

THESE DE DOCTORAT DE SPECIALITE

DE PEDOLOGIE

Présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de NANCY

par

Pierre ROGER

Ingénieur Agronome E.N.S.A.N.

APPLICATION DES METHODES RADIOISOTOPIQUES
A L'ETUDE COMPAREE DE L'EVOLUTION DES ACIDES CITRIQUE ET OXALIQUE
DANS UN SOL A MULL ET UN SOL A MOR

Soutenu le décembre 1969
devant la Commission d'Examen

M. DUCHAUFOUR Président
MM. DOMMARGUES Examineurs
JACQUIN
METCHE

UNIVERSITE DE NANCY

Faculté des Sciences

DOYEN : M. AUBRY
Assesseur : M. GAY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT - ROUBAULT

Professeurs honoraires : MM. RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY - LAPORTE - EICHBORN - CAPELLE - GODEMENT - DUBREIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE - DE MAL- LEMAN - LONGCHAMBON - LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER - CORNUBERT CHAPELLE - GUERIN - WAHL.

Maîtres de Conférences honoraires : MM. LIENHART - PIERRET - M^{lle} MATHIEU

PROFESSEURS

MM. ROUBAULT	Géologie		GAYET	Physiologie
VEILLET	Biologie Animale		HADNI	Physique
BARRIOL	Chimie théorique	*	BASTICK	Chimie
BIZETTE	Physique		DUCHAUFOUR	Pédologie
GUILLIEN	Electronique		GARNIER	Agronomie
LEGRAS	Mécanique rationnelle		NEEL	Chimie organique
BOLFA	Minéralogie			Industrielle
NICLAUSE	Chimie		BERNARD	Géologie appliquée
FAIVRE	Physique appliquée	*	CHAMPIER	Physique
AUBRY	Chimie minérale	*	GAY	Chimie biologique
COPPENS	Radiogéologie		STEPHAN	Zoologie
DUVAL	Chimie	*	CONDE	Zoologie
FRUHLING	Physique	*	WERNER	Botanique
HILLY	Géologie		EYMARD	Calcul différentiel et Intégral
LE GOFF	Génie chimique			
SUHNER	Physique expérimentale		LEVISALLES	Chimie organique
CHAPON	Chimie biologique		FELDEN	Physique
HEROLD	Chimie minérale industrielle	*	GOSSE	Mécanique physique
		*	DAVOINE	Physique (ENSMIN)
SCHWARTZ B.	Exploitation minière		HORN	Physique (1 ^o cycle)
MALAPRADE	Chimie	*	ROCCI	Géologie
* MANGENOT	Botanique		DELPUECH	Chimie physique

* Professeur titulaire à titre personnel

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M ^{me}	BASTICK	Chimie P.C.Epinal	BALESDENT	Thermodynamique, chi- mie appliquée (ENSIC)
MM.	GUDEFIN	Physique		Minéralogie appliquée (ENSG)
	VUILLAUME	Psychophysiologie	BLAZY	
	FRENTZ	Biologie animale		
	MARI	Chimie (ISIN)	JANOT	Physique P.C.Epinal
	AUROUZE	Géologie	CACHAN	Entomologie appliquée (ENSA)
	DEVIOT	Physique du solide		
	FLECHON	Physique P.C.	MAINARD	Physique M.P.
M ^{le}	HUET	Mathématiques C.G.B.	MARTIN	Chimie P.C.
	VIGNES	Métallurgie	PAULMIER	Mécanique expérimen- tale
	JURAIN	Géologie C.G.B		Minéralogie
			PROTAS	

MAITRES DE CONFERENCES

MM. JOZEFOWICZ	Physico-chimie	BAVEREZ	Chimie (ENSIC)
RIVAIL	Chimie appliquée (CUCES)	CHAMBON	Exploitation mi- nière (Mines)
VILLERMAUX	Génie chimique	HUSSON	Physique (ENSEM)
METCHE	Biochimie appliquée (Brasserie)	WEISSLINGER	Physique
PAIR	Mathématiques appliquées	GERL	Physique (ENSEM)
BAUMANN	Physique 1 ^o cycle	ROQUES	Chimie minérale
DURAND	Physique	FERRIER	Mathématiques
GRANGE	Physique (ISIN)	GILORMINI	Mécanique (ISIN)
DEPAIX	Probabilités et statistiques	DEXHEIMER	Botanique
		CASTRO	Chimie organique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. AMARIGLIO - COEURE - DAVRAINVILLE - GIRARDEAU - HILY - MAURIN - NOVERRAZ
OVAERT - RUYER - WEBER.

A Monsieur le Professeur DUCHAUFOR, qui par son enseignement, a permis la réalisation de ce travail, et accepté de présider le jury.

A Monsieur le Professeur JACQUIN, qui a suggéré ce travail, puis l'a guidé à chacune de ses étapes avec une continuelle et bienveillante attention.

A Monsieur le Professeur DOMMERGUES, qui nous a initié à la recherche, et dont les conseils et l'attention constante nous ont toujours été très précieux.

A Monsieur METCHE, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, qui a bien voulu faire partie du jury.

A Monsieur BRUCKERT, Assistant à la Faculté des Sciences et à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de NANCY, qui par ses conseils pratiques et sa collaboration, a efficacement contribué à la réalisation de ce travail.

A Monsieur GUCKERT, Assistant à la Faculté des Sciences, et à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de NANCY, avec qui nous avons mis au point les méthodes relatives au comptage du ^{14}C .

A Madame SCHOULLER, pour son aide technique.

A Madame LAHALLE, qui a bien voulu se charger de la dactylographie de ce mémoire.

