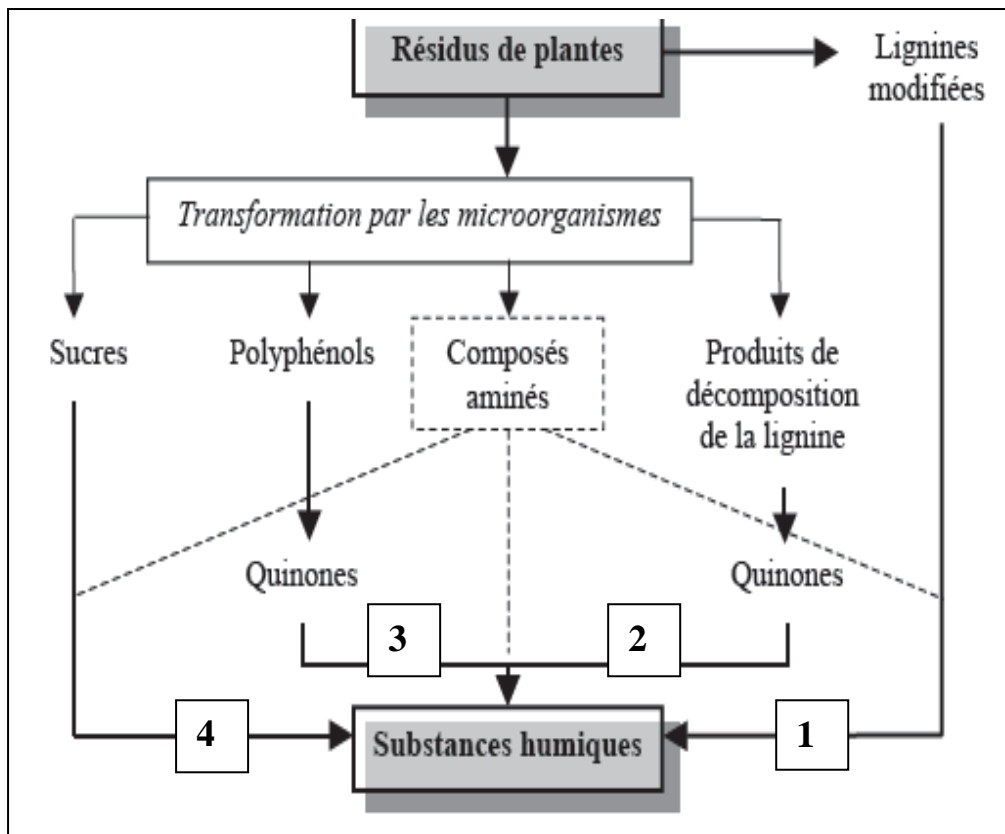


Figure 2. 1 : Schéma simplifiant les voies de formation des substances humiques [7].

Trois théories ont été lancées pour expliquer la formation des substances humiques :

#### a) Théorie de la lignine (voie 1)

Pendant plusieurs années, la formation des SHs a été attribuée principalement à une modification de lignine. La lignine est un biopolymère difficilement biodégradable constitué d'un assemblage de trois types d'unités phénylpropanoïdes reliés entre elles par différents types de liaisons C, et éther oxydes (Figure 2. 2 : a et b).

Selon cette théorie, la lignine est incomplètement utilisée par les microorganismes et son résidu devient la partie constituante de l'humus du sol [70]. La modification de la lignine consiste en la perte des groupements méthoxyles ( $\text{OCH}_3$ ), en la production d'ortho-hydroxyphénols et en l'oxydation des chaînes aliphatiques périphériques pour former les groupements



carboxyliques libres (COOH) [71]. Ce matériel modifié, est soumis à d'autres changements inconnus pour former d'abord les AHs et ensuite les AFs.

Cette voie constitue la théorie lignoprotéique de WAKSMAN [72] justifiée par des similitudes entre la lignine et les AHs telles qu'une biodégradabilité faible par la majorité des champignons et des bactéries, la solubilité dans les alcalins et différents solvants, la présence de groupements méthoxyles [39, 73].

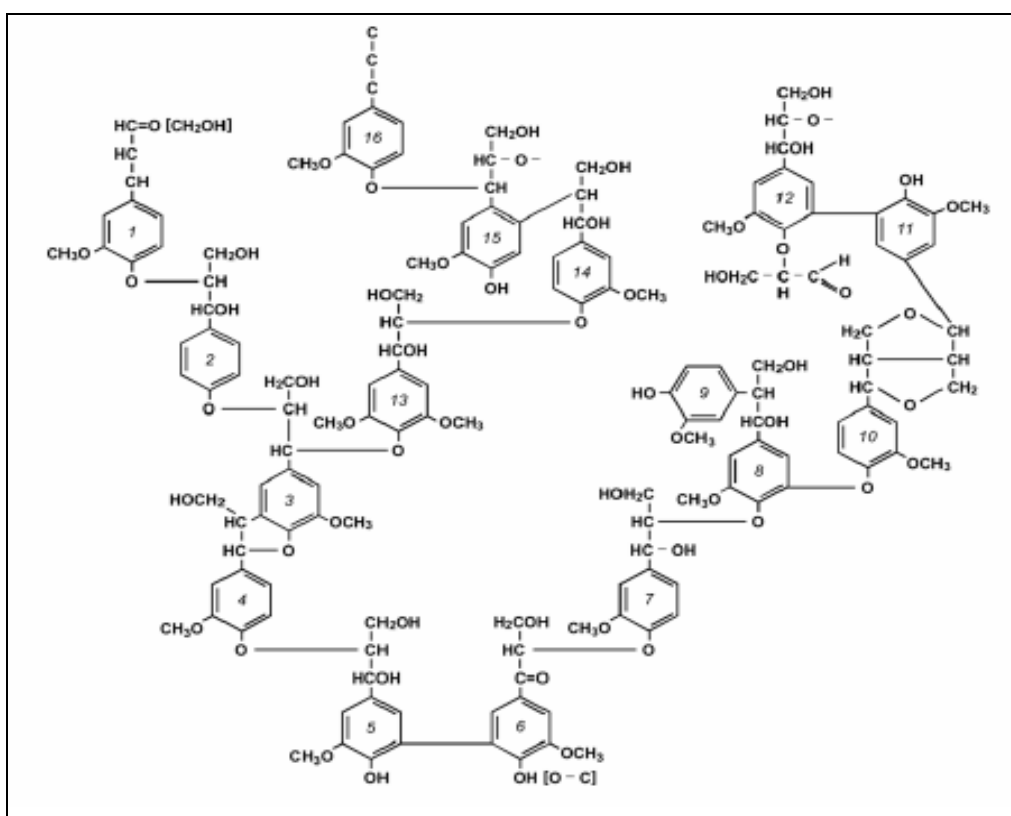
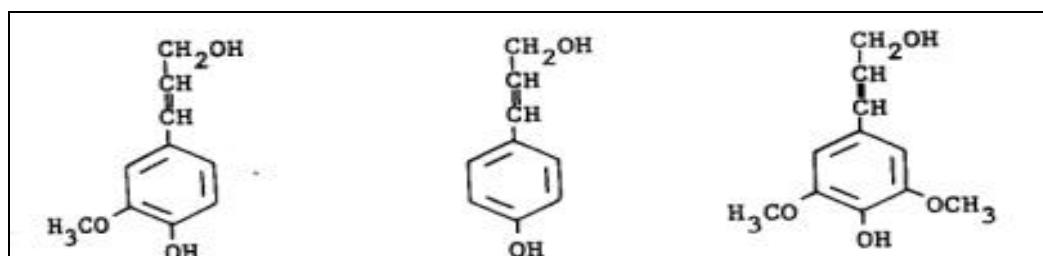


Figure 2. 2. a : Structure moléculaire de la lignine [75].



Alcool coniférylique

Alcool-hydroxycinnamyl

Alcool sinapylique

Figure 2. 2. b : Trois unités phénylpropanoïdes de la lignine.

### b) Théorie des polyphénols (voies 2 et 3)

Dans la voie 3, les acides et les aldéhydes phénoliques issus de la lignine pendant l'attaque microbienne sont convertis en quinones par des enzymes spécifiques [39, 74]. Ceux-ci sont ensuite autopolymérisés ou recombinaés avec des composés azotés pour former des macromolécules humiques [41, 75, 76].

La voie 2 est semblable à la voie 3, sauf que dans ce dernier, les polyphénols sont synthétisés par les microorganismes à partir des composés organiques non ligneux principalement cellulosiques (Schéma de la figure 2.3). Dans le concept de FLAIG [76], c'est la synthèse des quinones quelque soit leur voie, dégradation de la lignine ou synthèse de polyphénols à partir des composés non ligneux, qu'est l'étape primordiale dans la formation des SHs. La lignine libérée de son lien avec la cellulose pendant la décomposition des résidus végétaux est soumise à une oxydation intramoléculaire conduisant à une formation d'unités primaires structurelles (dérivés du phénylpropane). Les chaînes latérales des unités de la lignine sont oxydées, une démethylation se produit et les polyphénols résultants sont convertis en quinones par des polyphénoloxydases. On retrouve le rôle des microorganismes comme source de polyphénols déjà mentionné par KONONOVA [1] qui a présenté le rôle des myxobacteries dans la synthèse des AHs en décomposant préférentiellement la cellulose avant la lignine [7, 39].

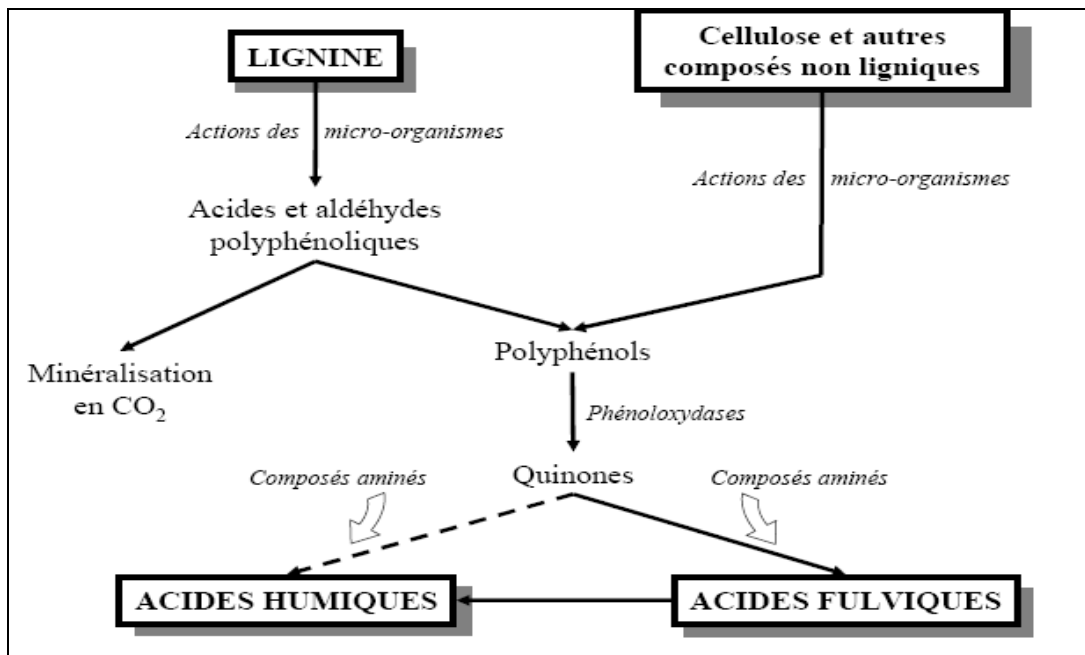


Figure 2. 3 : Schéma simplifiant la théorie de polyphénols de formation des substances humiques [7].

#### c) Théorie de la condensation amino-saccharidique (voie 4)

Selon ce concept, les sucres réduits et les amines, sous-produits du métabolisme microbien, subissent une polymérisation non enzymatique pour former les polymères bruns et azotés [39, 75, 76, 77]. La réaction initiale de la condensation sucre/amine implique l'addition de l'amine au groupement aldéhydique du sucre pour former une glycosylamine N-substituée. Cette glycosylamine se fragmente en N-1-amino-deoxy-2-cetose conduisant à la formation d'aldéhydes et de cétones à trois carbones, comme l'acétol, le diacétyl etc., ou par déshydratation, conduit à la formation des réductones et d'hydroxyméthyl furfurals. Tous ces composés sont fortement réactifs et polymérisent spontanément en présence de composés aminés pour former des produits de couleur brune ou « réaction de MAILLARD » (Figure 2. 4) [39].

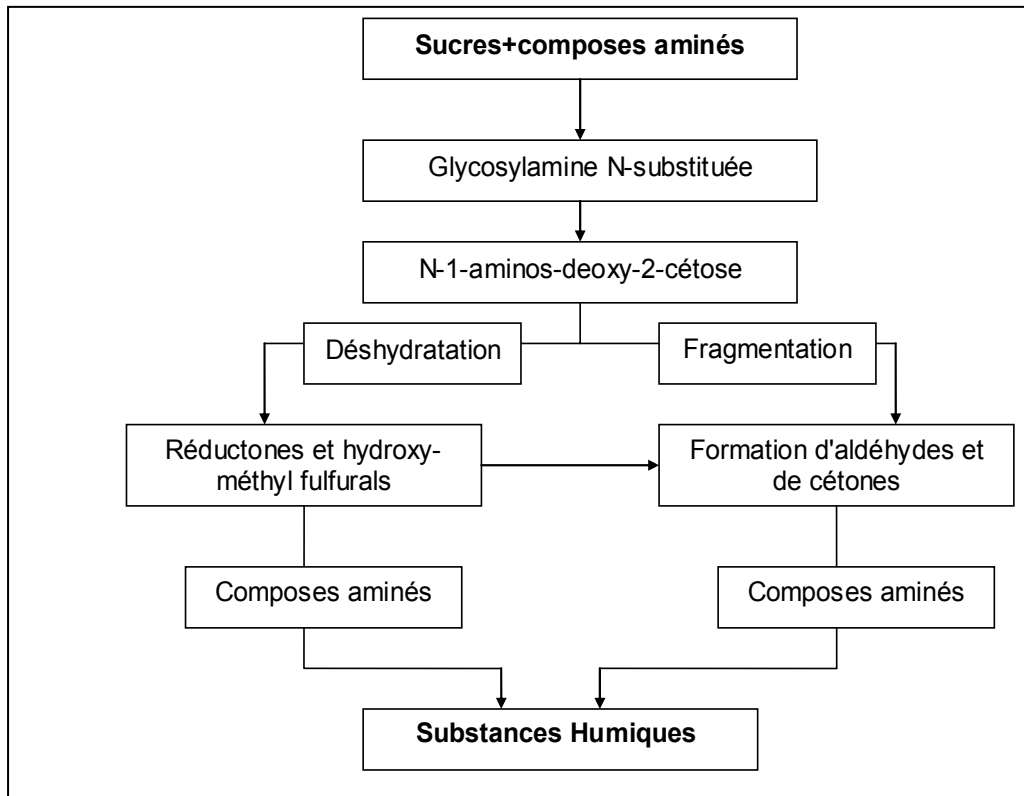


Figure 2. 4 : Schéma simplifiant la voie de condensation de sucres et acides aminés [7].

### 2. 2. 3 Agents de l'humification

La biomasse joue un rôle essentiel dans l'humification à la fois direct (par transformation de la biomasse morte) et indirect (par l'action enzymatique qu'elle exerce au cours des différentes étapes de l'humification).

La biomasse microbienne représente en moyenne 2 à 5% de la matière organique total du sol. Elle augmente considérablement, mais de façon éphémère, après l'introduction de la MOF très fermentescible et riche en azote. Les microorganismes agissent sur les constituants de la MOF par la sécrétion de diverses enzymes, on peut les classer en trois groupes [5, 64] :

- Enzymes de dépolymérisation, qui simplifient les molécules en libérant les "Précurseurs";
- Enzymes de minéralisation, libérant l'azote et le phosphore sous ses formes minérales;

- Enzymes de l'humification agissant par oxydation des composés phénoliques (Polyphénolsoxydases);

### 2. 2. 3. 1 Activité bactérienne

Les bactéries prolifèrent dans les milieux les plus riches en composés azotés et légèrement acides, elles sont surtout abondant autour des racines de certaines plantes (graminées, légumineuses), au sein de la rhizosphère.

La plupart d'entre elles sont hétérotrophes et saprophytes, elles décomposent les celluloses, les sucres, qui constituent des sources d'énergie, et sont pour la plus grande part minéralisés sous forme de CO<sub>2</sub>. Les bactéries protéolytiques hydrolysent les protéines des protoplastes et libèrent des acides amines, qui subissent à leur tour l'ammonification.

Les bactéries représentent la plus grande partie de la microflore tellurique. Elles peuvent être hétérotrophes, autotrophes, aérobies stricts ou facultatifs, anaérobies stricts, mésophiles, thermophiles ou psychrophiles.

Parmi les microorganismes qui dominent dans le sol, on signalera plus particulièrement les *Pseudomonas*, les *Bacillus* et les *Arthrobacter*. Les *Clostridium*, *Micrococcus* et *Xanthomonas* sont aussi bien représentés.

Les microorganismes impliqués dans la fixation d'azote (*Azotobacter*, *Rhizobium*...) et surtout ceux qui interviennent dans la nitrification (*Nitrobacter*, *Nitrosomonas*...) représentent, dans beaucoup de cas, une faible fraction. Cependant, elles jouent un rôle important. Les bactéries contribuent énormément à la fertilisation du sol grâce à leur pouvoir de décomposer et de minéraliser la matière organique en composés assimilables [66, 83].

Certaines bactéries, plus spécialisées, jouent un rôle particulier : les photolithotrophes autotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de certains composés minéraux (S, NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, Fe<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>) et assimilent le carbone du CO<sub>2</sub> atmosphérique ou dissout dans l'eau. Les bactéries nitrifiantes, pour la plupart, et les bactéries qu'oxydent le fer et le soufre appartiennent à cette catégorie. Les bactéries du sol seront classées ici, en relation avec leur

fonction dans le sol en groupes physiologiques : La plupart jouent en effet, un rôle important dans le cycle des éléments fondamentaux du sol, azote, soufre, fer, manganèse, en particulier en intervenant dans les processus d'oxydoréduction [65, 79]. Les principaux phénomènes de la biodégradation bactérienne sont les suivants :

- Cycle de l'azote : Groupe des fixateurs d'azote (aérobies et anaérobies), groupe des ammonificateurs, groupe des nitrificateurs, groupe des dénitrificateurs et groupe des protéolytiques;
- Cycle du carbone : Groupe des amylolytiques, groupe des pectinolytiques, groupe des chitinolytiques, groupe des hémicellulolytiques et groupe des cellulolytiques;
- Cycle du soufre : Sulfato-réducteurs ( $\text{SO}_4^{-2} \rightarrow \text{S}^{-2}$ ), Sulfo-oxydants ( $\text{S}^{-2} \rightarrow \text{SO}_4^{-2}$ ) et le groupe des minéralisateurs du soufre organique;
- Cycle de fer : Réduction fer ferrique en ferreux ( $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ ) et oxydation de fer ferreux en ferrique ( $\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$ ) [66, 82].

### 2. 2. 3. 2 Activités des microorganismes mycéliens

Ces microorganismes se caractérisent par une organisation filamenteuse par la formation des mycéliums. Deux groupes jouent un rôle important dans la décomposition des litières d'une part, et dans **l'humification** d'autre part.

Les actinomycètes constituent les microorganismes intermédiaires entre bactéries et champignons, elles sont connues par la formation des filaments mycéliens très ramifiés et non cloisonnés. Ils semblent jouer un grand rôle dans la transformation de certains composés organiques et minéraux du sol, mais ce rôle est encore mal connu : ils seraient susceptibles de décomposer les composés aromatiques de la MOF (lignine, certains tannins), et d'élaborer certains acides humiques en favorisant les liaisons des chaînes peptidiques avec les noyaux aromatiques, en particulier quinoniques (Humification biologique) (figure 2. 1).

Les actinomycètes ont aussi d'autres fonctions: la sécrétion d'antibiotiques, notamment, est très utilisée en pharmacologie. Certaines espèces, en particulier, du genre *Frankia*, forment des nodosités avec les racines des aunes et des casuarinales : elle sont à l'origine d'une fixation active d'azote atmosphérique qui explique le rôle améliorant de ces espèces et leur fréquente utilisation pour les reboisements de sols minéraux dépourvus d'humus ) [64, 81].

Les champignons de toute dimension, ils sont caractérisés par un mycélium pluricellulaire. Ils résistent mieux que les bactéries à la sécheresse et à l'acidité, et constituent la microflore quasi exclusive de certains mors secs et acides. Mais, à la différence des bactéries, ils sont toujours hétérotrophes et aérobie, et ne prolifèrent pas dans les milieux mal aérés. Ils sont très variés et appartiennent à divers groupes : imparfaits, ascomycètes, et basidiomycètes.

Leur rôle dans le sol est considérable et très varié: il s'exerce surtout dans la phase de "décomposition" de la matière organique fraîche, qui précède l'humification: La plupart sont aptes à décomposer les celluloses, certains sont susceptibles d'hydrolyser les composés de nature phénolique, plus résistants : lignine, tannins. Les pourritures brunes ou molles (actives en milieu neutre) décomposent les celluloses préférentiellement aux composés phénoliques, la lignine libérée est peu transformée. Les pourritures blanches des milieux acides, au contraire, s'attaquent aussi à la lignine et aux composés tanniques, libérant des composés phénoliques, à petite molécule, donc solubles (ils font partie des "précurseurs" des composés humiques) [66, 81].

### 2. 2. 3. 3 Activité de la faune

La faune du sol joue un grand rôle dans la transformation de la MOF et la modification des structures : Elle agit en relation étroite avec la microflore. Elle est divisée suivant la taille des microorganismes, en micro-, méso- et macrofaune.

On signale ici le rôle de la macrofaune (taille supérieure à 1cm), en particulier les lombrics qui jouent un rôle essentielle dans le processus d'humification, il existe trois formes de lombrics, classée selon leur mode de vie, en relation avec la nature des litières et l'acidité de l'horizon humifère : chacune d'elle exerce une action différente sur l'humification [64, 81].

### 3. 3 Résistances des substances humiques

D'après ce qui précède, on saisit aussitôt le caractère de la distinction entre les substances humiques résistant à la décomposition microbienne : on peut affirmer que certaines fractions humiques, les composés jeunes d'origine essentiellement biologique sont au moins aussi labiles que la matière organique fraîche.

Nous verrons dans le paragraphe suivant, que certains facteurs écologiques (notamment les contrastes saisonniers) peuvent exercer une action *inoersée* sur les composés humiques, accélérant ou ralentissant la biodégradation : on voit à quel point cette distinction est capitale.

Nous classerons, un peu schématiquement, les composés humiques en trois fractions : 1) labile ; 2) stabilité moyenne; 3) très stables [33].

#### 1) Fraction labile

Il s'agit évidemment des formes « jeunes », celles qui résultent d'une polymérisation faible et incomplète de molécules solubles et qu'ont contracté très rapidement des liens chimiques avec les argiles : certains AFs, AHs jeunes, formes de l'humine, résultant de l'évolution de produits solubles, constituées surtout de chaînes de saccharides ou d'uronides. La décomposition de ces fractions est accélérée, nous le verrons, par les alternances saisonnières très contrastées, c'est seulement dans les sols podzoliques à mors que certains de ces composés, qualifiés souvent d'acides fulviques « agressifs » par les auteurs Russes, probablement composés phénoliques [33, 82].



## 2) Fraction de stabilité moyenne

Il s'agit de la fraction de l'humine, provenant d'une oxydation rapide de la lignine, dans les litières dites « améliorantes », c'est-à-dire les plus riches en azote [33, 84].

Ceci montre la relative stabilité de cette forme d'humine qui, bien que jeune, est relativement insensible à l'action des saisons, les valeurs considérables de l'humine, mesurée dans les mull les plus actifs (50 à 60 % du carbone total) attestent la relative stabilité de cette fraction à l'égard de la biodégradation.

## 3) Fraction très stable

Il s'agit des fractions les plus évoluées : AHs gris très polymérisés, abondants dans les sols à climats dont les saisons sont très contrastées, et l'humine résultant de la « surévolution » de ces AHs. Les expériences de NGUYEN et al. [82] ont montré l'opposition entre les deux formes d'AHs :

- Ceux des mull tempérés sont instables et très sensibles aux alternances saisonnières de type « tempéré atlantique », c'est-à-dire sans contrastes de température et d'humidité trop marqués. Par contre, ils sont biodégradés à nouveau en été;
- Ceux des mull tropicaux (vertisols) sont parfaitement stables, et absolument insensibles aux contrastes saisonniers réalisés artificiellement à l'étuve, même s'ils sont très accentués et analogues à ceux d'un climat tropical. Bien mieux il a été possible de transformer par polymérisation provoquée, les AHs du mull tempéré en AHs stables de type tropical [33].

Les recherches que nous avons effectuées ont au contraire, montré qu'il était nécessaire de diviser les composés humiques en deux grands groupes, fondamentalement différents selon la stabilité [33].

- 1- Les composés humiques jeunes, encore faiblement polymérisés: ils comprennent la presque totalité des AFs, une partie des AHs et de l'humine subissent la biodégradation microbienne [33].

- 2- Les composés humiques stables à grosse molécule sont constitués d'AHs gris et d'humine très évolués et liés de façon intime aux argiles (par l'intermédiaire des cations polyvalents) [33].

En ce qui concerne la nutrition azotée et carbonée, il convient de souligner que le rôle des composés humiques est, à ce point de vue, très variable suivant leur résistance à la biodégradation : alors que les composés les plus stables (AHs gris) ne jouent dans ce domaine qu'un rôle négligeable, il n'en est pas de même des AHs labiles, qui se comportent en «intermédiaires » efficaces : l'azote et le carbone lors de la décomposition, se réorganise au sein de ces composés humiques qui permettent son stockage temporaire [33].

#### 2. 4 Biodégradabilité des substances humiques

La matière organique tient un rôle primordial dans l'activité microbiologique d'un milieu. Quelles que soient les origines : indigène, allochtone ou anthropogène, les composés organiques dissous et/ou particulaires servent de source d'énergie aux microorganismes et constituent également la matière première nécessaire à la multiplication des populations microbiennes [1].

Les microorganismes ont besoin de trouver dans leur environnement les éléments constitutifs de leur cellule : C, H, O, N, P, S, .... Ces éléments se trouvent dans la matière organique sous forme de molécules simples ou moins complexes : sucres, amidon, cellulose, protéines,... Les perméases, enzymes contrôlant l'entrée des substances organiques et des ions par transport actif à l'intérieur des cellules, permettent le passage des molécules organiques solubles de faible poids moléculaire (monomères et oligomères <1000 dalton). HISANO et al remarquaient que la matière organique ne peut plus être directement incorporée par les bactéries lorsque le diamètre des molécules est supérieur à 0,1µm. Ainsi, les polymères organiques de haut poids moléculaire doivent préalablement subir une hydrolyse enzymatique.

Celle-ci conduit à des processus de dégradation et dépolymérisation, qui permettent aux molécules formées d'être métabolisés par les

microorganismes. Ces hydrolyses sont possibles grâce à la présence d'exoenzymes extracellulaires [4, 39].

Enfin, une réactivité microbiologique ou « bioréactivité », traduisant les possibilités d'utilisation de la MO par une population microbienne, peut être alors définie par deux principaux termes :

- La biodisponibilité, qu'exprime le potentiel d'interaction entre la MO et les microorganismes. Cette notion considère que l'utilisation de composés organiques ne doit pas nécessairement résulter de leur fragmentation en plus petites entités ou même jusqu'à minéralisation mais intègre aussi la dégradation extracellulaire des composés par les exoenzymes microbiens [81].
- La biodégradabilité, qui représente l'utilisation effective de la matière organique par les microorganismes et traduit l'expression mesurable du potentiel d'interaction. Au sens strict, la biodégradabilité englobe deux processus, d'une part l'utilisation microorganismes directe ou après décomposition de composés pour la biosynthèse de nouveau matériel cellulaire et d'autre part la minéralisation pour obtenir de l'énergie et des nutriments inorganiques [81].

Les SHs ne sont pas biodégradables qu'après une éventuelle mutation et adaptation progressive de certains microorganismes possédant les enzymes capables d'attaquer cette molécule. Le principe de « l'infaillibilité microbienne » cité par ALEXANDER et ROGERS dit que : « *pour toute molécule il existe quelque part un microorganisme capable de le dégrader dans certaines conditions du milieu* » [81, 83].

Pour les SHs, la biodégradation a été démontrée en condition aérobie avec formation de métabolites facilement biodégradables. Il existe actuellement un certain nombre de travaux qui s'intéressent à la prédiction informatisée de la biodégradabilité à partir des réactions connues de biodégradation.

Les différents microorganismes peuvent dégrader les SHs, et cette dégradation est limitée selon l'effet de la nature des SHs et de leurs tailles

moléculaires [84]. La dégradation des AHs a lieu après des réactions chimiques ou enzymatiques. Cette dégradation peut être suivie en utilisant plusieurs méthodes d'analyses par exemple photométrique et  $^{14}\text{C}$  [85]. Actuellement l'application des SHs synthétiques est l'une des meilleures méthodes disponibles pour expliquer la minéralisation de SHs [85].

Certaines bactéries peuvent dégrader ou décolorer les SHs, y compris les actinomycètes tels que les espèces de *Streptomyces*, ou d'autres bactéries à savoir les *Pseudomonas* [83, 86]. La dégradation est réalisée par des enzymes extracellulaires, où par la fixation des substances humiques sur les surfaces des bactéries afin d'avoir la dégradation [87].

Dans la plupart des cas, la biodégradation est assurée par une l'attaque enzymatique des carbohydrates afin d'assurer la source du carbone [84, 88, 89, 90, 91, 92, 93]. Une stimulation de la biodégradation peut y avoir en en présence  $\text{Mn}^{+2}$  [97, 98].

Le schéma des figures 2. 5 et 2.6 résument les différentes voies d'attaque microbiens et leurs mécanismes sur les SHs.

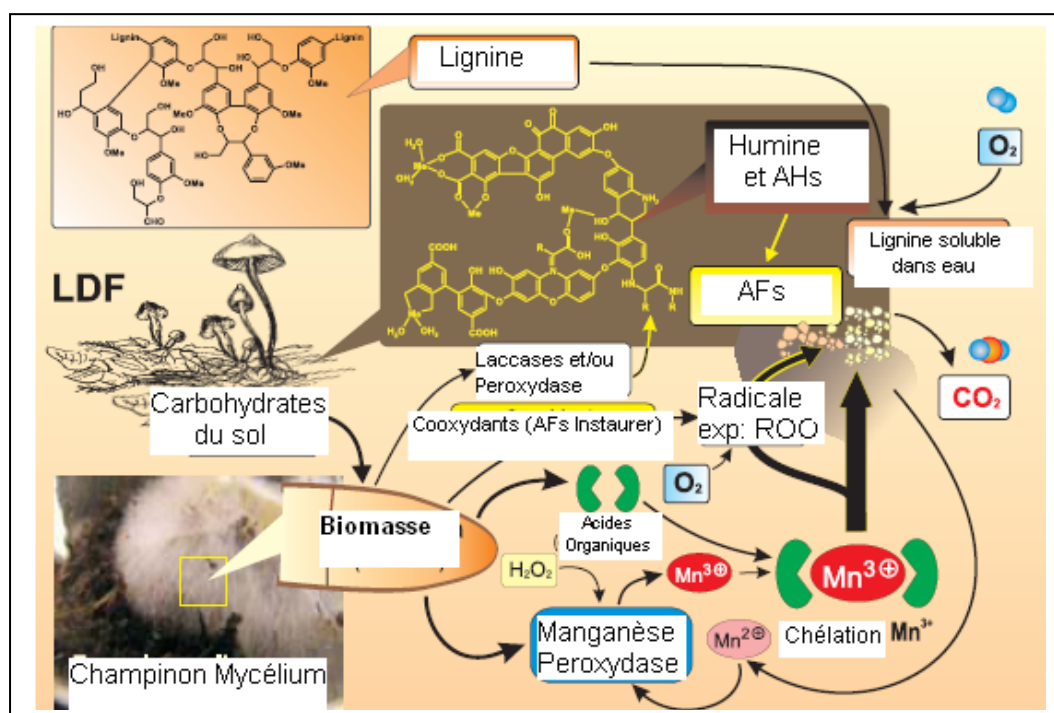


Figure 2. 5 : Mécanismes de la biodégradation les SHs et la lignine par les champignons [84].

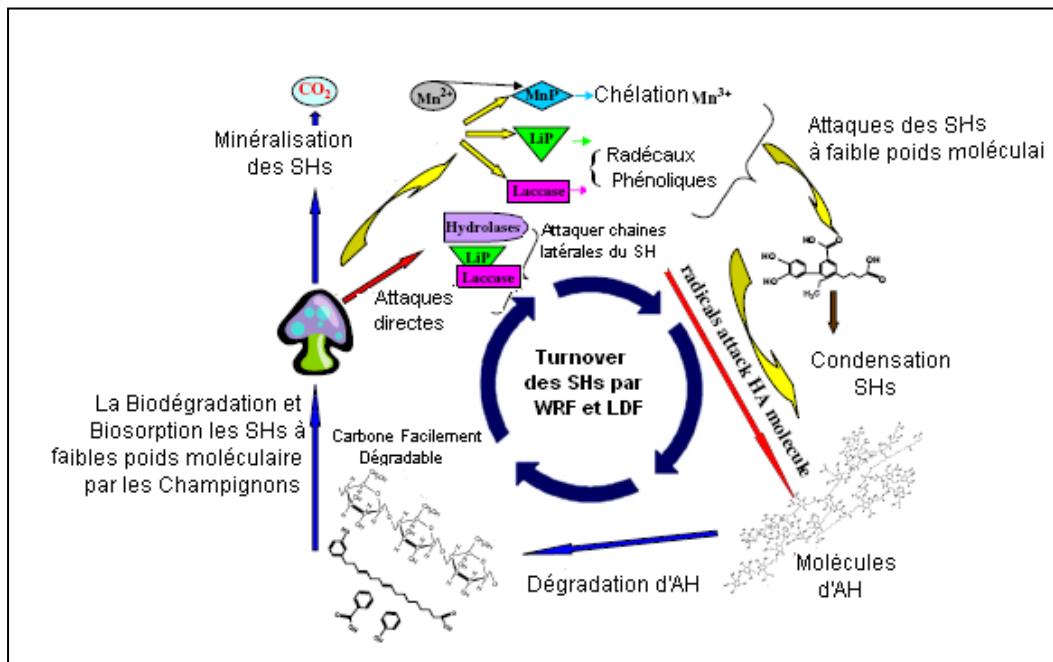


Figure 2. 6 : Mécanismes de la biodégradation et transformation les SHs par WRF et LDF [12].

## 2. 5 Rôle des substances humiques

Le rôle et l'importance des SHs dans les sols, et en particulier de l'humus, sont prouvés depuis longtemps. Par leur présence dans tous les milieux, leurs multiples propriétés, réductrices, tensioactives et surtout leur pouvoir « séquestrant » (adsorbant, complexant, chélatant) vis-à-vis de composés organiques et minéraux (métaux et pesticides entre autres) leur confèrent un rôle essentiel dans la solubilisation, l'accumulation, la biodisponibilité, la dégradation, le transport et les échanges de ces composés dans les eaux, les sols et les sédiments [95].

Comme l'indique EYHERAGUIBEL [35] la nature acide des groupements fonctionnels confère aux SHs un caractère de poly-électrolytes de type anionique dont résultent leurs propriétés complexantes vis-à-vis des ions métalliques. STEVENSON [7] résume dans le tableau (2. 1), les différentes propriétés des SHs.

Tableau 2.1 : Propriétés générales des SHs et leurs effets dans le sol [7].

Propriété	Remarques	Effets dans le sol
Rétention de l'eau	Les SHs retiennent jusqu'à 20 fois leurs poids en eau	Aident à prévenir le dessèchement et améliorent la rétention de l'eau dans les sols sableux.
Liaison avec les argiles.	Cimentent les particules des sols en formant des agrégats.	Permettent l'échange gazeux la perméabilité et stabilisent la structure du sol.
Chélation	Forment des complexes stables avec $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , et autres cations polyvalents.	Favorisent la biodisponibilité des micronutriments pour les plantes.
Effet tampon	Possèdent un grand pouvoir tampon.	Permettent de maintenir une réaction uniforme dans le sol.
Echange de cation	L'acidité totale des fractions de l'humus varie de 300 à 1400 cmol/Kg.	Augmentent la capacité et échanges cationiques.
Minéralisation	La décomposition des SHs donne: $\text{CO}_2$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ .	Source nutritive pour les plantes de N, P et S.
Combinaison avec les molécules organiques	Modifie la bioactivité et biodégradation des pesticides.	Modifie le taux d'application des pesticides

## **CHAPITRE 3**

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

#### 3. 1 Introduction

La première partie de notre expérimentation consiste à extraire les AHs à partir du sol. L'extraction est faite au moyen d'une solution alcaline, classiquement employée dans les sciences du sol. La réaction finale génère deux phases, une phase insoluble concentrée, brune contenant les AHs et une phase soluble jaunâtre renfermant les AFs. A la fin, les AHs ont été récupérés sous formes de résidus noirs serviront comme matières premières dans les essais de la biodégradation.

On visera dans la deuxième partie d'isoler et de sélectionner un biotope de souches microbiennes capables de dégrader les AHs. Deux niches écologiques différentes, le sol et l'extrait de la betterave rouge, ont été employées pour l'isolement des microorganismes.

#### 3. 2 Extraction, purification et caractérisation des acides humiques

##### 3. 2.1 Extraction

###### 3. 2. 1. 1 Echantillonnage

Au total, trois échantillons du sol ont été prélevés à partir du sol de surface (10- 20 premiers centimètres situés en dessous de la litière). Ces échantillons correspondent aux trois différents types du sol de la Mitidja (vertisols à Meftah, sols humides à Boufarik et sols rouges méditerranéens à Hadjout). L'échantillonnage a été effectué au cours du mois de Novembre 2006.

###### 3. 2. 1. 2 Protocole expérimental d'extraction

Le protocole d'extraction des AHs du sol a été élaboré en s'appuyant sur la procédure recommandée par "International Humic Substances Society"

(IHSS) [96, 97]. Les principales étapes de ce protocole sont appliquées successivement comme suit :

- Après stabilisations microbiennes des échantillons au laboratoire (2 à 3 jours à température ambiante), ceux-ci sont séchés à l'air libre, homogénéisés par tamisage sur maille (1 mm de diamètre), puis broyés;
- L'extraction est réalisée avec une solution composée de 44,6 g  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  + 4 g NaOH dans un litre d'eau distillée [1, 98]. On mélange 5g du sol prêt avec 100 ml de la solution précédente, puis on ajuste le pH à environs 13. On met la préparation dans un erlenmeyer fermé hermétiquement avec du parafilm pour empêcher la pénétration du  $\text{CO}_2$  atmosphérique, on mélange tout doucement et périodiquement la solution;
- Après 16 à 18 h de repos, le surnagent formé est récupéré par aspiration, puis filtré plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un filtrat claire;
- Les AHs dissous dans la solution sont précipités à un pH acide égal à 2 par ajout de l'acide sulfurique 2 N. Cette solution est soumise à 80°C sous étuve pendant 30 minutes, puis remise à température ambiante et laisser à repos pendant 24 h pour mieux précipiter les AHs. Le précipité est centrifugé à 4000 tr/min pendant 20 min pour éliminer toute la phase liquide. Répéter la centrifugation plusieurs fois par un lavage d'eau afin d'obtenir une matière plus au moins homogène [99];
- Après les dernières centrifugations, les AHs sont récupérés sous formes de résidus noirs (cf. Photos 3.1 et 3.2). Ils ont été séchés à l'étuve à 60°C et conservés secs. Le stockage des AHs était en chambre froide, à 4°C, à l'obscurité, pour limiter toute évolution de leur composition [99];





Photo 3.1 : Acides humiques extraits du sol sous forme solide.



Photo 3.2 : Acides humiques extraits du sol sous forme liquide à pH basique.

### 3. 2. 2 Purification et solubilisation des acides humiques

Les AHs synthétiques (Aldrich) et les AHs naturels (extraits de sol) ont parfois été utilisés comme substrats mais compte-tenu de leurs teneurs en cendres et leur faible solubilité dans l'eau, ils ont été préalablement purifiés au laboratoire.

Une solution, contenant 5% (P/V) d'AHs dans NaOH 0,1 N, est mise en agitation sous atmosphère d'azote pendant 20 min, puis elle est amenée à pH 1 avec HCl 1 N. Le floculat obtenu est solubilisé avec de la soude 0,1 N et la

solution est ensuite traitée à nouveau (agitation, floculation, re-solubilisation) [29].

Les deux types d'AHs, employés au long de cette étude, sont solubilisés comme suit : En dissolvant 1 g d'AH dans 62,5 ml de NaOH (2 N), on complète à un litre avec de l'eau distillée. Cette solution est agitée pendant 48 h et conservée à 4°C à l'abri de la lumière [29].

### 3. 2. 3 Caractérisation des acides humiques

#### 3. 2. 3. 1 Spectroscopie UV-visible et Rapport $E_{465}/E_{665}$

Le principe de la spectroscopie UV-visible repose sur des transitions électroniques, c'est le passage d'un électron d'une orbitale stable vers une orbitale instable, engendrées par l'absorption de radiations électromagnétiques dans les régions UV (200 - 400 nm) et visible (400 - 800 nm). Dans le cas des composés organiques, ces transitions électroniques correspondent à des changements d'orbitales moléculaires de groupes fonctionnels spécifiques (chromophores). Ainsi, les spectres d'absorption d'un composé peuvent être utilisés pour sa caractérisation. La spectroscopie UV-visible a ainsi été utilisée par de nombreux auteurs pour caractériser les SHs [97, 98].

Le spectrophotomètre, UV-visible à monofaisceau de marque Technicomp 8500 avec une cellule en quartz de 1 cm d'épaisseur, a été utilisé dans notre cas pour la détermination des spectres caractéristiques des AHs étudiés.

Les spectres ont été tracés de 800 à 200 nm après réalisation d'une ligne de base sur toute la longueur d'onde du spectre à tracer avec la cuve remplie d'eau distillée.

D'après nos expériences, la caractérisation comparative des AHs est basée sur le rapport  $E_{465}/E_{665}$  des absorbances spectrales spécifiques à 465 et 665 nm avec le balayage sur la gamme UV-visible [98].

Une préparation d'une solution de 0,3 mg d'AHs dissout dans 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  (0,05M) à un pH 8,3 [98, 100] servira pour la mesure de l'absorbance à 465 et 665 nm.

### 3. 2. 3. 2 Spectroscopie Infrarouge

Le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est très largement utilisé pour l'étude des SHs du sol. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques de produits organiques. Une molécule soumise à des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques constitutifs [35, 100].

Cette méthode spectrale permet de caractériser l'acide humique naturel et commercial vis-à-vis de leurs aspects fonctionnels. L'échantillon d'AHs est préparé par micropastillage de 1 ou 2 mm dans du bromure de potassium (KBr) à une concentration d'environ 0,004% (1 mg AHs/ 250 mg KBr) en masse et soumis à une pression de 20 bar/cm<sup>2</sup>. La pastille ainsi formée est analysée à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU de type FTIR 9800. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm<sup>-1</sup> et enregistrés par un logiciel Huper tous les 8 cm<sup>-1</sup>. Le spectre obtenu représente  $\text{Abs} = f(\tau)$  avec : Abs = Absorbance, nombre d'onde =  $1/\lambda$  exprimé en cm<sup>-1</sup>. Logiciel Bio-Red IR Search MasrchMaster a été utilisé pour le traitement des spectres obtenus.

### 3. 2. 3. 3 Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Le principe de la microscopie électronique à balayage consiste en à explorer la surface d'un échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident. Le microscope à balayage utilise un faisceau très fin qui balaie point par point la surface de l'échantillon. Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétro diffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon qui sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le

balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet. La résolution spatiale dépend de l'énergie des rayonnements. Cette nouvelle technologie a permis, de faire de profondes analyses, concernant l'observation du relief d'échantillons massifs [37, 101].

