

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER  
LABORATOIRE DE PEDOBIOLOGIE

COMPTE-RENDU DE TRAVAUX DE LABORATOIRE  
SUR LES SUBSTANCES HUMIQUES  
N° II

G. BACHELIER  
( rapport ronéotypé à 50 exemplaires )

## PREFACE

Ce rapport ronéotypé et tiré à un nombre réduit d'exemplaires résulte d'une mise au propre de nos notes de travail sur quelques points précis concernant les substances humiques.

Son contenu ne paraît pas devoir donner lieu à une publication, mais, d'une part, il est peut-être susceptible d'intéresser des collègues travaillant en ce domaine et, d'autre part, il constitue pour nous une base de départ en vue d'une étude ultérieure sur les composés fluorescents des substances humiques et leur éventuelle corrélation avec la stabilité structurale des sols.

## SOMMAIRE

- RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DE TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT LES MATIERES ORGANIQUES, LES PROCESSUS D'HUMIFICATION ET LES SUBSTANCES HUMIQUES.
- PURIFICATION DES EXTRAITS HUMIQUES PAR LE FROID ET LE GEL.
- SOLUBILISATION DU FER ET DE L'ALUMINIUM PAR LE PYROPHOSPHATE DE SODIUM CONJOINTEMENT A L'EXTRACTION DES ACIDES HUMIQUES.
- FRACTIONNEMENT DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR GELS SEPHADEX AVEC RECHERCHE DES FLUORESCENCES.
- COMPARAISON AVEC LES RESULTATS DE L'ELECTROPHORESE SUR PAPIER. ESSAI DE TABLEAU COMPARATIF.
- CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES :
  - par la spectrographie infra-rouge
  - par la thermogravimétrie
  - par la microscopie électronique
- RECHERCHE D'INFLUENCES POSSIBLES SUR L'HUMIFICATION :
  - Influence possible d'un champ électrique artificiel.
  - Influence possible de l'ionisation de l'air.
  - Influence possible d'un champ magnétique tournant.
- REFERENCE DE QUELQUES OUVRAGES GENERAUX SUR LES MATIERES ORGANIQUES DU SOL.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DE TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT LES MATIERES ORGANIQUES, LES PROCESSUS D'HUMIFICATION ET LES SUBSTANCES HUMIQUES.

- BACHELIER G. (1960) - Sur l'orientation différente des processus d'humification dans les sols bruns des régions tempérées et les sols ferrallitiques des régions équatoriales.  
L'Agronomie tropicale, 3, 320-324.
- BACHELIER G. (1961) - Sur l'évolution des matières organiques dans les sols.  
Rapport ronéotypé. 54 pages.
- BACHELIER G. (1963) - Influence du climat sur les processus pédo-biologiques de l'humification et de la déshumification.
- BACHELIER G. (1966) - Les sucres dans le sol et leur dosage global.  
Cah.ORSTOM, sér.Pédol., IV, 1, 9-22.
- BACHELIER G. et GAVINELLI R. (1966) - Dosage global des glucides du sol par les méthodes colorimétriques à l'anthrone et à l'orcinol.  
Cah.ORSTOM, sér.Pédol., IV, 3, 97-103.
- BACHELIER G. (1968) - Contribution à l'étude de la minéralisation du carbone.  
Mémoire ORSTOM n°30, 145 pages.
- BACHELIER G. (1972) - Etude expérimentale de l'action des animaux sur l'humification des matériaux végétaux. I.Premières expériences et conclusions préliminaires.  
Coll.ORSTOM Trav.Doc., n°14, 175 pages.
- BACHELIER G. (1973) - Etude expérimentale de l'action des animaux sur l'humification des matériaux végétaux. II.Action des animaux morts et des acides aminés. Conclusions générales.  
Coll.ORSTOM Trav.Doc., n°30, 80 pages.
- BACHELIER G. (1973) - Action de la faune du sol sur l'humification des matériaux végétaux. Mise au point.  
Rev.Ecol.Biol.Sol, 10, 4, 453-473.
- BACHELIER G. (1973) - Compte-rendu de travaux de laboratoire sur les substances humiques. N°I : Fractionnement des acides humiques par chromatographie sur gel de polyacrilamine, chromatographie sur gel séphadex et électrophorèse sur papier. Fluorescence des fractions et colorations spécifiques.  
Rapport ronéotypé. 20 pages.
- BACHELIER G. (1975) - Importance de la nature stéréochimique des acides aminés dans les processus d'humification.  
Rev.Ecol.Biol.Sol, 12, 1, 383-392.
- BACHELIER G. (1977) - Mise en évidence de rythmes dans les processus d'humification à température et humidité constantes.  
Cah.ORSTOM, sér.Pédol., n°3, 337-340.