A tous nos camarades du Centre de Pédologie de NANCY.

AVANT-PROPOS

Ce manuscrit effectue la synthèse de travaux déjà publiés ; pour cette raison, nous avons évité de reprendre systématiquement tous les protocoles et résultats obtenus, et nous n'avons développé que les points présentant une certaine originalité.

D'autre part, nous n'avons reproduit ni tableaux ni figures, pour lesquels nous renvoyons aux articles correspondants, par l'intermédiaire du code ci-dessous :

- A₁ : ROGER (P.) et DOMMERGUES (Y.) - Utilisation du micro^{respiromètre}~~scope~~ différentiel Gilson pour l'étude d'échantillons de sol - Revue d'Ecologie et de Biologie du sol
- A₂ : GUCKERT (A.), ROGER (P.) et JACQUIN (F.) - Contribution à l'utilisation des techniques radioisotopiques pour l'étude de la matière organique du sol - Bull. E.N.S.A.N., tome X, Fasc. II, 1969, 69-100.
- A₃ : ROGER (P.), BRUCKERT (S.) et JACQUIN (F.) - Etude de l'évolution de l'acide citrique dans un sol brun lessivé et dans un podzol. Science du sol
- A₄ : ROGER (P.), BRUCKERT (S.) et JACQUIN (F.) - Etude de l'évolution de l'acide oxalique dans les sols, et comparaison avec la dynamique de l'acide citrique. - Bull. E.N.S.A.N.

P L A N

I.- INTRODUCTION

II.- MATERIEL ET METHODES

A.- MATERIEL UTILISE

B.- METHODES

- 1) Mesure respirométrique de l'O₂ consommé
- 2) Dispositif d'incubation
- 3) Méthode de fractionnement des échantillons
- 4) Mesure de la radioactivité dans les différentes fractions
 - a) Testage des mélanges de scintillation en fonction du quenching
 - α) quenching chimique
 - β) quenching de coloration
 - b) Autres facteurs influant sur le rendement de comptage
 - c) Réalisation de courbes d'étalonnage par la méthode de standardisation externe
 - d) Conclusion

III.- RESULTATS

A.- ACIDE CITRIQUE

- 1) Etude respirométrique
- 2) Etude de la répartition de la radioactivité au cours des différentes phases de l'expérience
 - a) Fraction hydrosoluble
 - b) Fractions humiques
 - α) Importance du ¹⁴C incorporé par l'ensemble des fractions humiques
 - β) Répartition du ¹⁴C dans les différentes fractions humiques
- 3) Conclusion

B.- ACIDE OXALIQUE

- 1) Etude respirométrique
- 2) Etude de la répartition de la radioactivité au cours des différentes phases de l'expérience
 - a) Hydrosolubles
 - b) Fractions humiques
 - α) Importance du ¹⁴C incorporé par l'ensemble des fractions humiques
 - β) Répartition du ¹⁴C dans les différentes fractions humiques
- 3) Conclusion

C.- COMPARAISON ENTRE ACIDE CITRIQUE ET ACIDE OXALIQUE

IV.- CONCLUSIONS GENERALES

I.- INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que la mobilité des cations métalliques dans les sols, à des pH où ils sont très peu solubles, est étroitement liée à la présence de produits organiques complexants.

Parmi les substances complexantes les mieux connues, les acides aliphatiques hydrosolubles ont été mis en évidence par de nombreux auteurs (KAURICHEV et al., 1963 ; LYKVIK, 1963 ; MUIR et al., 1964 ; JACQUIN et BRUCKERT, 1965), et le rôle prépondérant de ces composés a été observé par BRUCKERT et JACQUIN (1969b).

Cependant, ces molécules complexantes ne peuvent pas intervenir dans les processus de migration :

- si elles sont rapidement métabolisées par les microorganismes telluriques (minéralisation et incorporation).
- si elles sont adsorbées ou insolubilisées par des processus physico-chimiques.

Différents travaux ont démontré que la minéralisation et l'incorporation biologiques sont étroitement liées à la densité de la microflore dégradant les complexes organo-métalliques (BRUCKERT et DOMMERGUES, 1968), et ont fait apparaître l'opposition existant entre les sols bruns lessivés à horizon superficiel actif et les podzols à activité beaucoup plus faible (DOMMERGUES et DUCHAUFOR, 1965).

Les divergences entre ces deux types de sols ont été confirmées à l'occasion de recherches faites :

- in situ, par l'étude sur ces profils de l'évolution globale des acides organiques au cours d'une saison de végétation (BRUCKERT et JACQUIN, 1966).
- au laboratoire, par une étude portant sur l'interaction entre la mobilité de plusieurs acides organiques et de divers cations dans les sols (BRUCKERT et JACQUIN, 1969a).

Dans le but de compléter et de préciser ces résultats, il nous a paru intéressant d'étudier de façon approfondie, l'évolution d'acides aliphatiques les plus importants au point de vue pédogénétique ; les acides citrique et oxalique. Ce travail présente l'originalité d'avoir été effectué au moyen de molécules marquées au ^{14}C , méthode d'investigation permettant de suivre avec beaucoup de précision, l'évolution d'un substrat dans les sols. Il nous a donc fallu, dans un premier temps, mettre au point un protocole expérimental et des méthodes de mesure de la radioactivité adaptés à l'étude d'échantillons de sol enrichis en substrat marqué au ^{14}C .

Nous avons pu ensuite étudier et comparer le devenir des acides citrique et oxalique dans un sol brun lessivé et un podzol humo-ferrugineux.