L'échantillon placé dans la chambre du microscope, reçoit un flux d'électrons très important [37]. L'examen microscopique a été réalisé à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) de marque ESEM XC30FEG qui permet un grossissement jusqu'à 2000 fois, piloté par un ordinateur, ce qui donne une information sur le pourcentage atomique des éléments majeurs présents dans les AHs.

### 3. 3 Isolement et sélection des souches performantes

Trois groupes de microorganismes ont été recherchés pour accomplir notre objet d'étude, à savoir, des souches mycéliennes (champignons et actinomycètes) et un consortium microbien. Les champignons et les actinomycètes ont été isolés à partir du sol de la surface (10 – 20 cm) de trois échantillons appartenant aux différents types du sol de la Mitidja (vertisols à Meftah, sols humides à Boufarik et sols rouges méditerranéens à Hadjout). Tandis que le consortium microbien a été isolé à partir de l'extrait de la betterave rouge cultivé dans les sols de Boufarik.

#### 3. 3.1 Isolement des microorganismes

##### 3. 3. 1. 1 Champignons

Les champignons ont été isolés selon la démarche suivante :

- Préparation des suspensions – dilutions

La préparation des suspensions-dilutions (SD) est faite selon la méthode classique en utilisant l'NaCl (0,9%) comme diluant pour assurer la survie des formes sporulantes et végétatives des germes. Pour les sols étudiés, les SD ont été diluées jusqu'à  $10^{-9}$ .

- Milieu de culture et ensemencement

La composition du milieu Czepek [102] utilisé pour l'isolement des champignons est donnée en APPENDICE A. Ce milieu est additionné à la Chloramphénicol et à la Streptomycine (500 mg/L) et stérilisées séparément par microfiltration pour éviter la croissance des bactéries et les actinomycètes.

Les dilutions  $10^{-4}$  jusqu'à  $10^{-8}$  sont servies pour l'ensemencement du milieu Czepek à raison de 0,1 ml en surface. Les boîtes de pétri ont été incubées à 30°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant 5 jours pour permettre une bonne croissance des champignons.

- Purification et conservations des isolats

Les colonies obtenues ont été purifiées sur milieu Czepek. Elles ont été conservées à court terme à + 4°C et repiquées chaque mois.

### 3. 3. 1. 2 Actinomycètes

Les actinomycètes ont été isolés sur milieu ISP2 solide (en APPENDICE A). Le milieu, additionné à 500 mg/L d'actidione pour éliminer la croissance des champignons, contient la chitine qui limite la croissance des bactéries [103]. Il est enrichi par 0,5% (P/V) d'acide humique synthétique (AHS) pour l'isolement sélectif des souches adaptées à la dégradation d'AHs [103, 104].

### 3. 3. 1. 3 Consortium microbien

Dans le contexte de tester le consortium microbien issu de l'incubation de l'extrait de la bettrave rouge dans la biodégradabilité des AHs, trois préparations ont été effectuées selon les étapes suivantes :

- Une quantité de 500 g de la bettrave rouge a été finement broyé avec 500 ml d'eau stérilisée dans un mixeur, puis filtrée pour obtenir un extrait frais qui est donc dénommée "EBR";

- Trois échantillons d'EBR ont été incubés séparément à 30°C (±1°C) pendant 7, 30 et 60 jours, dénomés EBRI<sub>7</sub>, EBRI<sub>30</sub> et EBRI<sub>60</sub>;
- Ces cultures sont très riches en microorganismes représentant ainsi le consortium microbien.

### 3. 3. 2 Choix et sélection des souches performantes

La biodégradabilité des AHS par les souches purifiées a été réalisée en batch dans des tubes à essai (15 cm de longueur et 2 cm de diamètre) contenant chacun 10 ml de milieu de culture liquide :

- Le milieu ISP9 (en APPENDICE A) pour les actinomycètes et Czepek pour les champignons;
- Le milieu EBR pour le consortium microbien.

Les AHS ont été employés pour révéler l'aptitude des souches à utiliser ces substances (AHS). Ils ont été stérilisés par microfiltration et additionnés aux milieux de culture à raison de 0,5% (P/V).

Les milieux de culture ont été inoculés à raison de trois disques de spores (champignons et actinomycètes) et 1ml du consortium microbien dans 9ml d'EBR. L'incubation a été lancée sous agitation (150 tr/min) à 30°C (±1°C) pendant trois semaines.

La biomasse a été éliminée par centrifugation (5000 tr/min) et les surnageants ont été récupérés et puis filtrés sur papier microfibre (0,45 µm).

Les absorbances des surnageants ont été mesurées à 254 et 350nm en référant à un témoin contenant le milieu à base d'AHS non inoculé. Les pourcentages de la réduction ont été calculés selon la formule suivante :

$$\%R = (Abs_i - Abs_f) / Abs_i$$

#### **Avec :**

Abs<sub>i</sub> : absorbance initiale.

Abs<sub>f</sub> : absorbance finale.

### 3. 4 Identification préliminaire des souches performantes

#### 3. 4. 1 Identification des champignons

La caractérisation macro et micromorphologique est souvent utilisée pour identifier les champignons, notamment au stade genre [102, 105].

- Etude macroscopique

La macromorphologie des isolats des champignons est basée sur les caractères suivants : couleur du mycélium aérien (MA) et du mycélium de substrat (MS), aspect du MA (poudreux, floconneux, velouté,...), présence des sporanges visibles à l'œil nu, la production ou non du pigment diffusible, la présence ou l'absence de sclérotés, existence d'odeur caractéristique du champignon.

- Etude microscopique

Cette observation est basée sur la méthode de DRAPEAU de ROTH dont nous avons noté les caractères suivants :

- ✓ le cloisonnement ou non du mycélium, la coloration, et l'aspect de la paroi du mycélium;
- ✓ l'absence ou la présence de périthèces
- ✓ la forme et le nombre de spores ainsi que la façon dont elles sont produites;
- ✓ la forme et la longueur des conidiophores.

#### 3. 4. 2 Identification des actinomycètes

Elle est effectuée grâce à la détermination de l'isomère (LL ou DL) de l'acide diaminopimélique (DAP) présent dans les parois, ainsi que la mise en évidence de la glycine à l'aide des analyses chromatographiques [106].

L'étude des caractéristiques culturales et micromorphologique selon les méthodes et les milieux préconisés par SHIRLING et GOTTLIEB [107]. Ils ont été appliqués pour la détermination des genres.

### 3. 4. 2. 1 Détermination de l'isomère (LL ou DL) de l'acide diaminopimélique

Trois étapes ont été suivies successivement comme suit :

#### 1°. Obtention du mycélium

Une bonne croissance a été obtenue après incubation à 30°C pendant 72 h dans le milieu liquide ISP2. Le mycélium est récolté après avoir été lavé (cinq fois avec l'eau distillée plus une fois avec l'éthanol 96°) et puis séché à 60°C.

#### 2°. Lyse du mycélium avec HCl (6 N)

- 1) Mettre 10 mg de mycélium dans 1 ml d'HCl (6 N) et laisser agir 18 h à 100°C;
- 2) Centrifuger à 5000 tr/min pendant 15 min pour éliminer le culot;
- 3) Vaporiser l'eau et ajouter chaque fois 1 ml d'eau distillée et re-vaporiser plusieurs fois jusqu'à l'augmentation du pH (5,5 à 7).

#### 3°. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Un spot renfermant 20 µl d'hydrolysate est déposé sur la plaque en référant au DAP commercial (Riedel-de Haën) composé de deux formes isomériques (LL ou DL) et préparé à une concentration de 0,01 M. Une migration de 6h a été effectuée avec un solvant composé de : n-butanol/ acide acétique/ eau distillée, selon les proportions suivantes : 60/ 20/ 20 respectivement. La révélation des taches est assurée par pulvérisation avec la ninhydrine (0,2% dans l'acétone) et suivie d'une incubation à 100°C pendant 2 min.

Les taches du DAP apparaissent en couleur verte noire qui se vire rapidement au jaune tandis que la glycine se colore en violet. La forme LL se migre rapidement par rapport à la forme DL mais moins comparativement à la glycine. Le chromatogramme a été lu selon les RF des taches obtenues ( $RF_{DL} < RF_{LL} < RF_{GLY}$ ).



### 3. 4. 2. 2 Etude culturelle et micromorphologique

Les milieux spécifiques ISP2, ISP3 et ISP4 ont été utilisés pour la description culturelle des souches d'actinomycètes en appuyant sur les couleurs caractéristiques du mycélium aérien et la production de pigments mélanoides diffusés dans le milieu de culture.

L'étude micromorphologique a été basée sur l'observation de la fragmentation du mycélium de substrat et le mode de regroupement des spores dans le mycélium aérien.

Une identification phénotypique, basée sur l'observation macro et microscopique, a été appliquée pour la détermination des isolats au stade genre et/ou espèce.

### 3. 5 Biodégradation des acides humiques

La dégradation des AHs par les microorganismes a été étudiée sur un milieu liquide à base d'AHs synthétique et naturels. Les essais de la biodégradation ont été effectués en présence et/ ou en absence des sources de carbone et d'azote assimilables. L'effet de l'agitation a été aussi testé comme un facteur influençant la biodégradation.

### 3. 4. 1 Biodégradation des acides humiques synthétiques

#### 3. 4. 1. 1 Milieux de culture

Le suivi de la biodégradabilité des AHS par les six souches performantes retenues et le consortium microbien a été réalisé en batch dans des tubes à essai contenant chacun 10 ml de milieu de culture liquide. Les AHS ont été employés pour suivre la cinétique de la biodégradation et déterminer l'aptitude des souches à utiliser ces substances (AHS). Ils ont été stérilisés de la même façon comme dans l'étape sélection des souches (3. 3. 2).

Pour cette raison quatre milieux de culture ont été préparés séparément pour illustrer le rôle d'AHS comme étant une source de carbone et/ ou d'azote :

**1) Milieu complet (MC)**

Ce milieu contient des quantités suffisantes des sources de carbone et d'azote assimilables assurant une bonne croissance des souches microbiennes. Deux milieux ont été employés respectivement, ISP9 et Czepek pour les actinomycètes et champignons.

Les AHS ont été ajoutés à raison de 0,5% (P/V) pour suivre la cinétique de la biodégradation selon BLANDEAU et DARI [103, 104].

**2) Milieu pauvre en carbone assimilable ( $M_{PC}$ )**

Dans ce milieu les AHS, représentant une quantité suffisante de la source du carbone pour la survie des souches, ont été ajoutés à raison de 0,5% (P/V). Le glucose (0,1%) dans le ISP9 et le saccharose (0,1%) dans le Czepek, ont été additionnés dans les milieux de culture pour démarrer la croissance.

**3) Milieu pauvre en azote assimilable ( $M_{PN}$ )**

Dans ce milieu les AHS, représentant une quantité suffisante de la source d'azote pour la survie des souches, ont été ajoutés à raison de 0,5% (P/V). Le  $(NH_4)_2SO_4$  (0,01%) dans le ISP9 et les  $NaNO_3$  (0,01%) dans le Czepek ont été additionnés dans les milieux de culture pour démarrer la croissance.

**4) Milieu pauvre en carbone et azote assimilables ( $M_{PCN}$ )**

Dans ce milieu les AHS, représentant une quantité suffisante de la source de carbone et d'azote pour la survie des souches, ont été ajoutés à raison de 0,5% (P/V). Les sources de carbone et d'azote assimilables ont été ajoutées avec faible concentration.

#### 4. 1. 1 Effet de la souche microbienne

Pour comparer le comportement des souches vis-à-vis le même type d'AHS comme l'unique source de carbone et d'azote selon le milieu ( $M_{PCN}$ ) (Figure 3. 1).

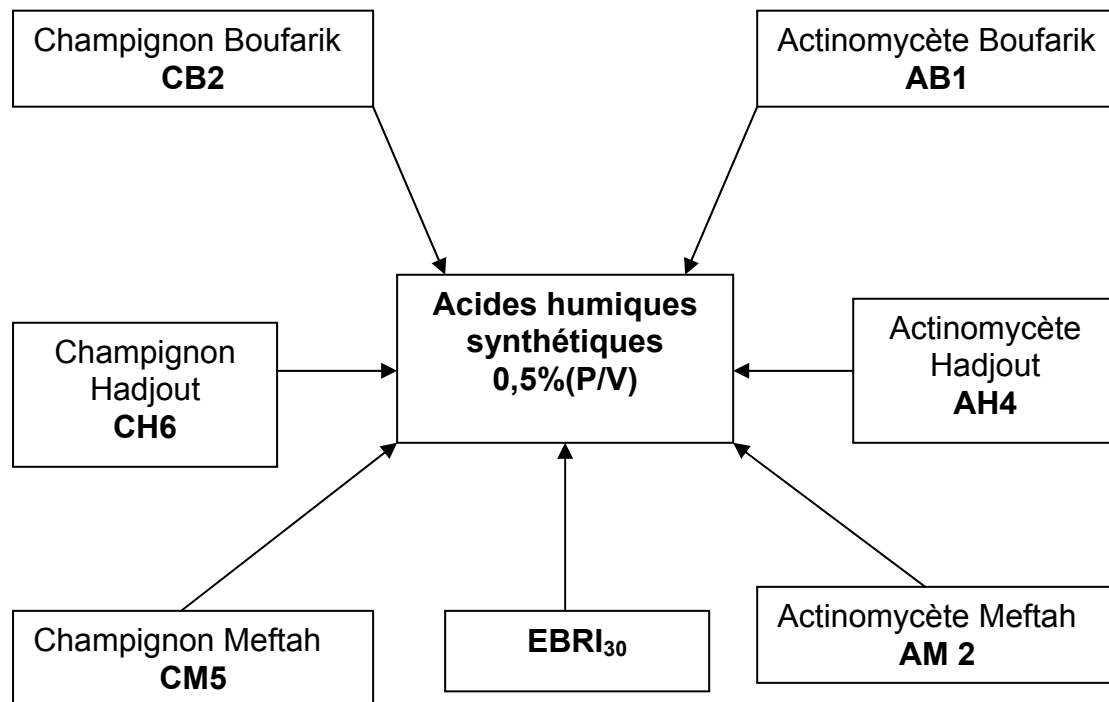


Figure 3.1 : Biodégradation d'AHS par les souches performantes.

#### 3. 4. 1. 2 Conditions de culture et analyses

Les conditions de culture (inoculum, durée et température d'incubation et agitation) et la préparation des échantillons pour l'analyse ont été réalisées en suivant les mêmes étapes précitées dans le paragraphe 3. 3. 2. Ainsi, la croissance microbienne a été lancée soit en présence ou en absence d'agitation pour vérifier l'effet de cette dernière sur la biodégradation.

Les analyses ont été faites chaque semaine pour établir la cinétique de la biodégradation en mesurant l'absorbance à 254 et 350 nm. Les analyses par CLHP ont été faites uniquement pour les prélèvements de la quatrième semaine pour la mise en évidence des produits générés après dégradation.

CHIN et al, rapporte que l'absorbance à 254 nm est une mesure approximative du degré d'aromaticité des matières organiques dissoutes [108] et selon SENESI et al, l'humification est décrite par le degré de polycondensation des structures aromatiques [109]. Dans cette optique, KALBITZ a utilisé l'absorption à 254 nm des matières organiques dissoutes pour estimer le degré d'aromaticité dans les acides humiques [110].

À 350 nm, cette longueur d'onde permet d'apprécier les variations de l'absorbance des acides humiques sans interférences avec les protéines excrétées au cours des incubations ou avec les différents éléments apportés au milieu de culture [29].

Les produits générés de dégradation formés dans le milieu sont détectés par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) que sont basées sur la séparation analytique des molécules d'un composés ou d'un mélange de composés [111]. Une colonne analytique a phase inverse de type RP-C18, de dimensions 4,6×125 mm et de porosité 5µm est utilisée. La solution à analyser dont le volume d'injection est fixée à 20 µl. L'éluant est constitué d'acétonitrile et de l'eau distillée a 0,3/ 0,7 (V/V). Le débit d'éluant est fixé à 0,6 ml.min<sup>-1</sup> à une température 35°C [112]. La détection des produits en sortie de colonne est réalisée à l'aide d'un détecteur UV-visible [112].

#### 3. 4. 2 Biodégradation des acides humiques naturels

L'adaptation de la souche à son AHs extrait du même site a été aussi établie par l'utilisation de l'AHs naturel comme seules sources de C et N mentenus sous agitation. Les expériences sont indiquées dans les figures 3. 2, 3. 3 et 3. 4

La cinétique de la biodégradation les acides humiques naturels a été suivie en mesurant l'absorbance à 254 et 350 nm à chaque semaine d'incubation. L'analyse par IRTF a été faite uniquement pour les prélèvements de la quatrième semaine pour la mise en évidence de la modification structurelle qui témoigne le mode d'attaque microbien sur la molécule d'AHs.

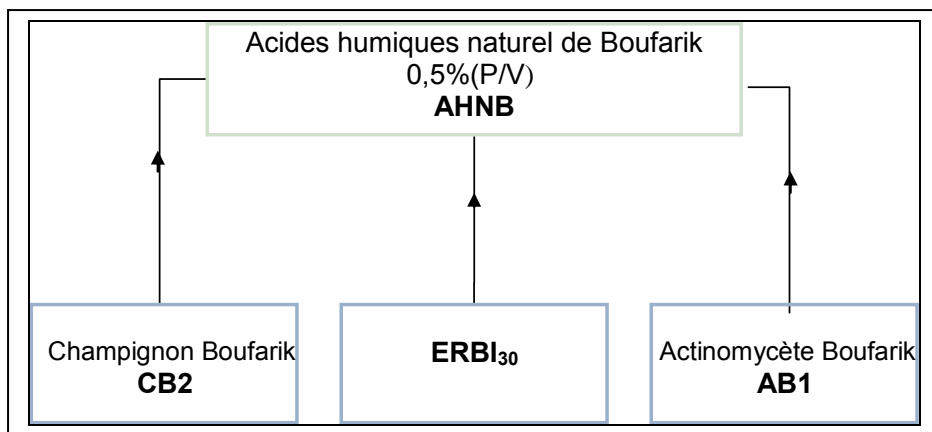


Figure 3. 2 : Biodégradation des AHs extraits de Boufarik par les souches performantes isolées du même sol.

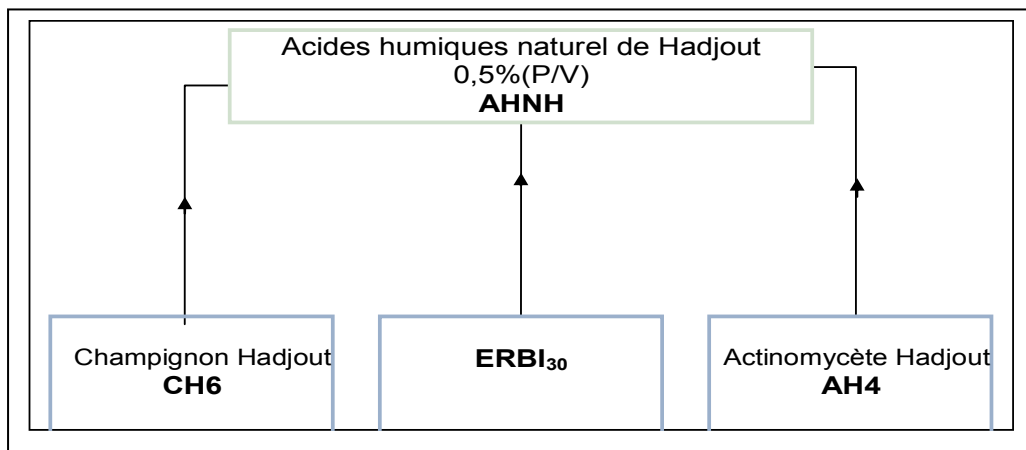


Figure 3. 3 : Biodégradation des AHs extraits de Hadjout par les souches performantes isolées du même sol.

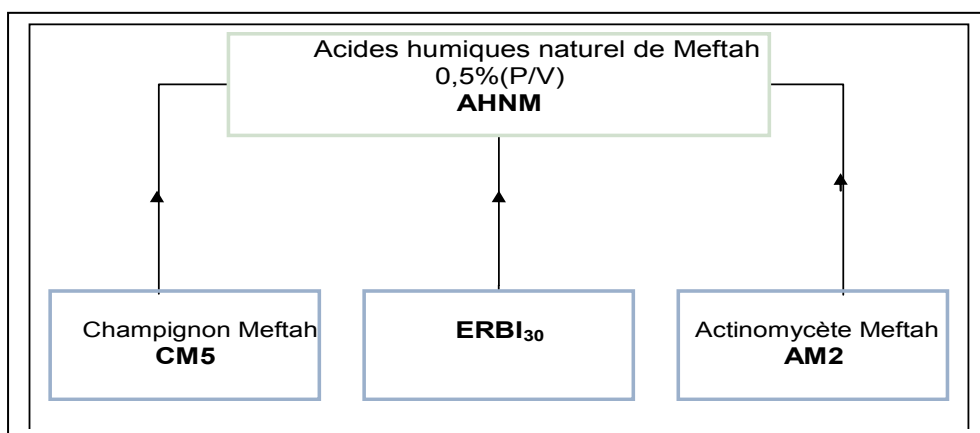


Figure 3. 4 : Biodégradation des AHs extraits de Meftah par les souches performantes isolées du même sol.

## CHAPITRE 4

### RESULTATS ET DISSCUSIONS

#### 4. 1 Caractérisations des acides humiques

##### 4. 1. 1 Spectroscopie UV-visible et Rapport $E_{465}/ E_{665}$

Les spectres UV-visible obtenus correspondant aux échantillons des acides humiques extraits de sols : de Boufarik (AHNB), de Hadjout (AHNH), de Meftah (AHNM) et synthétiques (AHS). Ils sont respectivement représentés dans les figures 4. 1 à 4. 4. Les rapports  $E_{465}/ E_{665}$  sont aussi indiqués dans le tableau 4. 1.

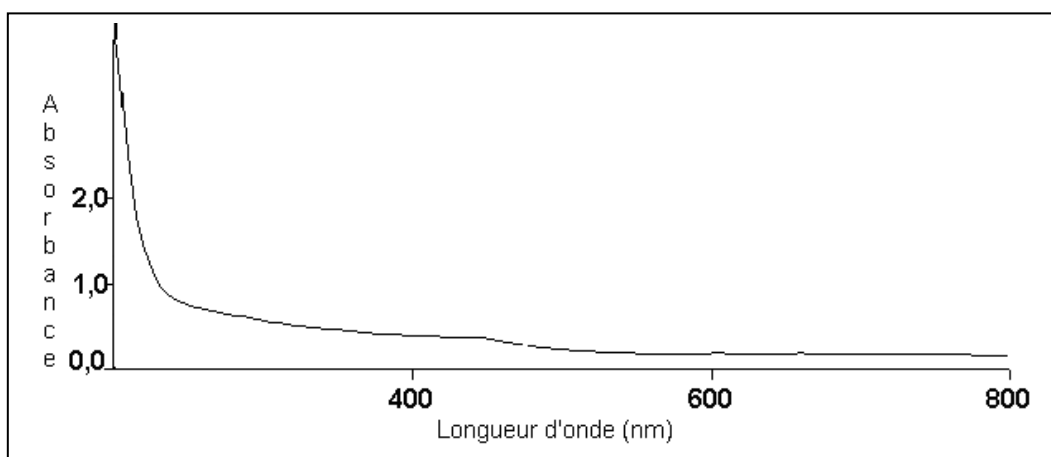


Figure 4. 1 : Spectre UV-visible de l'AHNB.

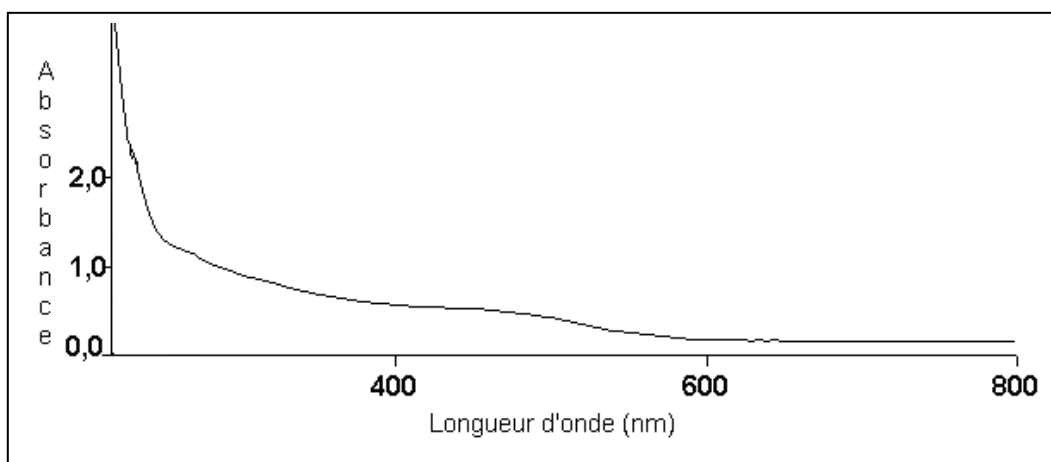


Figure 4. 2 : Spectre UV-visible de l'AHNH.

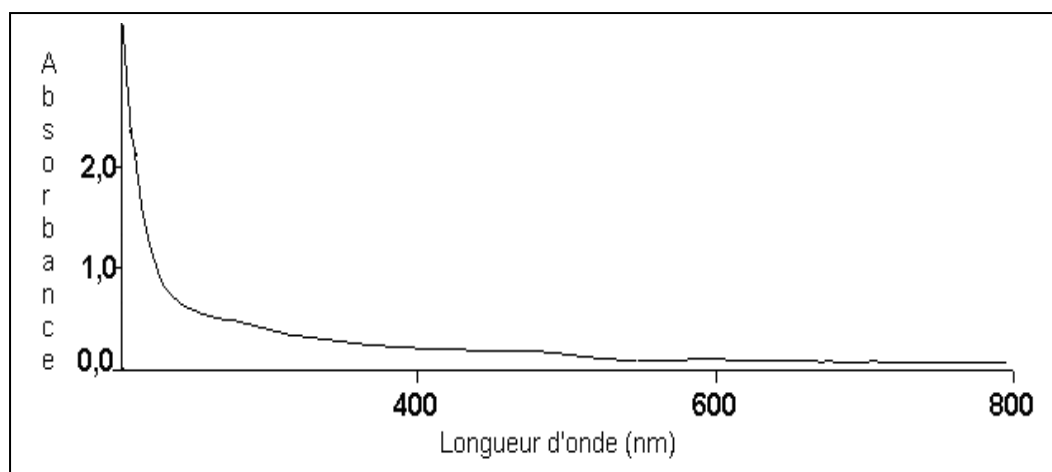


Figure 4. 3: Spectre UV-Visible de l'AHNM.

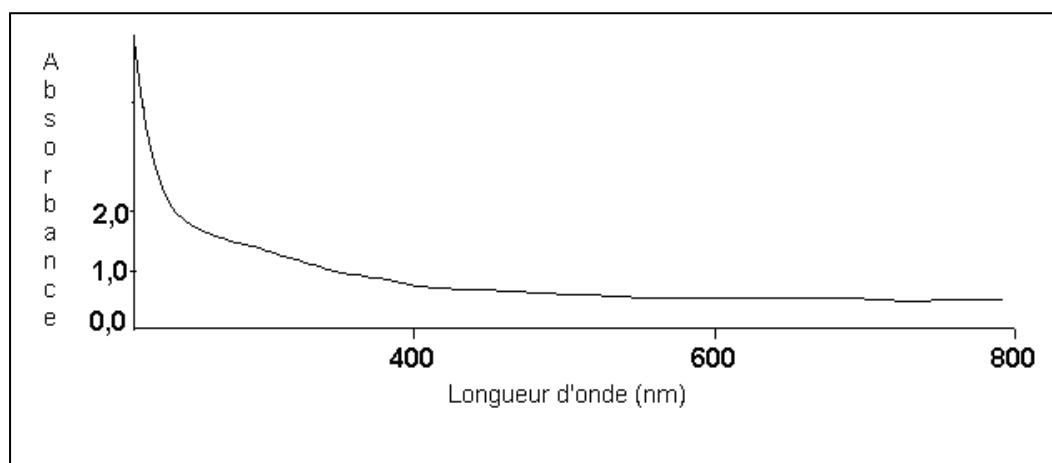


Figure 4. 4 : Spectre UV-visible de l'AHS.

Tableau 4.1 : Rapports  $E_{465}/E_{665}$  calculés pour les différents AHs analysés.

	$E_{465}$	$E_{665}$	$E_{465}/E_{665}$
AHNB	0,491	0,177	2,77
AHNBH	0,889	0,278	3,19
AHNM	0,266	0,092	2,89
AHS	1,1	0,285	3,86

Les spectres représentés sur les Figure 4. 1 à 4. 4 sont en accord avec la description de SWIFT [113]. L'allure de ces spectres est expliquée par le fait que ceux-ci correspondent à la somme de nombreux chromophores. SWIFT a rapporté que KONONOVA [1], CHEN et al. [108, 114] et STEVENSON [7, 27] se sont basés sur le rapport  $E_{465}/E_{665}$ , comme étant un

indice d'humification inférieur à 5, qu'il était assigné aux acides humiques dans le cadre d'une étude de caractérisation des acides humiques extraits à partir de composte.

La gamme d'absorbance des spectres représentée ci-dessus est entre 200 et 800 nm. Cette analyse montre une diminution monotone d'absorption avec des longueurs d'onde croissantes, ce qui a été prouvé par KI-HOON [115] et SCHNITZER [116, 117]. En effet, des constatations ont été faites : Entre 200 et 400 nm, la formation d'un palier, ce qui explique la présence des chromophores aromatiques, et de doubles liaisons conjuguées de C=C [113, 117]. La gamme entre 400 et 800 nm correspond à la région du visible due à la couleur des AHs [125].

Les valeurs du rapport calculés (ratio  $E_{465}/E_{665}$ ) selon WELT [22], inférieur à 5 (2,77 à 3,86), signifient un poids moléculaire élevé pour tous les échantillons analysés, à savoir, ceux de Boufarik et de Meftah. Ce rapport est largement employé pour caractériser les substances humiques [22, 115].

Cependant, de nombreux paramètres agissent sur la valeur de ce rapport et rendent son interprétation difficile :

- Le ratio  $E_{465}/E_{665}$  varie selon le type d'extrait humique mais il est indépendant de la concentration en matières humiques [113]. Notons cependant que la mesure de l'absorbance à 465 nm et 665 nm est impossible pour des concentrations de solutions trop élevées.
- Le ratio  $E_{465}/E_{665}$  varie inversement au poids moléculaire (PM) des particules. Or les particules de PM élevé (acides humiques) présentent un ratio faible (<5), celles de PM faible (acides fulviques) présentent un ratio élevé ( $5 < E_{465}/E_{665} < 10$ ) [22].

Les teneurs en carbone et en oxygène sont aussi corrélées avec le ratio  $E_{465}/E_{665}$ . Ainsi, un faible ratio est associé à une forte teneur en carbone et une faible teneur en oxygène ce qui caractérise dans notre cas l'ensemble des acides humiques analysés. Nos résultats sont en accord avec ceux signalés dans plusieurs travaux par TWAGIRAMUNGU, SCHNITZER et CHEN-EUGENE [22, 113, 116].



#### 4. 1. 2 Spectroscopie infrarouges

Les spectres IRTF enregistrés pour les acides humiques AHNB, AHNH, AHNM et AHS sont respectivement exposés dans les figures 4. 5 à 4. 8. Ainsi que les bandes d'absorption (en  $\text{cm}^{-1}$ ) et vibrateurs associés des acides humiques étudiés (Tableau 4. 2).

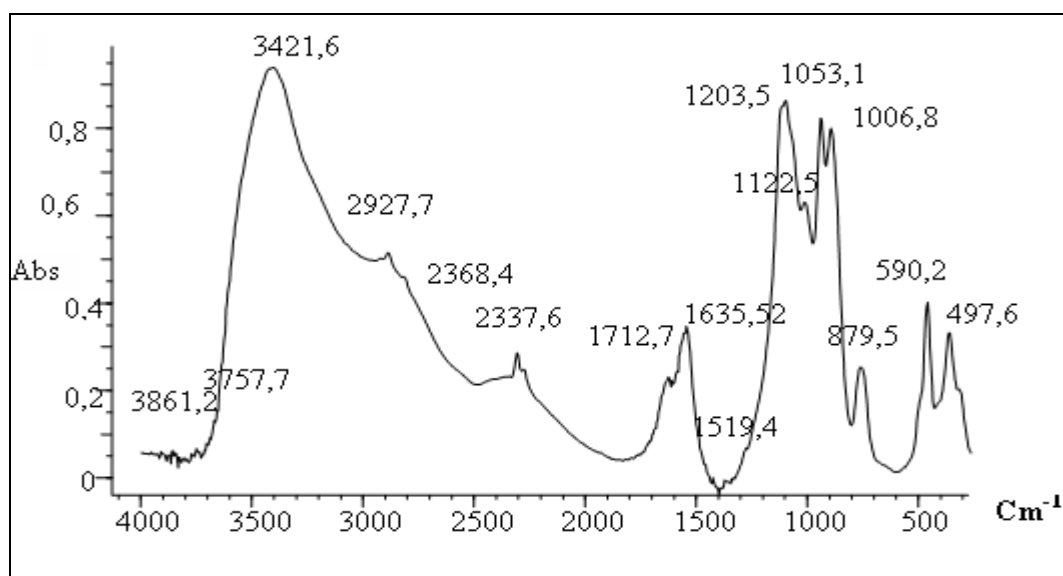


Figure 4. 5 : Spectre infrarouge de l'AHNB.

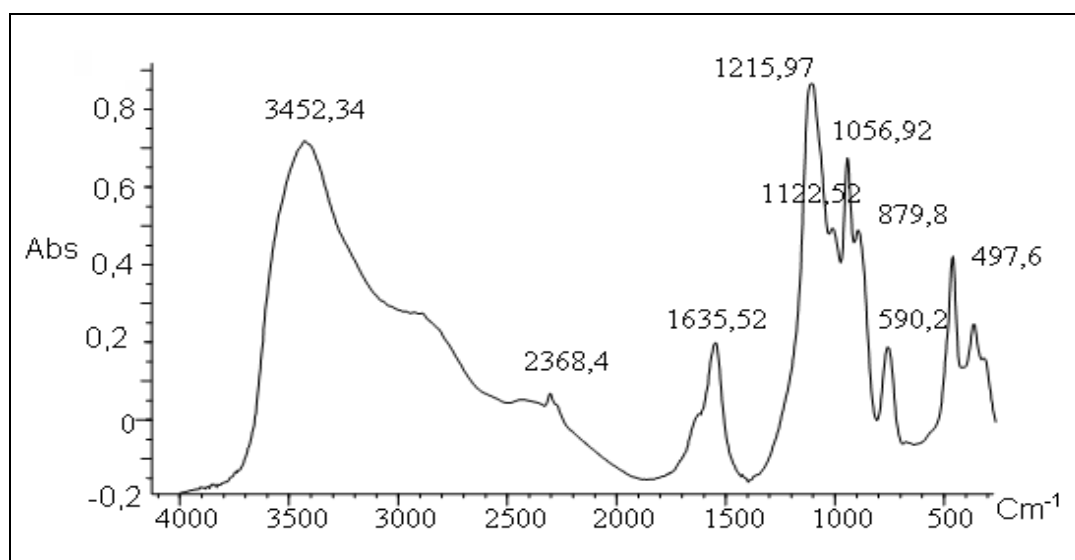


Figure 4. 6 : Spectre infrarouge de l'AHNH.

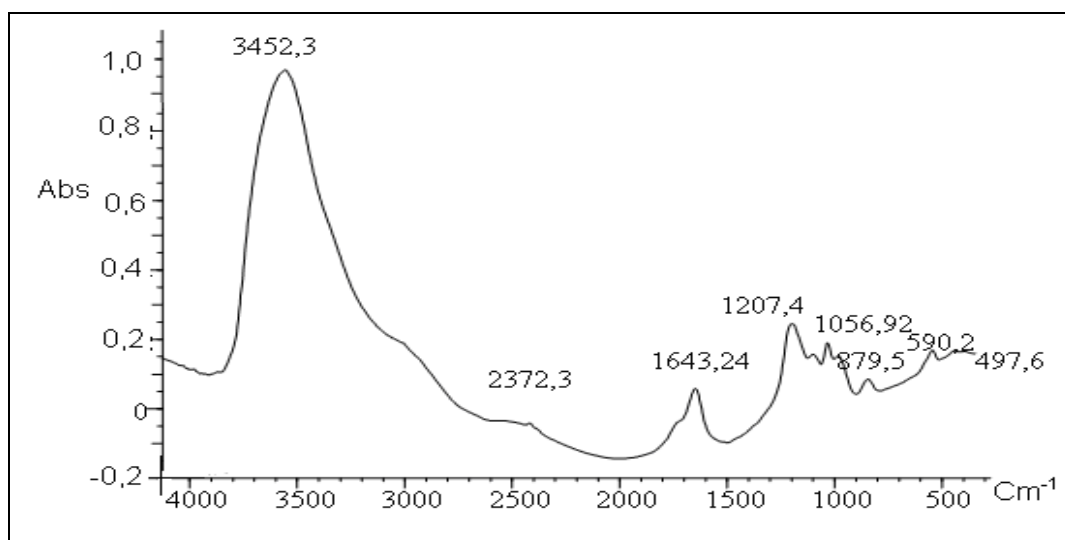


Figure 4. 7 : Spectre infrarouge de l'AHNM.

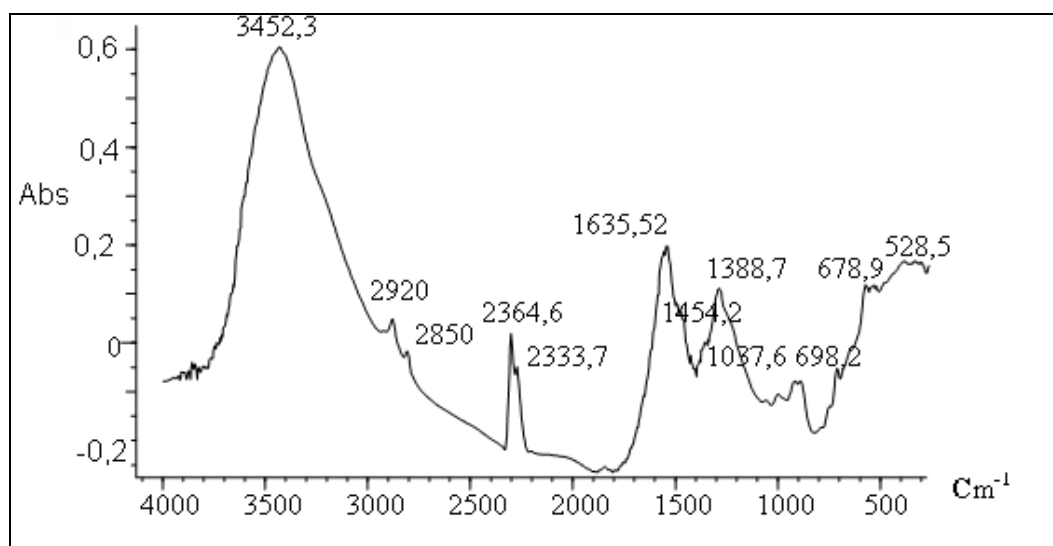


Figure 4. 8 : Spectre infrarouge de l'AHS.

Ces spectres montrent les différentes bandes d'absorption et vibrateurs associés de chaque échantillon. L'attribution des bandes a été effectuée en fonction du caractère aromatique, carboxylique, phénolique, etc. Ces groupements fonctionnels caractérisent les acides humiques selon plusieurs travaux [22, 37, 117, 118, 119].

Entre 3460 et 3300  $\text{cm}^{-1}$ , on peut observer pour les quatre spectres une bande harmonique de OH phénolique, groupe alcools et acide organique

avec des NH, NH<sub>2</sub> et OH en se basant sur les comparaisons faites par rapport à la bibliographie [118, 119].

Les bandes d'absorption entre 2950 et 2850 cm<sup>-1</sup>, les spectres des quatre acides humiques montrent des bandes de vibration caractéristiques des CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> [22, 113, 119, 120].

La bande d'intensité observée entre 2360 et 2300 cm<sup>-1</sup> sur les spectres de AHNB, AHNH et AHNM est probablement due aux dérivés azotés chargés absorbants dans cette région. Seulement, l'AHNB est caractérisé par deux pics spécifiques, à 2368,4 cm<sup>-1</sup> et 2337,6 cm<sup>-1</sup> [22, 120, 121].

Entre 2273 cm<sup>-1</sup> et 2000 cm<sup>-1</sup>, les spectres montrent la présence des bandes de vibration caractéristique de C≡N, C=N, -N=C=O et N=C=S [122, 123].

L'acide humique du sol de Boufarik ayant une bande de vibration 1712,3 cm<sup>-1</sup> qui associé C=O de l'acide carboxyle, cétone et aldéhyde et CH aromatique [22, 121].

Entre 1650 à 1600 cm<sup>-1</sup>, on peut observer la présence d'une bande aromatique de C=C avec une vibration de valence C=O quinonique et cétone dans les quatre spectres des acides humiques du Boufarik, Hadjout, Meftah et synthétique [22, 37, 113, 118, 120].

A 1519,8 cm<sup>-1</sup>, cette vibration montre la présence d'une C=C du noyau aromatique [124] et la déformation des CH des groupements méthoxyle, et celui des COO<sup>-</sup> et C-O-C-R [8, 122, 123].

La gamme de 1456 à 1380 cm<sup>-1</sup> est caractérisée par la présence des groupements importants de CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> dans l'acide humique synthétique [122].

Dans le domaine de 1300 à 1000 cm<sup>-1</sup>, on devait observer des C-O et/ou déformation OH de COOH, des bandes de déformation dans le plan de H aromatique, sur nos spectres, ces bandes sont totalement fortes pour les acides humiques naturels que l'acide humique synthétique.

La bande de vibration  $879,5\text{ cm}^{-1}$  incluse dans la gamme  $900\text{ à }860\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration de déformation C-H aromatique hors du plan pour les acides humiques naturels [22, 37, 121, 122].

Les bandes de déformation de OH phénolique en dehors du plans (de la molécule), sont observée dans le région  $685\pm 115\text{ cm}^{-1}$ , mais les phénols renfermant également des groupements carbonyle, qui laissent apparaître des bandes d'absorption ver  $750\pm 50\text{ cm}^{-1}$  [22, 35, 113, 122].

Tableau 4. 2 : Bandes d'absorption (en  $\text{cm}^{-1}$ ) et vibrateurs associés des acides humiques étudiés. AV : Absence de Vibrateur.

Bandes d'absorption ( $\text{cm}^{-1}$ )				Vibrateurs associés
AHS	AHNB	AHNH	AHNM	
3452,3	3444,6	3452,3	3452,3	OH phénol et NH des amines et amides.
2923,9 2854,5	2927,7	AV	AV	CH aliphatiques.
2364,5 2349,1	2368,4	2368,4	2372,3	$\text{C}\equiv\text{N}$ , $\text{C}=\text{N}$ , $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ et $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ .
AV	1712,7	AV	AV	CH alcène avec noyau aromatique et $\text{C}=\text{O}$ de carboxyle, cétone et aldéhyde.
1635,5	1635,5	1635,5	1643,5	$\text{C}=\text{O}$ de cétone et $\text{C}=\text{C}$ aromatique.
1454,2 1388,7	1519,8	AV	AV	Etirements $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{O}$ du noyau aromatique. Déformation CH des groupements méthoxyles, $\text{COO}^-$ et $\text{C}-\text{O}-\text{R}$ .
1037,6	1203,5 1122,5 1053,1 1006,8	1215,9 1122,5 1056,9	1207,4 1056,9	Etirements $\text{C}-\text{O}$ et/ou déformation OH de $\text{COOH}$ avec H aromatique.
AV	879,5	879,5	879,5	$\text{C}-\text{H}$ aromatique.
698,2 678,9 528,5	590,2 497,6	590,2 497,6	590,2 497,6	OH phénolique.

#### 4. 1. 3 Microscope Electronique à Balayage (MEB)

L'observation des AHs extraits du sol (Boufarik, Hadjout et Meftah) et AHS par microscope électronique à balayage a permis d'avoir une idée sur leur structure tridimensionnelle (3D) [37].