## PURIFICATION DES EXTRAITS HUMIQUES PAR LE FROID ET LE GEL

L'extraction des substances humiques par un sel de sodium, et notamment le pyrophosphate de sodium, entraîne une plus ou moins grande quantité d'argile complexée. Ceci, principalement dans le cas des sols ferrallitiques, et même après la centrifugation du filtrat qui ne peut guère dépasser 2000 tours/mn, si l'on ne veut pas risquer de précipiter les plus grosses micelles argilo-humiques.

On peut toutefois obtenir la sédimentation d'une grande partie de l'argile entraînée en conservant au froid plusieurs jours la solution humo-fulvique, mais il apparaît que cette sédimentation de l'argile est nettement plus affirmée et plus complète quand, dans un récipient en plastique souple, on soumet pendant 24 heures cette solution au gel et qu'on la laisse ensuite se dégeler lentement.

Le gel doit agir à la fois par l'arrêt du mouvement brownien et un effet de dessiccation des complexes argilo-humiques ou argilo-fulviques avec libération partielle des argiles qui se déposent alors au fond du récipient.

La solution ainsi purifiée est récupérée, soit par siphonnage au dessus d'une rondelle de papier filtre précautionneusement disposée au dessus du dépôt d'argile, soit, après un nouveau gel, par découpage du bloc de glace.

## SOLUBILISATION DU FER ET DE L'ALUMINIUM PAR LE PYROPHOSPHATE DE SODIUM CONJOINTEMENT A L'EXTRACTION DES ACIDES HUMIQUES.

Au cours de l'extraction des substances humiques par le pyrophosphate de sodium, de très notables quantités de fer et d'aluminium se trouvent solubilisées.

Ces éléments ne précipitent pas en milieu acide, demeurent donc dans les acides fulviques, et ne contaminent pas, en principe, les acides humiques. Il est intéressant de connaître "l'aluminium solubilisé par le pyrophosphate de sodium", celui-ci étant généralement supérieur à "l'aluminium échangeable" extrait classiquement au chlorure de potassium.

Dans un échantillon de 100g d'un sol rouge ferrallitique (horizon 0-20cm), nous avons ainsi extrait 2,92 mg d'aluminium au pyrophosphate de sodium, alors que l'aluminium échangeable extrait au chlorure de potassium n'était que de 0,20 mg, soit donc près de 15 fois moins.

De plus, alors que passé 24 heures, le temps d'extraction par le pyrophosphate de sodium ne semble pas affecter la quantité d'aluminium solubilisé, il influence par contre fortement la quantité de fer simultanément solubilisé. Ainsi, dans notre échantillon de sol rouge ferrallitique, la quantité d'aluminium extraite au pyrophosphate de sodium a été pratiquement la même en 4 jours qu'en 24 heures, alors que la quantité de fer a été 3 fois plus élevée, à savoir : 25,5 mg en 4 jours et 8,0 mg en 1 jour. Le fer ainsi solubilisé ne représente toutefois qu'une très faible fraction du fer libre extrait par la méthode DEB (dithionite et solution acétate tartrate); celui-ci était par exemple 50 à 100 fois plus abondant dans notre échantillon ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  % = 3,65).

### Technique de dosage du fer et de l'aluminium extraits par le pyrophosphate de sodium.

Rappelons que le fer et l'aluminium solubilisés par le pyrophosphate de sodium ne précipitent pas en milieu acide avec les acides humiques et se retrouvent donc dans la fraction filtrée, dite des acides fulviques.

Ce filtrat acide est porté à sec sous lampe à filament de carbone. Il subit au cours de cette dessiccation une lente hydrolyse acide avec libération d'acide phosphorique qui donne secondairement des phosphates de fer et d'aluminium. Le dessiccat, qui reste souvent poisseux, est repris par de l'eau distillée et les phosphates de fer et d'aluminium sont ensuite précipités à pH 12 par de la soude.

Après repos de quelques heures, ces phosphates sont récupérés par filtration puis dissous sur filtre par de l'acide chlorhydrique.