II.- MATERIEL ET METHODES

A.- MATERIEL UTILISE

Afin de conserver l'opposition entre le mull et le mor, nous avons choisi l'horizon A₁ d'un sol brun lessivé (mull eutrophe) et les horizons A₁ (base du mor) et B_h d'un podzol humo-ferrugineux. Les profils correspondants ont été récemment décrits et analysés (BRUCKERT et DOMMERGUES, 1968).

B.- METHODES

Pour aborder le problème de la dégradation des acides aliphatiques, nous nous sommes tout d'abord adressé à la mesure respirométrique de l'oxygène consommé. Cette méthode ne nous permettant pas de pousser assez loin les investigations, nous avons fait alors appel aux méthodes radioisotopiques conjuguées à la mesure respirométrique du CO₂ dégagé.

Pour ce faire, nous avons mis au point un dispositif permettant la mise en incubation d'échantillons de plusieurs dizaines de grammes de sol enrichi en substrat marqué au ¹⁴C. Une mesure journalière du gaz carbonique dégagé permet d'évaluer la minéralisation du substrat, puis, à différents stades de l'incubation, les échantillons sont repris, et subissent un fractionnement en hydrosolubles, acides fulviques, acides humiques et résidu non extractible. Cette méthode permet donc de connaître l'évolution du substrat introduit, par le calcul de la répartition du ¹⁴C en substrat non dégradé, carbone minéralisé, carbone insolubilisé et incorporé dans les substances de type humique.

Nous étudierons successivement :

- la mesure respirométrique de l'O₂ consommé
- le dispositif d'incubation permettant la mesure du CO₂ dégagé
- la méthode de fractionnement
- les problèmes liés au comptage de la radioactivité dans les différentes fractions du sol.

1°) Mesure respirométrique de l'O₂ consommé

Pour effectuer cette mesure, nous avons adapté le microrespiromètre différentiel GILSON à l'étude d'échantillons de sol (A₁).

En effet, l'appareil standard, tel qu'il est livré, ne peut être utilisé directement, ni avec des chambres de respiration assez grandes pour le sol, ni pour des mesures de longue durée. Les modifications apportées à l'appareil consistent essentiellement dans le remplacement des 14 fioles initiales par 12 fioles de DROBNIK modifiées, et le montage d'un circuit d'alimentation en air humidifié et amené à la température de l'expérience. Cette dernière transformation permet de renouveler périodiquement l'atmosphère des fioles et d'effectuer des mesures de longue durée.

L'utilisation de cet appareil nous a permis d'étudier la vitesse de dégradation du substrat par la mesure de l'oxygène consommé. Toutefois, pour le but de notre étude, cette technique ne constituait qu'une méthode

d'approche et ne permettait pas de pousser plus loin les investigations. En effet, elle ne donnait, entre autres, aucun renseignement sur les phénomènes d'incorporation. Nous l'avons donc abandonnée pour utiliser les méthodes radioisotopiques conjuguées à la mesure respirométrique du CO_2 dégagé.

2°) Dispositif d'incubation (A₂ - fig. 16)

Dans ce dispositif, on peut traiter simultanément 12 échantillons en double exemplaire, et ce, dans des conditions de température et d'humidité constantes. Un renouvellement journalier de l'atmosphère des fioles d'incubation permet de récupérer le CO_2 dégagé, par barbotage dans un réactif approprié.

3°) Méthode de fractionnement des échantillons (A₂ - fig. 17)

Après une durée variable d'incubation, les échantillons sont repris et subissent un fractionnement qui peut être résumé de la façon suivante :

- une extraction à l'eau permet de récupérer les hydrosolubles qui sont ensuite séparés par passage sur résines anionique et cationique, en fractions acide, basique et neutre. La fraction acide est ensuite étudiée de façon plus poussée, par chromatographie et autoradiographie.
- une seconde extraction, à la soude, permet d'obtenir les alcalino-solubles ; ces derniers sont ensuite séparés par précipitation à pH 1.
- une dernière fraction est constituée par le résidu non extractible, qui correspond à l'humine au sens large du terme.

4°) Mesure de la radioactivité dans les différentes fractions (A₂)

A noter que nous n'avons utilisé que des substrats marqués au ^{14}C .

Les produits radioactifs obtenus après fractionnement des échantillons incubés, peuvent se classer en plusieurs groupes :

- $^{14}\text{CO}_2$ respirométrique
- produits solubles plus ou moins colorés
- produits insolubles

Le comptage du $^{14}\text{CO}_2$ s'effectue par la méthode classique (JEFFAY, 1961) consistant à fixer le $^{14}\text{CO}_2$ dans un mélange d'éthanol-amine, de cellosolve et de scintillateur au toluène (2/8/10 ; v/v) qui est ensuite compté directement en scintillation.

En ce qui concerne les produits solubles et insolubles, une première possibilité consiste à procéder par combustion ; le $^{14}\text{CO}_2$ est alors fixé et compté suivant le protocole ci-dessus. Cette méthode, obligatoire pour les produits insolubles, a le désavantage d'être très longue et de demander beaucoup de manipulations, ce qui augmente les risques d'erreur, par perte de substance marquée.

Pour cette raison, nous avons essayé de compter directement la radioactivité des fractions liquides en les additionnant à un mélange de scintillation approprié.

Cette méthode, à priori plus rapide, posait cependant deux problèmes importants de quenching dus, le premier au solvant de la fraction à compter (eau ou soude), le second à la coloration des échantillons. Pour cette raison, nous avons été amenés à tester les rendements de différents mélanges de scintillation, en fonction des facteurs de quenching.