Les clichés (a et a') montrent la structure à faible grossissement des AHS de référence [37] et AHS utilisés dans notre cas, respectivement. Cette morphologie présentant un assemblage important d'agrégats de molécules étendues sous forme de litière et la même morphologie a été observée par DAIES [37]. D'autres chercheurs ont mis les mêmes remarques que EYHERAGUIBEL [37].

Des grossissements plus importants du même agrégat laissent apparaître un enchevêtrement des filaments (cliché b). Cette morphologie donne aux AHS une structure filamenteuse, c'est-à-dire, aliphatiques plus que aromatique selon DAIVIS [37] (cf. cliché g).

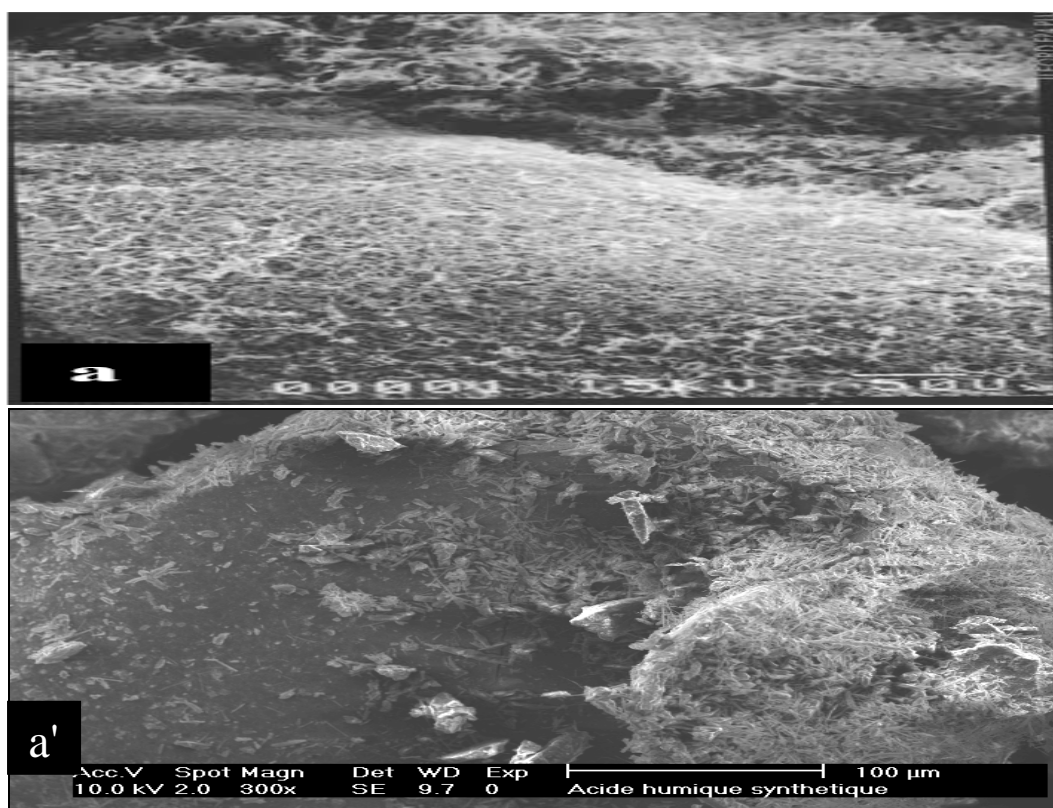


Figure 4.9 : Comparaison entre AHs synthétique (a`) et celui de référence (a) à faible grossissement.

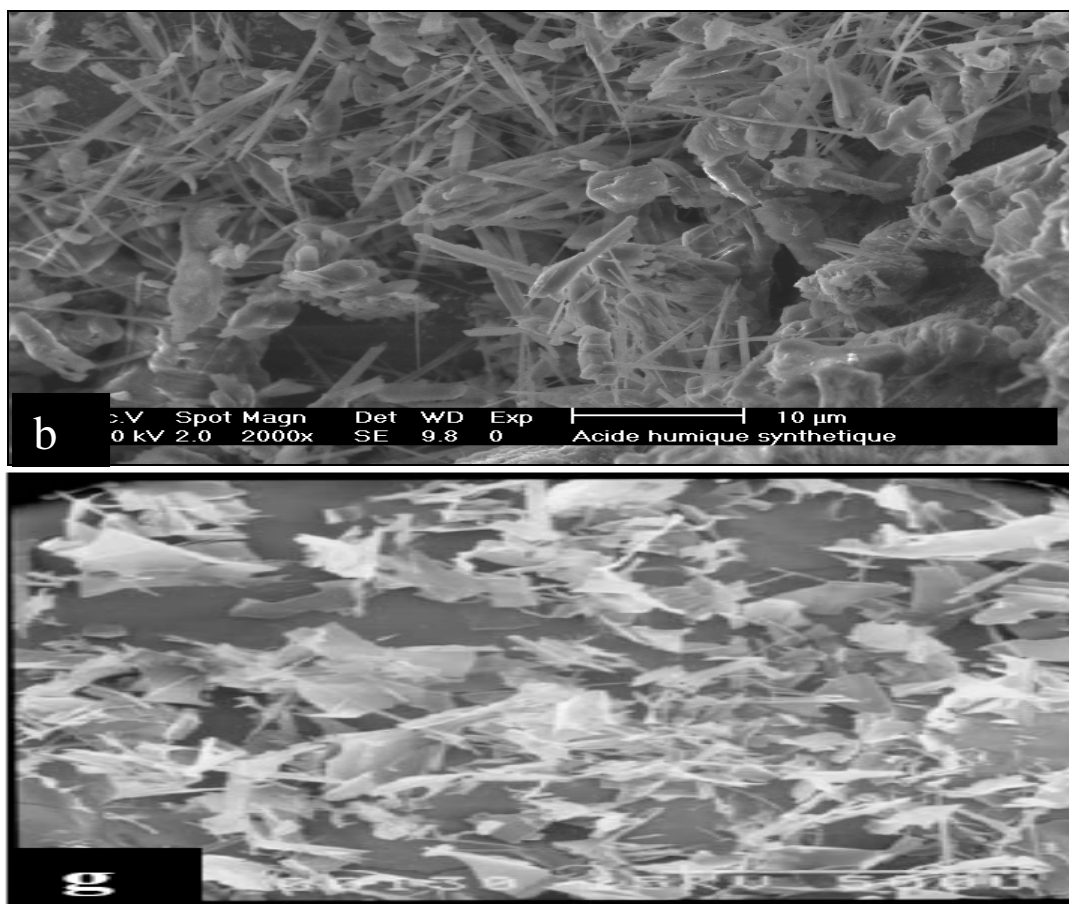


Figure 4. 10 : Comparaison entre AHs synthétique (b) et celui de référence (g) à fort grossissement.

Quant aux AHs du sol, les clichés (c, d et e) montrent bien leurs structures à faible grossissement. Nous remarquons la présence des agrégats rocheux chez les trois échantillons observés. A fort grossissement, les AHs naturels montrent une structure très condensée qui semble pouvoir se dérouler (clichés f, g' et h') comparativement à la structure globulaire, donc aromatique plus que aliphatique, obtenue par DAVIES (cliché h) sur un échantillon d'AH extrait aussi à partir du sol [4, 37].

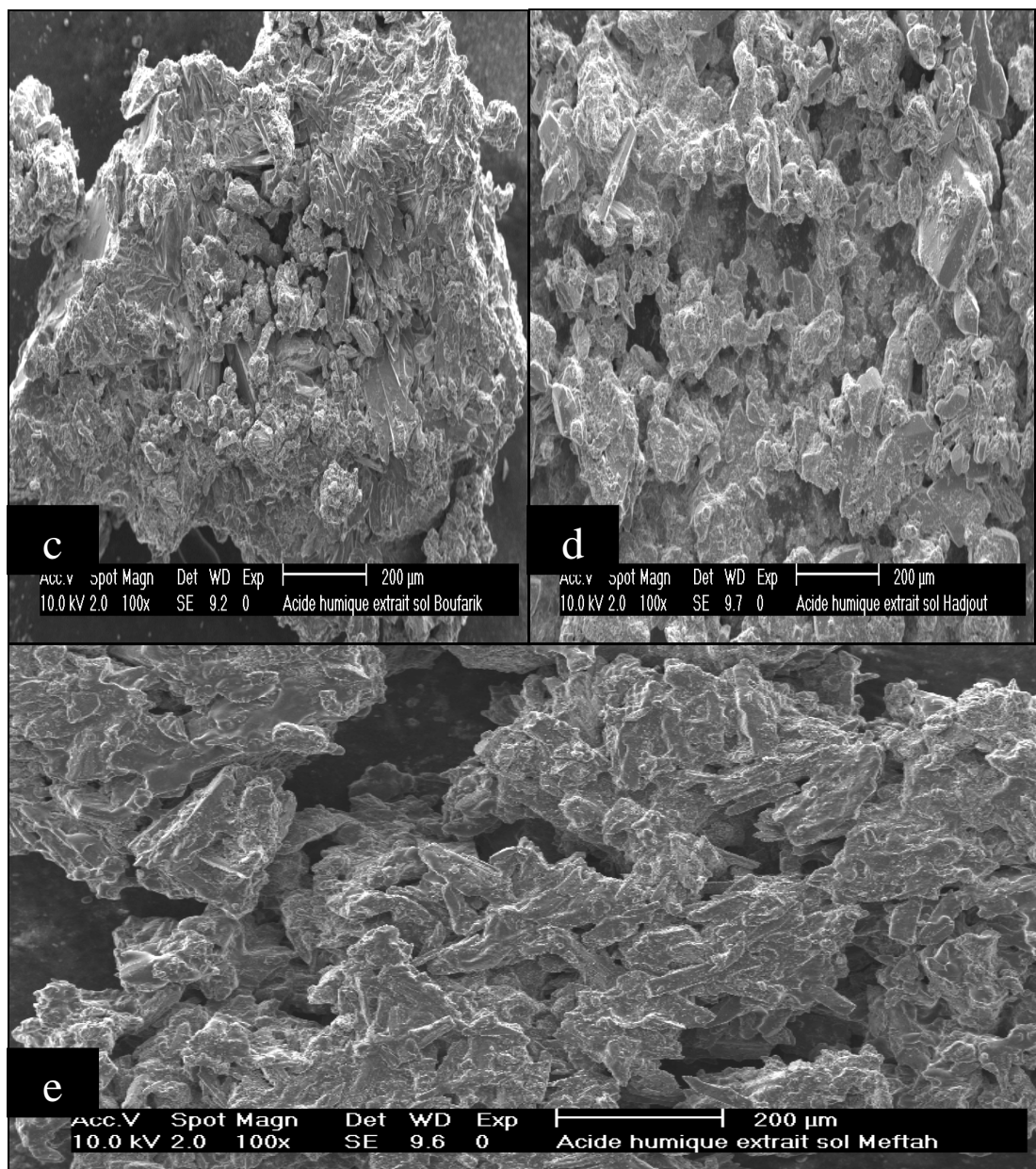


Figure 4. 11 : AHs extraits du sol à faible grossissement, AHNB (c), AHNH (d), AHNM (e).



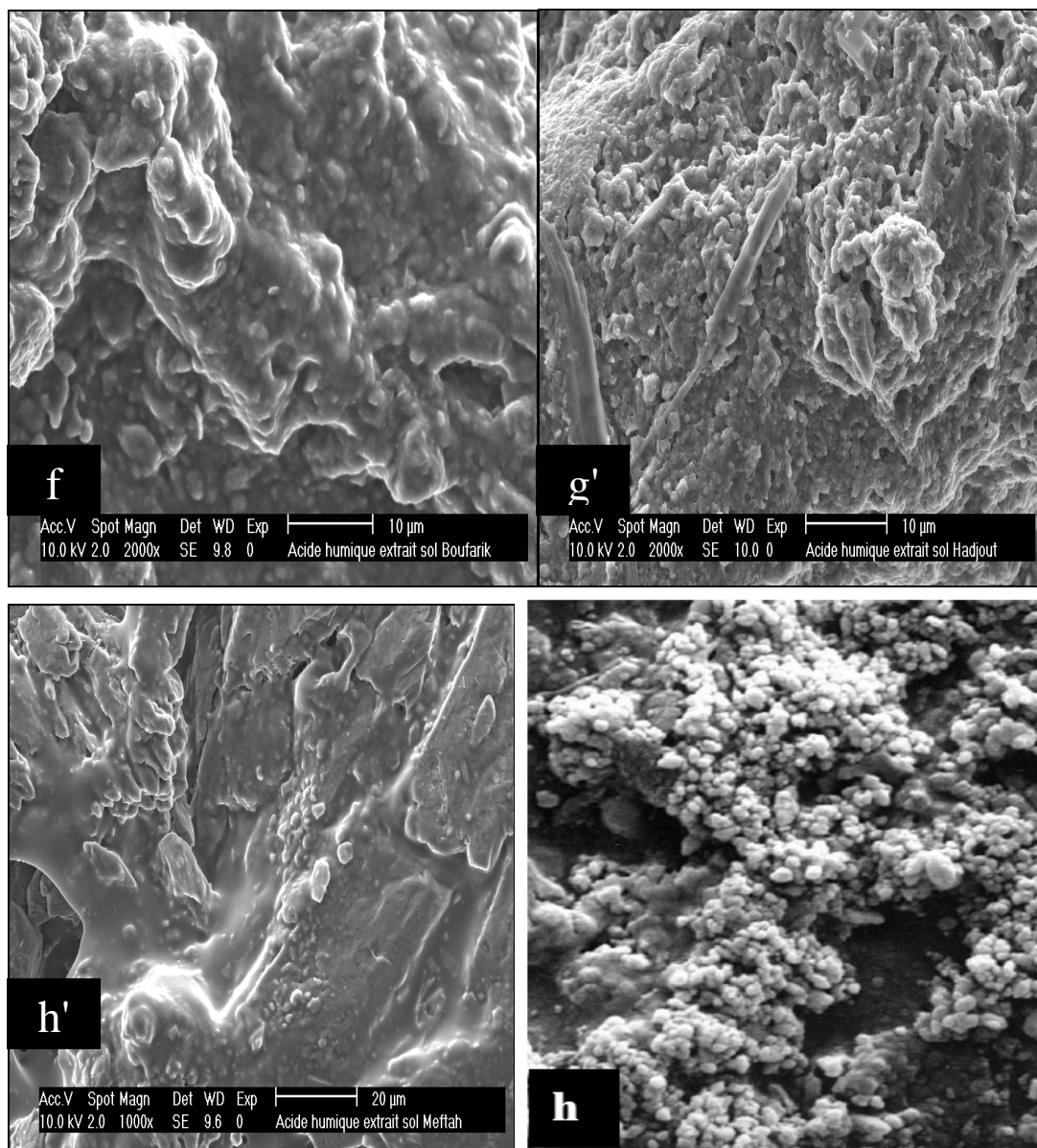


Figure 4. 12 : Comparaison entre les AHs extraits du sol. AHNB (f), AHNH (g'), AHNM (h') et AHs du sol de référence (h) à fort grossissement.

Une analyse globale, couplée à l'observation des échantillons par MEB, a permis d'obtenir les spectres des éléments majeurs présents sur les échantillons observés des AHs extraits du sol et AHS (figure 13, a, b, c et d).

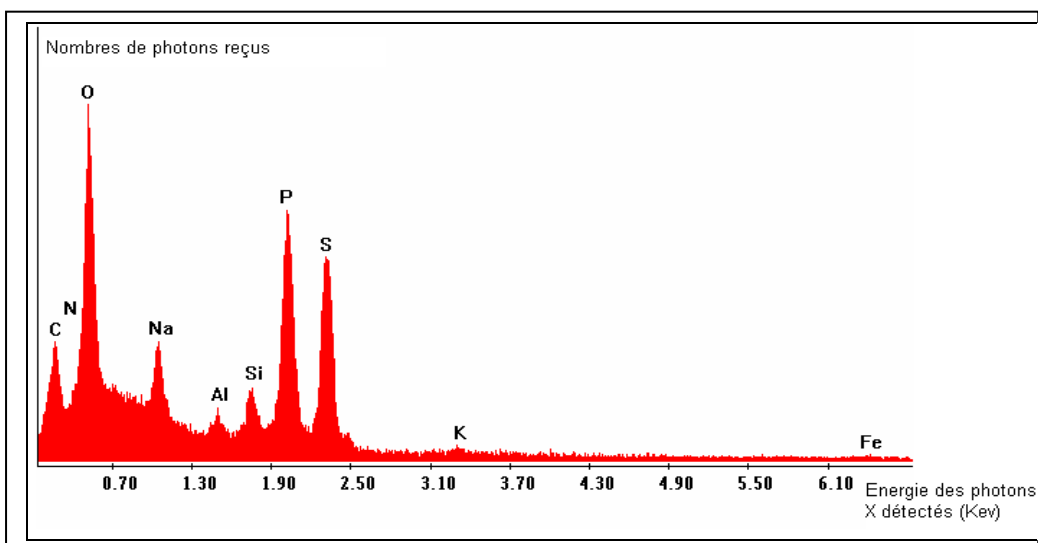


Figure 4. 13a : Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHNB.

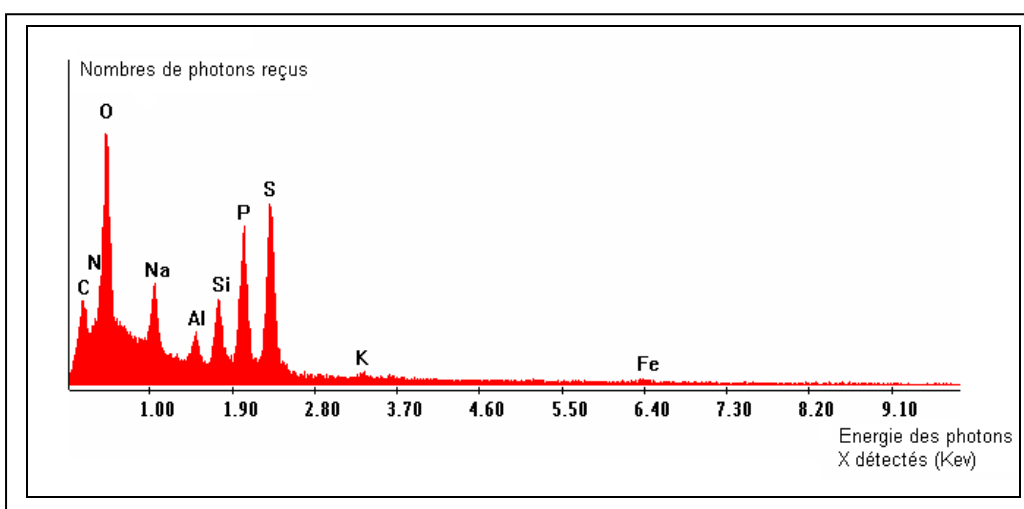


Figure 4. 13b : Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHNH.

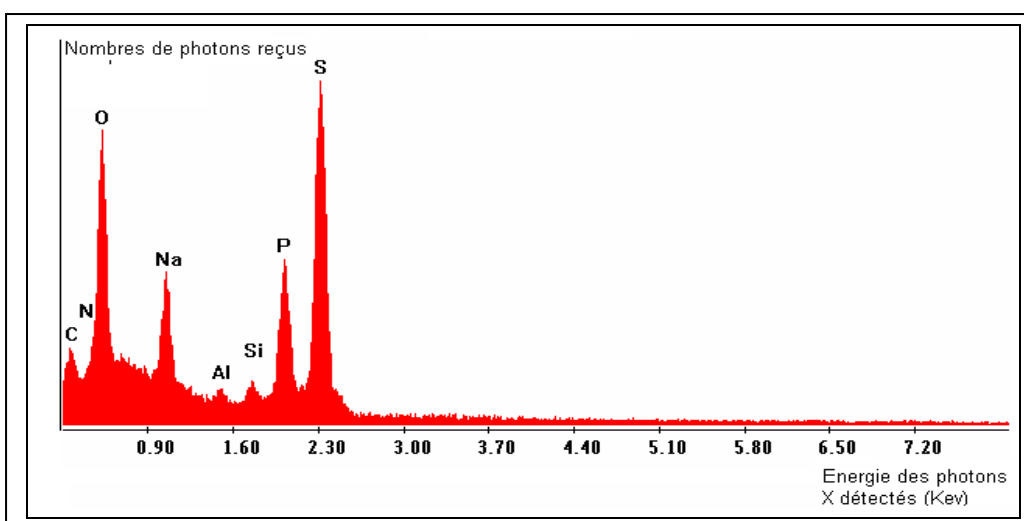


Figure 4. 13c : Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHNM.

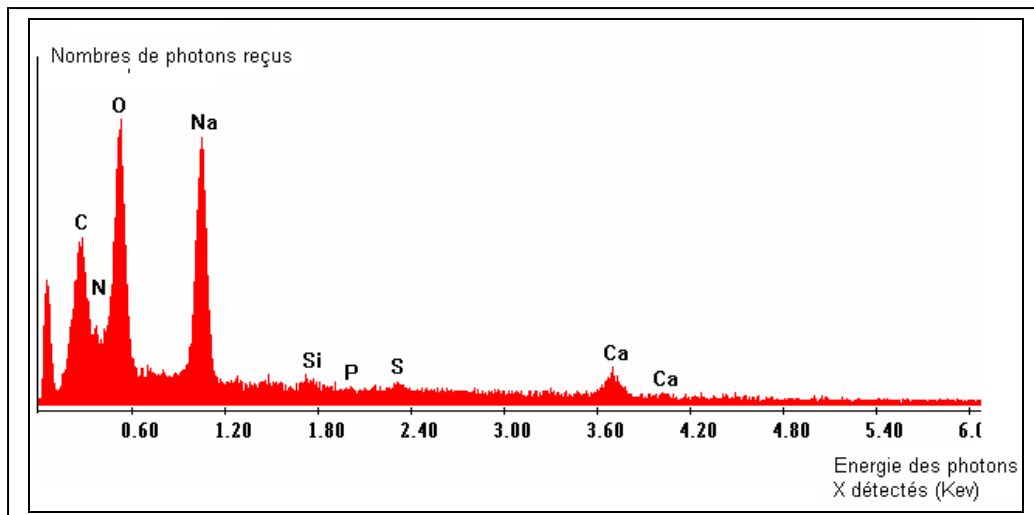


Figure 4.13d : Spectres d'éléments majeurs sur l'échantillon d'AHS.

Tableau 4. 3 : Pourcentage atomique approximatif des éléments majeurs.

	<b>AHNB</b>	<b>AHNH</b>	<b>AHNM</b>	<b>AHS</b>
Carbone(C)	39,52	32,38	30,40	65,64
Azote (N)	5,17	6,56	5,73	24,18
Oxygéné (O)	41,33	42,93	43,99	2,13
Sodium (Na)	2,82	3,93	5,81	1,2
Aluminium (Al)	0,67	1,34	0,56	0,63
Silicium (Si)	1,1	2,36	0,73	5,7
Phosphate (P)	4,75	4,15	3,63	-
Sulfate (S)	4,14	5,6	9,15	-
Potassium (K)	0,16	0,22	-	-
Fer (Fe)	0,34	0,52	-	-

Une nette différence dans le pourcentage atomique est enregistrée chez les deux types d'échantillons analysés (AHS et AHN) qui concernent les éléments majeurs détectés à la surface. Les éléments majeurs sont : C, N, O, Al, Si et Na.

Cependant, la présence du phosphore et du soufre est typique chez les AHs naturels avec un pourcentage atomique presque similaire dans les trois échantillons d'AHs extraits. Ceci est probablement dû au mode d'extraction appliquée en utilisant le pyrophosphate de sodium et l'acide sulfurique.

A cet effet, les résultats obtenus montrent bien la nécessité d'une étape complémentaire de purification d'AHs obtenus vis-à-vis les éléments révélés par la détection couplé par MEB.

Les techniques analytiques utilisées dans ce présent travail ont confirmé l'obtention des substances humiques de nature "**Acides Humiques**" basant sur l'observation morphologique faite par MEB, le rapport de WELT ( $E_{465}/E_{665} < 5$ ) et la présence de différents groupements fonctionnels caractéristiques des acides humiques extraits. Toutefois, cette caractérisation préliminaire montre des différences dans les propriétés de ces substances semble être liées à la nature des groupements fonctionnels qui sont issus suite d'une humification caractéristique de chaque type d'AHs.

## 4. 2 Isolement et sélection des souches performantes

### 4. 2. 1 Isolement et sélection des microorganismes mycéliens

L'isolement par la méthode classique de SD sur milieu Czapek pour les champignons et la méthode d'adaptation sur milieu ISP2 à base d'AHS pour les actinomycètes (photo en APPENDICE B), a permis d'isoler 22 champignons et 19 actinomycètes. Les isolats de champignons obtenus sont répartis comme suit : 7 de Boufarik, 8 de Hadjout et 7 de Meftah. Les souches d'actinomycètes sont : 6 de Boufarik, 8 de Hadjout et 5 de Meftah.

Toutes les souches isolées ont été testées pour la biodégradation et les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 14 à 4. 19.

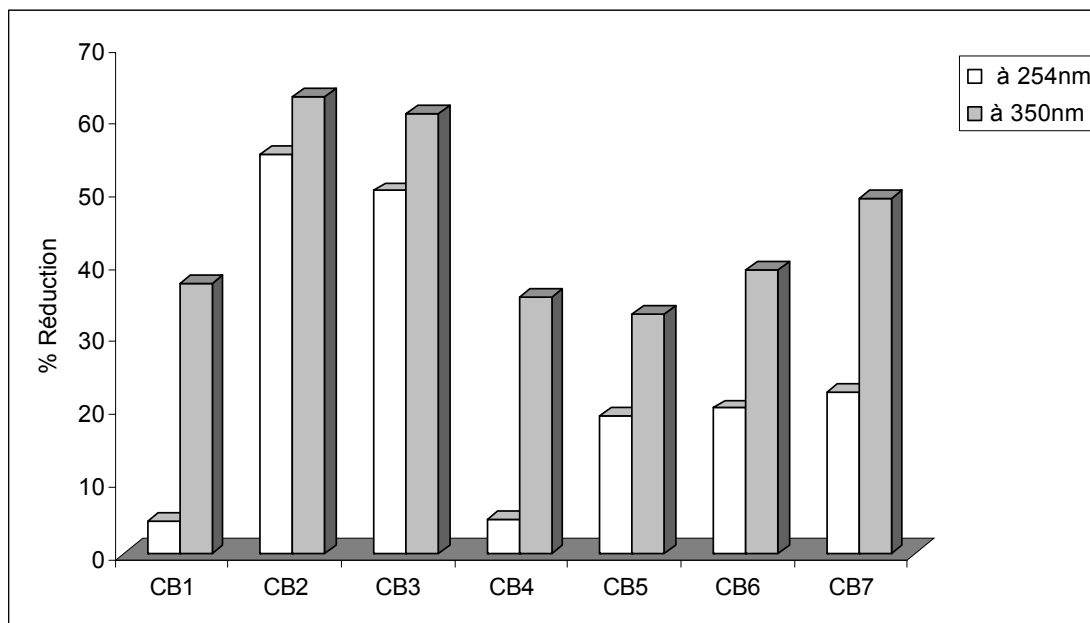


Figure 4. 14 : Réduction d'AHS par les champignons du sol de Boufarik.

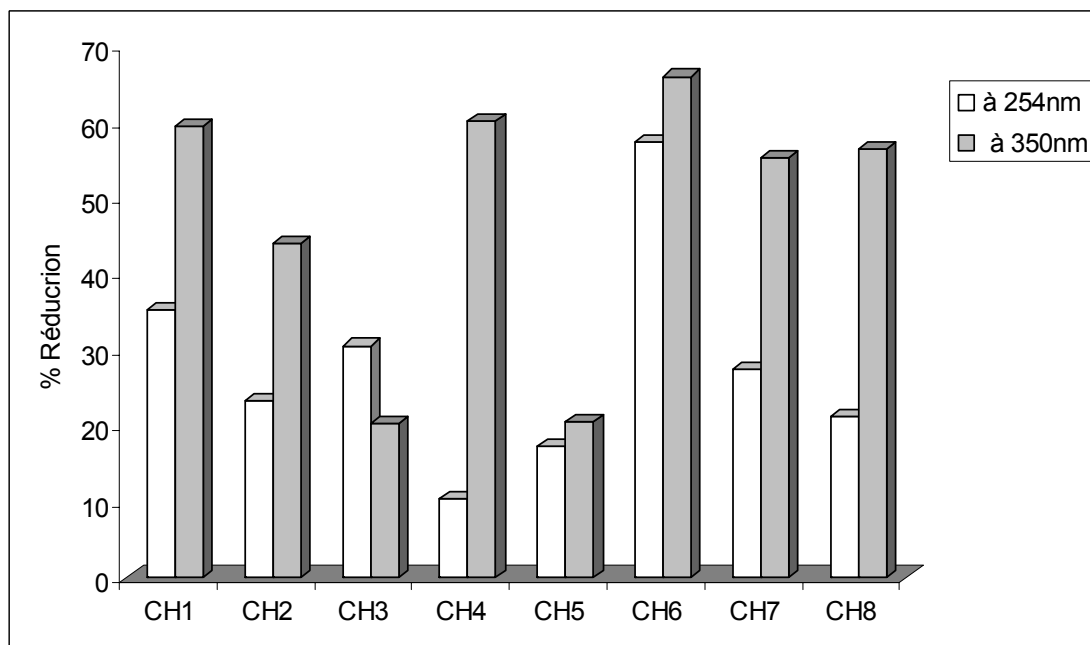


Figure 4. 15 : Réduction d'AHS par les champignons du sol de Hadjout.

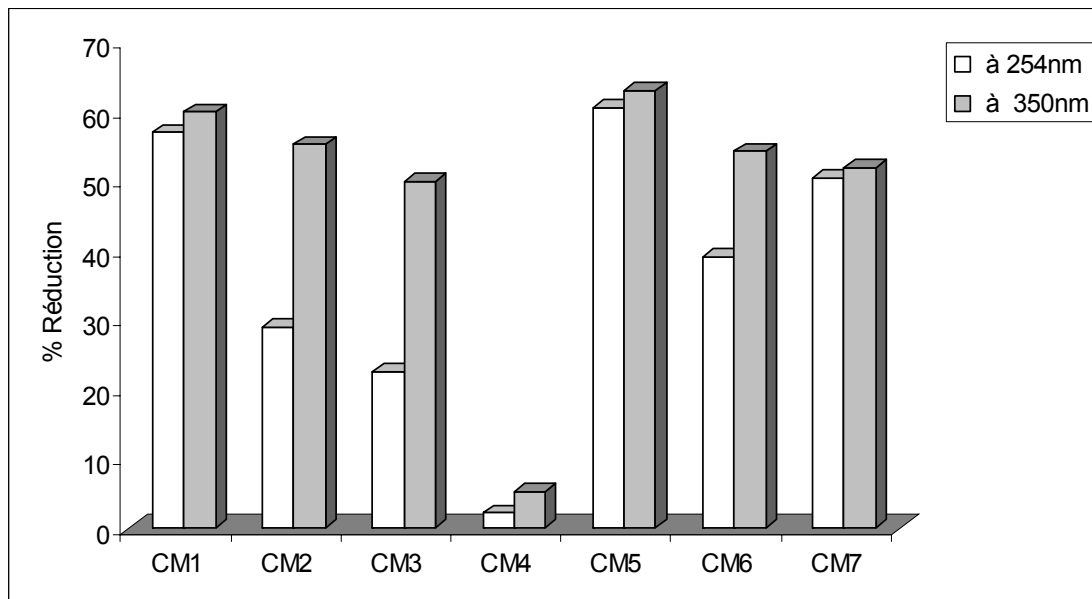


Figure 4. 16 : Réduction d'AHS par les champignons du sol de Meftah.

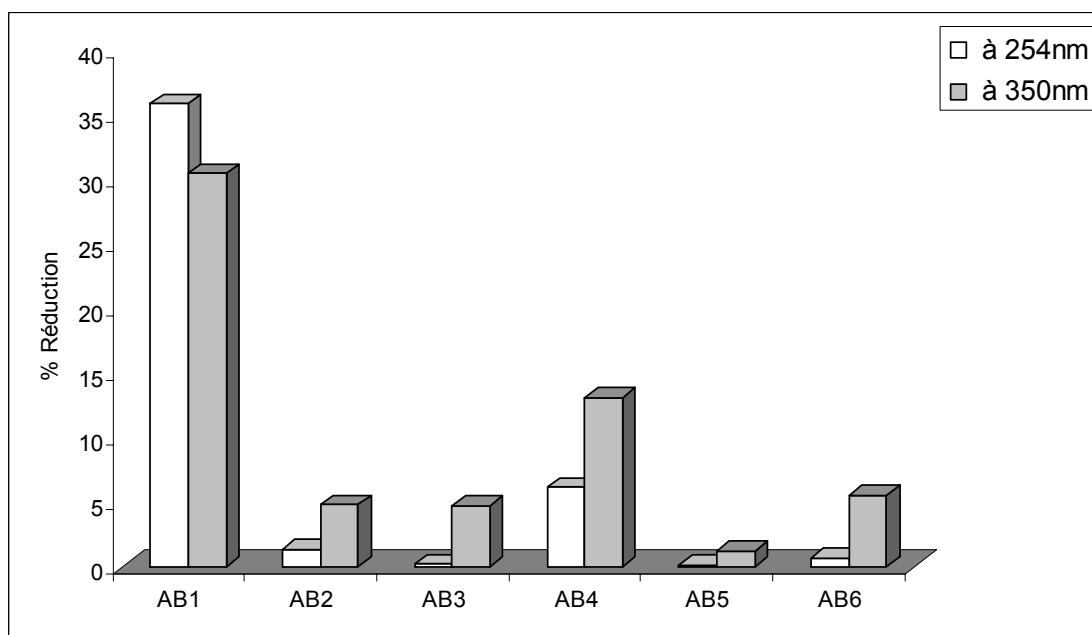


Figure 4. 17 : Réduction d'AHS par les actinomycètes du sol de Boufarik.

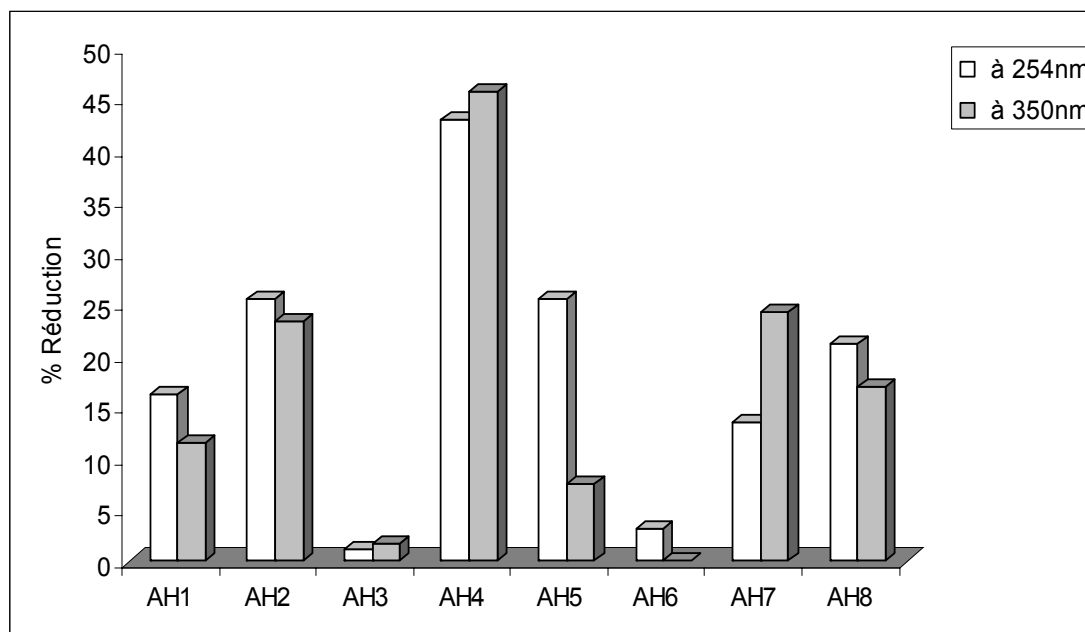


Figure 4. 18 : Réduction d'AHS par les actinomycètes du sol de Hadjout.

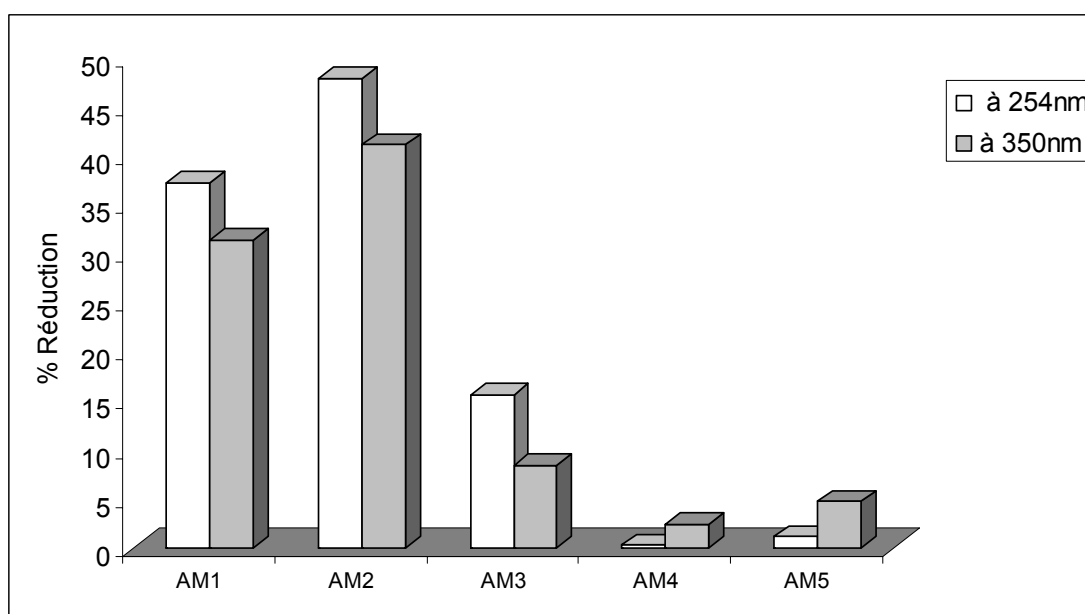


Figure 4. 19 : Réduction d'AHS par les actinomycètes du sol de Meftah.

Une bonne activité de la dégradation a été remarquée chez les champignons où le taux de la réduction estimé à 350 nm atteint 65%, en particulier chez les deux souches CB2 et CB3 de Boufarik et qui est très important aussi à 254 nm ( $\approx$  55%). Le taux de la réduction, de l'ordre de 55 à 67% à 350 nm, est très intéressant chez les souches de Hadjout (CH6, CH4, CH1, CH8 et CH7, par ordre décroissant). Mais, à 254 nm, l'élimination d'AHS était relativement faible qui ne dépassant pas 57%.

Chez les souches de Meftah, l'élimination des AHS était importante arrivant autour de 60% surtout pour les souches CM5 suivie par CM1, dans les deux longueurs d'ondes.

Une réduction modérée du milieu après trois semaines d'incubation a été enregistrée chez les isolats des actinomycètes. Elle atteint 30 et 48% à 350 et 254nm respectivement.

Cette estimation analytique par UV-visible a conduit à la sélection de six souches performantes. Le pourcentage et la rapidité de la réduction ainsi que l'origine de la souche ont permis de retenir trois champignons et trois actinomycètes. Les souches retenues sont :

- Les champignons : CB2 de Boufarik, CH6 de Hadjout et CM5 de Meftah.
- Les actinomycètes : AB1 de Boufarik, AH4 de Hadjout et AM2 de Meftah.

Ces souches ont été sélectionnées pour la poursuite de l'étude qui porte sur le mode d'utilisation des AHs comme étant une source de carbone et/ou d'azote.

#### 4. 2. 2 Sélection du consortium microbien

Les résultats de la sélection d'un consortium microbien sont représentés dans la figure 4. 20. ils montrent que, à 254 et 350nm, la biodégradation des AHS en présence de consortium microbien de l'EBl<sub>30</sub> est plus rapide et très intéressante, elle atteint 57% à la troisième semaine. Du même titre qu'avec l'EBl<sub>60</sub>, la biodégradation est rapide et même importante (55%), alors qu'avec l'EBl<sub>7</sub>, une faible dégradation a été enregistrée (37%).



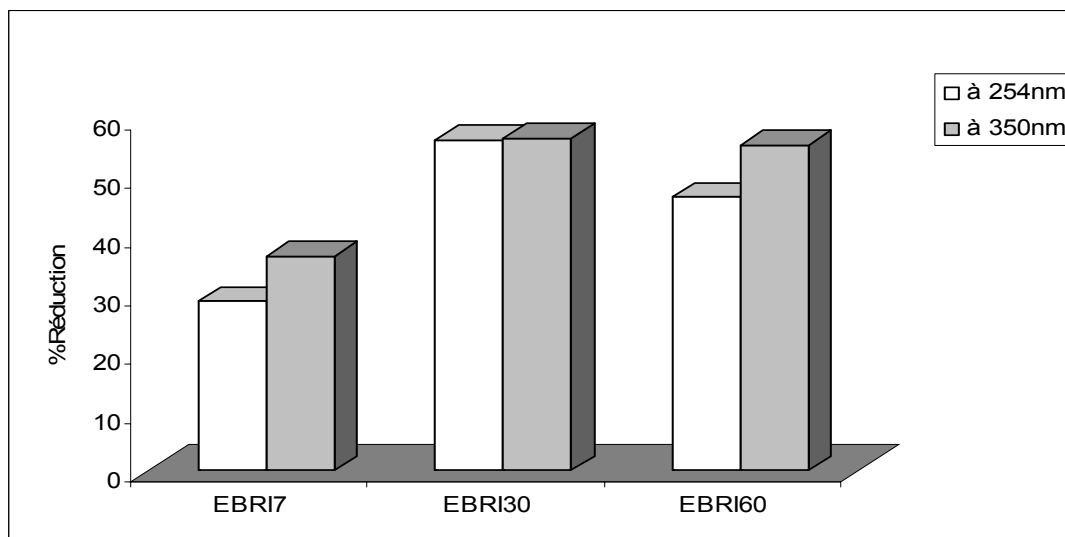


Figure 4. 20 : Décoloration et dégradation d'AHS par les consortiums microbiens de la betterave rouge.

Cette différence dans l'activité du consortium est liée à la formation d'une biomasse qui par la suite donnera un bon démarrage de la croissance bactérienne puis la biodégradation. Ainsi qu'une forte croissance, traduisant par une bonne formation de biomasse, favorise la dégradation totale de la Bétanine (photo 4. 1).

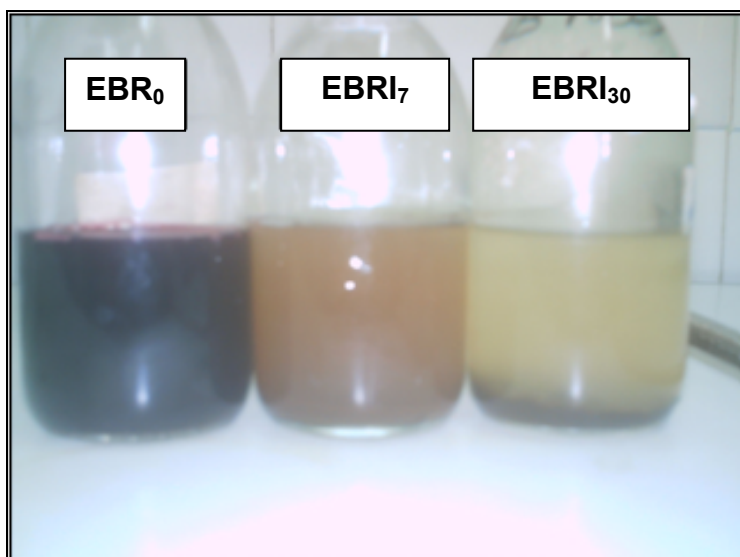


Photo 4. 1: Biodégradation de la Bétanine de l'extrait de la betterave rouge.

Avec : **EBR<sub>0</sub>** : Extrait Brute de Betterave rouge à temps=0.

**EBRI<sub>7</sub>** : Extrait de Betterave Incubée 7 jours.

**EBRI<sub>30</sub>** : Extrait de Betterave Incubée 30 jours.

### 4. 3 Identification des souches performantes

#### 4. 3. 1 Identification des champignons

Les observations macroscopiques sont visualisées sur les photos 4.2 et 4. 3 pour CB2 de Boufarik, 4. 4 et 4. 5 pour CH6 de Hadjout et 4. 6 et 4. 7 pour CM5 de Meftah.