L'aluminium peut être dosé par l'ériochrome cyanine en présence d'acide ascorbique et en milieu chlorhydrique. Le fer peut être dosé à l'orthophénanthroline.

FRACTIONNEMENT DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR GELS SEPHADEX AVEC  
RECHERCHE DES FLUORESCENCES.

Nous avons déjà réalisé antérieurement le fractionnement des acides humiques (dispersés en milieu basique) par chromatographie dans un gel séphadex afin de comparer ce fractionnement à celui effectué par électrophorèse au sein d'un gel de polyacrylamine (BACHELIER, 1973). Nous avons repris ce fractionnement des acides humiques dans un gel séphadex, toujours avec de simples colonnes de fortune, mais avec des gels différents.

De tous les gels séphadex utilisés : G 10, G 15, G 25 fin, G 25 moyen, G 50 fin, G 75, LH 20, LH 60 et Sephacryl S-200 superfine, c'est le gel G 25 fin qui nous a donné les séparations les plus satisfaisantes, car à la fois les plus nettes et les mieux reproductibles.

La chromatographie dans le gel LH 20 peut toutefois pour certains échantillons permettre une séparation plus précise des diverses substances fluorescentes (sol rouge ferrallitique BAC 21 par exemple), mais elle ne nous a pas paru convenir à l'ensemble des échantillons.

Les quelques reproductions de chromatogrammes de la figure 1 illustrent nos principaux résultats.

Il en ressort que d'une manière générale passent en tête de migration les molécules d'acides humiques les plus condensées et de couleur brune (10 YR 2/2, 3/3, 3/4; 7,5 YR 5/4, ...) ou plus rarement brun-jaune (10 YR 5/8 par exemple pour un sol rouge ferrugineux sur granite). Cette première bande d'acides humiques n'est pas fluorescente.

Viennent ensuite en continu ou, au contraire, en bande plus ou moins bien délimitée des acides humiques de couleur brun-jaune (10 YR 5/6, 5/8, 6/4, 6/6) offrant une très vive fluorescence jaune.

Enfin, en queue de migration s'observe une bande plus étroite d'acides humiques de couleur brune (7,5 YR 3/2, 4/4, 5/6 ; 10 YR 5/3) à brun-jaune (10 YR 5/4, 5/6, 5/8, ...) présentant aussi une vive fluorescence.

Parfois, tout à fait en queue de migration, demeure une large traîne brun pâle à brun-gris pâle de grosses micelles qui n'ont pu que très difficilement s'infiltrer à travers le gel. Ce sont des micelles argilo-humiques de sols à humus grossier (anmor, ranker, nor de podzol, sol ferrallitique brun-rouge sur basalte). Une légère fluorescence peut accompagner ces grosses micelles argilo-humiques.

Il arrive que les diverses fluorescences soient décalées par rapport aux bandes d'acides humiques ou correspondent à des fractions pratiquement invisibles (cas du sol brun calcaire), ce qui nous suggère que les substances fluorescentes généralement liées aux acides humiques en sont cependant chimiquement différentes. La chromatographie des matériaux végétaux humifiés nous le confirme d'ailleurs souvent; confer, par exemple, sur la figure 1 la chromatographie des acides humiques extraits d'un morceau de bois de pommier fortement brun, ou encore la fluorescence blanche existant en queue de migration des acides humiques extraits d'une paille humifiée. Nous verrons aussi que dans l'électrophorèse sur papier la fluorescence jaune-paille la plus vive précède toujours la bande des acides humiques mobiles.