Parallèlement, nous avons testé les autres facteurs influant sur le rendement de comptage. Ces différents essais nous ont permis de déterminer le mélange de scintillation et les conditions de comptage optimales. Enfin, nous avons réalisé des courbes étalon permettant de connaître le rendement de comptage de chaque échantillon et d'exprimer tous les résultats en désintégration par minute.

a) Testage de mélanges de scintillation en fonction du quenching

α) Quenching chimique (A_2 - fig. 22 et 23)

Nous avons testé trois mélanges de scintillation après addition de 1, 2, 3, 4 ml d'eau ou de soude N, N/2, N/5. Simultanément, nous avons étudié l'influence de l'adjonction d'un gel thixotropique : Cab-O-Sil. Les résultats montrent la nette supériorité d'un mélange à base de dioxane et de naphthalène en présence de gel thixotropique. On observe d'autre part l'impossibilité de compter des solutions alcalines de concentration supérieure à la semi-normalité.

β) Quenching de coloration (A_2 - fig. 24)

Nous avons étudié les variations de rendement des différents mélanges de scintillation après adjonction de substances colorées à des concentrations croissantes. Les résultats montrent une diminution importante du taux de comptage avec la coloration et montrent qu'on a intérêt, soit à diluer les solutions colorées, soit à compter de très faibles quantités, tout en conservant dans l'échantillon une activité suffisante (supérieure à vingt fois le bruit de fond)

b) Autres facteurs influant sur le rendement de comptage
(A_2 - fig. 25-26, tableau III)

Les différentes expériences réalisées nous ont permis de faire les constatations suivantes :

- le comptage, effectué dans une enceinte réfrigérée à + 2°C, ne doit être commencé qu'après une mise en équilibre thermique des échantillons, d'au moins 10 heures.
- les flacons, une fois préparés, peuvent être comptés pendant une période d'au moins 6 jours sans que le résultat subisse de variation significative.
- le volume de mélange de scintillation utilisé a une grande influence sur le rendement de comptage, et nous préconisons une valeur constante de 18ml.

- dans tous les cas, les flacons en matière plastique donnent un meilleur rendement que les flacons en verre.

c) Réalisation de courbes d'étalonnage par la méthode de standardisation externe (A₂ - fig. 27)

Cette méthode consiste à évaluer le rendement de comptage d'un échantillon en effectuant la mesure des coups par minute, dus à une source de radium d'activité connue, dont le rayonnement traverse ce même échantillon.

Pour l'établissement des courbes d'étalonnage, une série de flacons contenant du scintillateur additionné d'une activité connue, sont comptés après adjonction de Cab-O-Sil, et de diverses substances présentant un quenching croissant. Ces dernières correspondent aux différentes solutions obtenues après incubation et fractionnement des échantillons de sol. Pour chaque flacon, on enregistre les coups par minutes, correspondant au ¹⁴C et les impulsions dues au standard externe. En calculant le rendement effectif du comptage à l'aide de l'activité connue introduite, une courbe de corrélation entre ce rendement et la valeur du standard externe peut être tracée.

Par la suite, la mesure sur les échantillons à compter, des coups par minute dus au ¹⁴C et du standard externe, permettra par l'intermédiaire de la courbe d'étalonnage, d'exprimer tous les résultats de façon homogène en désintégrations par minute.

d) Conclusion

Ces différentes observations nous ont permis de déterminer les méthodes optimales de comptage de la radioactivité sur les différentes fractions :

- le ¹⁴CO₂ provenant, soit des mesures respirométriques, soit de la combustion des substances insolubles, (résidu non extractible) est fixé et compté dans 18 ml d'un mélange d'éthanol-amine, cellosolve et scintillateur au toluène (8/2/10 : v/v).

- les fractions liquides sont comptées en additionnant 0,2 et 0,4 ml de ces mêmes fractions et 500 mg de Cab-O-Sil dans 18 ml de scintillateur au dioxane.

Cette méthode présente, outre l'avantage d'être relativement rapide, celui de permettre l'obtention de bilans pour lesquels la perte de ¹⁴C initialement introduit n'excède pas 5 %, et ce après des incubations allant jusqu'à vingt et un jours, suivies de nombreux fractionnements.

III.- RESULTATS

Nous commenterons d'abord les résultats relatifs à l'acide citrique, avant d'aborder ceux concernant l'acide oxalique ; enfin, nous comparerons l'évolution de ces deux substrats. Ces trois points seront exposés suivant le même plan, en envisageant successivement l'étude respirométrique puis la répartition de la radioactivité dans les fractions hydrosolubles et les fractions de type humique.

A.- ACIDE CITRIQUE (A₃)1) Etude respirométrique

Rappelons que le substrat utilisé était marqué uniquement sur les carbones 1 et 5. Il nous a donc fallu mesurer à la fois le $^{14}\text{CO}_2$ et le CO_2 total dégagés (A₃, fig. 5 et 6). Ces deux mesures nous ont alors permis de constater les faits suivants :

- Dans l'horizon A₁ de sol brun lessivé, l'acide citrique est biodégradé de façon très intense, avec un maximum de 50 mg de CO_2 pour 30 g de sol par jour, dans nos conditions expérimentales. A noter que ce maximum apparaît à la deuxième journée d'incubation.

- Dans les horizons de podzol, l'acide citrique est minéralisé beaucoup plus lentement et le maximum, deux fois plus faible que celui du mull, est retardé jusqu'au quatrième (B_h PHF) et même sixième jour (A₁ PHF).

A noter que, parallèlement à l'étude respirométrique, nous avons effectué une étude microbiologique consistant en une numération à 0, 5, 10 et 21 jours, de la microflore spécifique dégradant les citrates. Les résultats de ces deux études montrent une nette concordance entre la vitesse de minéralisation du substrat et la densité microbienne.