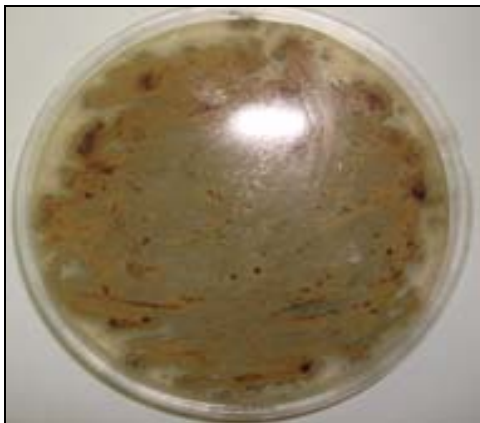


Photo 4.2 : Aspect de MS du substrat de CB2. Photo 4.3 : Thalle de la souche CB2.



Photo 4.4 : Aspect de MS de la souche CH6. Photo 4.5 : Thalle de la souche CH6.



Photo 4.6 : Aspect de MS de la souche CM5. Photo 4.7 : Thalle de la souche CM5.

Les observations microscopiques sont aussi visualisées sur les photos 4. 8, 4. 9 et 4. 10. Dans ces photos le mycélium est nettement cloisonné.



Photo 4. 8 : Observation microscopique à 100 fois de CB2 de Boufarik.

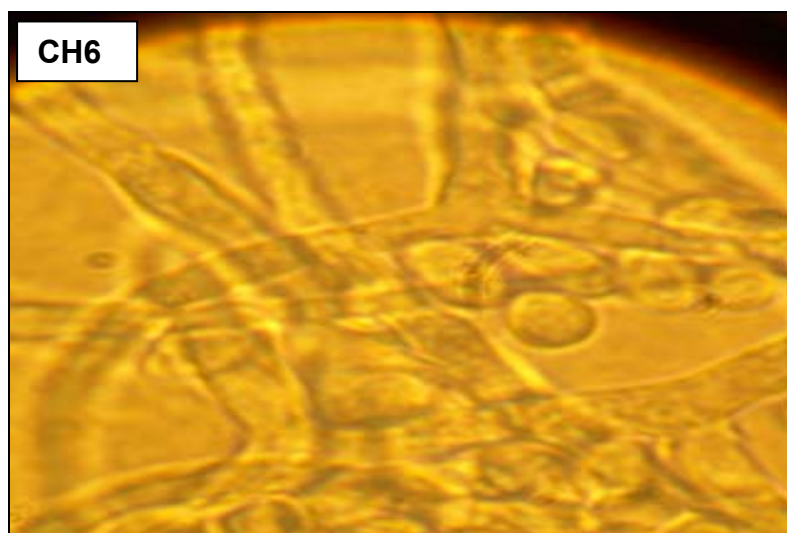


Photo 4. 9 : Observation microscopique à 100 fois de CH6 de Hadjout.

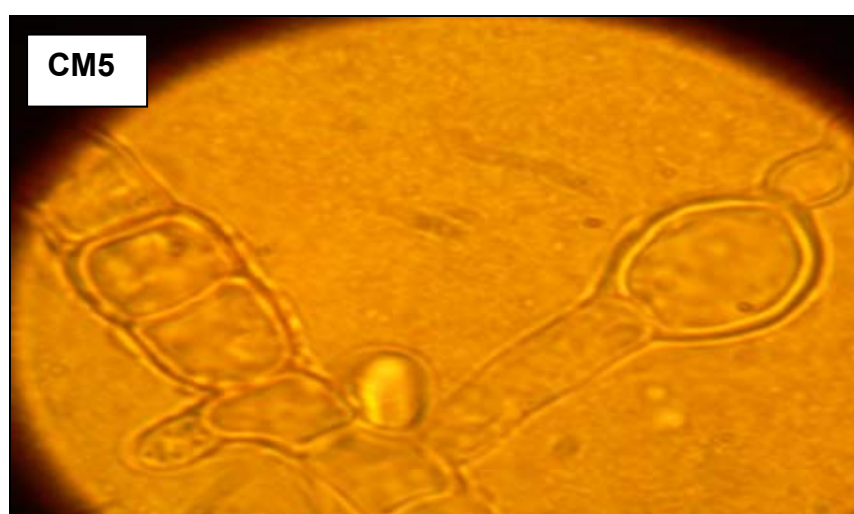


Photo 4. 10 : Observation microscopique à 100 fois de CM5 de Meftah.

Le tableau (4. 4) résume les caractères culturaux des trois souches performantes de champignons.

Tableau 4. 4 : Caractérisation macromorphologique des champignons.

Caractères Souches	Vitesse de croissance	Texture du thalle	Couleur du thalle	Couleur de reverse	Odeur
<b>CB2 de Boufarik</b>	Rapide (3 jours)	Véloute	Blanc virre au vert foncé	Marran foncé	Sans
<b>CH6 de Hadjout</b>	Moyenne (4-5 jours)	Conttonneux plat	Blanc	Marran claire	Sans
<b>CM5 de Meftah</b>	Rapide (3-4 jours)	Conttonneux sur éleve	Blanc	Marran très claire	Sans

Les caractéristiques micromorphologiques sont décrits dans les paragraphes suivants :

**CB2** : Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule, phialides formées directement sur les vésicules (têtes conidiennes bisériées), conidies sèches, en chaîne divergentes ou associées en colonnes compactes, unicellulaires globuleuses, sub-globuleuse ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en, brun ou vert. Cellules à paroi épaisse et les sclérotés parfois présents.

**CH6** : Le mycélium de CH6 cloisonné portant des conidiophores lisses, conidies en chaînes ramifiées irrégulières.

**CM5** : Thalle portant des conidiophores parfois très ramifiés formant des coussinets (sporodochies) et portant des masses de spores d'aspect gras. Phialides plus au moins allongées pouvant produire deux types de conidies, des macroconidies fusiformes, souvent courbées, pluriséptées, avec

une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon, des microcondies petites fusiformes ou ovoïdes. Chlamydozoospores présentes ou absentes, terminales ou intercalaires, différenciées par le mycélium ou par les conidies.

La caractérisation macro et microscopique ont permis de rattacher les deux souches aux genres suivants : *Aspergillus sp* (CB2) et *Fusarium solani* (CM5).

Les caractères macro et micromorphologiques déterminés pour la souche CH6 de Hadjout ne permettent pas de rattacher cette souche à aucun genre. Elle nécessitera une étude plus approfondie pour son identification. Elle est nommée **Non-identified strain CH6**.

#### 4. 3. 2 Identification des actinomycètes

Les observations macroscopiques sont visualisées sur les photos 4. 11 et 4. 12 pour la souche AB1 de Boufarik, 4. 13 et 4. 14 pour la souche AH4 de Hadjout et 4. 15, 4. 16 pour la souche AM2 de Meftah.

L'isolat AB1 et AH4 ont la particularité d'avoir une croissance assez rapide (4 jours) et moyennement pour AM2 (5- 6 jours). La croissance est meilleure sur milieu ISP9 et ISP2. Le mycélium aérien de couleur jaune pour AB1 et AH4 par contre la couleur de mycélium du substrat de la souche AB1 marron foncé que AH4 (marron clair). Le mycélium aérien de la souche AM2, de couleur blanche et une marron claire de reverse.



Photo 4. 11 : Mycélium du substrat de la souche AB1.



Photo 4. 12 : Mycélium aérien de la souche AB1.



Photo 4. 13 : Mycélium du substrat de la souche AH4.



Photo 4. 14 : Mycélium du substrat de la souche AH4.



Photo 4. 15 : Mycélium du substrat de la souche AM2.



Photo 4.16 : Mycélium aérien de la souche AM2.

L'observation microscopique du mycélium aérien a permis de distinguer les chaînes de spores exogènes (flexibles ou en crochés) chez les trois souches d'actinomycètes (Photos 4. 17, 4. 18 et 4. 19).



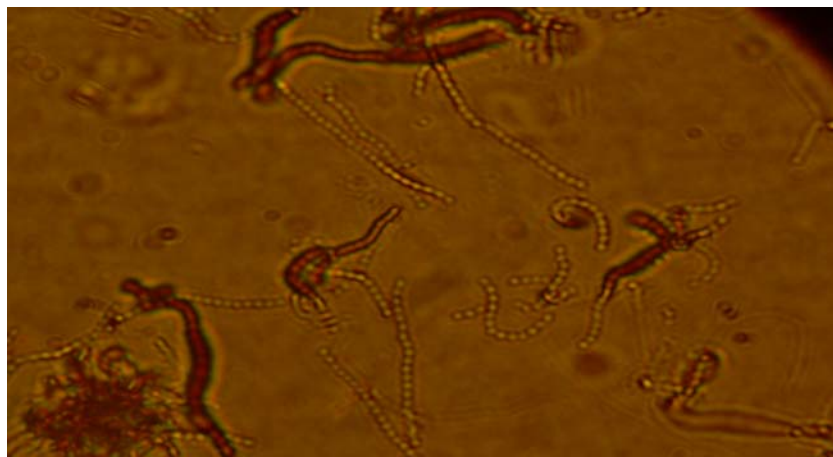


Photo 4. 17 : Spores exogènes sur le MA de la souche AB1.

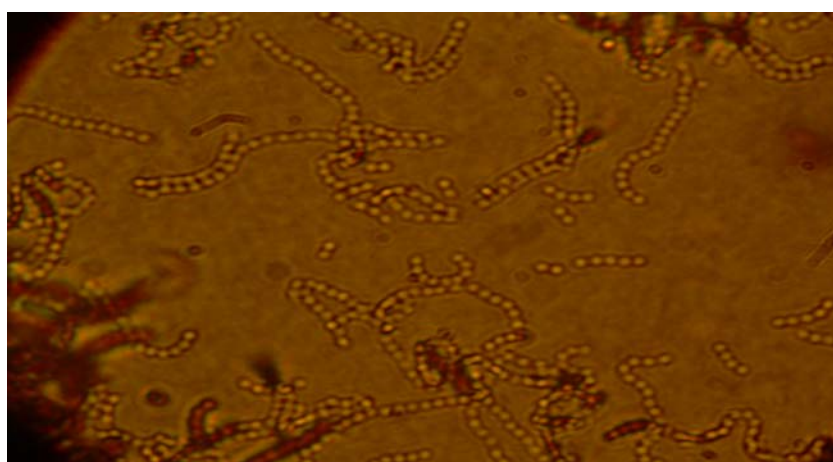


Photo 4. 18 : Spores exogènes sur le MA de la souche AH4.

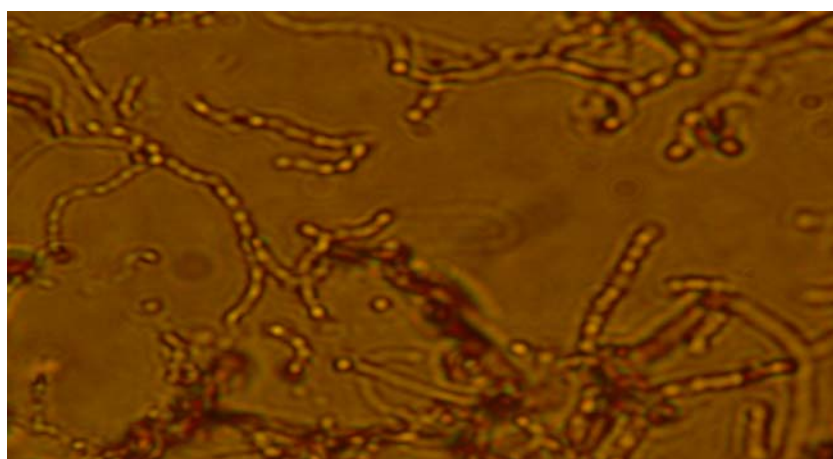


Photo 4. 19 : Spores exogènes sur le MA de la souche AM2.

La chromatographie sur couche mince (CCM) (Phto en APPENDICE B) a mis en évidence l'existence de l'isomère LL de l'DAP chez les trois souches d'actinomycètes.



La caractérisation morphologique et la détection de l'isomère LL de l'DAP chez les trois souches d'actinomycètes ont permis le rattachement de ces souches au genre ***Streptomyces***.

#### 4. 4 Biodégradation des acides humiques

##### 4. 4. 1 Biodégradation des AHs synthétiques (AHS)

###### 4. 4. 1. 1 Par les champignons

###### o Visualisation de la biodégradabilité et la croissance

Les deux phénomènes sont bien éclaircis sur les photos présentées en APPENDICE C.

Après quatre semaines d'incubation, on a enregistré un changement de couleur de milieu du marron foncé vers un milieu claire incolore. Ainsi que une importante formation de la biomasse qu'indique la bonne croissance des souches.

Des constatations d'ordre général ont été mises selon la nature de la source de carbone et d'azote, l'influence de l'agitation ainsi que la souche utilisée :

- Effet positif de l'agitation sur la décoloration du milieu et la formation de la biomasse dans les différents milieux;
- Croissance très rapide dans le milieu complet contenant un substrat assimilable;
- Teinture du mycélium avec du marron y compris le mycélium blanc des souches CM5 et CH6;
- Eclaircissent et limpidité des différents milieux à la fin de la quatrième semaine d'incubation;
- Formation moindre de la biomasse dans les cultures non agitées.

Cette décoloration du milieu de culture est en relation avec l'élimination des AHs présents dans le milieu initial. La diminution de la concentration des

AHs dans le milieu est liée à deux phénomènes qui peuvent manifester, la biosorption et la biodégradation souvent signalés par plusieurs auteurs [29, 103].

Le suivi de la cinétique de la biodégradation a été établi dans les différents milieux où les AHs représentent les sources uniques de carbone et/ou d'azote.

- Dans le milieu complet (MC)

Dans ce milieu le saccharose représente la source énergétique initiale pour démarrer la croissance des champignons. La cinétique de la biodégradation dans ce milieu a été suivie par les mesures en deux longueurs d'onde, à 254 et à 350 nm et les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans les figures 4. 21 à 4. 24.

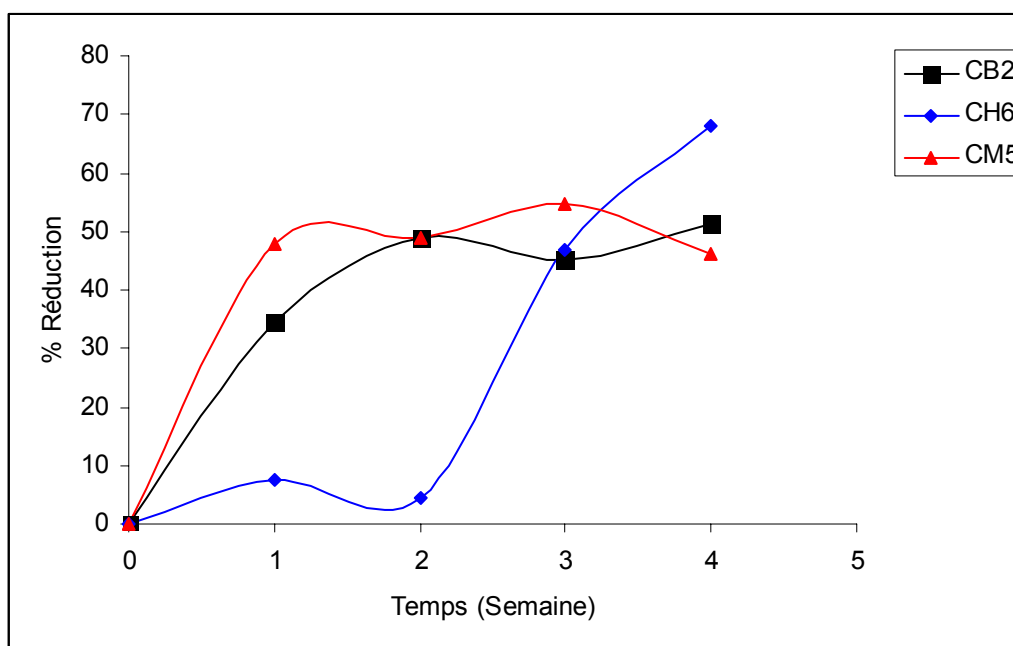


Figure 4. 21 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC agité à 254 nm.

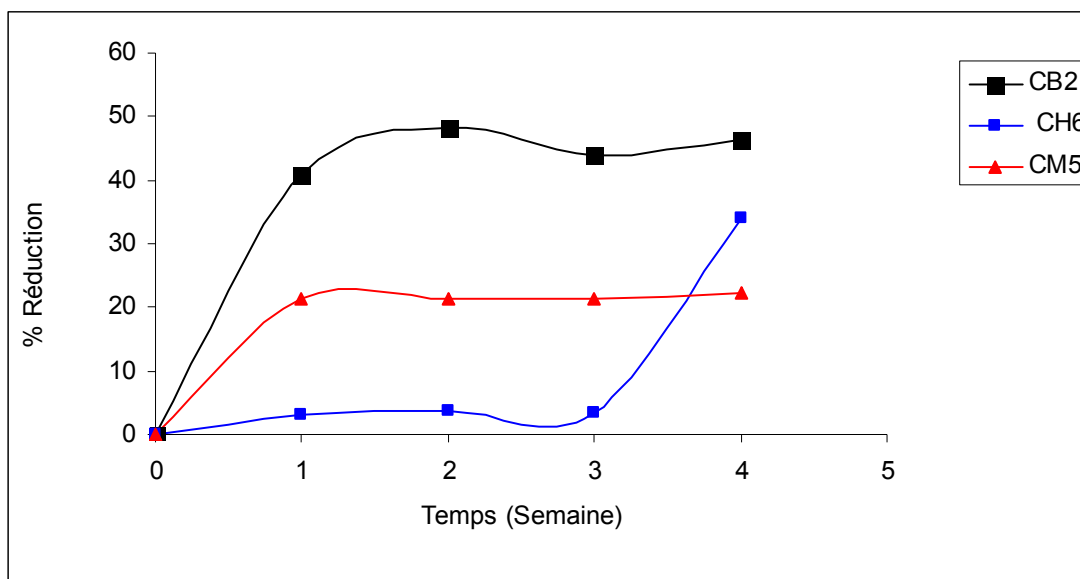


Figure 4. 22 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC statique à 254 nm.

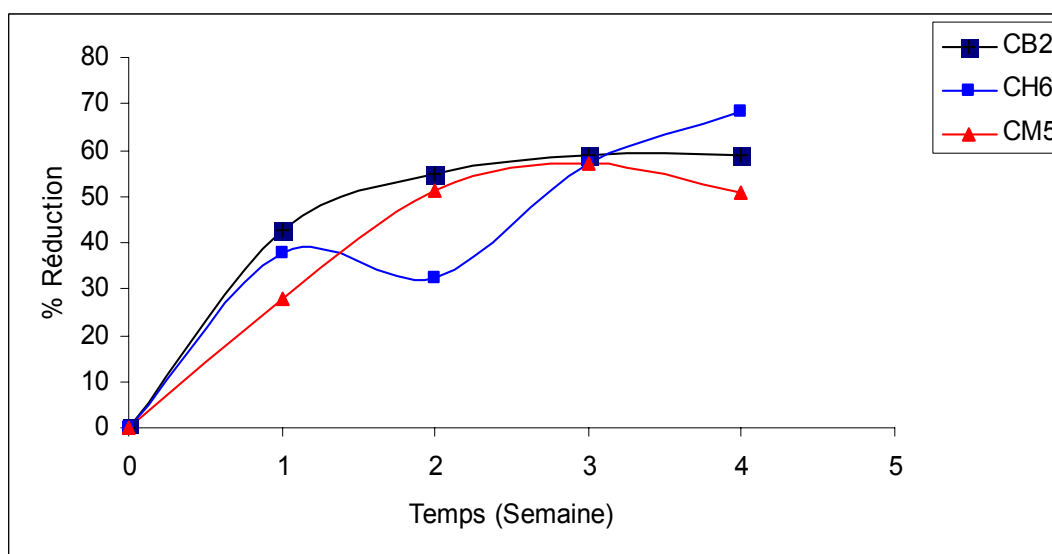


Figure 4. 23 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC agité à 350 nm.

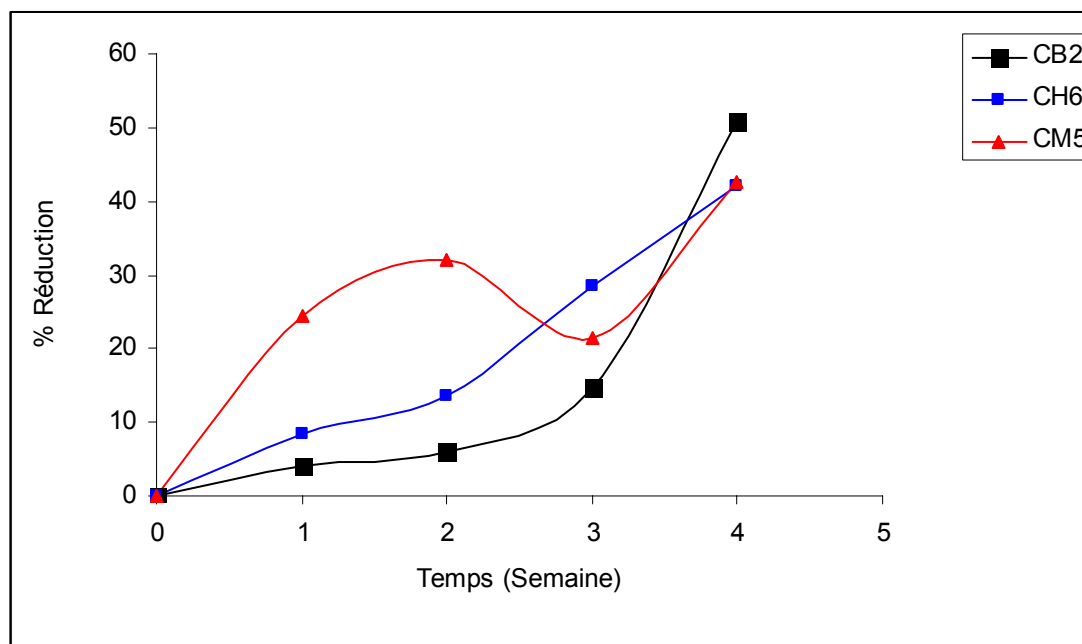


Figure 4. 24 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MC statique à 350 nm.

Une bonne élimination d'AHS, autour de 50 à 70% a été obtenue après quatre semaines d'incubation chez la totalité des souches étudiées, particulièrement, avec les cultures agitées. L'effet améliorant de l'agitation sur la biodégradation des AHs a été signalé par plusieurs auteurs [29, 124]. Ils suggèrent que l'activité microbienne est stimulée par l'effet du contact permanent du substrat avec le germe microbien et, surtout la suffisance d'oxygène pour ces souches aérobies stricts.

Une augmentation et une diminution dans le pourcentage d'élimination d'AHS ont été enregistrées par les mesures à 350 nm et 254 nm. Cette fluctuation semble être due à l'adsorption des molécules humiques sur les mycéliums : à titre d'exemple cette adsorption est importante à la deuxième semaine d'incubation par la souche CM5 de Meftah en culture statique à 350nm et puis, on observe une désorption des acides humiques dans la troisième semaine d'incubation.

L'adsorption des molécules humiques sur les cellules peut se comprendre car, dans la nature, les acides humiques se trouvent sous formes

de composés insolubles associés aux cations métalliques ou aux colloïdes minéraux [103, 124, 125, 126].

Un retard dans la biodégradation a été remarqué chez la souche CH6 et d'un degré moindre chez la souche CB2 surtout dans le milieu non agité.

▪ Dans le milieu  $M_{PC}$

Dans ce milieu les AHs représenteraient la source de carbone en quantité majeure vis-à-vis le saccharose qu'était ajouté pour accélérer la croissance. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 25 à 4. 28.

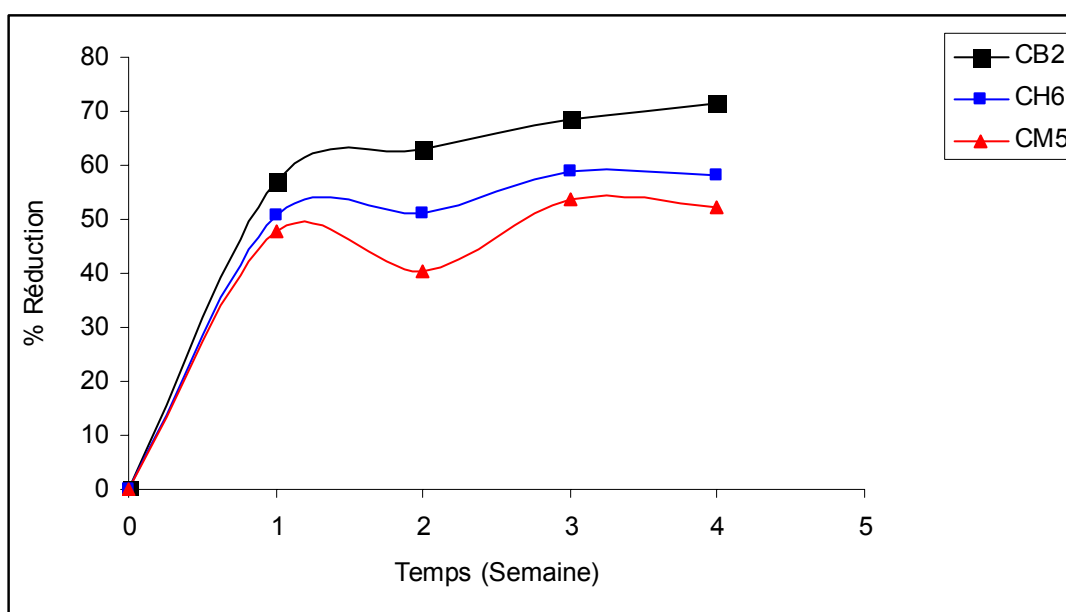


Figure 4. 25 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PC}$  agité à 254 nm.

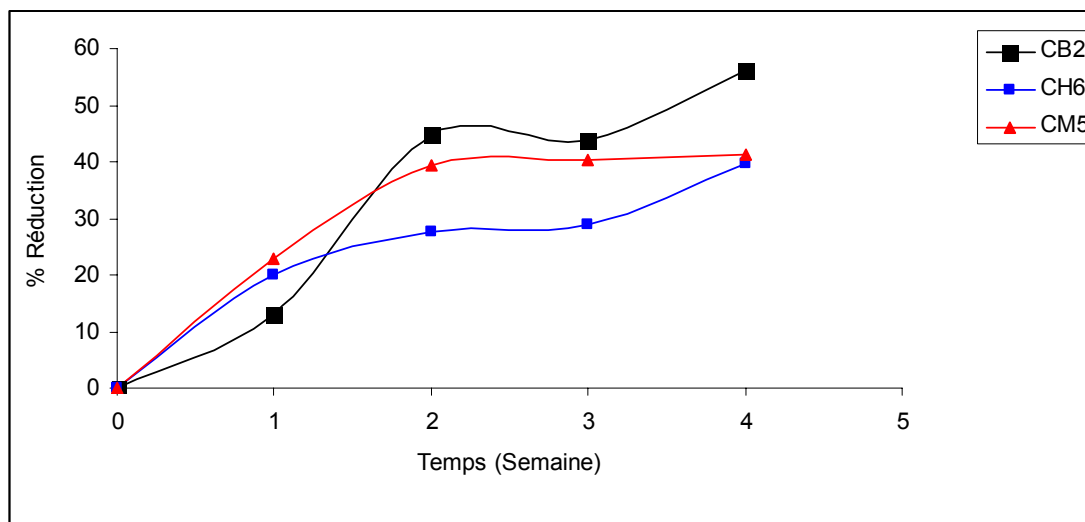


Figure 4. 26 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MPC statique à 254 nm.

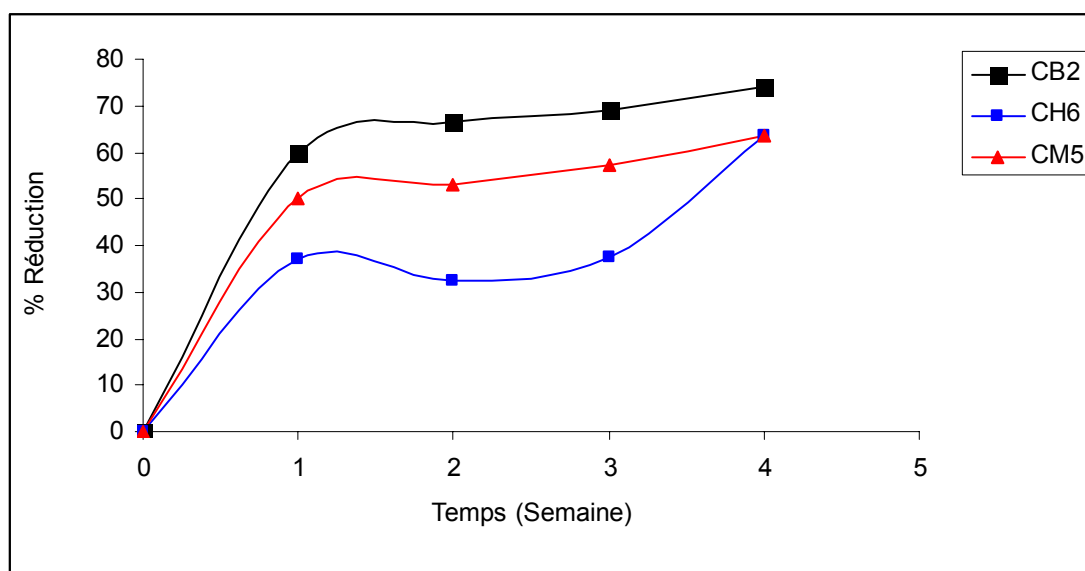


Figure 4. 27 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un MPC agité à 350 nm.

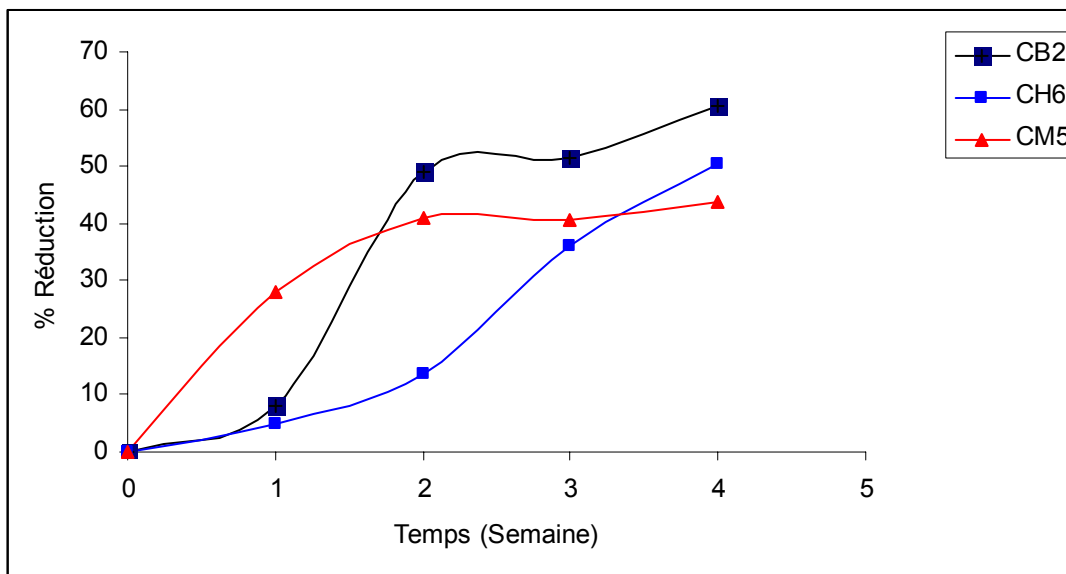


Figure 4. 28 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PC}$  statique à 350 nm.

Lorsque les AHS sont utilisés comme seules sources de carbone dans le milieu de culture, la diminution de la teneur en AHS est importante, varie entre 40 à 75%. Le taux d'élimination s'améliore entre 60 à 75% et 42 à 60% avec ou sans agitation respectivement, en particulier à 350 nm. Il faut signaler aussi une rapidité de réduction pour toutes les souches à savoir la CH6 et la CB2 qu'ont récupérés le retard engendré dans le MC non agitée.

- Dans le milieu  $MC_{PN}$

Dans ce milieu l'AHS représenteraient la source d'azote en quantité majeure vis-à-vis le  $NaNO_3$  qu'était ajouté pour accélérer la croissance. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 29 à 4. 32.

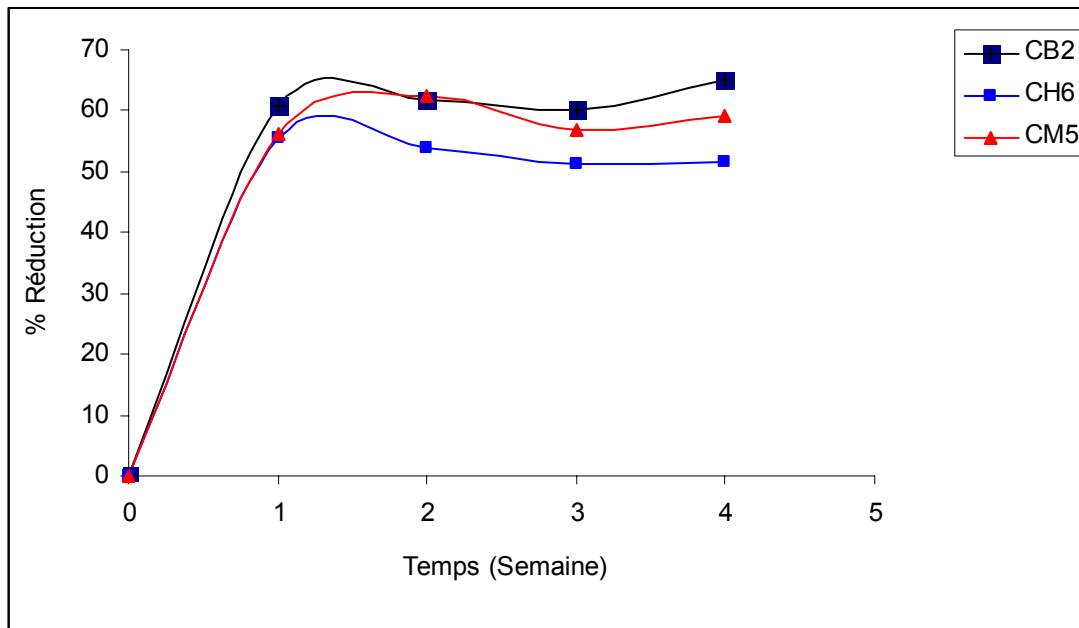


Figure 4. 29 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M<sub>PN</sub> agité à 254 nm.

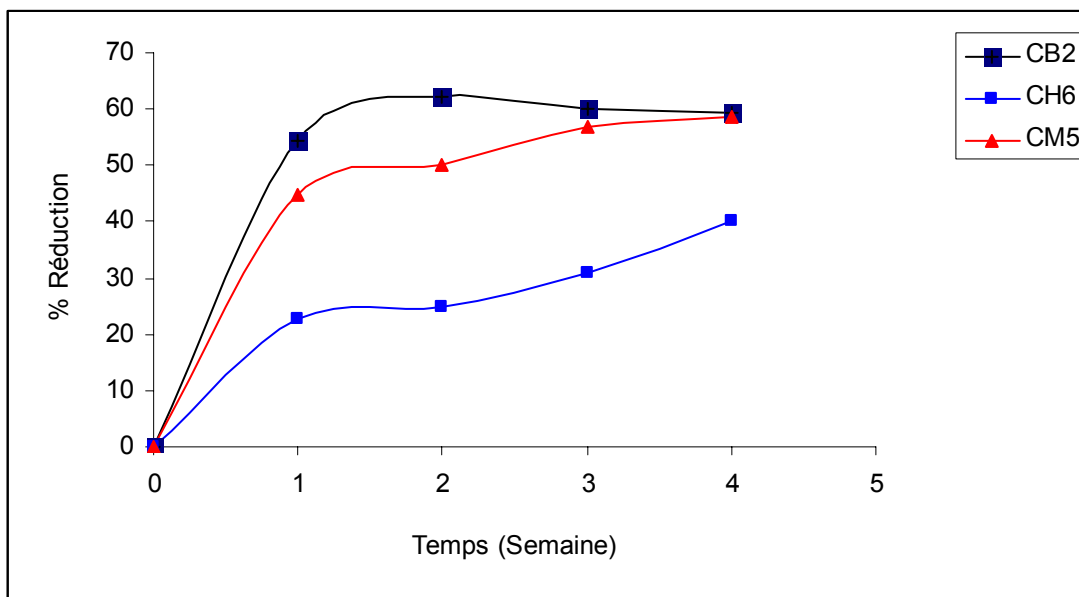


Figure 4. 30 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un M<sub>PN</sub> statique à 254 nm



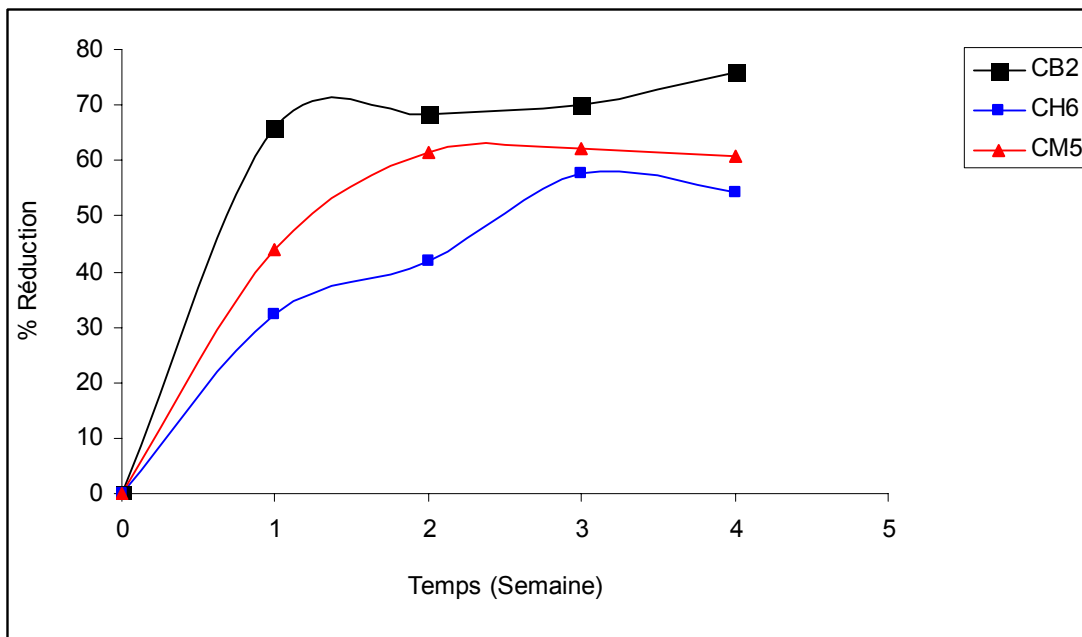


Figure 4. 31 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PN}$  agité à 350 nm.

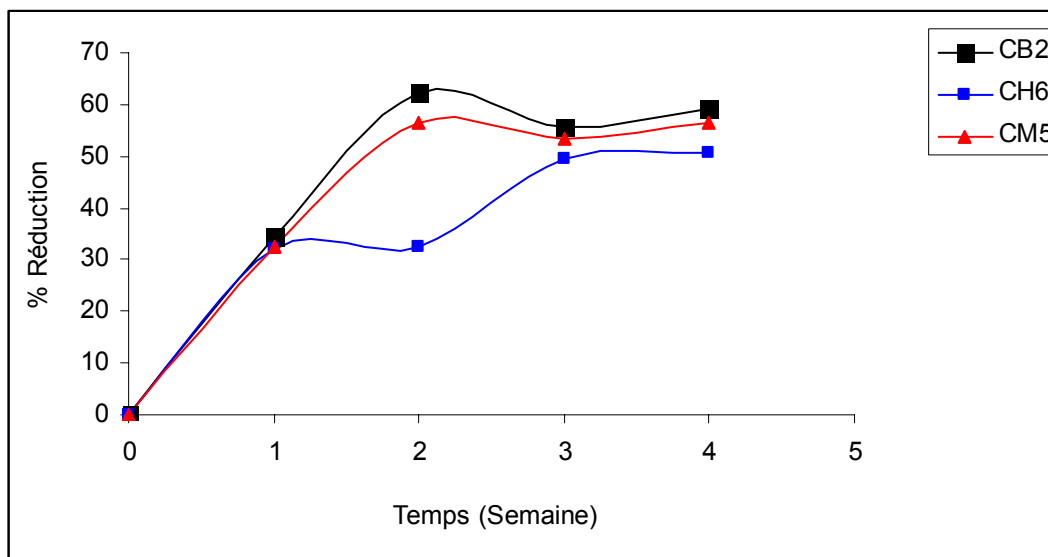


Figure 4. 32 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PN}$  statique à 350 nm.

Lorsque les souches CB2, CH6 et CM5 ont été cultivés dans un milieu pauvre en azote assimilable où l' AHS peuvent fournir l'exigence en azote, la biodégradation d'AHS est approximativement similaire à celle du milieu  $M_{PC}$  avec une tendance d'amélioration surtout en absence d'agitation. Une chose

très remarquable ici, l'homogénéité dans les résultats des taux d'élimination qu'est toujours sans cesse.

- Dans le milieu  $M_{PCN}$

Dans ce milieu l'AHS représenteraient la source de carbone en quantité majeure vis-à-vis le saccharose et le  $NaNO_3$  qu'étaient ajoutés pour accélérer la croissance. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 33 à 4. 36.

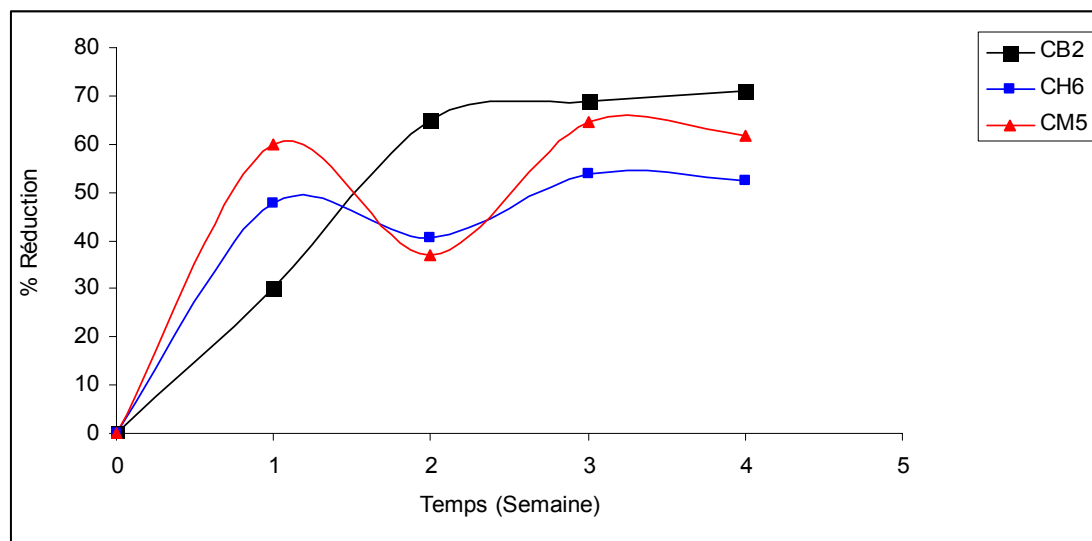


Figure 4. 33 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PCN}$  agité à 254 nm.

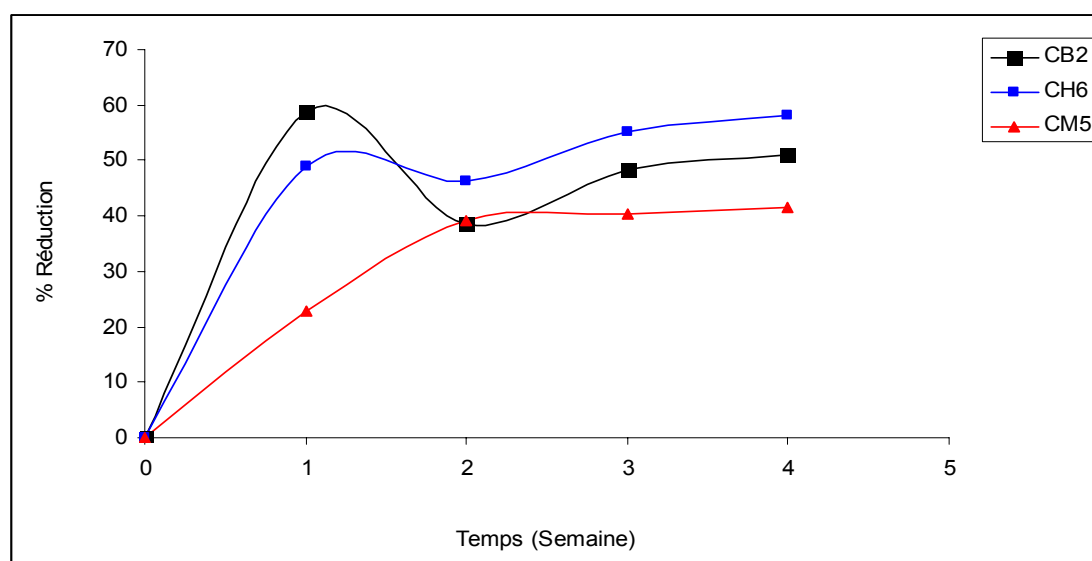


Figure 4. 34 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PCN}$  statique à 254 nm.

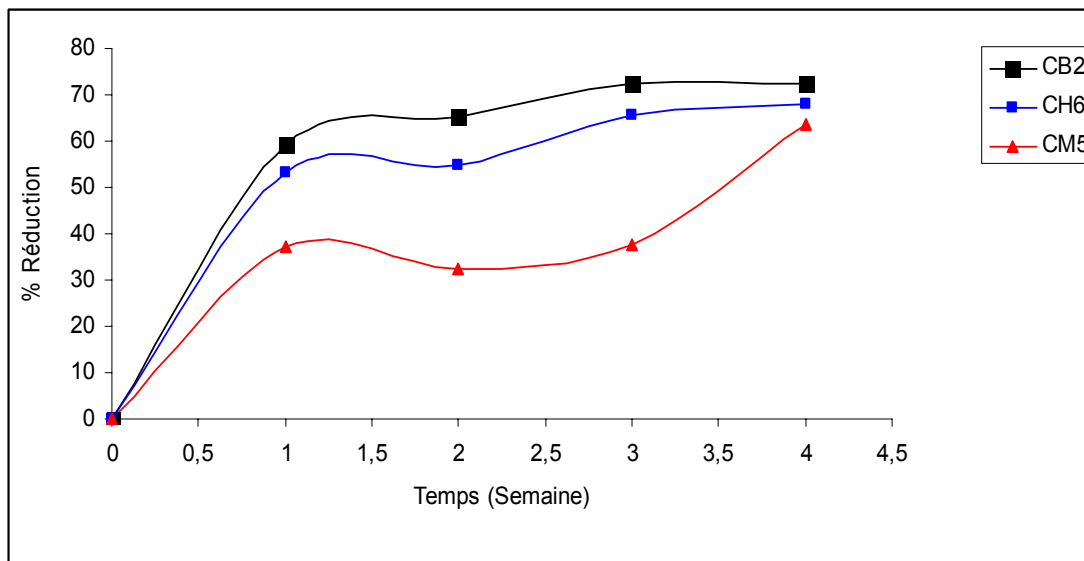


Figure 4. 35 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PCN}$  agité à 350 nm.

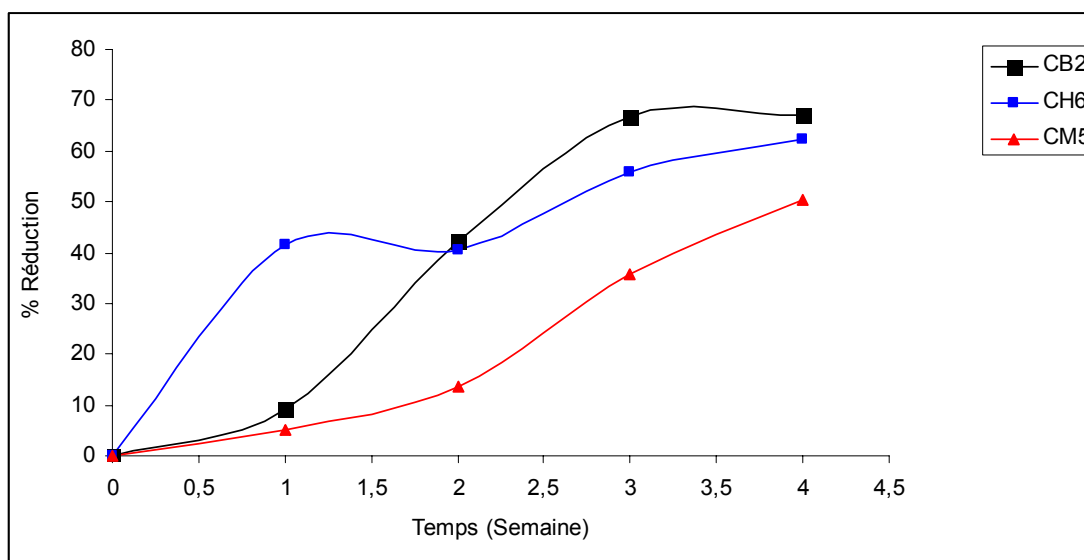


Figure 4. 36 : Réduction d'AHS par les champignons performants dans un  $M_{PCN}$  statique à 350 nm.

Dans ce dernier milieu qui ne contient que les acides humiques comme seules sources de carbone et d'azote en quantités suffisantes, la dégradation était clairement visualisée (cf. Photos en APPENDICE C) et illustrée graphiquement.

Une légère amélioration a été obtenue avec toutes les souches et pratiquement sous agitation. Un détail sur les taux de dégradation nous a permis de dire que :

- La réduction par CB2 est la plus élevée, elle atteint le maximum de dégradation à la fin de l'incubation (**72%** à 254 et 350 nm);
- Une nette augmentation (**53 %** à 254 nm et **69%** à 350 nm) par CH6;
- Une activité nettement importante par CM5 (**62%** à 254 et 350 nm).

#### 4. 4. 1. 2. Par les actinomycètes

##### · Visualisation de la croissance et la biodégradabilité

La décoloration du milieu de culture est clairement visualisée par rapport au milieu témoin non ensemencé et incubé dans les mêmes conditions (Photos en APPENDICE C). Mais, le milieu décoloré est trouble comparativement à celui de champignons, ceci semble être dû à une libération des spores dans le milieu de culture par les *Streptomyces*. Ces microorganismes sont connus par l'élaboration des spores exogènes [127, 128, 129]. Nous avons noté aussi que la masse mycélienne est moins teintée, cela veut dire que il y a une faible adsorption des AHS sur le mycélium.

La même stratégie a été aussi suivie pour la mise en évidence, tout d'abord, de la biodégradation des AHS et puis le mode d'utilisation d'AHS (source de carbone et/ou d'azote).

##### ▪ Dans le milieu complet (MC)

Dans ce milieu le glucose et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ont ajoutés avec des quantités suffisantes pour assurer les sources de carbone et d'azote. Le milieu contient en plus l'AHS (0,5%) pour suivre la cinétique de la réduction dans ces conditions en mesurant le taux d'élimination d'AHS à deux longueurs d'onde, à 254 et à 350 nm. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans les figures 4. 37 à 4. 40.

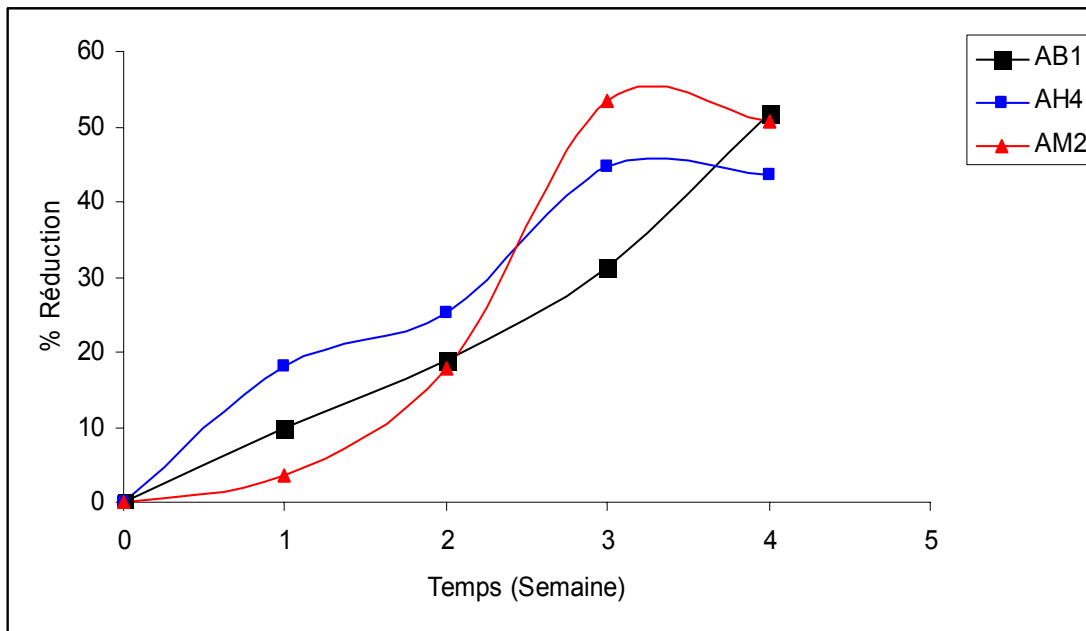


Figure 4. 37 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, agité, mesures à 254 nm.

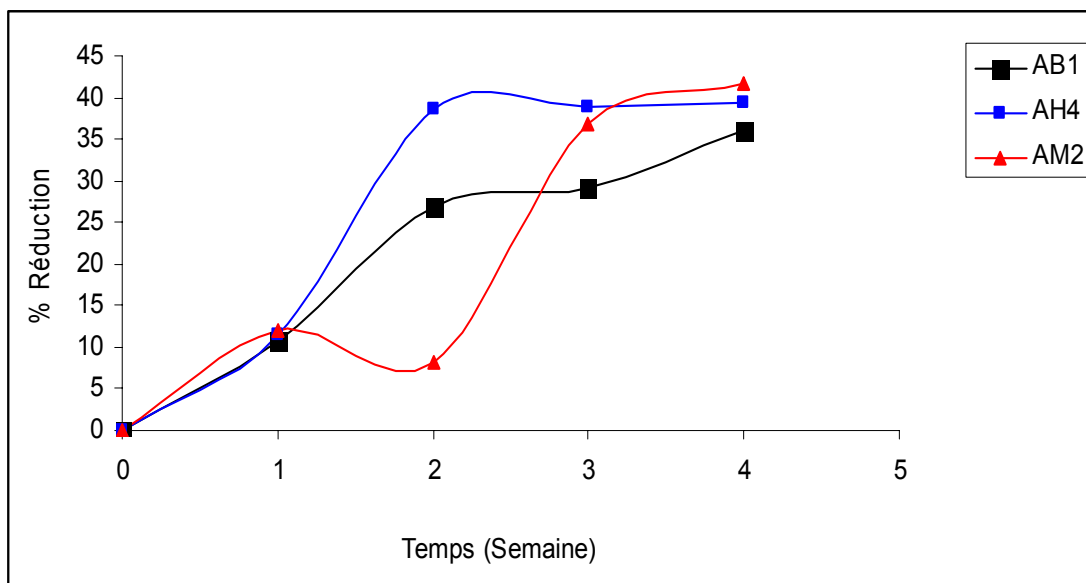


Figure 4. 38 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, statique, mesures à 254 nm.

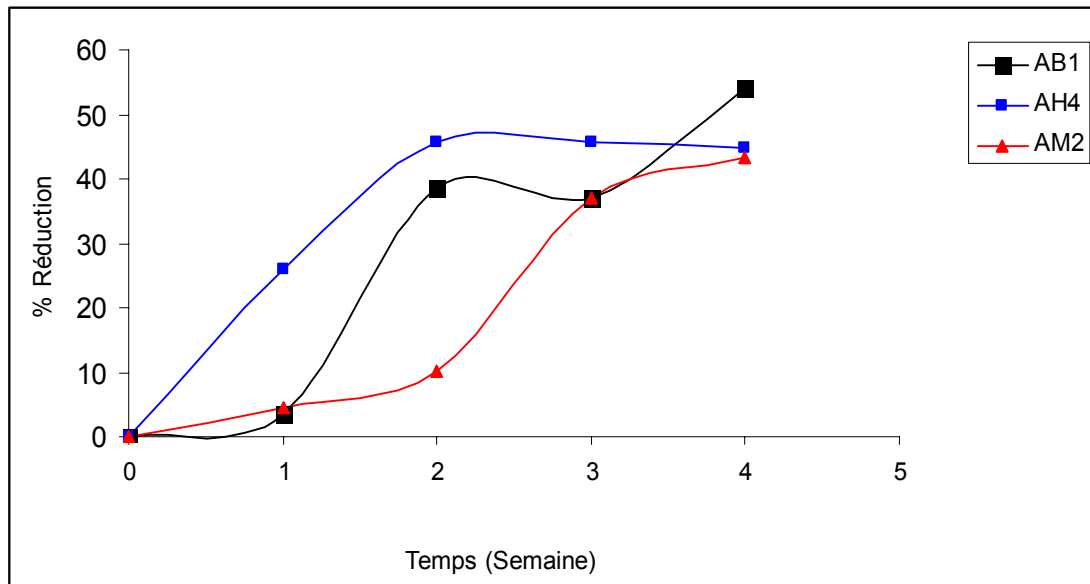


Figure 4. 39 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, agité, mesures à 350 nm.

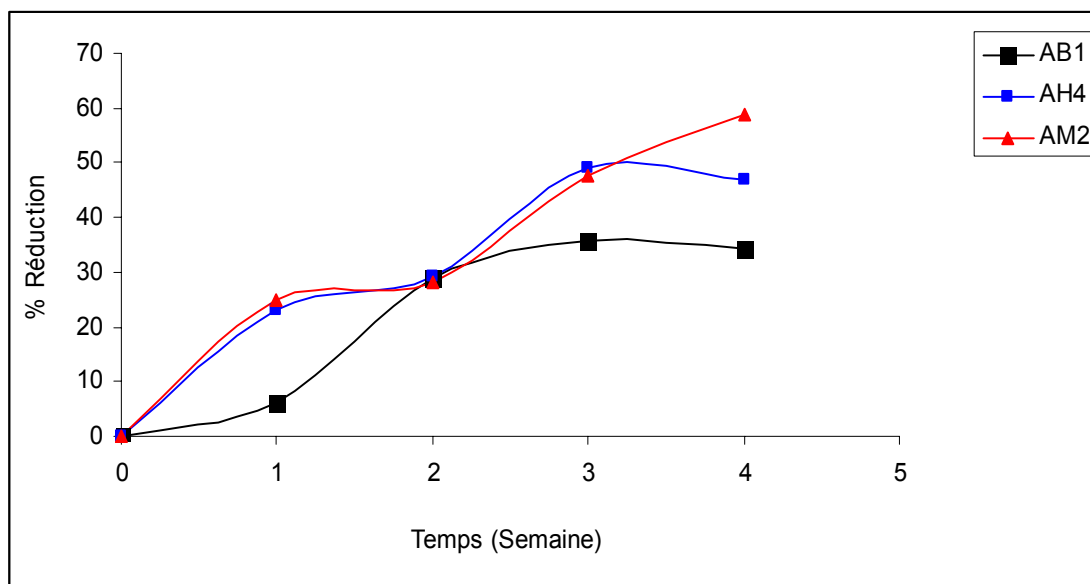


Figure 4. 40 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu MC, statique, mesures à 350 nm.

Dans ce milieu l'élimination d'AHS était moindre comparativement aux valeurs obtenues avec les champignons. Mais aussi, l'influence de l'agitation est limitée sur l'amélioration de la biodégradabilité.

A cet effet, la faible vitesse d'élimination dans la première semaine d'incubation poursuit jusqu'à la deuxième semaine dans les deux cultures

(avec ou sans agitation). Le pourcentage de réduction n'a pas dépassé les 25% à la première semaine et 40% à la deuxième semaine, sauf pour la souche AH4 qui est considérée rapide. Par ailleurs, on a constaté une augmentation progressive à partir de la troisième semaine jusqu'à la fin de l'incubation, il atteint 59% par la souche AM2 dans une culture statique à 350nm. Cette dernière souche a une forte activité, suivie de deux autres souches qu'elles alternent leur aptitude à la biodégradation selon les mesures.

- Dans le milieu M<sub>PC</sub>

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 41 à 4. 44.

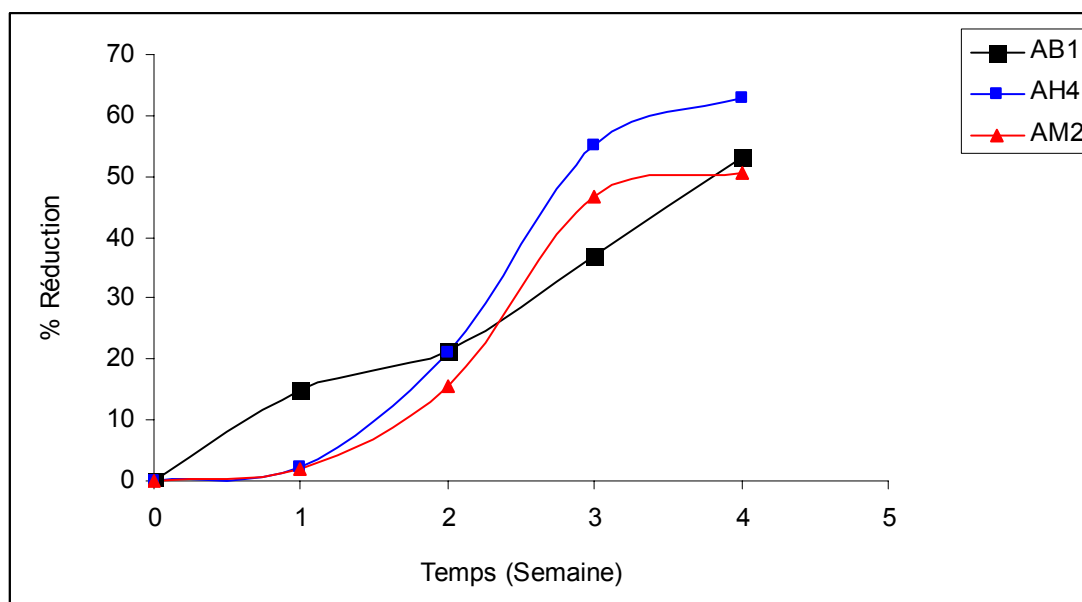


Figure 4. 41 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu M<sub>PC</sub> agité, mesures à 254 nm.

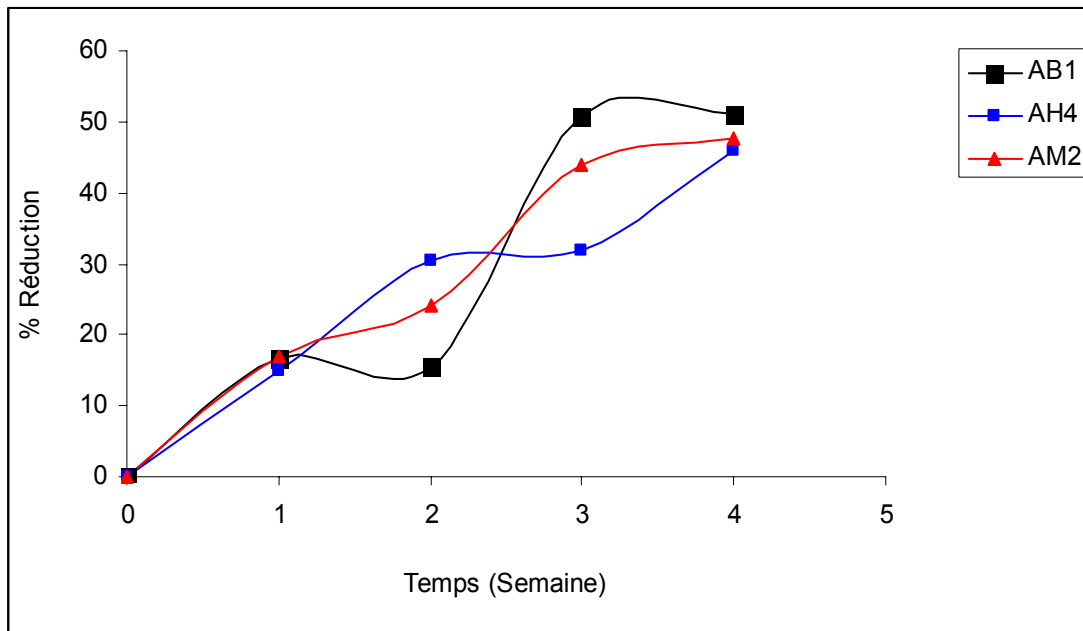


Figure 4. 42 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PC}$  statique, mesures à 254 nm.

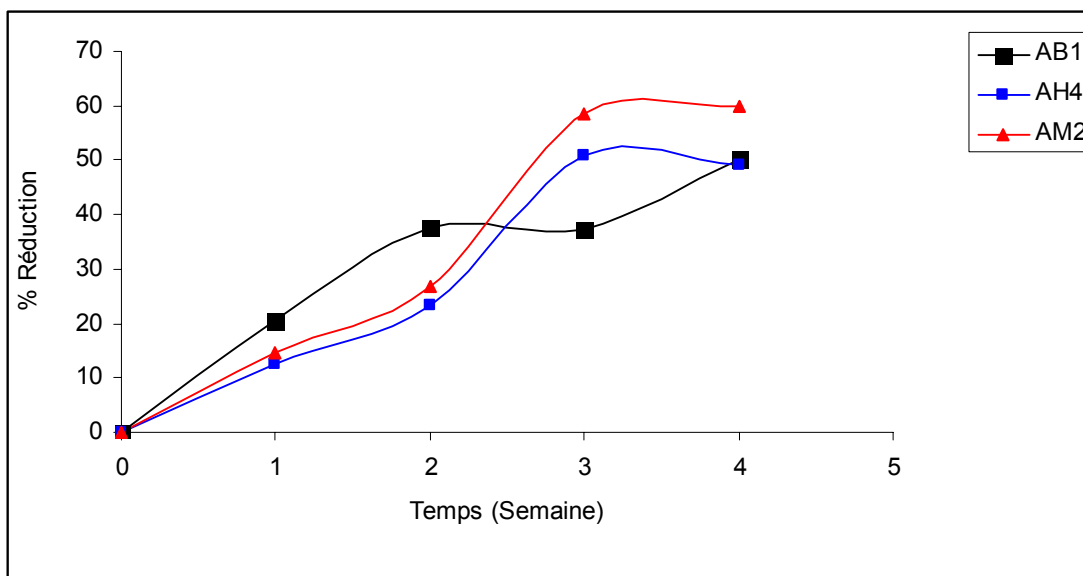


Figure 4. 43 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PC}$  agité, mesures à 350 nm.



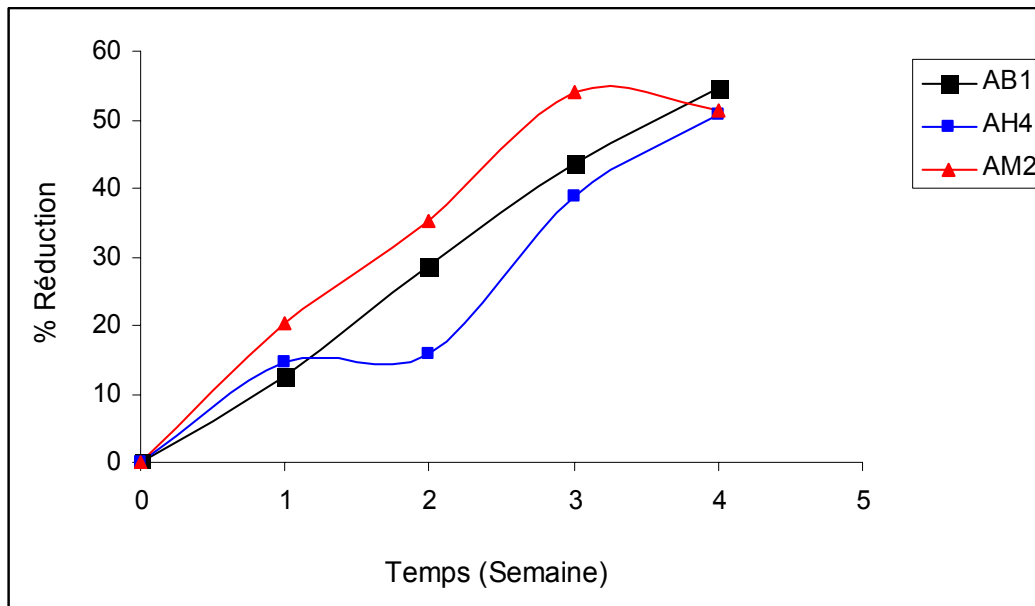


Figure 4. 44 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PC}$  statique, mesures à 350 nm.

La faible vitesse d'élimination d'AHS persiste chez les trois souches où nous avons noté que le taux de réduction d'AHS n'a pas dépassé les 20% à première semaine d'incubation. Une activité remarquable, de trois souches de *Streptomyces*, est apparue au bout de la troisième semaine. Ici, la souche AH4 a marqué le taux le plus élevé (63% à 254nm sous agitation).

- Dans le milieu  $M_{PN}$

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 45 à 4. 48.

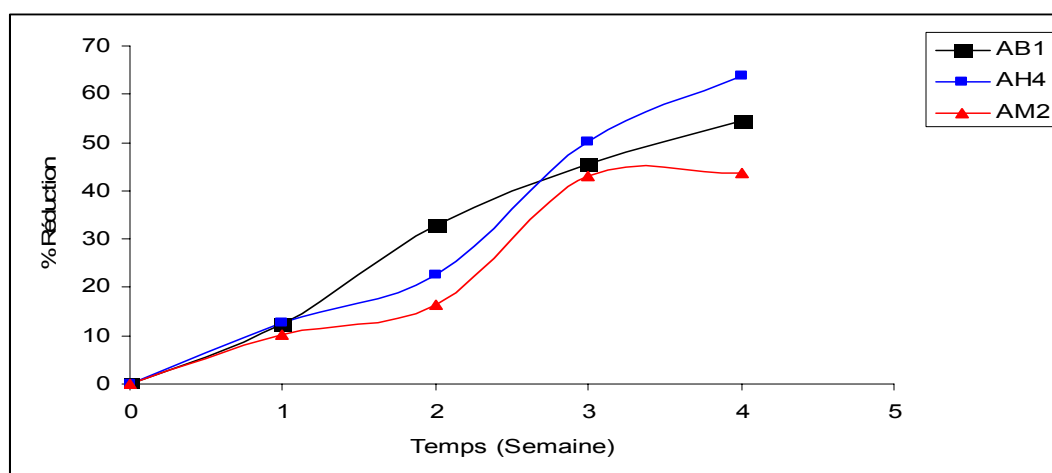


Figure 4. 45 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PN}$  agité, mesures à 254 nm.

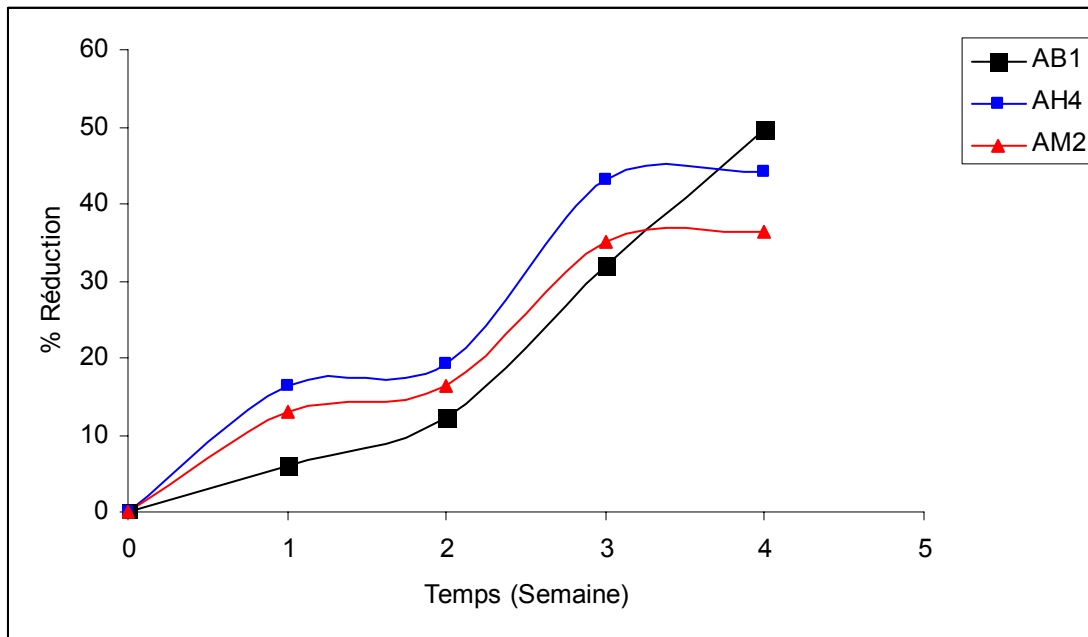


Figure 4. 46 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PN}$  statique, mesures à 254 nm

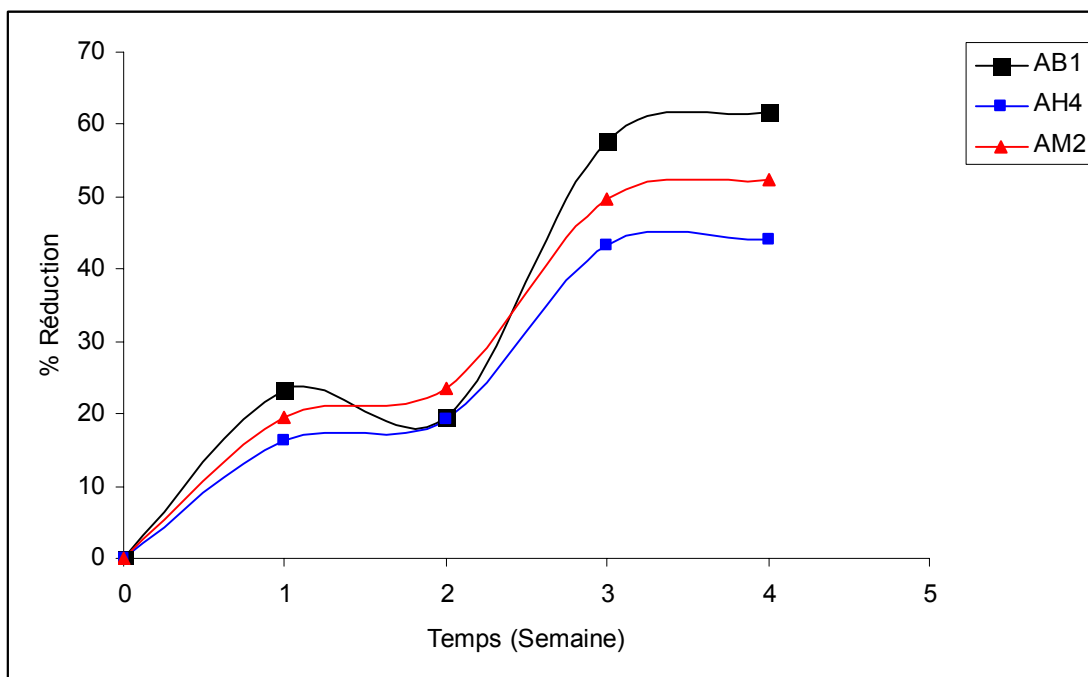


Figure 4. 47 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PN}$  agité, mesures à 350 nm.

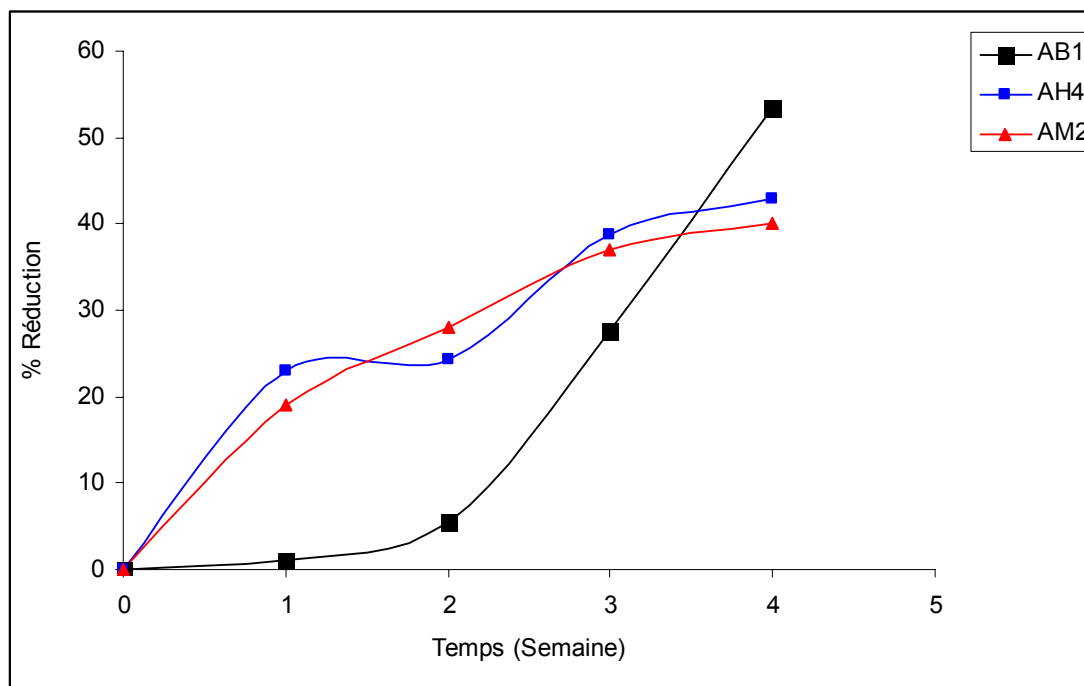


Figure 4. 48 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PN}$  statique, mesures à 350 nm.

Les trois souches de *Streptomyces* utilisent l'AHS comme source unique d'azote, elles ont concrétisé l'obtention de cet élément avec une aptitude très forte et même similaire à celui du milieu  $M_{PC}$ . Nous avons observé une évolution homogène dans la cinétique de la biodégradation chez les trois souches, mais à part le retard très remarquable engendré par la souche AB1 dans le milieu statique mesuré à 350 nm.

Les figures 4. 44 à 4. 48 montrent que la réduction par :

- AB1 a débuté dès la première semaine d'incubation, elle varie entre 6 et 13% à 254 nm et de 1 à 24% à 350 nm en milieu statique et agité, puis une augmentation progressive pour atteindre un maximum de 50% à 254 nm et 54% à 350 nm en milieu statique et 55% et 62% respectivement à 254 et 350 nm en culture agitée.
- AH4 (à 254 nm, sous agitation) a donné un % important (64%) par apport à celle en culture statique après quatre semaine d'incubation.
- AM2 était moins (43,71% et 52,47% en milieu agité à 254nm et 350nm respectivement) alors qu'en milieu statique il ne dépasse pas 40%.

- Dans le milieu  $M_{PCN}$

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 49 à 4. 52.

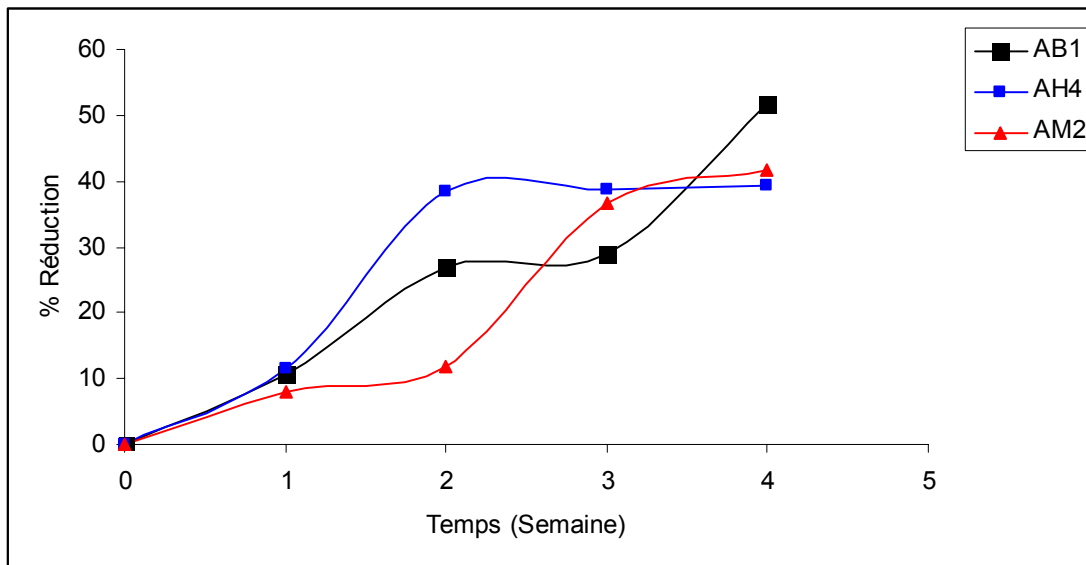


Figure 4. 49 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PCN}$  agité, mesures à 254 nm.

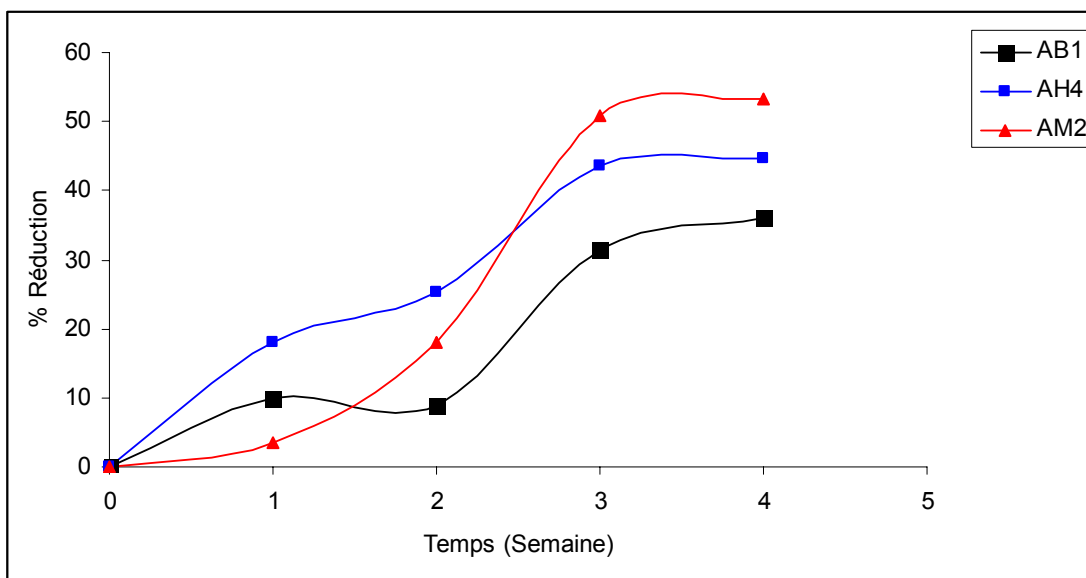


Figure 4. 50 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PCN}$  statique, mesures à 254 nm.

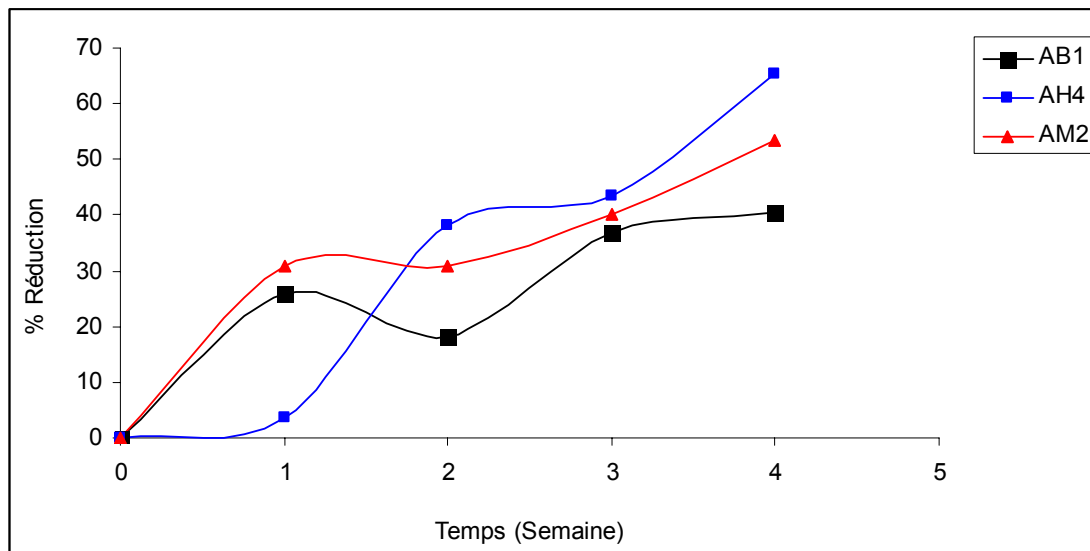


Figure 4. 51 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PCN}$  agité, mesures à 350 nm.

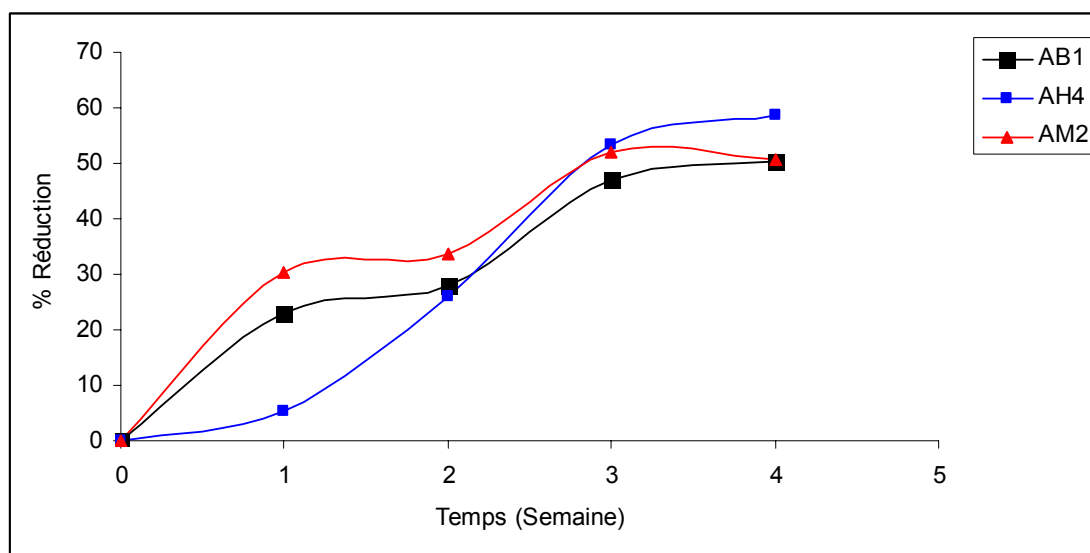


Figure 4. 52 : Réduction d'AHS par les souches performantes d'actinomycètes dans le milieu  $M_{PCN}$  statique, mesures à 350 nm.

On a constaté d'après les figures 4. 49 à 4. 52 que les actinomycètes sont actives et utilisent l'AHS utilisés comme sources de carbone et d'azote. La dégradation est réalisée plus facilement lorsque l'incubation s'effectue sous agitation. D'où le pourcentage de réduction est de 65,21% à 350 nm et 52% à 254 nm à la fin de l'incubation par AH4 et AB1 respectivement.

Les fluctuations des résultats, remarqués généralement après la première et la deuxième semaine d'incubation, peuvent être expliqués par le fait que ces microorganismes, notamment les actinomycètes, sont caractérisés par la production des pigments mélanoides. Les pigments sécrétés dans le milieu de culture, portant une couleur marron similaire à celle d'AHS qui peuvent facilement couvrir le pourcentage d'élimination d'AHS comme signalé par BLANDEAU [103].