Outre les conclusions relatives à la vitesse de minéralisation du substrat, l'étude respirométrique nous a permis de constater un autre fait important : en effet, bien que les courbes de CO_2 total (correspondant aux 6 carbones de la molécule d'acide citrique) et de $^{14}\text{CO}_2$ (correspondant aux carbones 1 et 5) présentent une grande analogie, on n'observe pas une homothétie exacte ; il nous a donc semblé utile d'étudier les variations du rapport journalier $\frac{\text{CO}_2}{^{14}\text{CO}_2}$ au cours de l'incubation (A₃, fig. 7).

Rappelons que si l'on considère la dégradation de l'acide citrique dans le cycle de KREBS, avec ou sans shunt glyoxylique, on constate que les carbones 1 et 5 de la molécule (seuls carbones marqués dans le cas de substrat utilisé) sont placés en position préférentielle pour passer à l'état de CO_2 par rapport aux autres carbones de la molécule.

Une dégradation totale de la molécule d'acide citrique radioactif 1-5 correspond à un rapport $\frac{\text{CO}_2}{^{14}\text{CO}_2} = 3$; toutefois, étant donné la position privilégiée des carbones marqués, on peut s'attendre à ce que ce rapport varie au cours de la transformation du substrat et que, partant d'une valeur inférieure à 3 en début d'incubation, il arrive à une valeur supérieure à 3 en fin d'expérience.

On constate en effet (A₃, fig. 7) une variation de 2 à 4 de ce rapport dans les deux horizons A₁ ; par contre, en ce qui concerne l'horizon B_h de podzol, le rapport reste pratiquement constant pendant toute la durée de l'incubation avec des valeurs oscillant autour de 2. Dans ce cas, l'allure de la courbe permet de penser que l'acide citrique se transforme suivant un processus différent avec, peut-être, une dégradation de la molécule bloquée à un stade donné par une incorporation biochimique au sein d'une matière organique à minéralisation ultérieure beaucoup plus lente.

En résumé, l'étude respirométrique du CO_2 et du $^{14}\text{CO}_2$ dégagés permet de tirer les conclusions suivantes :

- dans le mull, la minéralisation extrêmement rapide de l'acide citrique entraîne sa disparition immédiate.
- Dans le mor et le B_h , la minéralisation en CO_2 est de beaucoup moins rapide et moins intense.
- L'étude du rapport $\text{CO}_2/^{14}\text{CO}_2$ incite à penser que la transformation de l'acide citrique suit des processus différents dans les horizons de surface par rapport à l'horizon d'accumulation.

2) Etude de la répartition de la radioactivité au cours des différentes phases de l'expérience

a) Fraction hydrosoluble (A_3 , fig. 9 et 10)

Une étude qualitative par chromatographie et autoradiographie de la fraction acide, préalablement isolée par passage sur résines anionique et cationique, montre que la radioactivité retrouvée dans l'ensemble des hydrosolubles correspond pratiquement à de l'acide citrique non dégradé.

Une étude quantitative montre en premier lieu une disparition très rapide de l'acide dans le A_1 de sol brun lessivé (reliquat 10,7 % à 5 jours). Au contraire, la disparition est beaucoup plus lente dans les horizons de podzol ; toutefois, on constate que le B_h adsorbe et transforme nettement plus d'acide citrique (reliquat 28,1 % à 5 jours) que le A_1 (reliquat 41,4 % à 5 jours) pendant les 10 premiers jours d'incubation.

Ce dernier point montre que l'acide citrique ne disparaît que très lentement dans les horizons superficiels de podzol. Par suite, il pourra être entraîné vers les horizons profonds par les eaux lysimétriques, après avoir éventuellement complexé des ions métalliques normalement insolubles au pH du sol.

b) Fractions humiques

a) Importance du ^{14}C incorporé par l'ensemble des fractions humiques (A_3 , fig. 11)

Dans cette étude, il convient de distinguer l'incorporation à 0 jour, qui correspond surtout à une immobilisation physico-chimique (adsorption et formation de sels insolubles) de l'incorporation ultérieure à des composés organiques qui correspond à des phénomènes biochimiques.

A 0 jour, on observe une incorporation relative forte dans le mull, moyenne dans le B_h et faible dans le mor ; ce fait est à mettre en relation avec les teneurs relatives en cations des différents horizons.

Après cinq jours d'incubation, le pourcentage de ^{14}C présent dans les fractions de type humique, atteint son maximum dans le cas du mull et du B_h ; par contre, dans le mor, l'incorporation est plus lente et ce maximum n'est constaté qu'au dixième jour.

On observe ainsi un résultat important : l'incorporation du ^{14}C aux différentes fractions humiques d'un horizon B_h de podzol, comparée à celle de l'horizon A_1 du même podzol, progresse au moins deux fois plus vite et atteint dès le cinquième jour un pourcentage deux fois plus élevé.

β) Répartition du ^{14}C dans les différentes fractions humiques (A_3 , fig. 12)

Dans les trois horizons étudiés, le mécanisme de l'incorporation se déroule suivant le même schéma : l'anion citrique est fixé tout d'abord par les acides fulviques, puis au cours des différentes transformations du citrate, le ^{14}C se répartit dans les acides humiques et la fraction non extractible.

Les résultats montrent une incorporation faible et pratiquement constante du ^{14}C dans les acides humiques ; toutefois, dans l'état actuel de nos recherches, nous ne pouvons affirmer si ce fait traduit :

- soit un passage direct du carbone incorporé dans les acides fulviques vers la fraction non extractible
- soit l'existence d'une phase transitoire de courte durée sous la forme d'acides humiques.