#### 4. 4. 1. 3. Par le consortium microbien

##### o Visualisation de la croissance et la biodégradabilité

Les deux phénomènes sont bien éclaircis sur la photo présentée en APPENDICE C. Le milieu de culture contient l'extrait de la betrave rouge inoculé par une culture issu d'EBRI<sub>30</sub>. Nous avons observé une décoloration du milieu de culture, mais un trouble était associé à la formation d'une biomasse très importante.

##### o La biodégradabilité

Les figures 4. 53 et 4. 54 illustrent l'évolution de la dégradation avec ou sans agitation et mesurée à 254 et 350 nm.

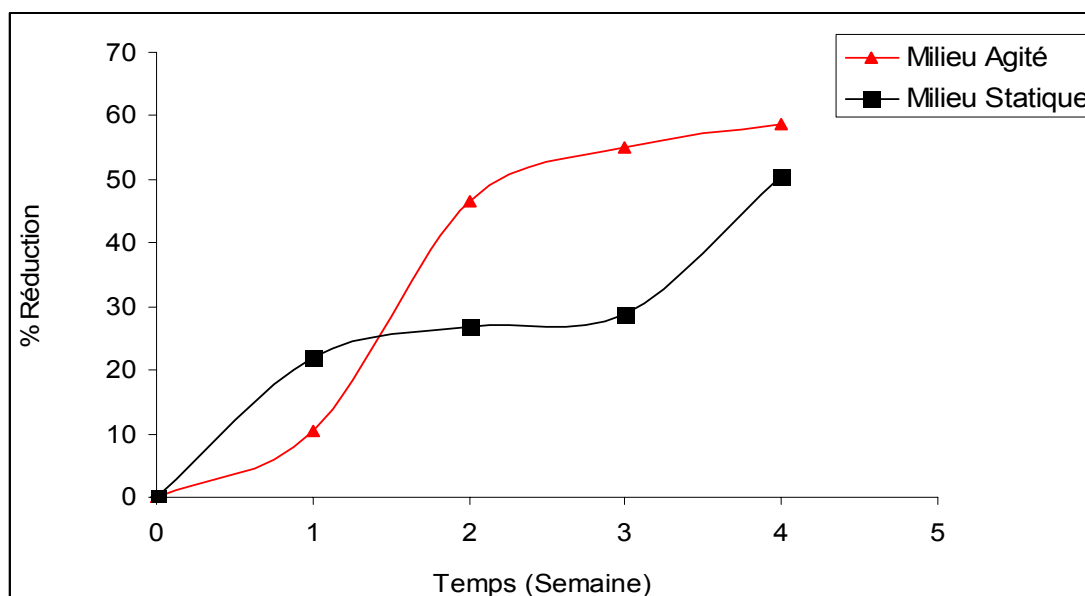


Figure 4. 53 : Réduction d'AHS par l'EBRI<sub>30</sub> sous l'effet d'agitation à 254 nm.

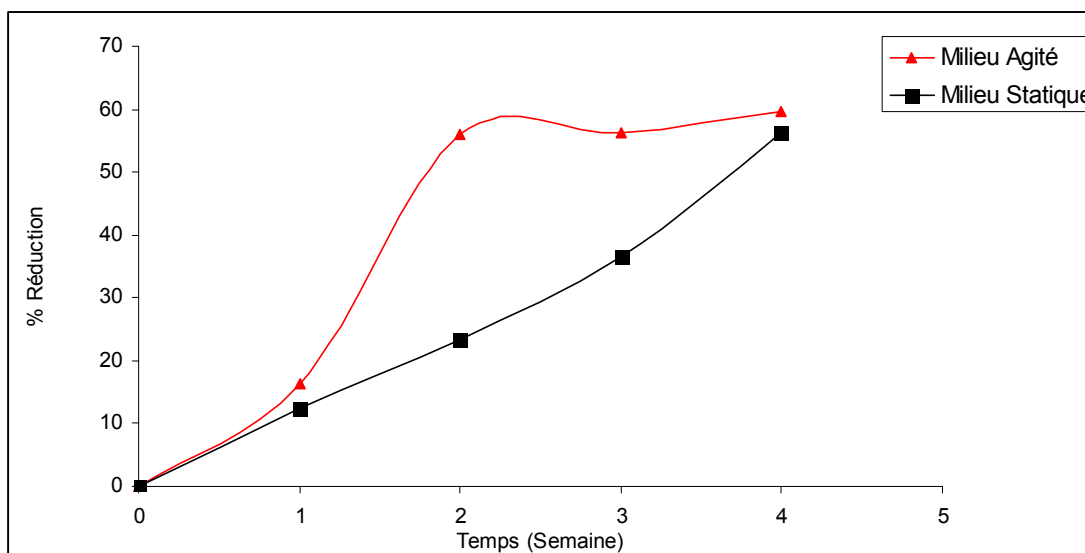


Figure 4. 54 : Réduction d'AHS par l'EBRI<sub>30</sub> sous l'effet d'agitation à 350 nm.

La biodégradation des acides humiques par l'EBRI<sub>30</sub> a traduit une bonne biodégradation, par succession de deux phases d'activités microbienne:

- Une phase d'adaptation : caractérisée par une dégradation faible d'AHS jusqu'à la deuxième semaine d'incubation.
- Une phase de dégradation : caractérisée par une augmentation de pourcentage d'élimination, correspond à la dégradation des molécules humiques.

En effet, le taux de décomposition enregistré est de 58,62 et 59,6% respectivement à 254 et 350 nm en milieu agitée après quatre semaines d'incubation. De même, l'action microbienne en milieu statique est considérable variée entre 50,47 % et 56,33% à 254 et 350 nm respectivement.

#### 4. 4. 1. 4 Génération des métabolites de dégradation

La mise en évidence de produits générés de la dégradation d'AHS a été détectée par CLHP. Le milieu utilisé est celui de M<sub>PCN</sub>, provenant des cultures des champignons, des actinomycètes et EBRI<sub>30</sub> en milieu agité à la

fin de la quatrième semaine d'incubation. Les spectres obtenus sont donnés respectivement dans les figures 4. 55, 4. 56 et 4.57.

En comparant les spectres d'un échantillon d'AHS issu d'une culture témoin (non ensemencé) avec celle d'un AHS soumis à une activité microbienne.

Dans le meilleur cas de biodégradation dans le milieu  $M_{PCN}$ , on a pu obtenir une diminution importante de concentration de l'AHS et formation des sous produits.

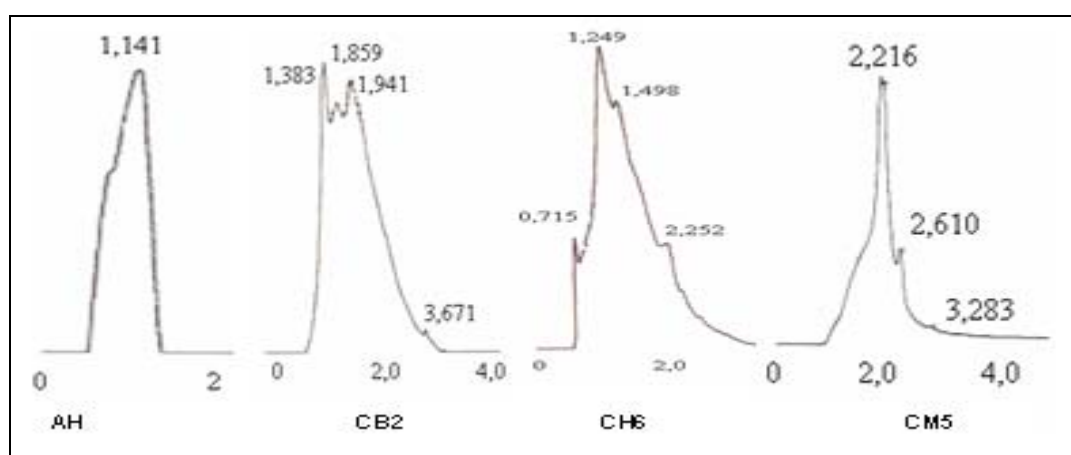


Figure 4. 55 : Chromatogrammes CLHP issus de la biodégradation en présence de champignons : milieu  $M_{PCN}$  sous agitation à la fin de la quatrième semaine.

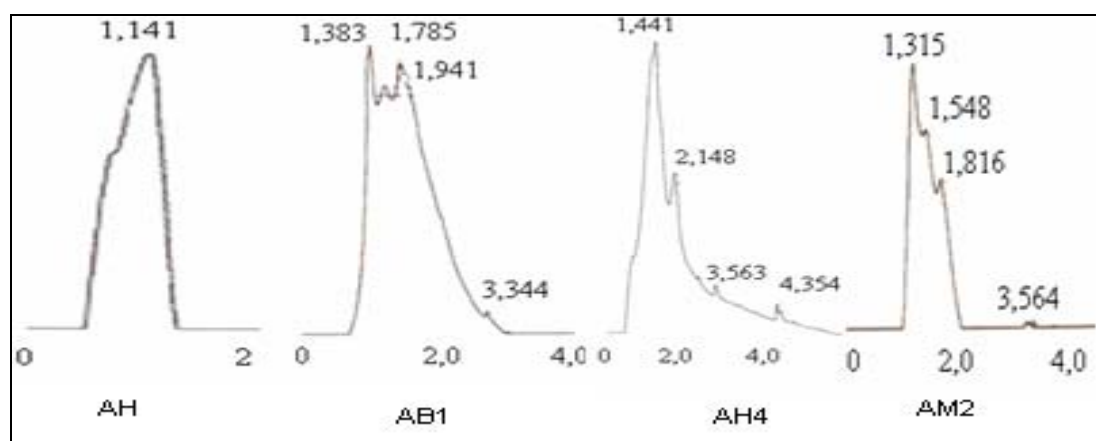


Figure 4. 56 : Chromatogrammes CLHP issus de la biodégradation en présence d'actinomycètes : milieu  $M_{PCN}$  sous agitation à la fin de la quatrième semaine.



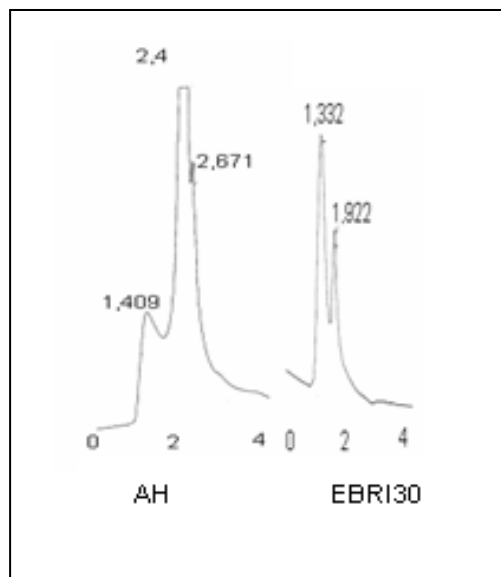


Figure 4. 57 : Chromatogrammes CLHP issus de la biodégradation en présence d'EBRI<sub>30</sub> : sous agitation à la fin de la quatrième semaine

Enfin l'analyse par UV-visible et CLHP permettant de dire que, la présence de ces AHS peut entraîner des perturbations au niveau de la croissance et de l'activité microbienne après un certain temps d'incubation, elle provoque au contraire une stimulation de la croissance et de l'assimilation du carbone et d'azote au début de l'incubation. Ce phénomène est observable dans toutes les conditions expérimentales employées, y compris dans les différents milieux de culture. Cette action du métabolisme secondaire d'AHS sur l'activité microbienne a déjà été remarquée par BLONDEAU [103] et VISSER [129].

#### 4. 5 Biodégradation des acides humiques naturels

Cette fois-ci, Nous avons testé les comportements des souches envers les AHN de même site d'isolement.

La biodégradabilité a été réalisée en milieu liquide sous agitation où les AHN représentent la source de carbone et d'azote en quantités majoritaires. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4. 58 à 4. 60. Il faut signaler aussi que les résultats qui seront présentés graphiquement ne concernent que les mesures à 350nm. Les autres résultats sont regroupés en APPENDICE D.

Une excellente réduction de l'AHN extrait du sol de Boufarik (Figure 4. 58) a été obtenue avec la souche de champignon CB2, elle atteint un taux de 86,85%. Il est clair que l'AHN a été utilisé comme seules sources de carbone et d'azote après avoir démarré la croissance par la stimulation de substrats assimilables. Concernant la souche *Streptomyces* sp. n°1 AB1 a aussi bien dégradé l'AHNB, on constate que la dégradation atteint 67%. Mais aussi, elle était importante pour EBRI<sub>30</sub>, qu'elle arrive à 68%.

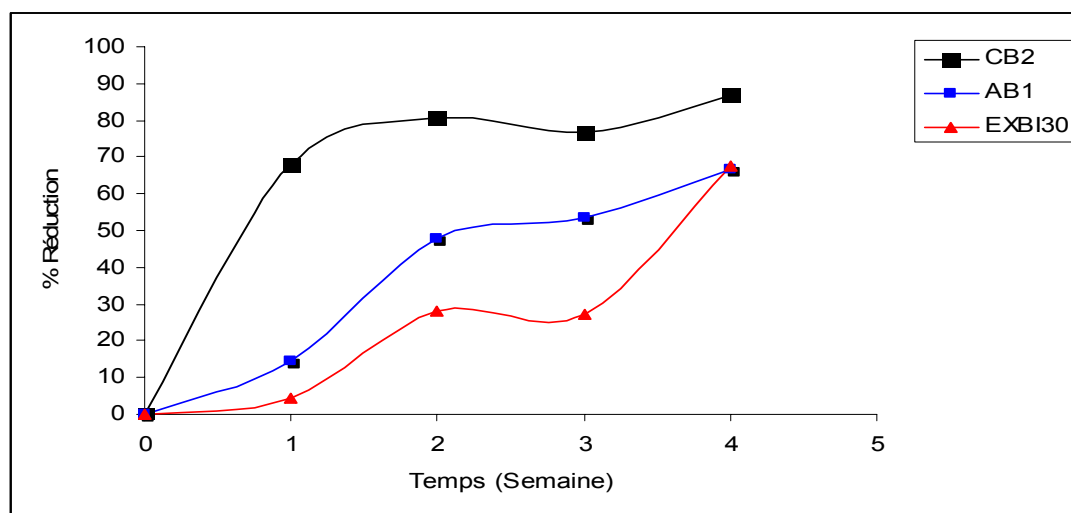


Figure 4. 58 : Réduction d'AHNB dans M<sub>PCN</sub> sous agitation à 350nm.

La cinétique de réduction de l'AHNH extrait du sol de Hadjout (Figure 4. 59) a été établie en présence du champignon CH6, d'actinomycète AH4 et d'EBRI<sub>30</sub>. Après 7 jours d'incubation, on a observé une dégradation faible pour les trois types de microorganismes, puis elle atteint le maximum pour CH6 qu'arrive à 85,96% et avec le même taux (57%) pour l'actinomycète et EBRI<sub>30</sub>. à la fin d'incubation.

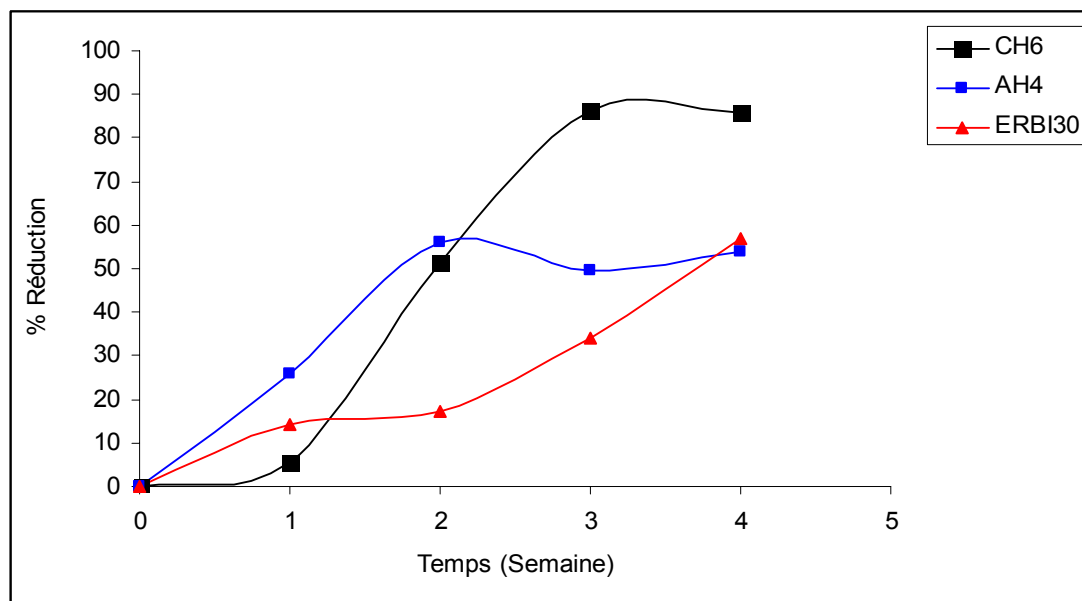


Figure 4. 59 : Réduction d'AHNH dans  $M_{PCN}$  sous agitation à 350nm.

En première semaine d'incubation, la dégradation observée dans les milieux contenant l'AHN extraits de Meftah incubés en présence du *Fusarium Solani* CM5, *Streptomyces* sp. n°3 AM2 et EBRI<sub>30</sub> (Figure 4. 60), a été évaluée en tant que faible, dans les milleures cas ne dépasserait jamais 10% (avec EBRI<sub>30</sub>).

La dégradation en présence des trois souches était importante à la fin d'incubation. Elle arrive à 71% par CM5 et 66% par AM2 et EBRI<sub>30</sub> de chacun.

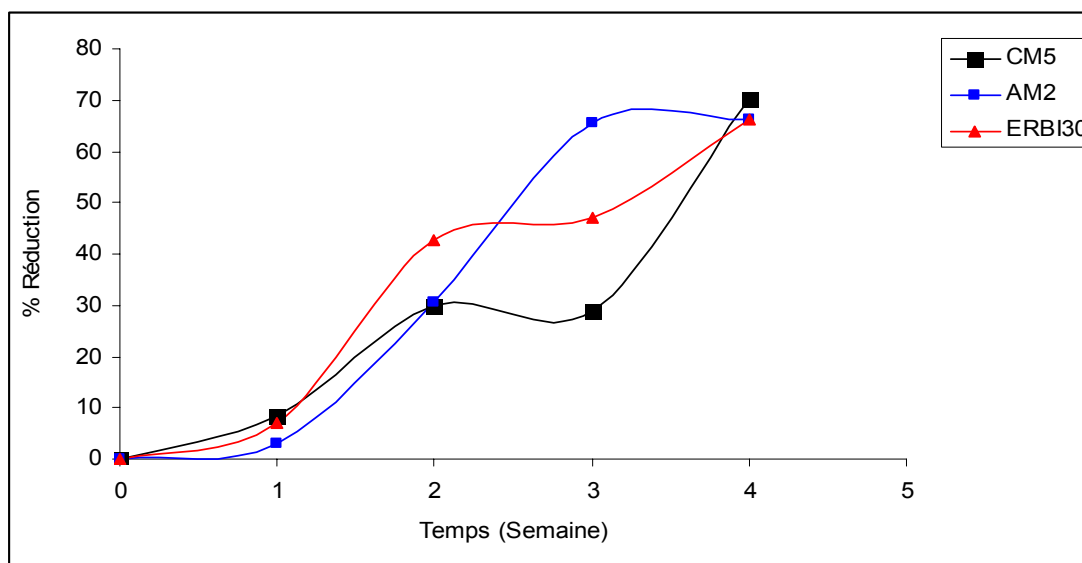


Figure 4. 60 : Réduction d'AHNM dans  $M_{PCN}$  sous agitation à 350nm.

Toutefois, comme il n'est guère possible d'envisager des analyses chimiques très précises de ces substances en cours de dégradation, nous nous sommes appuyés sur l'analyse par IRTF des AHs restants dans le milieu de culture après quatre semaines d'incubation. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 4. 61 à 4. 69. Ces spectres montrent le niveau d'attaque microbienne sur la molécule humique.

- Cas d'AHN de Boufarik .

Les figures 4. 61, 4. 62 et 4. 63 montrent bien les modifications résultantes sur les molécules d'acide humique naturel du sol de Boufarik par les souches isolées du même site (CB2, AB1) ainsi que par EBRI<sub>30</sub>. On constate qu'une modification structurale importante est en présence de CB2 dans les deux régions principales. La gamme de 2800 à 1700  $\text{cm}^{-1}$  correspond aux dérivés d'azote, aux CH aliphatiques et aux groupements méthoxyles, carboxyle et cétone. De 1400 à 900  $\text{cm}^{-1}$  une dégradation est presque totale après quatre semaines d'incubation, avec une diminution significative de la bande 1720  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la double liaison C=O qui a été déjà signalée et montrée par RAMUNNI et al [124].

Une dégradation importante des différents groupements fonctionnels existe dans la bande d'absorption 2800 à 1800  $\text{cm}^{-1}$ , ceci prouve que la structure d'AHNB est modifiée par l'action bactérienne EBRI<sub>30</sub>.

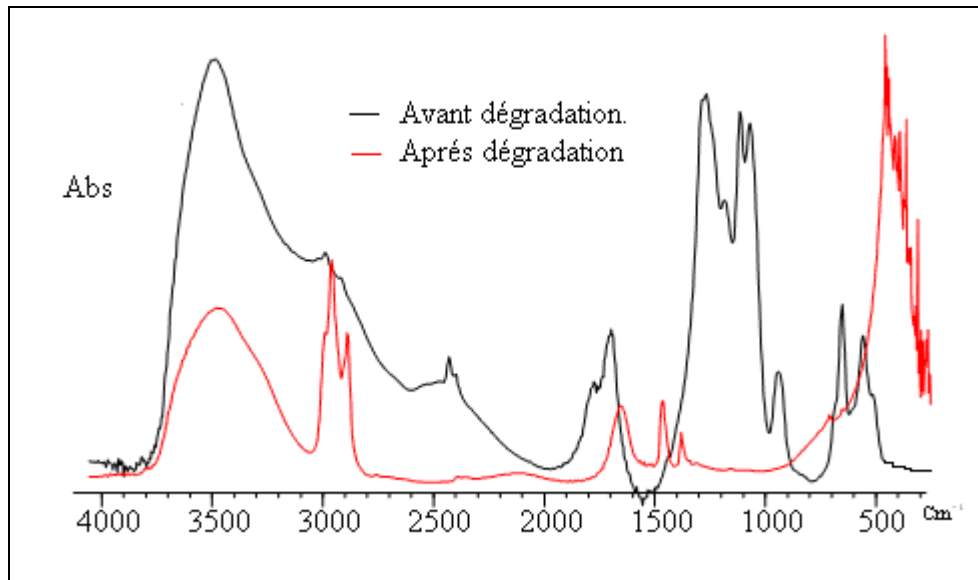


Figure 4. 61 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNB par CB2.

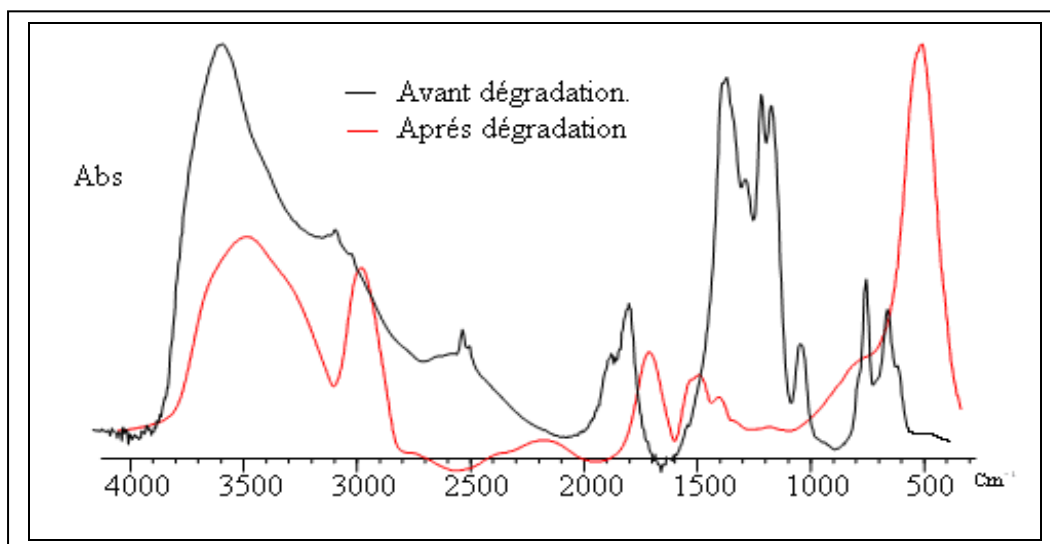


Figure 4. 62 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNB par AB1.

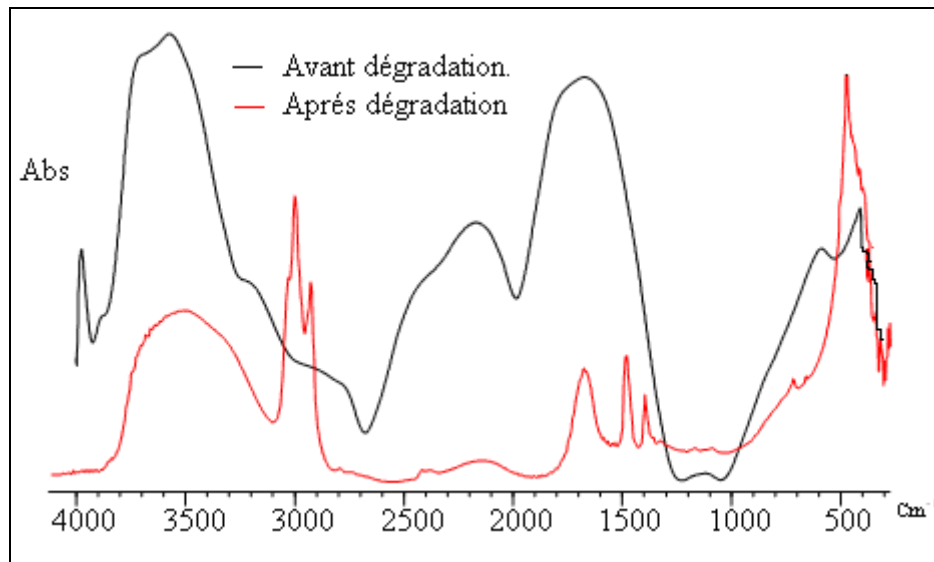


Figure 4. 63 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNB par EBRI<sub>30</sub>.

- Cas d'AHN de Hadjout

L'activité du CH6 et celle de EBRI<sub>30</sub> ont manifesté de la même façon selon les figures 4. 64 et 4. 66. La structure a été modifiée dans deux régions: entre 2800 à 1800  $\text{cm}^{-1}$  et 1300 à 800  $\text{cm}^{-1}$ . La biodégradation de l'AHNH par *Streptomyces* sp. AH4 a permis de détruire et de modifier sa structure, ceci a été constaté par la dégradation totale de deux bandes entre 3000 à 1800 et 1500 à 900  $\text{cm}^{-1}$ .

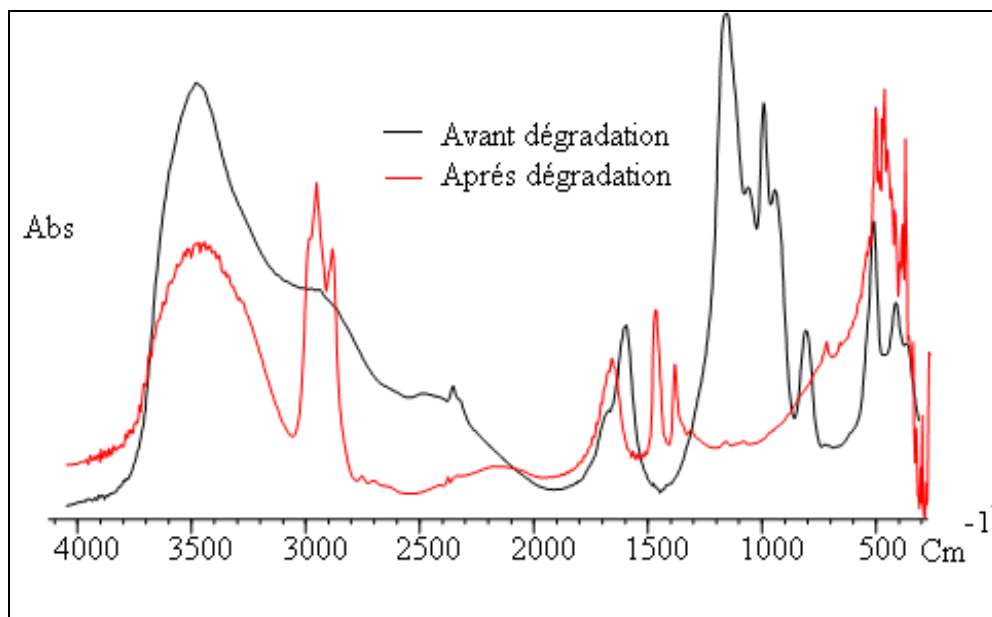


Figure 4. 64 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNH par CH6.

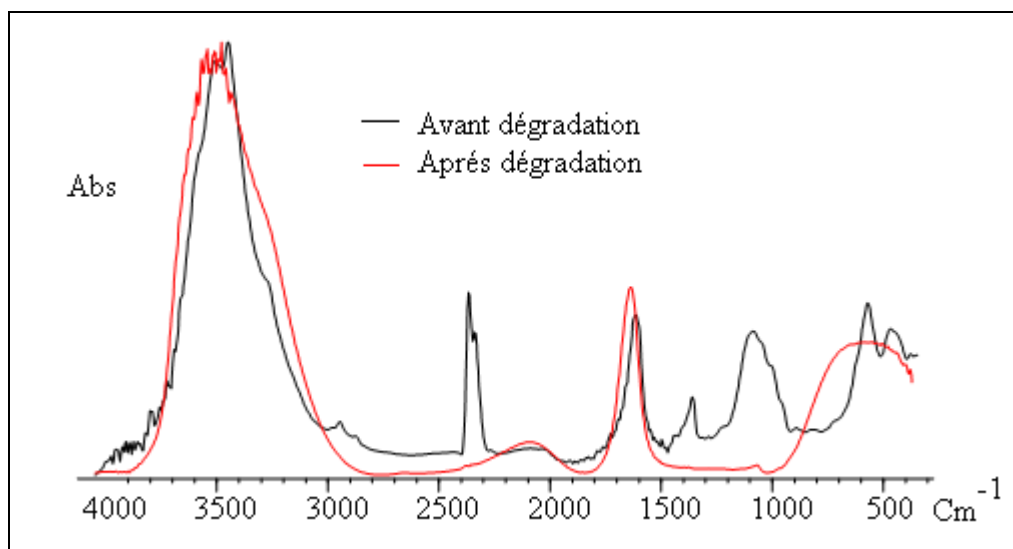


Figure 4. 65 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNH par AH4.

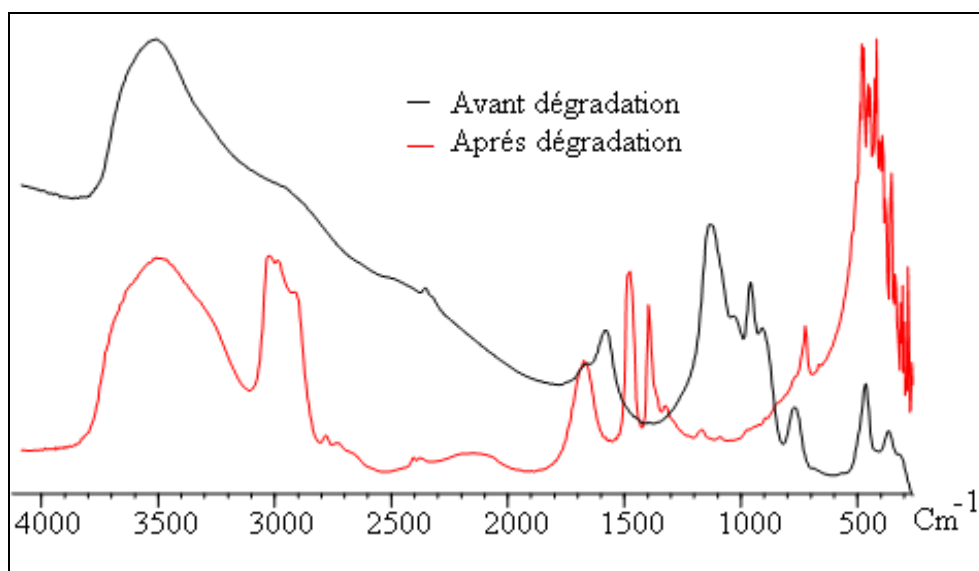


Figure 4. 66 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNH par BRI<sub>30</sub>.

- Cas d'AHN de Meftah

La souche CM5 montre une forte capacité de biodégradation de l'AHNM selon la modification de la structure finale après quatre semaines d'incubation, ce qu'a été remarqué dans les deux régions : 2800 à 2000  $\text{cm}^{-1}$  et 1300 à 800  $\text{cm}^{-1}$ . D'après la figure 4. 67, on constate la bonne activité de la souche *Streptomyces* sp. AM2. La figure 4. 68 montre la modification par EBRI<sub>30</sub> dans une large gamme d'absorption entre 1500 à 900  $\text{cm}^{-1}$ .

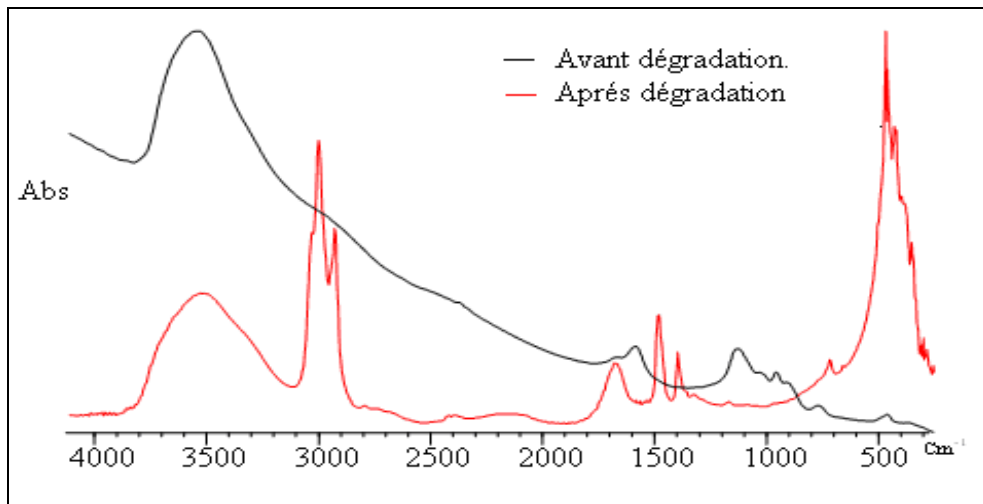


Figure 4. 67 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNM par CM5.

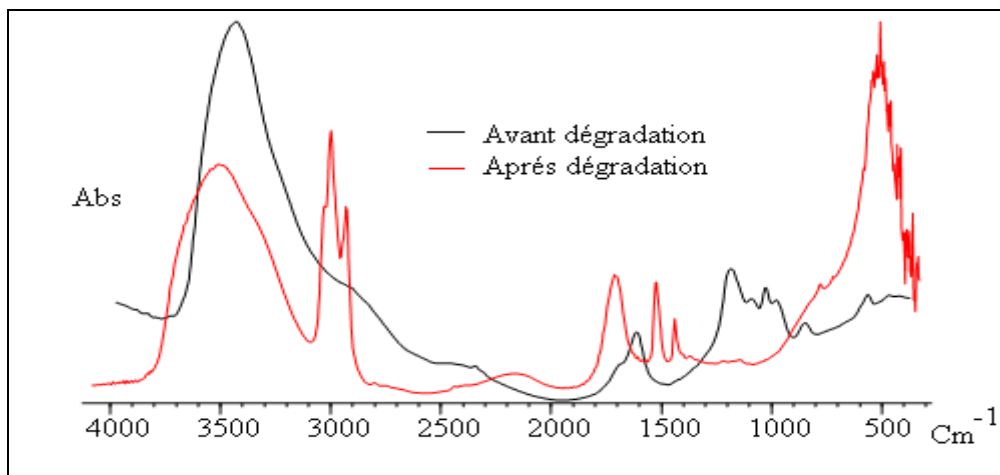


Figure 4. 68 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNM par AM2.

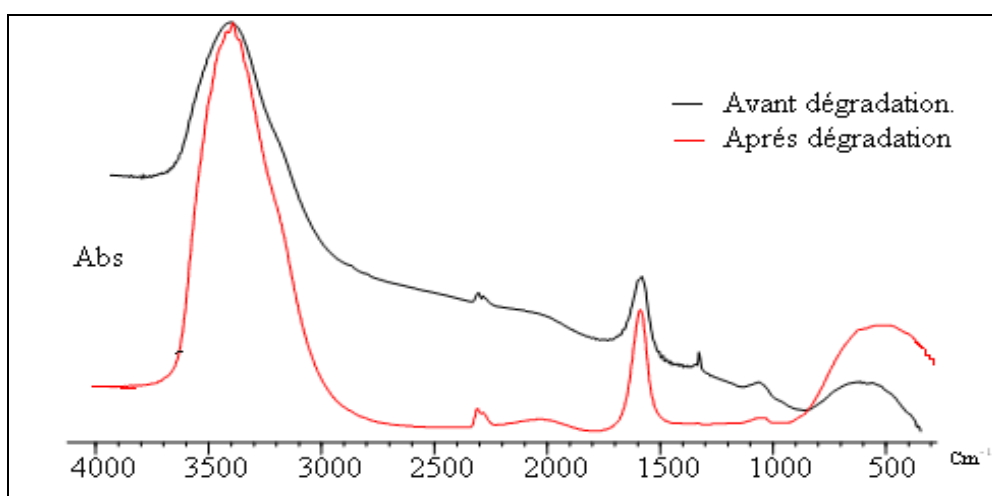


Figure 4. 69 : Spectre infrarouge de la biodégradation de l'AHNM par BRI<sub>30</sub>.



#### 4.6 Discussion générale

Ce travail a porté sur deux volets, la caractérisation des AHs d'une part et l'étude de la biodégradabilité de ces substances d'autre part.

Pour l'ensemble des analyses effectuées, les résultats de la caractérisation affirment le caractère homogène et reproductible des AHs. Elles montrent clairement et avec certitude que le produit obtenu est de nature "**AHs**". De plus, la maîtrise du protocole expérimental réalisé lors de ce travail a permis de produire une quantité suffisante de produits d'AHs bruts.

Cependant, cette caractérisation reste préliminaire mais elle peut contribuer d'informer sur ce type de macromolécules surtout où il n'y a pas beaucoup de travaux réalisés sur les AHs de sols locaux. Au cours des trois dernières décennies, il y a eu des progrès considérables pour regrouper les méthodes d'analyse qui peuvent être utilisées pour caractériser les substances humiques. En appliquant ces méthodes au cours de la biodégradation, une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent ce processus peut être atteint.

Notre contribution concernant la partie biodégradation touche essentiellement l'activité de trois principaux groupes de microorganismes, à savoir, les champignons, les actinomycètes et les bactéries. Toutefois, ces microorganismes sont considérés comme étant la force motrice derrière le "turnover" (formation, transformation, dégradation et minéralisation) des SHs. Bien que les bactéries, souvent dominant l'environnement, participent dans ces transformations humiques, mais leur capacité à dégrader les macromolécules stables, tels que les AHs, est limitée [130, 131, 132 133, 134, 135]. Les bactéries sont probablement actives sur les composés à faible poids moléculaire tels que les AFs et les métabolites de dégradation des AHs.

Il est clair que les champignons isolés à partir du sol de surface de la Mitija participent fortement dans la biodégradabilité des AHs naturels et synthétiques. En effet, dans les écosystèmes naturels, les champignons saprophytes sont des décomposeurs primaires, secondaires et tertiaires qui se nourrissent par le recyclage des grandes quantités de carbone ainsi que

d'autres éléments nutritifs. Ils affectent la stabilité des sols et sont donc au cœur de l'activité environnementale terrestre.

Néanmoins, il reste encore un manque d'informations concernant leur diversité et leur fonction dans la décomposition de la matière organique. Les champignons actifs dans le processus de décomposition comprennent principalement les ascomycètes et les basidiomycètes et qui sont les résidants permanents des couches supérieures de forêt et de sols des prairies. Cependant, leur abondance relative et leur rôle dans le turnover des SHs sont encore obscurs [136, 137].

Le taux d'élimination d'AHs, quantifié par décoloration ou dégradation, varie entre **40** et **90%** avec les trois souches performantes de champignons. Cette activité est située dans l'intervalle publié dans la littérature (2,6 à 90%). La décoloration ou le blanchissement du milieu d'une couleur foncée, représentant une plus forte concentration d'AH, est considéré comme un indicateur de dégradation. Les résultats rapportés par les auteurs sont :  $\approx 85\%$  avec *Phanerochaete chrysosporium* [138],  $\approx 80\%$  avec *Nematoloma frowardii* [138],  $\approx 50\%$  avec *Pleurotus ostreatus* [139, 140],  $\approx 45$  à  $60\%$  avec *Nematoloma frowardii* [12],  $\approx 2,6\%$  avec *Coriolus hirsutus* [12],  $\approx 30\%$  avec *Paecilomyces inflatus* [141],  $59 \approx 90\%$  avec *Bjerkandera adusa* [141] et  $\approx 22\%$  avec *Paecilomyces lilacinus* [142].

Les deux espèces identifiées dans notre cas (*Aspergillus sp.* CB2, *Fusarium solani* CM5) et la souche non identifiée appartiennent aux ascomycètes. Ce groupe de champignons, largement étudié, est connu par son rôle dans la formation et la modification de l'humus. Parmi les ascomycètes les plus activées dans la formation des AHs à partir des composés phénoliques sous l'influence des différentes conditions sont : *Epicorom nigrum*, *Eurotium echinulatum*, *Hendersonula torulidea* et *Aspergillus sydowi*. Cette polymérisation a été faite en présence des phenoloxidasés [142, 143, 144, 145, 146].

Les actinomycètes ont manifesté pleinement en tant que des bons dégradeurs d'AHs. Ils viennent en deuxième position avec une activité aussi importante où le taux d'élimination varie entre **35** à **68%**. Ils sont rattachés au

genre *Streptomyces*. Certains espèces de ce genre peuvent dégrader ou blanchir les AHs [83, 86]. Néanmoins, peu de travaux ont été publiés concernant la biodégradation des AHs par les actinomycètes [103].

Nous suggérerons qu'une association synergique entre les microorganismes du consortium EXBRI<sub>30</sub> pour accomplir leur rôle dans l'élimination des AHs dans le milieu. Dans une étude récente qui décrit un consortium d'un biofilm employé pour la dégradation d'AHs, elle a montré que les microorganismes présents dans ce biofilm ont la faculté d'utiliser les AHs comme seule source de carbone et d'énergie. Les auteurs expliquaient cette biodégradation par les processus cométaboliques ou le métabolisme secondaire effectués principalement par les champignons du biofilm [148]. Par ailleurs, CHEFETZ [149] a signalé que la dégradation et la minéralisation des matières organiques stables dans le compost sont les résultats d'une parfaite synergie entre ascomycètes, deuteromycètes et bactéries.

L'effet améliorant de l'agitation, remarqué chez les trois groupes de microorganismes étudiés, a été anciennement publié par BURGES et LATTE [150]. En outre, ils ont noté que l'aération de la culture est corrélée avec le taux de dégradation. Cette bénéfique association a été signalée dans d'autres études menées sur la décomposition de la lignine et la dégradation des AHs [12, 141].

L'utilisation des AHs comme seules sources de C+N a été nettement obtenue dans notre présente étude. Seulement, cette extraordinaire faculté des souches locales exigerait une préoccupation peu spécifique car des souches rares à travers le monde qui sont dotées par des aptitudes pareilles.