3) Conclusion

Rappelons encore une fois que l'acide citrique utilisé est marqué en 1-5. Les résultats obtenus ne concernent donc que deux des carbones de la molécule (A_3 , fig. 13). Toutefois, il est possible, connaissant le dégagement total de CO_2 , et le pourcentage d'acide non transformé, de calculer par différence, le pourcentage réel de carbone total incorporé dans l'ensemble des substances humiques.

Ce calcul (A_4 , fig. 4, tableau 2) montre que le fait de raisonner sur deux carbones fait surestimer la minéralisation et sous estimer les phénomènes d'incorporation. Cependant, les conclusions relatives à la vitesse et aux mécanismes de transformation du substrat restent exactement les mêmes :

- Dans un humus de type mull, sur sol brun lessivé, on observe, après enrichissement en acide citrique, une disparition très rapide de ce substrat, qui correspond non seulement à une minéralisation directe, mais aussi à un turn-over du carbone incorporé dans les fractions de type humique, lors des premiers jours d'incubation.
- En ce qui concerne les horizons de podzol, la cinétique de la minéralisation est beaucoup plus lente ; toutefois, malgré un dégagement de CO_2 très voisin dans le mor et le B_h , on observe une disparition beaucoup plus rapide de l'acide citrique dans l'horizon d'accumulation. La différence fondamentale entre ces deux horizons réside en une incorporation intense et rapide de l'acide citrique à l'ensemble des composés humiques au niveau du B_h . Cette incorporation est beaucoup plus faible et surtout plus lente, au niveau du A_1 de podzol.

L'interprétation de ces résultats permet alors d'expliquer la dynamique de l'acide citrique dans les deux types de sol étudiés :

- Dans le sol brun lessivé, l'acide citrique ne peut migrer jusqu'aux horizons B car il subit immédiatement une fixation et une biodégradation dès l'horizon A₁.

- A l'opposé, dans le podzol humo-ferrugineux, l'acide citrique est susceptible de traverser les horizons A où il n'est que très faiblement fixé et transformé ; toute percolation, même de faible durée, pourra le soustraire à l'action des microorganismes et l'entraîner vers les horizons d'accumulation. En B_h, l'anion citrate, fortement fixé, disparaît rapidement par minéralisation et surtout par incorporation aux substances humiques.

B.- ACIDE OXALIQUE (A₄)

1) Etude respirométrique (A₄, fig. 1)

Le substrat utilisé est uniformément marqué ; seule la mesure du ¹⁴CO₂ demeure donc nécessaire. Les courbes respirométriques font ressortir les faits suivants :

- l'acide oxalique est minéralisé de façon intense, non seulement dans le mull, mais aussi dans l'horizon B_h de podzol ; dans le mor, au contraire, on observe une dégradation beaucoup plus progressive.

- d'autre part, les courbes de dégagement de CO₂ sont caractérisées par l'existence de deux pics dont on peut expliquer l'existence par l'hypothèse suivante, résultant des travaux de KORNBERG (1961) : le premier pic correspondrait à l'activité d'une microflore synthétisant un composé dont la dégradation serait traduite par le second pic.

2) Etude de la répartition de la radioactivité au cours des différentes phases de l'expérience

a) Hydrosolubles (A₄, fig. 2)

L'étude qualitative montre que la radioactivité retrouvée dans cette fraction correspond pratiquement à de l'acide oxalique non dégradé. Cet acide est pratiquement disparu au cinquième jour d'incubation dans le mull (reliquat 0,7 %) ; au contraire, la quantité d'acide non transformé et hydrosoluble diminue plus progressivement dans l'horizon B_h (reliquat 32,6 % au 5^{ème} jour) et surtout dans le mor (reliquat 51,8 %).

b) Fractions humiques

α) Importance du ¹⁴C incorporé dans l'ensemble des fractions humiques (A₄, fig. 3)

Dès l'enrichissement des échantillons (temps zéro), le mull s'oppose aux horizons podzoliques par une immobilisation physico-chimique considérable atteignant environ 80 % du carbone introduit. Par la suite, cette opposition persiste : la radioactivité décroît de façon accélérée dans le mull, alors qu'elle diminue lentement dans les horizons podzoliques.

Il est important de remarquer que dans le cas de l'acide oxalique, l'immobilisation du substrat correspond en majeure partie à une insolubilisation sous forme de sel de calcium, et qu'une fois cet oxalate dégradé, on ne retrouve que peu de ¹⁴C dans les fractions humiques. Ce fait

traduit donc une incorporation biologique faible, aussi bien dans le mull que dans les horizons de podzol.

β) Répartition du ^{14}C dans les différentes fractions humiques (A_4 , tableau 1)

Le mécanisme de l'incorporation semble se dérouler suivant un schéma identique à celui observé pour l'acide citrique.

Notons cependant que, si ce mécanisme apparaît avec évidence dans les horizons de podzol, il est masqué dans le cas du mull, pendant les cinq premiers jours de l'expérience, par suite d'une forte immobilisation physico-chimique, sous forme d'oxalate de calcium.

3) Conclusion

Dans le mull, on assiste à une disparition de l'acide oxalique due à une immobilisation physico-chimique considérable, relayée par une minéralisation rapide et quasi totale du carbone introduit. A noter la très faible valeur de l'incorporation biologique.

Dans le mor, une insolubilisation peu importante et surtout une minéralisation très lente, laissent à l'anion oxalique la possibilité de migrer vers l'horizon B_h où il disparaîtra par insolubilisation, et surtout par une minéralisation très poussée et rapide ; à noter là encore, la faible valeur de l'incorporation biologique.