Quant aux mécanismes d'élimination d'AHs, les travaux ont suggéré l'association de deux phénomènes, l'adsorption par fixation des substances humiques sur les surfaces des cellules microbiennes et la dégradation par des enzymes extracellulaires [87]. L'adsorption des SHs sur le mycélium est susceptible d'être la cause principale des difficultés d'interprétation des résultats afin de comprendre les détails de la biodégradabilité. A cet effet, différentes méthodes d'analyse par chromatographie sont couramment

utilisées pour démontrer que le blanchiment des substances humiques est associé à la dégradation [12, 84, 87, 150, 152].

Les modifications de la structure des AHs extraites des sols locaux ont été mises en évidence par l'analyse par infrarouge. Elles diffèrent selon la souche et l'origine des AHs. Ces modifications peuvent être initialement prouvées par l'augmentation du rapport  $E_{465}/E_{665}$ . Récemment, plusieurs espèces de champignons telles que : *Alternaria*, *Clonostachys*, *Exophiala*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phoma* et *Paecilomyces* ont été étudiés pour leurs capacités à modifier les AHs et les AFs extraits de sols. Ces champignons décolorent légèrement les AHs (jusqu'à 27%) et de très petits changements ont été observés au cours de l'incubation avec les AFs. Ces résultats sont en accord avec GRAMSS et al. [133] qui ont montré que les AHs ont été dégradés plus facilement que les AFs. Ceci peut être expliqué par le fait que les AFs, riches en groupement phénoliques, s'exercent un effet inhibiteur sur la croissance microbienne.

En changeant la souche et l'origine des AHs, les résultats peuvent être contradictoires. DEHORTER [130] a incubé les deux champignons *P.chrysosporium* et *T.versicolor* avec l'HA originaire de forêt et de sol, il n'a pas remarqué de grands changements dans les propriétés d'HA après 30% de taux d'élimination d'HA (les analyses ont été faites par  $^{13}\text{C}$ -RMN). Par contre, dans une autre étude, l'incubation de la souche RBS1k (pourriture blanche) avec AHs originaire de lignite a abouti à une augmentation des groupements carboxyliques, hydroxylés et méthoxyles aliphatiques, avec une diminution des cycles aromatiques. L'analyse élémentaire a montré une augmentation du contenu en oxygène et une diminution d'hydrogène [153].

Dans les trois cas, avec les champignons, actinomycètes ou consortium, il y avait une génération de nouveaux produits qui nous les considérons comme des métabolites de la dégradation. Dans une étude plus profonde FAKOUSSA et FROST [154] ont montré par une analyse faite par CLHP la formation d'un nouveau composé à faible poids moléculaire (AFs) issu après incubation de *P.chrysosporium* et *T.versicolor* avec les AHs d'origine de lignine.

Par rapport à l'activité enzymatique, il y a peu d'informations concernant les produits chimiques qui génèrent au cours de la biodégradation. Leur complexité structurale rend la détection des changements extrêmement difficile. Il est donc difficile de caractériser les substances humiques, ainsi que la sécrétion d'enzymes et d'autres composés. Cependant, la limite de la biodégradation dépendrait de l'effet du vieillissement et l'âge des SHs et leur taille macromoléculaire (> 0,6 Kilo Dalton) [12, 154]. Ces molécules ne devraient pas être absorbés par les cellules microbiennes, et ne localisent pas à proximité de sites actifs des enzymes [154, 155]. Il est donc plus probable que les enzymes catalysent des réactions radicalaires causant la dégradation de ces molécules [156, 157].

CHEFETZ [74] a isolé la laccase à partir du champignon *Chaetomium thermophilium* au cours de la phase thermophile du compostage. Dans le même contexte, d'autres chercheurs ont suggéré que cette enzyme joue un rôle essentiel dans le processus d'humification au cours du compostage. KLUCZEK-TURPEINEN [141] a montré que la souche *Paecilomyces inflatus*, isolée à partir du composte, a un taux de dégradation d'AHs synthétiques de 5%. Tandis que le renforcement par la laccase a amélioré la dégradation jusqu'à 30%.

En fait, les mêmes types d'enzymes peuvent polymériser les SHs dans certaines conditions, et sont également responsables de leur dégradation. HAIDER, MARTIN [146, 147], DEHORTER et BLONDEAU [89, 103], montraient que l'activité des enzymes extracellulaires de la peroxydase étaient en corrélation avec la dégradation des AHs. Toutefois, dans certain cas, les SHs jouent un rôle inhibiteur sur l'activité de peroxydase et laccases [12, 155].

## CONCLUSION

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution sur l'étude de la biodégradabilité des acides humiques. Cette investigation correspond à un sujet relativement récent car peu d'informations sont disponibles dans la littérature à propos des microorganismes d'intérêt industriel, en particulier ce qui est en relation avec leurs activités vis-à-vis la dégradation des substances humiques. Par conséquent, ayant constaté qu'un manque d'études concernant la caractérisation des acides humiques extraits de sols algériens et surtout leurs biodégradation par un biotope de souches locales, nous a incité d'atteler cette tâche de recherche.

L'extraction, la caractérisation et la biodégradation des AHs ont été étudiées en utilisant, à titre comparatif, des AHs synthétiques. L'ensemble des recherches entreprises nous a permis de conclure sur les sept principaux points suivants :

- 1) Les AHs isolés à partir de sols locaux, en appuyant sur la procédure d'extraction recommandée par l'IHSS, sont similaires à ceux de produits commerciaux (synthétiques). Néanmoins, une étape de purification est avérée primordiale;
- 2) D'une manière générale, les structures macromoléculaires et les formes observées par MEB, les spectres UV-visible et les spectres IRTF d'AHs sont typiquement proches de ceux du sol publiées dans plusieurs travaux;
- 3) Nos résultats, dans sa partie biodégradabilité, ont montré que les souches sélectionnées sont le représentant biotope dégradeur d'AHs dans les sols locaux. En effet, une bonne élimination d'AHs (naturel et synthétique) aller de **35** à **90%**, a été obtenue après quatre semaines d'incubation chez la totalité des souches étudiées, en particulier, avec

les cultures agitées où nous avons remarqué une corrélation entre le niveau de la dégradation et l'agitation des cultures;

- 4) Les champignons sont des excellents dégradeurs d'AHs, suivis des actinomycètes et d'un degré moindre le consortium EBRI<sub>30</sub>. Même, dans des milieux minéraux les souches sélectionnées sont capables d'utiliser les AHs comme seules sources de carbone et d'azote;
- 5) La dégradation d'AHs naturels est apparue meilleure, chez *Aspergillus* sp. CB2 (**≈ 90%**) contre (**≈ 70%**, AHs synthétiques). De même titre, avec *Streptomyces* sp. AB1 et EBRI<sub>30</sub>;
- 6) De plus, nous suggérons que les souches rapides (CB2, CH6, CM5, AB1, AH4, AM2 et EBRI<sub>30</sub>) extrêmement efficaces et d'une grande capacité dégradante, peuvent sélectionner comme des candidates à fortes potentielles pour des applications dans la biorémediation des sols et les biotechnologies de traitement des eaux, spécialement, dans les processus de la biosorption;
- 7) Les modifications de la structure ainsi que la génération de métabolites devraient être approfondies par d'autres techniques analytiques (GC-MS, RMN), afin d'avoir une idée sur les détails structuraux, les processus et les mécanismes de la biodégradation des acides humiques naturels.

Le travail présenté ici a évidemment une durée limitée et est loin de venir à bout des problèmes envisagés. Sa prolongation devrait nous semble t'il porter sur les points suivants :

- Réaliser une expérimentation plus longue, avec d'autres mesures des paramètres qui n'ont pas pu être suivis tels que le COT, CO<sub>2</sub>, carbohydrates, acides aminés et d'autres produits résultent de la biodégradation;
- Etudier les mécanismes réactionnels de la biodégradation et déterminer les enzymes responsables de ce phénomène;

- Réfléchir sur les dispositifs d'application à grande échelle. Pour cela, la conception d'un procédé biosorption-biodégradation à base d'un bioréacteur membranaire pourrait être prometteuse.



## APPENDICE A

### Milieu Czepek

On dissout :2 g  $\text{NaNO}_3$  (Prolabo), 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Bolab-Gmbh), 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 0,5 g KCl (Panreac), 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 0,01 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), 0,05g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), et 30g Saccharose (Prolabo), dans un litre de l'eau distille.

Après avoir ajuster le pH de la solution à 6,5 avec HCl 0,1N, on ajoute 20 g d'Agar bactériologie (Panreac) en agitation. Enfin, on stériliser la solution préparée pendant 20 min à 120°C dans l'autoclave.

### Milieu ISP2

On dissout : 4 g Extrait de levure (Panreac) et 10 g Extrait de malte (Panreac) dans un litre de l'eau distille. On ajuster le pH de la solution à 7,2 avec HCl 0,1N et ajouter 20 g d'Agar bactériologie en agiter bien la solution. Enfin, on stériliser la solution préparée pendant 20 min à 120°C dans l'autoclave.

### Milieu ISP9

On dissout : 10 g Glucose (Merck), 2,84 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck), 2,38 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fluka), 5,65 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fluka) et 1ml d'une solution contenant (g /L) :0,64 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), 0,11g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck),, 0,79 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 0,15 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), dans un litre de l'eau distillé.

Milieu ISP3 : farine d'avoine et agar bactériologie.

Milieu ISP4 : amidon, sels minéraux et agar bactériologie.

## APPENDICE B

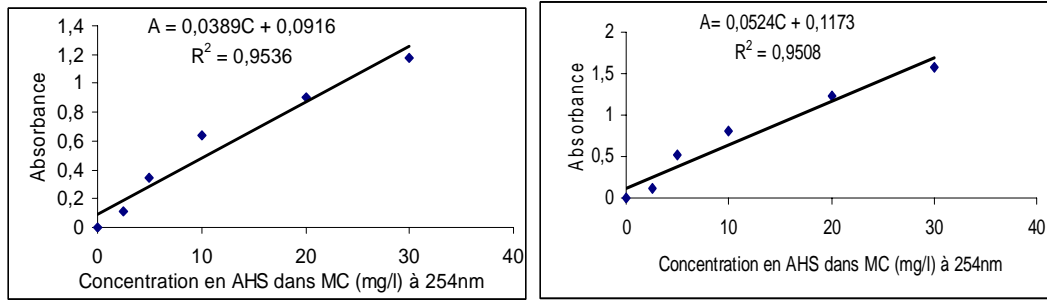


Figure (1): Courbe d'étalonnages de AHS dans MC (czepek).

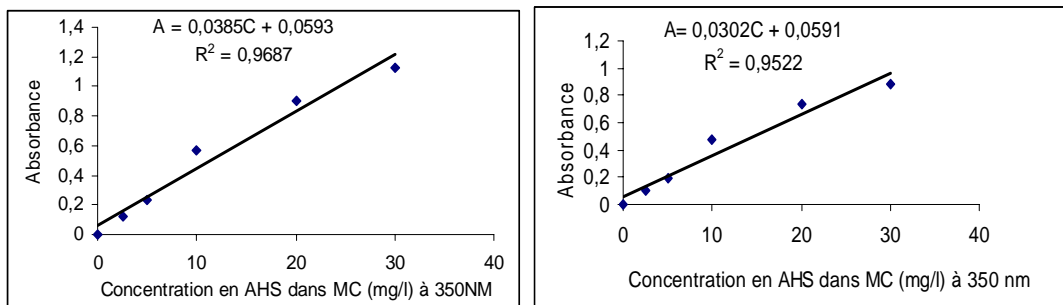


Figure (2): Courbe d'étalonnages de AHS dans MC (ISP9).

**Tableau 1** : Pourcentage de la réduction les acides humiques par les souches isolées.

Selections des champignons	% Réduction à 254nm	% Réduction à 350nm
Champignons du sol de Boufarik		
CB1	4,34	37,3
CB2	55	63
CB3	50	60,6
CB4	4,6	35,3
CB5	19	33,07
CB6	20	39,01
CB7	22,2	49
Champignons du sol de Hadjout		
CH1	35,3	59,54
CH2	23,3	43,97
CH3	30,5	20,3
CH4	10,3	60,2
CH5	17,3	20,5

CH6	57,4	66,01
CH7	27,3	55,33
CH8	21,17	56,5
Champignons du sol de Meftah		
CM1	57	60
CM2	29,03	55,3
CM3	22,47	49,96
CM4	2,1	5,3
CM5	60,56	63
CM6	39	54,3
CM7	50,5	52
Selections des actinomycètes	% Réduction à 254nm	% Réduction à 350nm
Actinomycètes du sol de Boufarik		
AB1	35,91	30,48
AB2	1,316	4,79
AB3	0,15	4,69
AB4	6,12	13,1
AB5	0,076	1,17
AB6	0,62	5,53
Actinomycètes du sol de Hadjout		
AH1	16,25	11,58
AH2	25,59	23,28
AH3	1,21	1,67
AH4	43,03	45,79
AH5	25,58	7,58
AH6	3,26	0,167
AH7	13,59	24,28
AH8	21,17	17,08
Actinomycètes du sol de Meftah		
AM1	37,28	31,5

AM2	47,98	41,2
AM3	15,64	8,37
AM4	0,23	2,34
AM5	1,076	4,69
Consortium microbien d'extrait de la betterave rouge		
EBl <sub>7</sub>	28,86	36,48
EBl <sub>30</sub>	56,35	56,71
EXB <sub>60</sub>	46,58	55,39

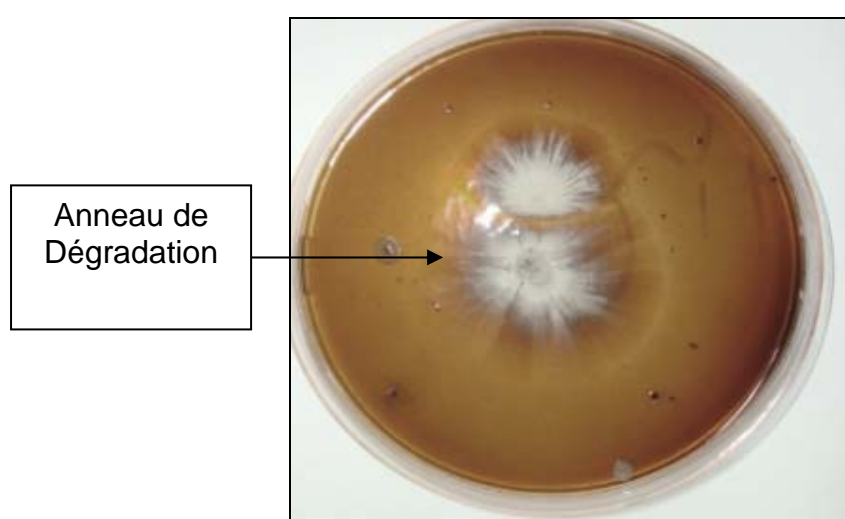


Photo 1: Biodégradation par l'adaptation.

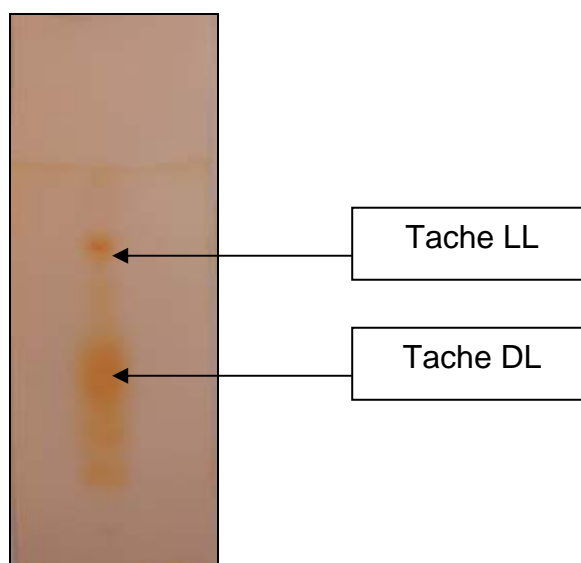
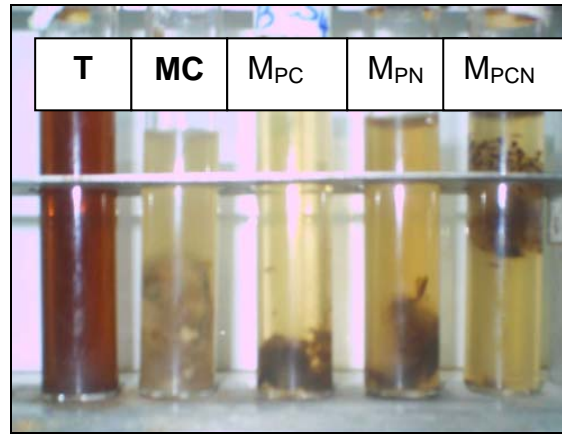
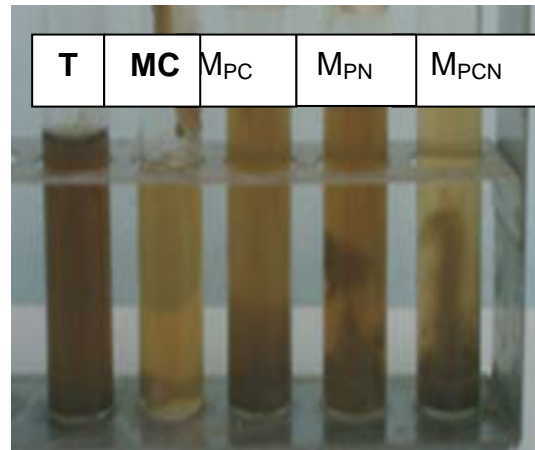
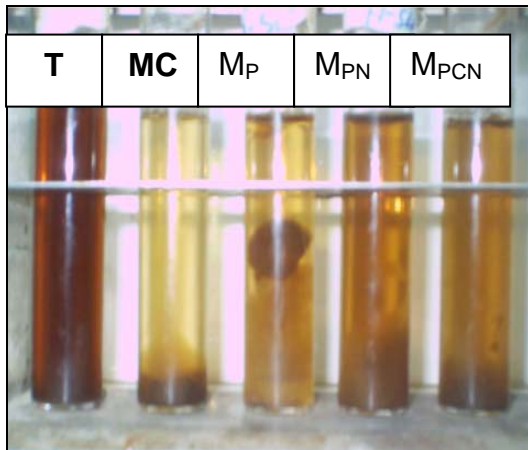


Photo 2 : Chromatographie sur couche mince (CCM).

## APPENDICE C

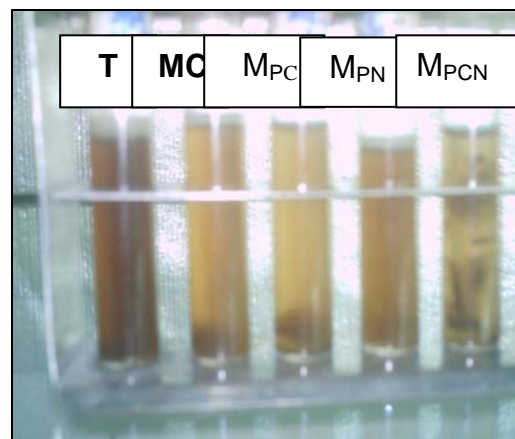
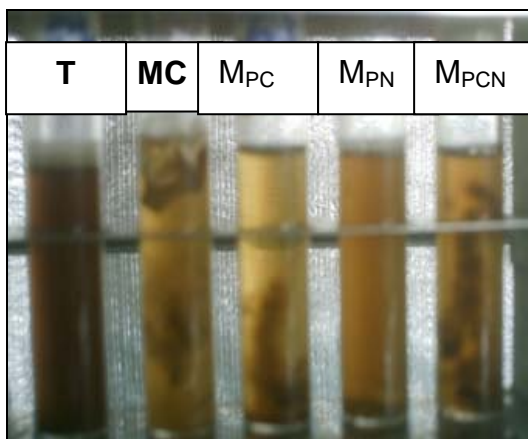


Biodégradation en milieu statique par CB2. Biodégradation en milieu agité par CB2.



Biodégradation en milieu statique par CH5.

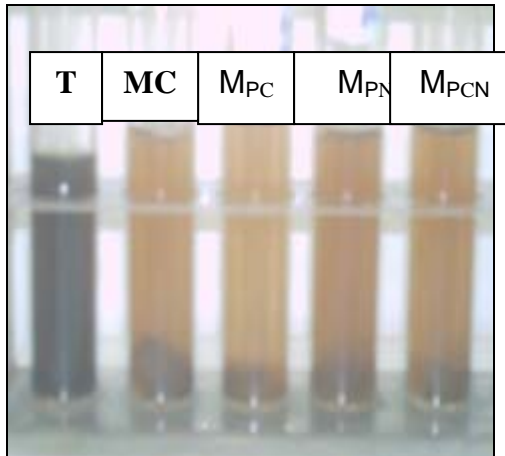
Biodégradation en milieu agité par CH5



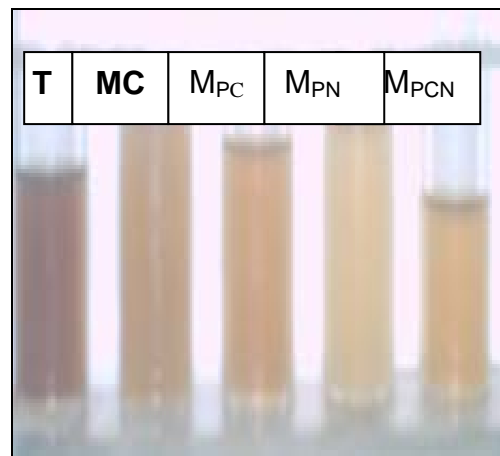
Biodégradation en milieu statique par CM6.

Biodégradation en milieu agité par CM6

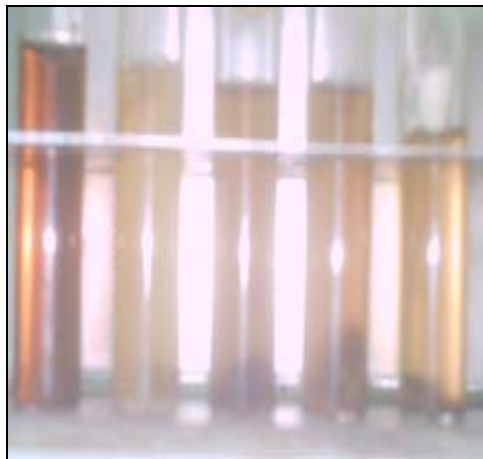
Photo 3 : Biodégradations les acides humiques synthétiques par les champignons performantes.



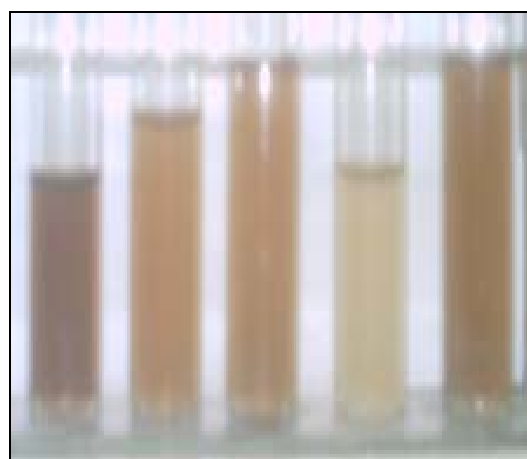
Biodégradation en milieu statique par AB1.



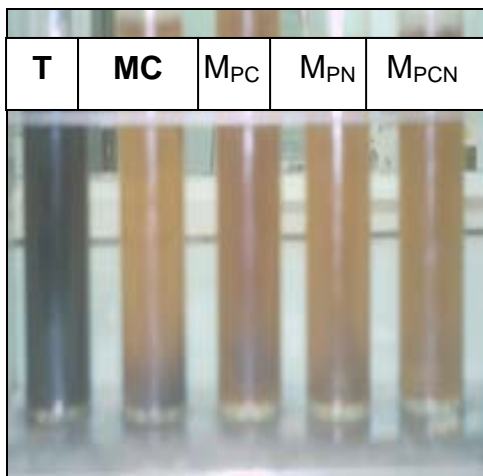
Biodégradation en milieu agité par AB1.



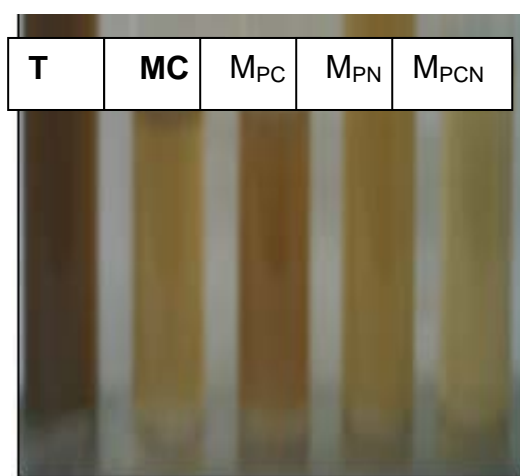
Biodégradation en milieu statique par AH4.



Biodégradation en milieu agité par AH4.



Biodégradation en milieu statique par AM2.



Biodégradation en milieu agité par AM2.

Photo 4 : Biodégradations les acides humiques synthétiques par les actinomycètes performantes



Photo 5 : Biodégradation les acides humiques synthétiques par l'EBRI<sub>30</sub>

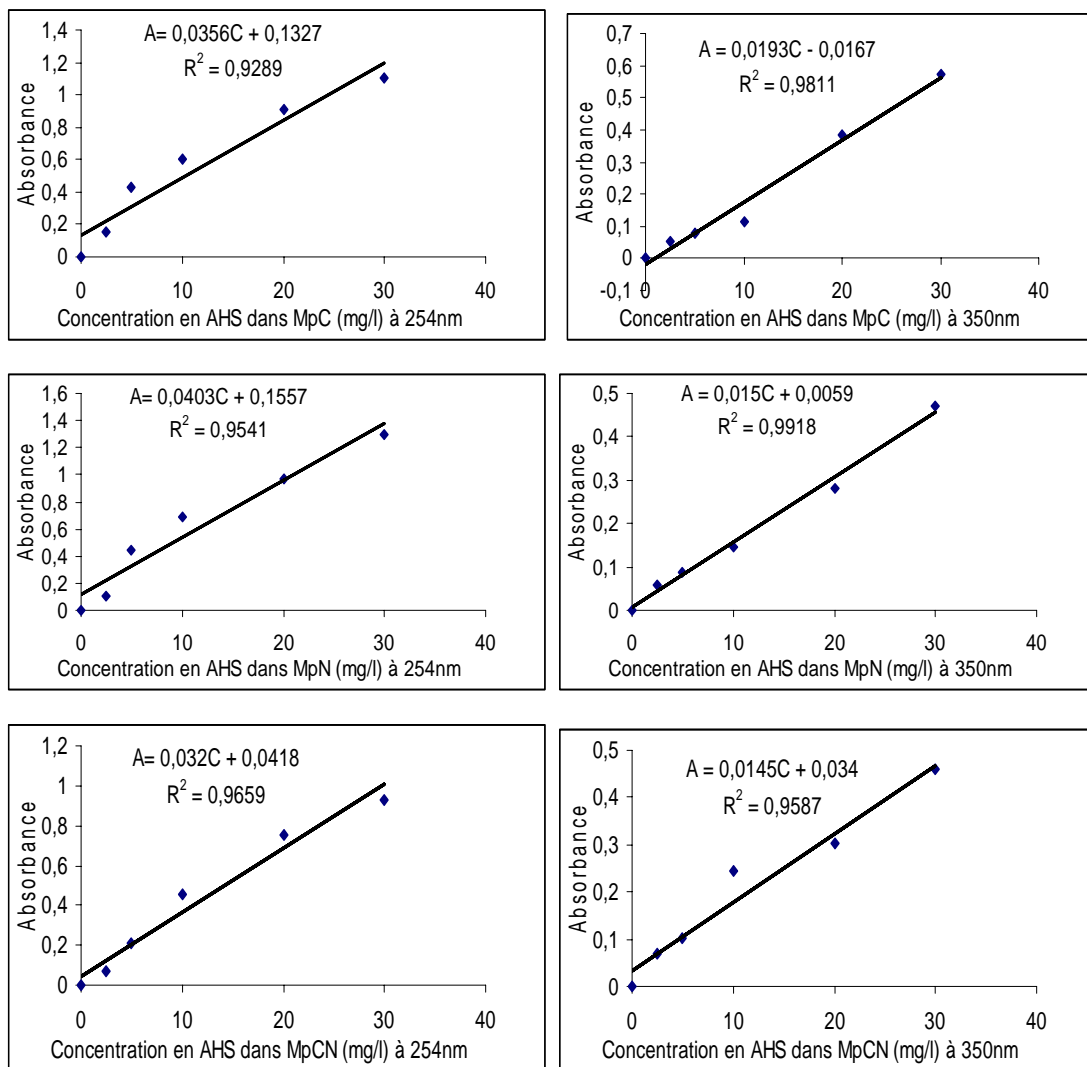


Figure (3): Courbe d'étalonnages de AHS.

Tableau 2 : Pourcentage de la réduction les acides humiques synthétiques par les champignons performantes.

Milieu Complet (MC)				
<b>CB2</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps ( Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	34,61	40,96	4,16	42,91
2	48,92	48,4	5,93	54,63
3	45,2	43,91	14,7	58,73
4	51,34	46,41	50,85	58,96
<b>CH6</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps ( Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	7,43	3,19	8,32	37,83
2	4,49	3,8	13,61	32,15
3	47	3,3	28,54	56,89
4	68,11	33,96	41,96	68,24
<b>CM5</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps ( Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	47,78	21,34	24,38	27,97
2	49	21,38	32,13	51,04
3	54,62	21,43	21,36	56,89
4	46,09	22,29	42,53	50,85
Milieu pauvre en carbone assimilable (M <sub>PC</sub> )				
<b>CB2</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	57,1	12,87	7,94	59,73
2	63	44,68	48,92	66,35
3	68,62	43,7	51,6	68,99
4	71,65	56,26	60,68	73,98
<b>CH6</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0



1	50,64	20	4,94	37,24
2	51,04	27,48	13,61	32,32
3	59,04	29,04	35,91	37,61
4	58,23	39,58	50,47	63,7
<b>CM5</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	47,79	22,73	27,97	50
2	40,44	39,23	40,82	52,93
3	53,88	40,2	40,45	57,08
4	52,37	41,4	43,86	63,7
Milieu pauvre en azote assimilable (M <sub>PN</sub> )				
<b>CB2</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	60,86	54,45	34,59	66,05
2	61,7	62,23	62,19	68,35
3	60,29	60	55,76	70
4	64,99	59,46	59,17	75,99
<b>CH6</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	55,57	22,8	32,13	32,35
2	54	25	32,32	41,77
3	51,42	31,03	49,34	57,84
4	51,6	40	50,47	54,25
<b>CM5</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	56,17	44,94	32,32	44,045
2	62,3	50,12	56,52	61,62
3	56,79	56,79	53,49	62,25
4	59,25	58,79	56,5	60,68
Milieu pauvre en carbone et azote assimilables (M <sub>PCN</sub> )				
<b>CB2</b>	à 254nm		à 350nm	

Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	30,07	58,68	9,26	59,17
2	64,94	38,5	42,15	65,21
3	68,88	48,22	66,72	72,4
4	71,07	50,9	66,99	72,42
<b>CH6</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	47,79	49	41,58	53,3
2	40,44	46,24	40,45	54,82
3	53,88	55,06	55,7	65,59
4	52,37	58,25	62,19	68,19
<b>CM5</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (Semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	59,8	22,73	4,94	37,24
2	37,07	39,23	13,61	32,32
3	64,64	40,2	35,91	37,61
4	61,62	41,4	50,47	63,7

Tableau 3 : Pourcentage de la réduction des acides humiques synthétiques par les actinomycètes performantes.

Milieu Complet (MC)				
<b>AB1</b>	à 254nm		à 350nm	
temps	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	9,91	10,62	6,06	3,59
2	18,85	26,86	28,78	38,58
3	31,17	29,03	35,68	36,88
4	51,71	36,08	34,43	53,97
<b>AH4</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	18,01	11,59	23	25,86

2	25,26	38,53	29,29	45,66
3	44,69	38,82	49,1	45,73
4	43,58	39,26	47,076	44,63
<b>AM2</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	3,54	11,95	24,85	4,34
2	17,93	8,06	28,28	10,04
3	53,3	36,72	47,49	37,03
4	50,82	41,61	58,77	43,408
Milieu pauvre en carbone assimilable ( $M_{PC}$ )				
<b>AB1</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	14,87	16,55	12,62	20,4
2	21,53	15,51	28,78	37,77
3	37,1	50,88	43,47	37,33
4	53,13	51,08	54,72	50,22
<b>AH4</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	2,17	15,04	14,7	12,6
2	21,07	30,38	15,85	23,23
3	55,08	31,95	38,68	50,82
4	62,83	45,87	50,82	49,02
<b>AM2</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	1,8	16,81	20,35	14,75
2	15,58	24,04	35,15	26,87
3	46,63	44,03	53,97	58,47
4	50,63	47,52	51,42	59,97
Milieu pauvre en azote assimilable ( $M_{PN}$ )				
<b>AB1</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité

0	0	0	0	0
1	12,47	5,93	1,1	23,3
2	32,81	12,14	5,45	19,59
3	45,61	31,9	27,58	57,72
4	54,38	49,49	53,38	61,61
<b>AH4</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	12,76	16,28	23	16,28
2	22,65	19,34	24,34	19,34
3	50,25	43,2	38,68	43,2
4	63,66	44,07	43,028	44,07
<b>AM2</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	10,17	12,92	19,03	19,39
2	16,37	16,37	27,96	23,63
3	43,01	35,07	37,11	49,62
4	43,71	36,37	40,17	52,47
Milieu pauvre en carbone et azote assimilables (M <sub>PCN</sub> )				
<b>AB1</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	10,62	9,91	23	25,86
2	26,86	8,85	28,08	18,13
3	29,03	31,57	47,076	36,97
4	51,71	36,08	50,22	40,63
<b>AH4</b>	à 254nm		à 350nm	
Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	11,59	18,01	5,25	3,5
2	38,53	25,26	26,06	38,18
3	38,82	43,58	53,37	43,48
4	39,26	44,69	58,77	65,21
<b>AM2</b>	à 254nm		à 350nm	

Temps (semaine)	Agité	Statique	Statique	Agité
0	0	0	0	0
1	8,06	3,54	30,5	30,8
2	11,95	17,93	33,53	30,91
3	36,72	50,82	52,04	40,03
4	41,61	53,3	50,52	53,52

## APPENDICE C

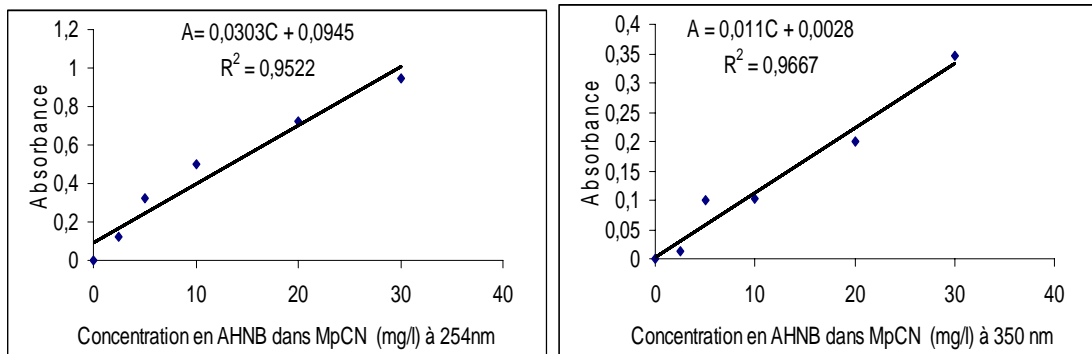


Figure (4): Courbe d'étalonnages de AHNB dans czepek.

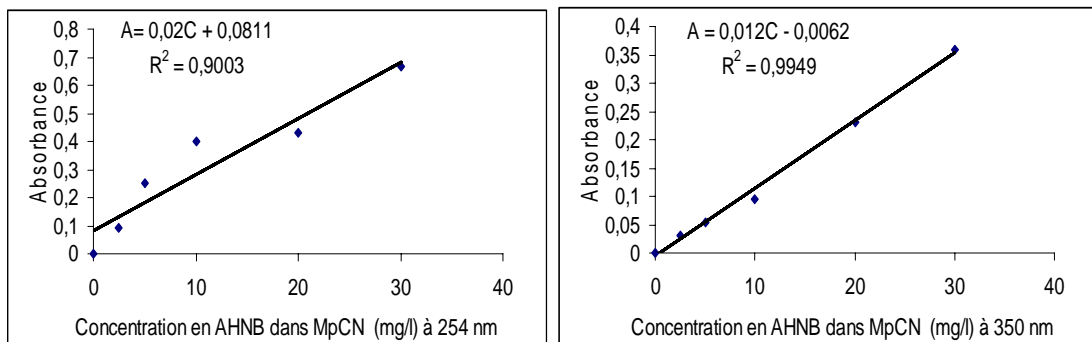


Figure (5): Courbe d'étalonnages de AHNB dans ISP9.

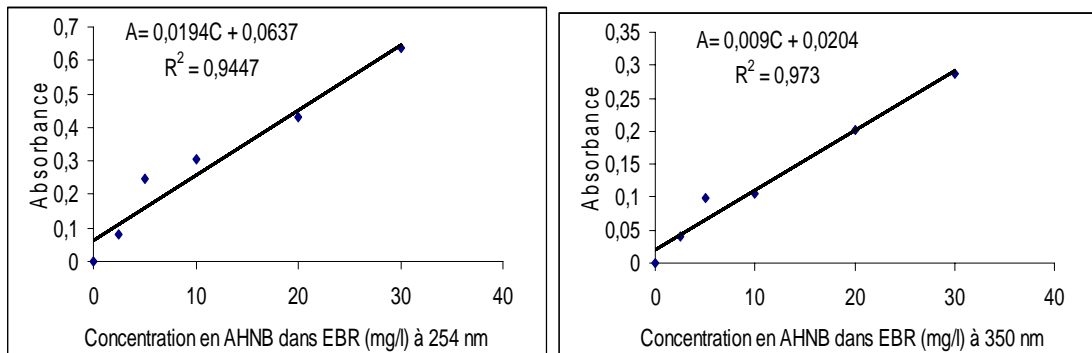


Figure (6): Courbe d'étalonnages de AHNB dans EBR<sub>130</sub>.

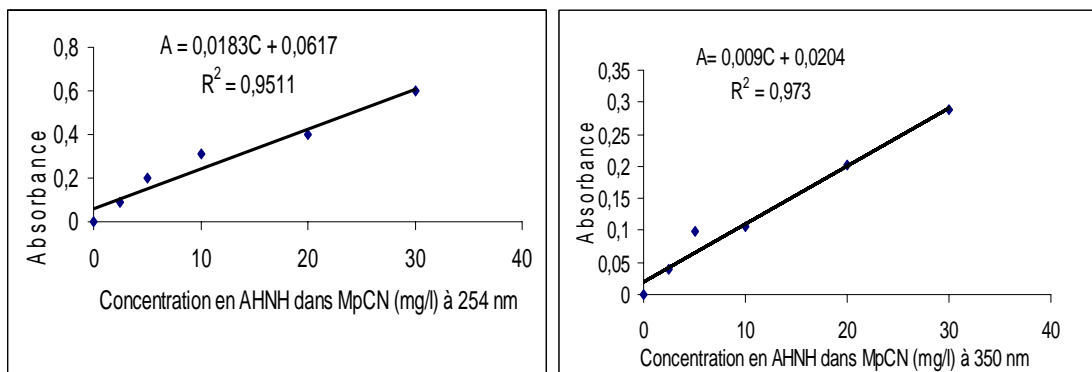


Figure (7): Courbe d'étalonnages de AHNH dans czepek.

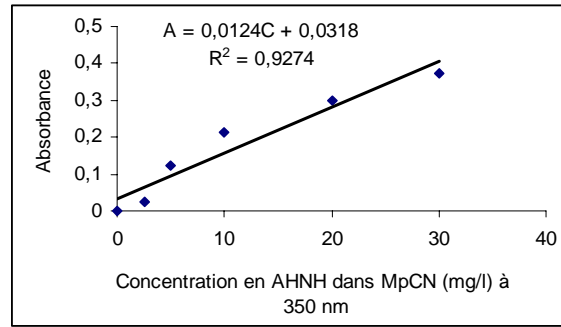
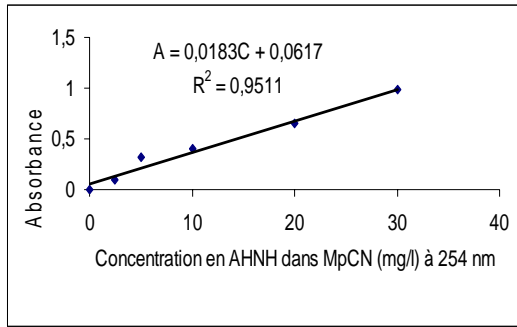


Figure (8): Courbe d'étalonnages de AHNH dans ISP9.

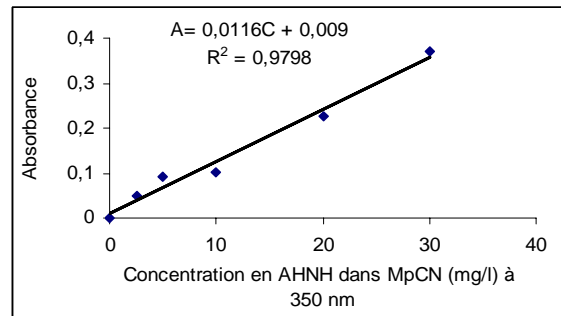
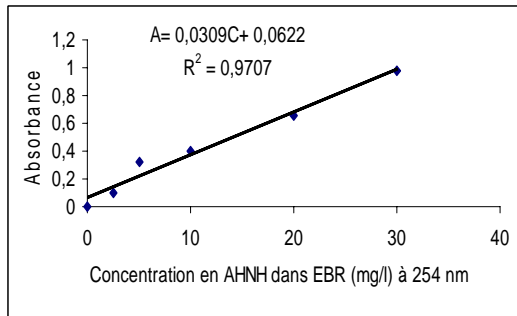


Figure (9): Courbe d'étalonnages de AHNH dans EBR130.

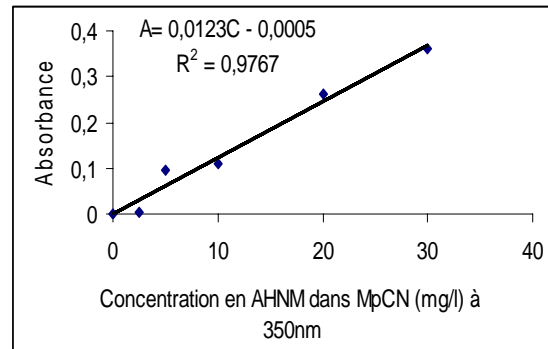
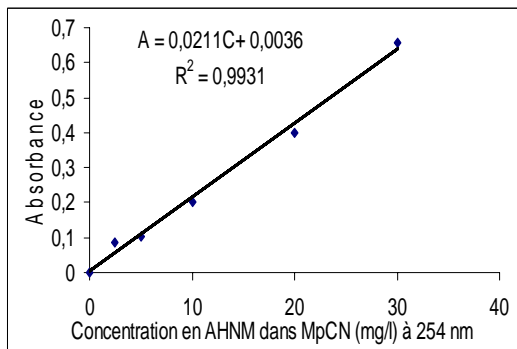


Figure (10): Courbe d'étalonnages de AHNM dans czepek.

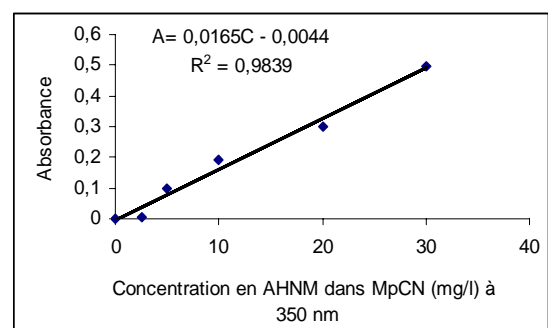
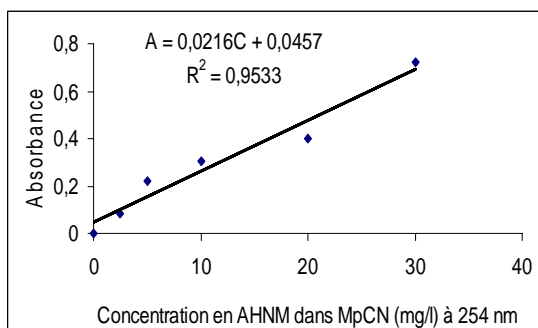


Figure (11): Courbe d'étalonnages de AHNM dans ISP9.

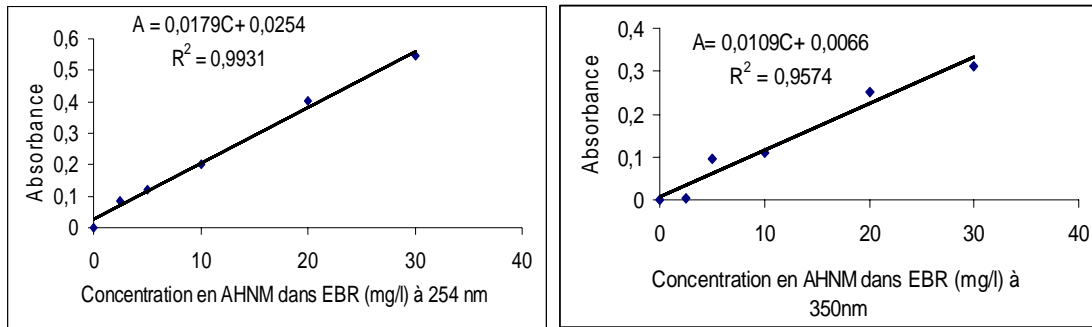


Figure (12): Courbe d'étalonnages de AHNM dans EBR<sub>30</sub>.

Tableau 4 : Pourcentage de la réduction les acides humiques naturels par les souches performantes.

<b>Acide humique naturel de Boufarik (AHNB)</b>						
Temps (semaine)	à 254nm			à 350nm		
	CB2	AB1	EXBI <sub>30</sub>	CB2	AB1	EXBI <sub>30</sub>
0	0	0	0	0	0	0
1	15	29,89	0,78	67,87	14,44	4,58
2	36,92	30,34	5,51	80,54	47,77	28,125
3	38,3	32,28	22,99	76,96	53,33	27,36
4	58,07	55,16	36,85	86,85	66,66	67,7
<b>Acide humique naturel de Hadjout (AHNH)</b>						
Temps (semaine)	à 254nm			à 350nm		
	CH5	AH4	EXBI <sub>30</sub>	CH5	AH4	EXBI <sub>30</sub>
0	0	0	0	0	0	0
1	10,97	2,64	16,12	5,7	25,73	14,25
2	40,16	21,86	19,28	51,44	56,02	17,2
3	50	32,79	36,53	86,3	49,7	33,87
4	48,86	45,05	43,98	85,968	53,8	56,99
<b>Acide humique naturel de Meftah (AHNM)</b>						
Temps (semaine)	à 254nm			à 350nm		
	CM5	AM2	EXBI <sub>30</sub>	CM5	AM2	EXBI <sub>30</sub>
0	0	0	0	0	0	0



1	16,38	15,31	1,83	8,43	2,95	7,11
2	21,06	11,95	4,02	29,88	30,7	42,84
3	32,92	46,12	22,3	28,95	65,7	47,03
4	52,73	50,73	52,47	70,11	66,29	66,19

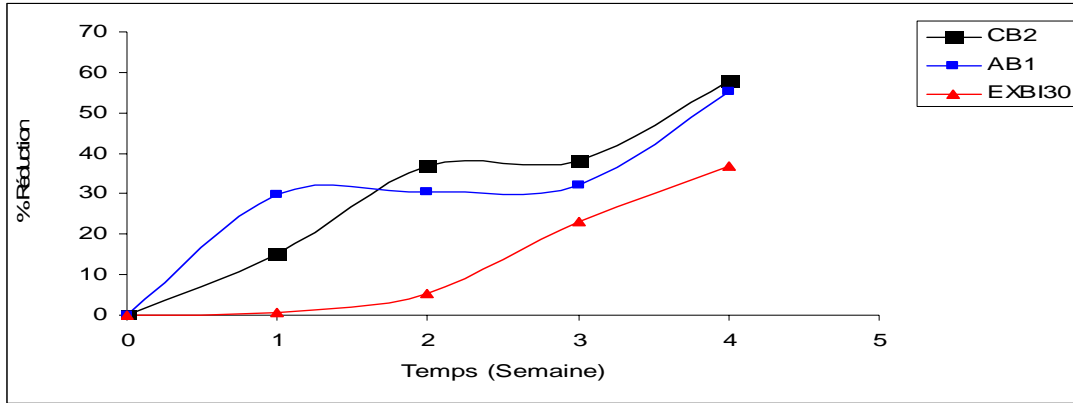


Figure 13: Réduction d'AHNB dans  $M_{PCN}$  sous l'agitation à 254 nm.

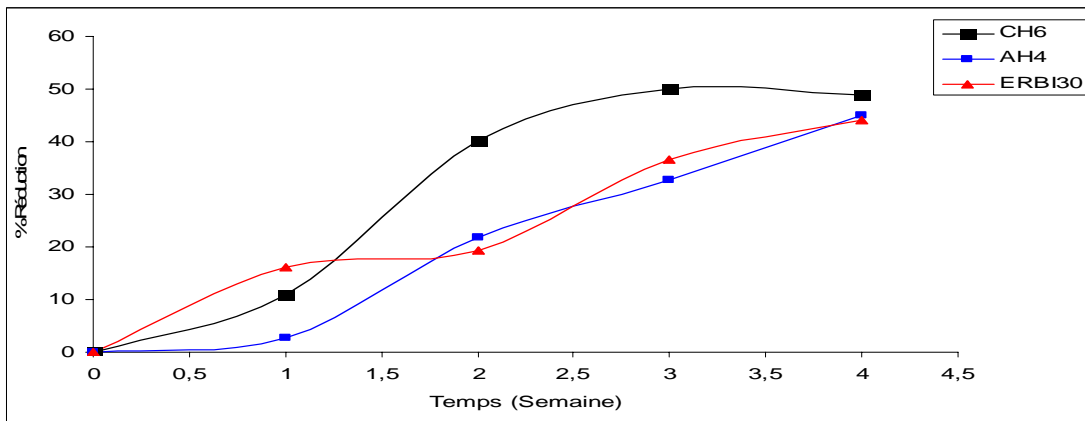


Figure 14: Réduction d'AHNH dans  $M_{PCN}$  sous l'agitation à 254 nm.

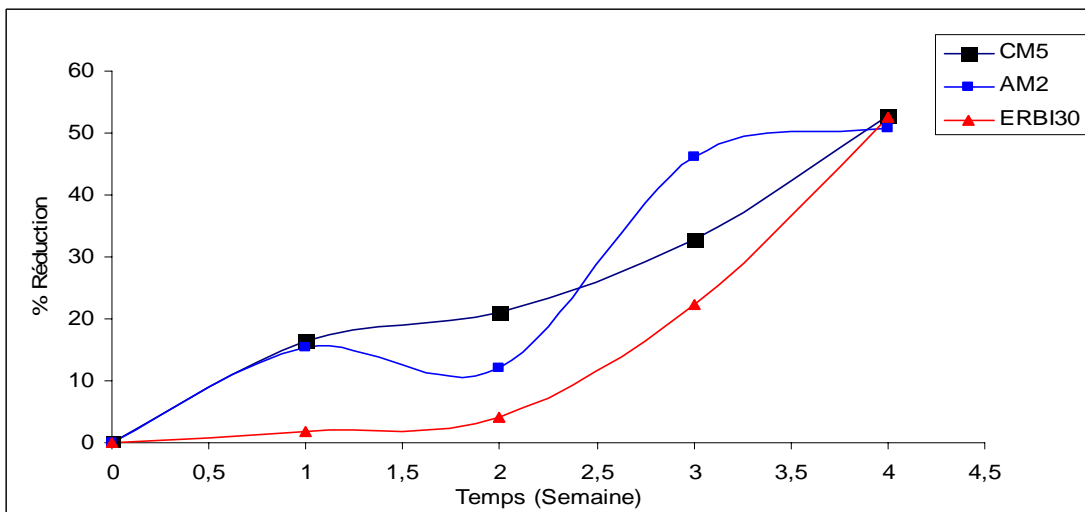


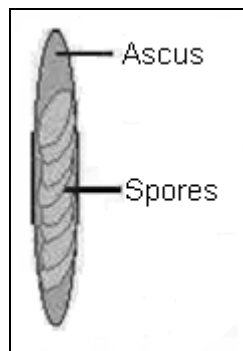
Figure 15: Réduction d'AHNM dans  $M_{PCN}$  sous l'agitation à 254 nm.

## GLOSSAIRE

**Acariens** : Les acariens (*Acari* ou *Acarina*) sont des arthropodes de l'ordre des arachnides, de taille souvent inférieure au mm. Ils sont retrouvés dans une grande diversité d'habitats. Beaucoup vivent librement dans le sol ou l'eau mais il existe un grand nombre d'espèces parasites et pathogènes pour les animaux ou les plantes.

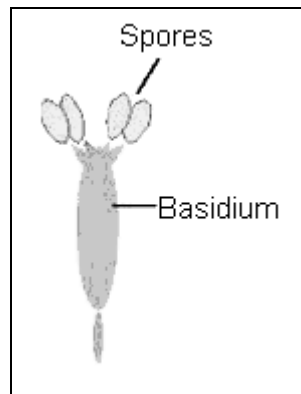
**Antibiotique**, sont des substances produites par des microorganismes et ayant le pouvoir d'inhiber ou de détruire d'autres microorganismes.

**Asques** : Structure contenant les spores de reproductions des Ascomycètes.



**Autotrophie** : L'autotrophie désigne la capacité de certains organismes vivants à produire de la matière organique en procédant à la réduction du carbone inorganique (dioxyde de carbone).

**Baside**: En mycologie, on appelle baside la cellule reproductrice des champignons basidiomycètes, de forme généralement clavée. Les spores prenant naissance à l'extrémité d'une baside, et qui se détacheront ensuite d'elle, s'appellent basidiospores. Il y a généralement quatre spores par baside. L'ensemble des basides constitue le basidiome (ou basidiocarpe).



**Biomasse** : En écologie, la biomasse est la quantité totale de matière (masse) de toutes les espèces vivantes présentes dans un milieu naturel donné.

**Biotope** : En écologie, un biotope est un ensemble d'éléments caractérisant un milieu physicochimique déterminé et uniforme qui héberge une flore et une faune spécifique (la biocénose).

**Cellulose** : Glucide, substance principale des parois cellulaires et des fibres de tous les tissus végétaux.

**Chitine**, substance organique dont la structure ressemble à celle de la cellulose et constituant en grande partie l'exosquelette de différents arthropodes, comme les crustacés et les insectes. Cette substance solide et ferme maintient les tissus de ces organismes.

**Chlamydospores**: spores volumineuses terminales ou intercalaires à paroi épaisse.

**Conidiospores**, sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore.

**Enzyme** : Catalyseur d'origine biologique. Un enzyme est une molécule (protéine ou ARN dans le cas des ribozymes) permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction.

**Hétérotrophie:** L'hétérotrophie est un type de métabolisme. Les hétérotrophes sont contraints de se procurer leur matière organique en la prélevant sur d'autres organismes, soit vivants (cas des prédateurs, des parasites et des commensaux), soit morts (nécrophages), ou encore sur les restes d'autres êtres vivants. L'existence même des hétérotrophes est intimement liée à celle des autotrophes, qualifiés de producteurs primaires.

**Hyphes** : Structure filamenteuse des mycètes constituée d'une file de cellules. Durant sa phase végétative, le mycète croît par allongement et ramification des hyphes qui forment un réseau lâche, le mycélium. Chez certaines espèces, les hyphes peuvent s'assembler en structures compactes, les carpophores.

**Lithotrophes** : utilisent comme donneur d'électrons un substrat minéral dans leur métabolisme énergétique : ils « mangent » des minéraux.

**Mésophiles** : qui comprennent la majorité des microorganismes se développent entre 15 et 45°C.

**Métabolisme** : Le métabolisme est l'ensemble des transformations moléculaires et des transferts d'énergie qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule ou l'organisme vivant. C'est un processus ordonné, qui fait intervenir des processus de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme).

**Microbe** : Le microbe est un terme générique et non scientifique visant les bactéries, levures, protozoaires et virus, pathogènes ou non. Familièrement, le mot microbe désigne un micro-organisme (le plus souvent une bactérie ou un virus) responsable d'une maladie.

**Microflore** : Ensemble des micro-organismes vivant dans un habitat.

**Mycélium** : Ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, formant la partie végétative d'un champignon. Suivant l'étape du cycle de reproduction du mycète, les cellules de ces filaments mycéliens sont haploïdes ( $n$  chromosomes) ou diploïde ( $2n$  chromosomes). Lorsque deux filaments haploïdes du même mycélium, ou de deux mycéliums différents, se

rencontrent, ils peuvent fusionner, donnant naissance, dans certains cas, à des cellules à deux noyaux ( $2n$  chromosomes).

**Mycorhize** : Association symbiotique d'un mycète avec les racines d'une plante. Le réseau dense et étendu des hyphes des champignons mycorhiziens aide la plante à obtenir des sels minéraux présent dans le sol (principalement l'eau, le phosphore et l'azote), tout en la protégeant d'attaques d'autres organismes pathogènes. Plusieurs études ont démontré que sans la présence d'un champignon symbiotique, la plante poussera plus lentement (voire pas du tout) et sera beaucoup plus susceptible d'être la victime d'une infection. En retour, le champignon bénéficie de la photosynthèse de la plante sous forme de matière organique riche en énergie (sucres) essentielle à sa survie. Les champignons **endomycorhiziens** forment des structures en forme d'arbustes ou de petits sacs microscopiques à l'intérieur même de la cellule de la plante. Les **ectomycorhiziens** ne pénètrent pas à l'intérieur de la paroi cellulaire de la plante, mais entourent simplement les racines, formant un manteau de mycélium et un réseau entre les parois des cellules de la racine.

**Nématode** : Les nématodes (*Nematoda*) appartiennent à l'embranchement des émathelminthes ou vers ronds. Ils possèdent une symétrie bilatérale, le corps est non segmenté. Les nématodes sont recouverts d'une épaisse cuticule. Ils mènent une vie libre ou parasite. Les nématodes libres se rencontrent dans des environnements très diversifiés : eaux douces, eaux saumâtres, eaux salées. *Caenorhabditis elegans* vit dans le sol, il est un organisme modèle en biologie. Les nématodes parasites s'attaquent aux Invertébrés et aux Vertébrés, vivant dans les cavités (intestin, rein), dans les vaisseaux sanguins ou dans les tissus. Il existe un grand nombre de nématode parasite des plantes.

**Nutriment** : Substance alimentaire pouvant être entièrement et directement assimilée.

**Phototrophes** : tirent leur énergie de la lumière. Les cyanobactéries se servent de chlorophylle pour capter l'énergie solaire et fabriquer du glucose à partir du dioxyde de carbone et de l'eau. Par exemple, les sulfobactéries

utilisent l'énergie solaire, le dioxyde de carbone et l'acide sulfurique pour élaborer des glucides et du soufre.

**Protéolytique** : ce sont des agents très actifs à la dégradation des protéines.

**Rhizomorphe** : Cordon macroscopique formé d'hyphes mycéliens étroitement apposés. Ils contribuent à l'expansion d'un mycète dans des conditions environnementales défavorables.

**Rhizosphère** : Région du sol directement influencée par les racines et les microorganismes associés. Elle est riche en bactéries qui se nourrissent des cellules rejetées par la plante et des protéines et sucres émis par les racines. Les protozoaires et nématodes qui se nourrissent des bactéries sont aussi concentrés autour des racines. Ainsi la plupart du cycle des nutriments et de la suppression des maladies se déroule dans la zone immédiatement adjacente aux racines.

**Streptomyces** : ce sont des bactéries saprophytes du sol. Gram+, sporulées apparaissant sous forme de filaments ramifiés portant des conidies en chaînes parfois très longues.

**Symbiose** : Association permanente ou prolongée de deux espèces, souvent indispensable à la survie de l'une et parfois des deux. Elle peut prendre trois formes : mutualisme, parasitisme ou commensalisme.

**Thermophiles** : Sont capables de se développer au dessus de 45°C et les thermophiles extrêmes jusqu'à 75 à 80°C et même au-dessus.

**Technique de Drapeau de Roth** : Consiste à appliquer en surface des colonies en développement un petit ruban adhésif que l'on appose ensuite sur une lame de microscope. On recouvre d'une lamelle et on observe au microscope optique au fort grossissement (x 100), avec l'huile d'immersion.

**Vésicule** : Organite cytoplasmique dont le contenu n'est pas structuré.

## REFERENCES

1. Kononova, M.M., « Soil Organic Matter », Ed. Pergamon, Press, Elmsford, NY, (1966).
2. Stevenson, F.J., « Geochemistry of Soil Humic Substances. In Humic Substances in Soil, Sediment and Water », Ed. Wiley- Interscience Publication John Wiley and Sons, (1985), pp. 13-52.
3. Volkoff, B., Cerri, C.C., « L'humus des sols du Brésil. Nature et relations avec l'environnement », Ed. Chiers Orstom, Paris, V.24, (1988), pp.83-95.
4. Victorndira, D., « Substances humiques du sol et du composte analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs: vers une approche thermodynamique », Thèse, Toulouse, France, (2006).
5. Berthelin, J., Leyval, C., Toutain, F., « Rôle des organismes dans l'altération et l'humification. In Pédologie », Tome 2, Ed. Paris, (1994), pp.143–237.
6. Paul, E.A., Clark, F.E., « In Soil microbiology and biochemistry », Ed. Academic press, New York, (1996).
7. Stevenson, F.J., « Extraction, fraction and general chemical composition of soil organic matter », Ed. Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions, John Wiley and Sons, New York, 1982.
8. Duchaufour., « Pédogenèse et classification », Pédologie, Ed. Masson, Paris, Barcelone, Milan, (1983).
9. Hayes, M.H.B., Clapp, C.E., « Humic substances: Consideration of composition, aspects of structure, and environmental influences », Ed. Soil Science, V. 166, (2001), pp.732-737.
10. Piccolo, A., « The supramolecular structure of humic substances », Soil Science, V.166, (2001), pp.810-832.
11. Sposito, G., « The Chemistry of soils », Ed. Oxford University Press, Oxford, (1989).
12. Tzafrir, G., Yitzhak, H., Yona, C., « Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms », fungal biology reviews, V.2 1, (2007), pp. 179-189.
13. Moriguch, T., Yano, K., Tahara, M., Yaguchi, K., « Metal-modified silica adsorbents for removal of humic substances in water », J. Colloid Interface Sci, V.283, (2005), pp.300–310.
14. Bian, R., Watanade, Y., Tanbo, N., Ozawa, G., « Removal of humic substances by uf and nf membrane systems », Water Sci, Technol, (1999), pp.121-129.
15. Bratskaya, S., Schwarz, S., Chevonetky, D., « Comparative study of humic acids flocculation with chitosan hydrochloride and chitosan glutamate, Water Res » , V.38, (2004), pp.2955-2961.

16. Wuh, S., Zhang, A.Q., Wang, L.S., « Immobilization study of biosorption of heavy metal ions onto activated sludge », Ed. J. Environ. Sci, V.16,(2004), pp.640-645.
17. Esparza, M., Esparza, S., Westerhoff, P., « Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass, Water Res », V. 37, (2003), pp.2301-2310.
18. Egil, T.G., « The role of humic substances in the acidification response of soil and water: results of the humic Lake acidification experiment (Humex) », Ed. Environ, Int, V.20, (1994), pp.363-368.
19. Choi, S.B., Yun, Y.S., « Biosorption of cadmium by various types of dried sludge: an equilibrium study and investigation of mechanisms », Ed. J. Hazard, Mater, V.138, (2006), pp.378-383.
20. Fenghua, J., Huali, F., Longa, Y., Shen, D.S., « Study on biosorption of humic acid by activated sludge », Pakistan Biochemical Engineering Journal, 2007.
21. Kastner, M., Hofrichter, M., « Biodegradation of humic substances », In M. Hofrichter and A. Steinbüchel, Biopolymers, Lignin, Humic Substances and Coal, Germany, V.1, (2001), pp.349-378.
22. Twagiramungu, F., « Etude potentiométrique des propriétés acidobasiques et de complexation d'acides humiques d'origine différente avec les ions  $Pb^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  », Thèse, Gent, (2003).
23. Hayes, H.B., Maccrthy, P., Malcom, R.L., Swift, R.S., « Humic Substances II: In search of structure », Ed. J. Wiley, Chichester, (1989).
24. Flaig, W., « Generation of Model Chemical Precursors in Humic Substances and their Role in the Environment », Ed. F.H. Frummel, R.F. Christman, Ed. John Wiley, New York, (1988).
25. Cambridge University Press 0521621461: « Cation Binding by Humic Substances », Edward Tipping Excerpt More information, (2003).
26. Exiangzhen, L., « Transformation and mineralization of organic matter by the humivorous larva of pachnoda ephippiata (Coloptera: Scarabaeidae) », Ed. Universitat Konstanz, (2004).
27. Stevenson, F.J., « Humus Chemistry », Genesis, Composition and Reactions, John Wiley, New York, (1982).
28. Langford, C.H, Gamble, D.S., Underdown, A.W., Lee, S., « Aquatic and Terrestrial Humic Materials », in R.F. Christman E.T. Gjessing, Ann Arbor Science, Michigan, (1983).
29. Yanze, K.C., « Biodégradation des acides humiques par Streptomyces Viridosporus », Thèse, Lille, (1992).
30. Annabi, M., « Stabilisation de la structure d'un sol limoneux par des apports de composts d'origine urbaine: relation avec les caractéristiques de leur matière organique », Thèse, Paris, Grignon, (2005).



31. Tissaux, J.C., « Une revue bibliographique des principaux mécanismes pédogénétiques pour caractériser le rôle du bois raméal fragmenté (BRF) dans le processus d'humification », N° 60 Laval Québec G1K 7P4 QUÉBEC Canada, (1996).
32. Mokol, R., « Les sols cultivés », Ed.Lavoisier, Paris, (1996).
33. Duchaufour, P., « Humification et Ecologie », Ed.Cah O.R.S.T.O.M, sér. Pédol, V. 8, (1970), pp.382-385.
34. Konkol., Thege, S.A., « Humifultate un principe actif a base naturelle humet », Budapest, HONGR E-mail: humet@humet.hu
35. Eyeraguibel, B., « Caractérisation des substances humiques biomimetiques-effets sur les végétaux », Thèse, Toulouse, (2004).
36. Biomed, J. A., « Review Humic substances compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine », (2005), pp.13-24.
37. Andreux, F., Jacquin, F., Metche, M., « Etude de la minéralisation et de l'humification biologique d'autolysats foliaires de Juglans regia », Ed. C.R. Ac. Sci, Paris, V. 270, (1970), pp.3017-3020.
38. Paul, E.A., Campbell, C.A., Rennie, A., Mccallum, K.J., «Investigations of the dynamics of soil humus utilizing carbon dating techniques », Ed. Gong, Znt. Sci, Sol, 8, Bucarest, V. 3, (1964), pp.201-208.
39. Amir, S., « Contribution a la valorisation de boues de station d'épuration par compostage: Devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost », Thèse, Toulouse, N° d'ordre : 2207, (2005).
40. Schnitzer, M., Khan, S.U., « Humic Substances in the Environment », Ed. Marcel Dekker, Inc, New York, (1972).
41. Almendros, G., Sanz, J., «A structural study of alkyl polymers in soil after perborate egradation of humin», Ed.Geoderma, V. 53, (1992), pp.79-95.
42. Buffle, J., « Complexation Reaction aquatic systems: an analytical approach », Ed. Chichester UK, Ellis Horwood Ltd, (1988).
43. Oades, J.M., « An introduction to organic matter in mineral soils », In J.B. Dixon and S.B. Weed, Minerals in soil environments, 2 Ed. SSSA, Madison, WI, (1989), pp.89-159.
44. Schnitzer, M., Khan, S.U., « Humic substances in the environment », M. Dekker, New York, (1972), pp.327.
45. Andreux, F., Munier.Lamy, C., « Genèse et propriétés des molécules humiques », M. BONNEAU & B SOUCHIER, Pédologie 2 : Constituants et propriétés du sol, Ed. Masson, (1994), pp.109-134.
46. Hayes, M.H.B., Clapp, C.E., « Humic substances: Consideration of composition, aspects of structure, and environmental influences », Ed. Soil Science, V.166, (2001), pp.732-737.

47. Jolyh, A., Belzile, N., « Pyrolysis gas chromatography – mass spectrometry of humic substances extracted from Canadian lake sediments », Ed. Can. J. Chem, V.78, (2000), pp.51-63.
48. Koivula, N., Hanninen, K., « Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stages of humification », Chemosphere, V. 44, (2001, pp.271-279.
49. Francou, C., « Stabilisation de la matière organique au cours du compostage de déchets urbains : influence de la nature des déchets et du procédé de compostage - Recherche d'indicateurs pertinents», Thèse Paris, Grignon, France, (2003).
50. Calvet, R., « Le Sol. Propriétés et fonctions », (tome1), Ed. France, Agricole, (2003), pp.456.
51. Calvet, R., « Le Sol. Propriétés et fonctions », Tome2, Ed.France, Agricole, (2003), pp.511.
52. Burdon, J., « Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic», Ed. Soil Science, V. 166, (2001), pp.752-769.
53. Rey, F., Cassado, J., Calle, E., Facal, P., « Fractal related morphology and acidic humus like extract obtained from eucalyptus (Eucalyptus globules) », Ed.Toulouse, France, Proceedings V.1, (2000), pp.77-80.
54. Senesi N., « Aggregation patterns and macromolecular morphology of humic substances: a fractal approach», Ed. Soil Science, V.164, (1999), pp.841-856.
55. Schulten, H.R., Leinweber, P., « Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modeling », Ed. J. Anal, Appl, Pyrolysis, V. 38, (1996), pp.1-53.
56. Schulten, H.R., Schinitzer, M., « Chemical Model Structures for Soil Organic Matter and Soils », Ed. Soil Science, V.162, (1997), pp.115-130.
57. Engebretson, R.R., Wandruszka, R.V., « The effect of molecular size on humic acid associations », Ed.Org. Geochem, V. 26, (1997), pp.759-767.
58. Quenea, K., « Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une cvhronoséquence forêt/maïs (Cestas, Sud Ouest de la France) », Thèse, Paris, France, (2004), pp.191.
59. Piccolo, A., « The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science », Ed. Adv, Agron, V.75, (2002), pp.57-134.
60. Kenzorthy, I.P., Hayes, M.H.B.,« Investigations of some structural properties of humic substances by fluorescence quenching », Eds. M.H.B. Hayes and W.S. Wilson, (1997), pp.39- 45.
61. Almendros, G., Sanz, J., « A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin », Ed. Geoderma, V. 53, (1992), pp.79-95.

62. Schulten, H.R., Leinweber, P., « New insights into organic-mineral particles: composition, properties, and models of molecular structure », Ed. Biol. Fertil. Soils, V. 30, (2000), pp.399–432.
63. Andreux, F., Munier.Lamy, C., « Genèse et propriétés des molécules humiques », Ed. Masson, (1994), pp.109-134.
64. Duchaufour.P, Ehblum, W., « Introduction à la science du sol, végétation, environnement », 6<sup>ème</sup> édition, (2001).
65. Flaig, W., « Science du sol », (1970).
66. Andreux, F., «Propriétés des molécules humiques », Pédologie 2 : Constituants et propriétés du sol, Ed. Masson, 1995, pp.109-134.
67. Gassart, P., «Contribution a l'étude des interactions de la matière organique des sols avec les métaux lourds. Etude structural et analytique des molécules modèle », Lille, (2001).
68. Tissaux, J.C., « Une revue bibliographique des principaux mécanismes pédogénétiques pour caractériser le rôle du bois raméal fragmenté (BRF) dans le processus d'humification », Ed. Laval Québec, Canada, N° 60, (1996).
69. Labanowsk, J., «Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure composé hension de sa réactivité et de sa caractérisation», (2004).
70. Saiw-Jimenew, C., Senesi, N., Leeum, J.W., « Evidence of lignin residues in Humic acids isolated from vermicomposts », Ed. J. Anal. Appl. Pyrol, V.15, (1989), pp .121-128.
71. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itaara, M., « Biodegradation of lignin in a compost environment: a review », Ed. Bioresource Technol, V.72, (2000), pp.169-183.
72. Waksman, S.A., «Humus, Origin, Chemical Compositions and Importance in nature», Ed.Baltimore, Williams &WilkinsCo, (1932).
73. Nimz, H., «Beech lignins: proposal of a constitutional scheme», Ed. Angew. Chem. Int, V.13, (1974), pp. 313-321.
74. Chefetz, B., Chen, Y., Hadra, Y., « Purification and Characterization of Laccase from Chaetomium thermophilum and Its Role in Humification », Ed. Appl. Environ. Microb, V.64, (1998), pp.3175-3179.
75. Pal, S., Bollag, J.M., Huang, P.M., « Role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds through oxidative coupling reactions », Ed. Soil Biol. Biochem, V.26, (1994), pp.813–820.
76. Flaig, W., « Effects of microorganisms in the transformations of lignin to humic substances », Ed. Geochim, Cosmochem, Acta, V.28, (1964), pp.1523-1535.
77. Anderson, H.A., Bick, W., Hepburn, A., Stewart, M., « Nitrogen in Humic Substances », Ed. Hayes,M.H.B, MacCarthy,P, Malcolm,R.L, Swift, R.S, Humic Substances, In Search of Structure, Wiley.Interscience, Chichester, (1989), pp.223–253.

78. Jokic, A., Frenkel, A.I., Vairava;urthy, M., Huang, P.M., « Birnessite catalysis of the Maillard reaction: its significance in natural humification », Ed. Geophysical Research Letters, V. 28, (2001), pp.3899–3902.
79. Bruckert, S., Dommerglje, S.Y., « Etude expérimentale de la biodégradation de deux complexes organo-ferriques dans un sol à mor et dans un sol à mull », Ed. Sci du sol, V. 2, (1966), pp.65-76.
80. Larochelle, L., Page, F., Beauchamp, C., Lemieux, G., « Rôle de la mésofaune dans la dynamique de transformation de la matière ligueuse appliquée au sol », Ed. G1K 7P4 QUÉBEC, Canada, N° 80, (1993).
81. Gourdon, R., « Aide à la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables, compostables », Ed. Record, 00-0118/1A, (2002).
82. Nguyen, K., Duchaufour, P., « Etude comparative de l'évolution de la matière organique du sol en conditions tempérées et tropicales », Ed. Pédologie, Gand, V.19, (1969), pp.49-64.
83. Kastner, M., Hofrichter, M., « Biodegradation of humic substances », Ed. Hofrichter and A. Steinbüchel. Biopolymers, Lignin, Humic Substances and Coal, Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, (2001), pp. 349-378.
84. Karit, S., « Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi», Ed. Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki Finland, (2003), pp.4-69.
85. Senesi, N., Loffredo, E., « Soil humic substances », Ed. Hofrichter and A.Steinbüchel, Lignin, Humic Substances and Coal, V.1, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, (2001), pp.247-299 .
86. Adhi, T.P., Korus, R. A., Crawford, D.L., « Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two streptomycetes in agitated submerged culture », Ed. Appl, Environ, Microbiol, V.55, (1989), pp.1165-1168.
87. Gramss, G., Ziegenhagen, D., SORGE, S., « Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes », Ed. Microbial Ecology, V. 37, 1999, pp.140-151.
88. Dehorter, B., Kontchou, C. Y., Blondeau, R., « <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic analysis of soil humic acids recovered after incubation with some white rot fungi and actinomycetes », Ed. Soil Biol, Biochem, V.24, (1992), pp.667-673.
89. Dehorter, B., Blondeau, R., « Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* », Ed. FEMS, Microbiol, Lett, V.94, (1992), pp.209-215.
90. Hofrichter, M., Fritsche, W., « Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal-humicacid- depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii*», Ed. Appl, Microbiol, Biotechnol,V. 47, (1997),pp.419-424.

91. Kestner, M., « Humification Process or Formation of Refractory Soil Organic Matter », Ed. Wiley-VCH, Environmental Processes, V. 11, (2000), pp.89-125.
92. Ralph, J.P., Catcheside, D. E. A., « Decolorization and depolymerization of solubilized low-rank coal by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* », Ed. Appl, Microbiol, Biotechnol, V. 42, (1994), pp.536-542.
93. Karit, S., « Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi », Ed. Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki Finland Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki, (2003).
94. Van-Trump, J.N., Sun, Y., Coates, J., « Microbial Interactions with Humic Substances », Ed. Department of Plant and Microbial Biology, California, V. 60, (2006).
95. Busnot, A., Busnot, F., Lequerler, J.F., Yazebeck, J., « Caractérisation de matériel humique, d'origine terrestre de la région Bas-Normande, Thermochemica Acta », V. 254, (1995), pp.319-330.
96. Humic Substance Society Method, Isolation of IHSS soil fulvic and humic acids, <http://www.ihss.gatech.edu/isolation>, (2005).
97. Bertrand, D., Clotaire, Y.K., Blondeau, R., « <sup>13</sup> C NMR spectroscopic of soil humic acid recovered after incubation with some white rot fungi and actinomycets », Ed. Soil, Biol, Biochem, V.24, (1992), pp.667-673.
98. Richard, J.F., « Caractérisation de substances humiques-like, comparaison avec des substances humiques naturelles », Toulouse, (2002).
99. Hayes-Micheal, H.B., « Solvent Systems for the Isolation of Organic Components from Soils », (2006).
100. Vusumzi, M., « Methods for the production of humic acids from black liquor », Ed. Stellenbosch, (2006).
101. Eberhart, J.P., « Méthodes physiques d'étude des minéraux et des matériaux solides », Ed. Doin 2diteursm Paris, (1976), pp. 448.
102. Roger, G., « Identification des moisissures », Ed.Prise, (1990).
103. Blondeau, R., « Évolution des acides humiques soumis à l'activité d'une microflore bactérienne hétérotrophe », Ed. Sci-Sol, V.26, (1988), pp.41-50.
104. Dari, K., Béchet, M., Blondeau, R., « Isolation of soil Streptomyces strains capable of degrading humic acids and analysis of peroxidase activity », Ed. FEMS Microbiology Ecology, V.16, (1995), pp.115-122.
105. Greetchen, M., Daiz, M., « Fungal diversity present at a hypersaline environment in Cabo Rojo, puerto rico determined by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clones libraries », Ed. University of Puerto Rico mayaguez Campus, (2006).
106. Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., «Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers

champignons pathogènes et toxigènes », Ed. Journal de Mycologie Médicale, V.15, (2005), pp.211-219.

107. Shirling, E.B., Gottlieb, D., « Methods for characterization of *Streptomyces* species », Ed. Int.J.Syst.Bacteriol, V. 16, (1966), pp.313-340.

108. Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M., «Information provided on humic substances by E4/E6 ratios », Ed. Soil Sci, Soc, V.41, (1970), pp.353-358.

109. Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., Brunette, G., « Characterization, differentiation and classification humic substances », Ed. Soil Sci, V.152, (1900) pp.259-271.

110. Kalbitz, K., « Properties of organic matter in soil solution in a German fen area as dependent on land use and depth », Ed. Geoderma, V.104, (2001), pp.203-214.

111. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., « Principe d'analyse instrumental », Ed. Américaine, (2003), pp-725.

112. Artur, J.M., Laerte, P., « Electrochemical degradation of humic acid », (2000), pp.67-76.

113. Swift, R.S., « Organic matter characterization », Analysis, Part 3: Chemical methods, SSSA Book Series No. 5. SSSA and ASA, Madison, WI, (1996), pp. 1011-1069.

114. Chen.Eugene, J., Lebofim, S.C., Bquohua, G., « Spectroscopic Characterization of Structural and Functional Properties of Natural Organic Matter Fractions », (2007).

115. Ki.Hoon, K., Hyun, S.S., Heekyung, A., «Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and dits implications», Water research, V. 36, (2002), pp. 4023-4032.

116. Schnitzer, M., « Organic matter characterization », Ed. Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Madison, WI, (1982).

117. Schnitzer, M., «Selected Methods for characterization of soil Humic Substances », Ed. Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings, Madison, Winsconsin, USA, (1990), pp. 65-89.

118. Schnitzer, M., « humic substances the environment », marcel dekker, new york, (1972).

119. Hyum, C., Myong, J., « Characterization of aquatic substances to DBPs formation in advanced treatment processes for conventionally treated water », Ed. Journal of Hazardous Materials, V.143, (2007), pp.486-493.

120. Amir, S., Hafidi, M., Merlinab,G., Hamd, H., Eveleb, J.G., «Elemental analysis, FTIR, <sup>13</sup>C-NMR of humic acids from sewage sludge composting », Ed. Marrakech, Maroc, (2004).

121. Saikat, G., Seunghun, K., Prasanta, C.B., Baoshan, X., « Adsorption of Humic Acid on Minerals as Examined by FTIR, NMR, and Elemental Analysis », Ed. Univ of Massachusetts, Stockbridge Hall, Amherst, (2006).

122. Syhvie, B., « Rapport de stage de Claudia NAG Amouttou, Traitement thermiques et caractérisations physico chimiques de matériaux carbonés », Ed. Centre de recherche sur la matière dérivée, (2006), pp.34.
123. Lingbo, L., Song, Y., Guangbo, S., « Comprehensive characterization of soil refinery effluent derived humic substances using various spectroscopic approaches », *Chemosphere*, (2005), pp.467-476.
124. Remunni, A., Scialdone, R., Fellaca, D., « Decomposition of humic acids by incubation in a soil water extract under various condition of oxygene availability », Ed. *Plant; soil*, V. 97, (1987), pp.15-23.
125. Lucas, N., « Etude et mise au point d'une nouvelle méthode d'évolution de la bioassimilation: utilisation des isotopes stables du carbone pur le marquage de la biomasse microbiennes », These de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, (2007).
126. Visser S.A., « Effect of humic acids numbers and activities of microorganisms within polysiological groups », Ed. *Org.Geochem*, V.8, (1985), pp.81-85.
127. Tranvik, L.J., «Availability of dissolved organic carbon for planktonic bacteria in oligo-trophic lakes of differing humic content », Ed. *Microbiol.Ecol*, V.16, 1989, pp.311-322.
128. Hayakawa, M., Nonomura, H., « Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycete », Ed. *J.Ferment, Technol*, V. 65, (1987), pp.69-76.
129. Visser S.A., « Effect of humic acids numrs and activites of miccroorganismes within physiological groups », Ed. *Org.Geochem*, V.8, (1985), pp.81-85.
130. Dehorter B, Blondeau R, «Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*». Ed. *FEMS Microbiology Letters*, V.94, (1992), pp. 209–215.
131. Esham, E.C., Ye, W.Y, Moran, M.A, «Identification and characterization of humic substances-degrading bacterial isolates from an estuarine environment». Ed. *FEMS Microbiology Ecology*, V.34, (2000), pp.103–111
132. Filip, Z., Tesarova, M., «Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils», Ed. *International Biodeterioration & Biodegradation*, V. 54, (2004), pp. 225–231.
133. Gramss, G., Ziegenhagen, C., Sorge, S., «Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes», Ed. *Microbial Ecology*, V.37, (1999), pp.140–151.
134. Machnikowska, H., Pawelec, K., Podgorska, A., « Microbial degradation of low rank coals», Ed. *Fuel Processing Technology*, V.77, (2002), pp.17–23.
135. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itavaara, M., « Biodegradation of lignin in a compost environment: a review», Ed. *Bioresource Technology*, V.72, (2000), pp.169–183.

136. Deacon, L.J., Pryce-Miller, E.J., Frankland, J.C., Bainbridge, B.W., Moore, P.D., Robinson, C.H., «Diversity and function of decomposer fungi from a grassland soil», Ed. *Soil Biology and Biochemistry*, V. 38, (2006) pp.7–20.
137. O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, JM., Vilgalys, R., «Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples», Ed. *Applied and Environmental Microbiology*, V.71, (2005), pp.5544–5550.
138. Ralph, J.P., Catcheside, D., «Decolorization and depolymerization of solubilized low-rank coal by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium*», Ed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.42, (1994), pp.536–542.
139. Fakoussa, R.M., Frost, P., «In vivo-decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus *Trametes versicolor*», Ed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.52, (1999), pp.60–65.
140. Wunderwald, U., Kreisel, G., Braun, M., Schulz, M., Jager, C., Hofrichter, M., «Formation and degradation of a synthetic humic acid derived from 3-fluorocatechol», Ed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.53, (2000), pp.441–446.
141. Kluczek-Turpeinen, B., Steffen, K., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M., «Modification of humic acids by the compost- dwelling deuteromycete *Paecilomyces inflatus*», Ed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.66, 2005 pp.443–449.
142. Rezacova, V., Hrselova, H., Gryndlerova, H., Miksik, I., Gryndler, M., «Modifications of degradation-resistant soil organic matter by soil saprobic microfungi», Ed. *Soil Biology and Biochemistry*, V. 38, (2006), pp.2292–2299.
143. Martin, J.P., Richards, S.I., Haider, K., «Properties and decomposition and binding action in soil of humic acid synthesized by *Epicoccum nigrum*». Ed. *Soil Science of America Proceedings*, V.31, (1967) , pp.657–662.
144. Martin, J.P., Wolf, D., Haider, K., «Synthesis of phenols and phenolic polymers by *Hendersonula toruloidea* in relation to humic acid formation». Ed. *Soil Science of America Proceedings*, V.36, (1972), pp. 311–315.
145. Bondiott, E., Haider, K., Martin, J.P., «Influence of nitrogen source and clay on growth and phenolic polymer production by *stachybotrys* Species, *Hendersonula-Toruloidea*, and *Aspergillus- Sydowi*»,Ed. *Soil Science of America Proceedings*, V.35, (1971), pp.917–925
146. Haider, K., Martin, J.P., «Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation», Ed. *Soil Science of America Proceedings*, V.31, (1967), pp.766–772.
147. Martin, J.P., Haider, K., «Phenolic polymers of *Stachybotrys atra*, *Strachybotrys chartarum* and *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation», Ed. *Soil Science*, V.107, (1969), pp.260–270.



148. Qi, B.C., Aldrich, C., Lorenzen, L., Wolfaardt, G.M., «Degradation of humic acids in a microbial film consortium from landfill compost», Ed. Industrial and Engineering Chemistry Research, V.43, (2004), pp.6309–6316.
149. Chefetz, B., Chen; Y., Hadar; Y., «Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification», Ed. Applied and Environmental Microbiology, V.64, (1998), pp.3175–3179.
150. Burges, A., Latter, P., «Decomposition of humic acid by fungi. Nature», V. 186, (1960), pp. 404–405.
151. Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegass, I., Ziegenhagen, D., Fritsche, W., «Mineralization of synthetic humic substances by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*», Ed. Applied Microbiology and Biotechnology, V. 49, (1998), pp. 584–588.
152. Ziegenhagen, D., Hofrichter, M., «Degradation of humic acids by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Clitocybula dusenii*», Ed. Journal of Basic Microbiology, V.38, (1998), pp.289–299.
153. Willmann, G., Fakoussa, R.M., «Biological bleaching of watersoluble coal macromolecules by a basidiomycete strain», Ed. Applied Microbiology and Biotechnology, V. 47, (1997), pp.95–101.
154. Fakoussa, R.M., Frost, P.J., «In vivo-decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus *Trametes versicolor*», Ed Applied Microbiology and Biotechnology, V. 52, (1999), pp.60–65.
155. Kastner, M., Hofrichter, M., «Biodegradation of humic substances and Biopolymers Lignin, Humic Substances and Coal », Ed. Hofrichter M, Steinbuchel A, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, V.1, (2001), pp.349–378.
156. Ralph, J.P., Catcheside, D.E.A., «Decolorization and depolymerization of solubilized low-rank coal by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium*», Ed. Applied Microbiology and Biotechnology, V.42, (1994), pp.536–542.
157. Ralph, J.P., Catcheside, D.E.A., « Depolymerization of macromolecules from Morwell brown-coal by mesophilic and thermotolerant aerobic microorganisms», Ed. Fuel Processing Technology, V. 40, (1994), pp.193–203.