C.- COMPARAISON ENTRE ACIDES CITRIQUE ET OXALIQUE (A_4)

Afin de pouvoir comparer de façon rigoureuse l'évolution des deux substrats, nous utilisons pour l'acide citrique les résultats calculés par rapport aux six carbones de la molécule. Ces résultats mis en parallèle avec ceux de l'acide oxalique (A_4 , fig. 4, tableau II) permettent de souligner les points suivants :

1) Etude respirométrique

Dans tous les cas, l'acide oxalique subit une minéralisation plus rapide et plus complète que l'acide citrique.

Si les vitesses relatives de dégagement de CO_2 à partir des deux substrats restent inchangées dans le cas du mull et du mor (rapport CO_2 citrique/ CO_2 oxalique pratiquement constant), il n'en est pas de même pour le B_h ; en effet, dans cet horizon, la vitesse de minéralisation peut être faible et comparable à celle du mor (cas de l'acide citrique) ou intense et comparable à celle du mull (cas de l'acide oxalique).

La minéralisation plus complète de l'acide oxalique laisse présager de voies métaboliques différentes également traduites par l'allure des courbes respirométriques (courbes en cloches pour l'acide citrique ; courbes présentant deux pics pour l'acide oxalique).

2) Etude de la répartition de la radioactivité au cours des différentes phases de l'expérience

Au temps zéro, l'immobilisation physico-chimique de l'acide oxalique demeure dans tous les cas supérieure à celle de l'acide citrique ; l'insolubilisation est d'autant plus considérable (mull 79,9 %) que l'horizon contient plus de calcium échangeable.

Ce processus est relayé plus ou moins rapidement par des phénomènes d'incorporation biochimique nettement plus importants pour l'acide citrique que pour l'acide oxalique ; cette différence se traduit par des variations de la teneur en ^{14}C des composés humiques : dans le cas de l'acide citrique, on constate une croissance de cette teneur à partir du premier jour d'incubation ; dans le cas de l'acide oxalique, une diminution constante du ^{14}C présent dans les fractions humiques, montre que la synthèse microbienne faible ne peut compenser les pertes dues à la minéralisation de l'oxalate insolubilisé et du carbone incorporé.

IV.- CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En utilisant le ^{14}C et les méthodes respirométriques, nous avons pu suivre l'évolution des acides citrique et oxalique dans un sol brun lessivé et dans un podzol humo-ferrugineux.

Le dispositif d'incubation et les méthodes de comptage de la radioactivité que nous avons mis au point, nous ont permis d'obtenir, après des incubations prolongées et des fractionnements poussés, des bilans dans lesquels la perte est inférieure à 5 % du ^{14}C introduit.

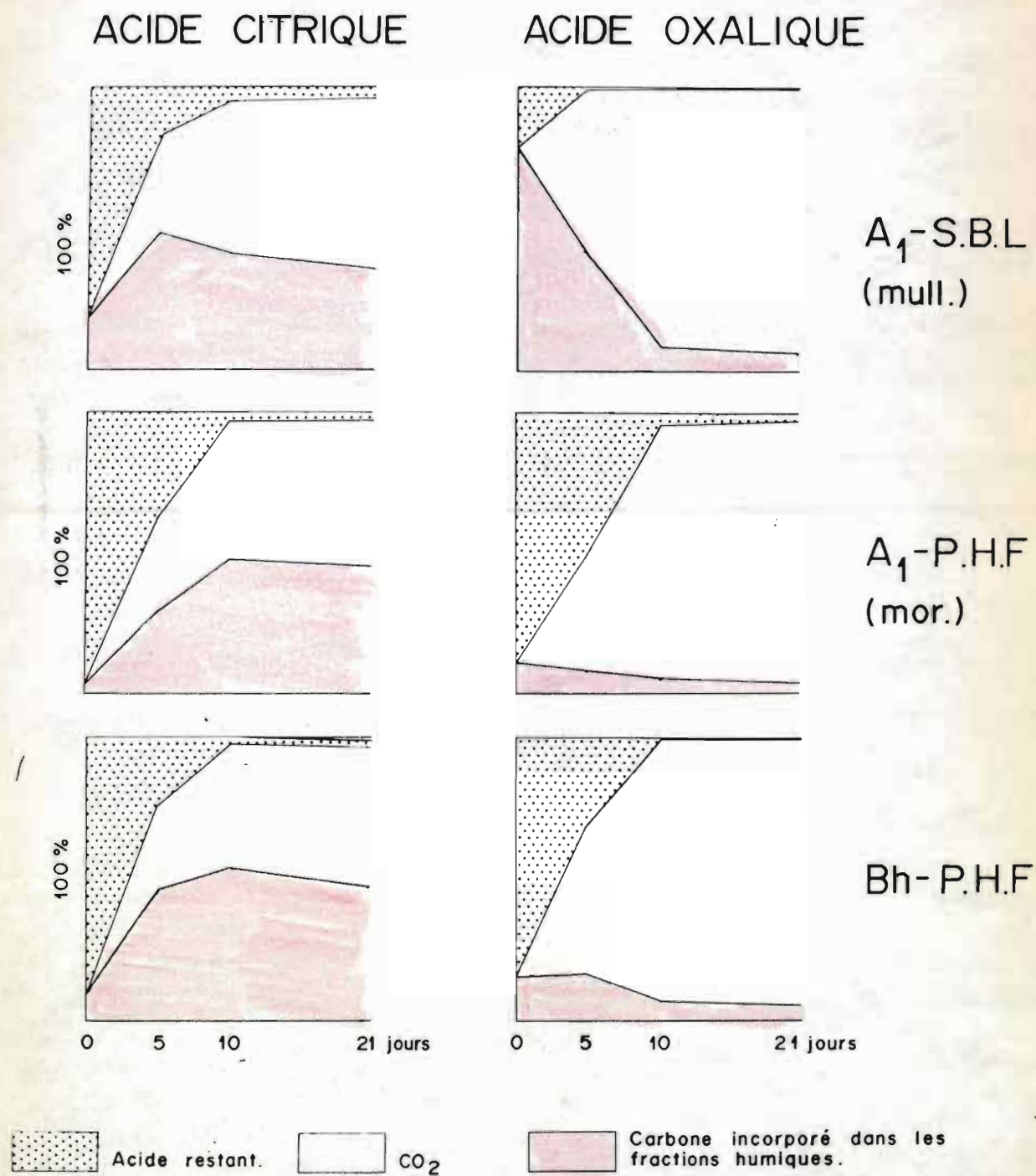
Les résultats obtenus, schématisés par la figure reproduite ci-après (A_4 , fig. 4), peuvent être résumés comme suit :

Au point de vue de la pédogenèse, l'influence des acides citrique et oxalique est avant tout liée à leur persistance dans les horizons. Aussi malgré des divergences dans les mécanismes de transformation, l'évolution de ces deux composés paraît aboutir globalement à un même résultat en ce qui concerne les processus pédogénétiques, et l'on constate une convergence très nette des quantités d'acide maintenu à l'état hydrosoluble dans les différents horizons.

Dans le sol brun lessivé, caractérisé par un humus biologiquement très actif et un taux de saturation élevé, on observe une insolubilisation immédiate, une incorporation rapide dans les composés de type humique, et une minéralisation importante des acides citrique et oxalique dès l'horizon A_1 ; ces processus interdisent toute migration vers l'horizon B. Notons d'autre part l'importance considérable de l'immobilisation physico-chimique de l'acide oxalique sous forme de sel de calcium.

Dans le podzol humo-ferrugineux, caractérisé par un humus biologiquement peu actif et un taux de saturation plus faible, on constate que les processus de rétention physico-chimique des deux acides sont faibles au niveau de l'horizon A_1 ; ceci permet alors leur entraînement par lessivage. En B_h , contrairement à l'horizon éluvial, ces anions fortement fixés, disparaissent rapidement par minéralisation et incorporation aux substances humiques. Ces deux phénomènes ont toutefois des valeurs relatives différentes : dans le cas de l'acide citrique, les processus d'incorporation

Fig 4 : Répartition du carbone en fonction du temps.
 (résultats exprimés en fonction du
 carbone total introduit.)



biochimique sont aussi intenses que les processus de minéralisation ; par contre, dans le cas de l'acide oxalique, la minéralisation l'emporte de beaucoup sur l'incorporation.

L'ensemble de ces résultats apporte une preuve supplémentaire du rôle joué par les microorganismes dans la différence d'évolution des sols lessivés et podzoliques. Ils précisent d'autre part certains mécanismes des transformations subies par les acides citrique et oxalique dans ces profils : si leur action paraît identique en ce qui concerne la migration des cations, l'acide citrique joue un rôle nettement plus intense dans les phénomènes de synthèse concernant l'élaboration des composés humiques.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUCKERT (S.) et DOMMERGUES (Y.) - 1968 - Importance relative de l'immobilisation physico-chimique et de l'immobilisation biologique du fer dans les sols - Sci. du sol, 1, 19-27.
- BRUCKERT (S.) et JACQUIN (F.) - 1966 - Relation entre l'évolution des acides hydrosolubles de deux litières forestières et les processus pédogénétiques - Bull. E.N.S.A.N., 8 (2), 95-112.
- BRUCKERT (S.) et JACQUIN (F.) - 1969a - Interaction entre la mobilité de plusieurs acides organiques et de divers cations dans un sol à mull et dans un sol à mor. - Soil Biol. Biochem. (sous presse)
- BRUCKERT (S.) et JACQUIN (F.) - 1969b - Complexation du fer (III) par les fractions organiques de divers extraits naturel de mor. - C.R. heb. Ac. Sci. Paris (sous presse).
- DOMMERGUES (Y.) et DUCHAUFOR (Ph.) - 1965 - Etude comparative de la dégradation biologique des complexes organo-ferriques dans quelques types de sol - Sci. du sol, 1, 43-59.
- JACQUIN (F.) et BRUCKERT (S.) - 1965 - Identification et évolution des acides hydrosolubles de deux litières forestières - C.R. heb. Acad. Sci. Paris, 260, 4556-4559.
- JEFFAY (H.) et ALVAREZ (J.) - 1961 - Liquid scintillation counting of ¹⁴C. Use of Ethanolamine, Ethylene, Glycol, Monomethyl Ether, Toluene - Anal. Chem., 33, 612-615.
- KAURICHEV (I.S.), IVANOVA (T.N.), NOZDRUNOVA (Y.M.) - 1963 - Teneur en acide organique de bas poids moléculaire dans la matière organique soluble à l'eau des sols - Soviet soil Sci., 3, 223-229.
- KORNBERG (M.L., et ELSDEN (S.R.) - 1961 - Growth on oxalate - Advances in Enzymology, 203, 446-453.
- MUIR (J.M.), MORISSON (R.I.), BOWN (C.J.) et LOGAN (J.) - 1964 - The mobilisation of iron by aqueous extracts of plants. I. Composition of the amino-acids on organic-acid fractions of an aqueous extract of Pine needles. II. Capacities of the amino-acid and organic-acid fractions of a Pine needles extract to maintain iron in solution - J. Soil Sci. G.B. 15 (2), 220-237.
- NYKVIST (N.) - 1963 - Leaching and decomposition of water-soluble organic substances from different types of leaf and needle litter. - Studia Forestalia Suecica, 3, 1-31