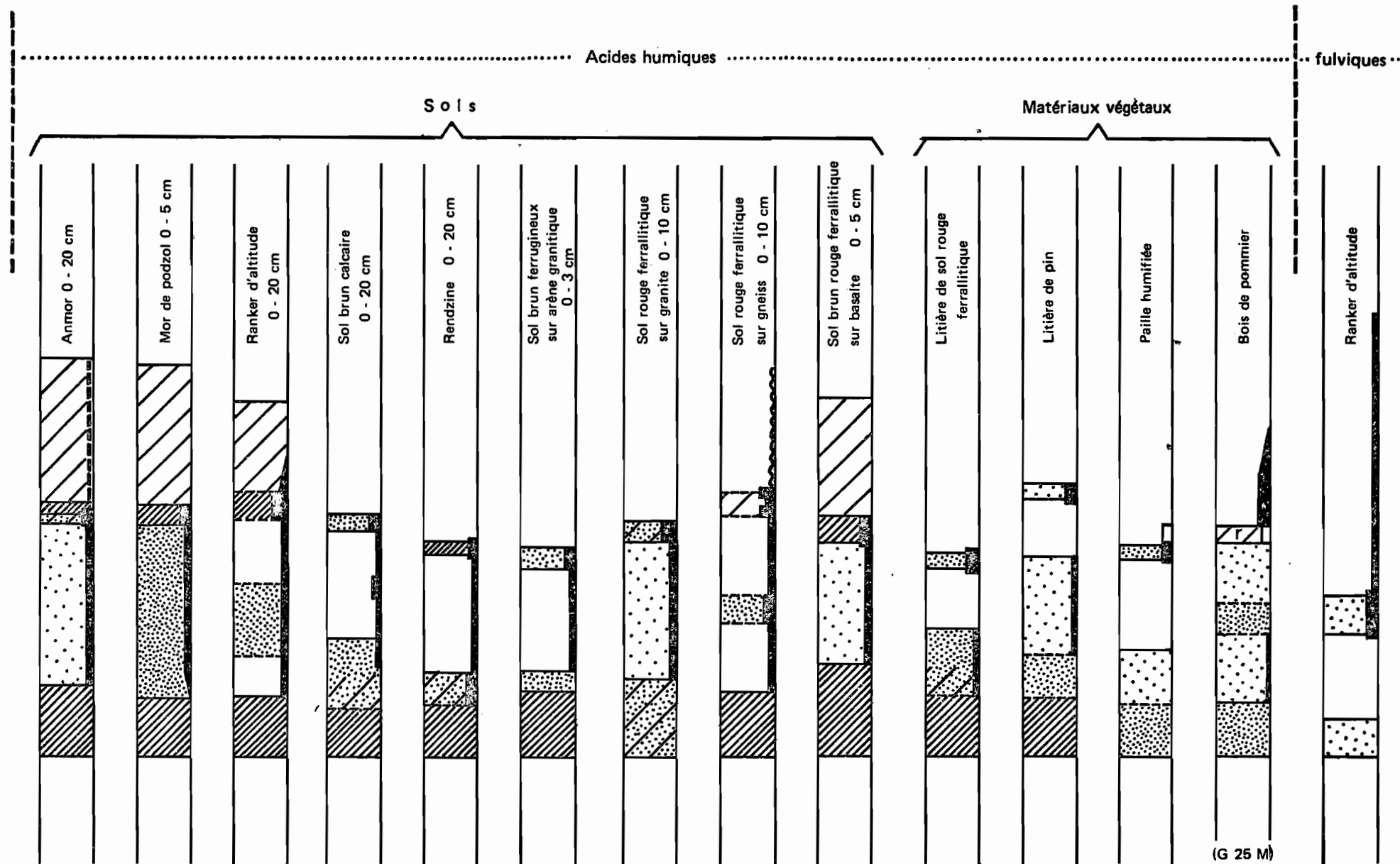


Figure 1 - Chromatographie et fluorescence de substances humiques dans le gel Sephadex G.25 fin



La chromatographie des acides fulviques dans un gel séphadex montre le plus souvent une tête de migration d'acides préhumiques brun-jaune pâle donnant une bande sombre sous lumière ultra-violette, puis une bande plus ou moins visible d'acides brun-jaune fluorescents et ensuite une fluorescence jaune générale du haut de la colonne.

Trois observations méritent encore d'être faites :

1- Si l'on récupère les grosses molécules non fluorescentes en tête de colonne (c'est à dire les 3/4 inférieurs de la zone brune) et qu'on les refasse passer sur la même colonne, on n'observe pas de nouvelle division, mais, par contre, une très légère bande fluorescente se manifeste encore dans la partie supérieure de la colonne. Il semble qu'il s'agisse là plus d'une libération des substances fluorescentes incluses dans les grosses molécules que d'une altération de ces dernières, d'autant plus qu'il ne se reforme pas d'anneau brun-jaune à la partie supérieure des colonnes.

2- Les chromatographies refaites dans les mêmes conditions à 2 mois d'intervalle et sur des acides humiques conservés au frigidaire redonnent les mêmes séparations avec toutefois une possibilité de légère atténuation des fluorescences, due vraisemblablement à la labilité des substances qui en sont responsables.

3- Les acides humiques d'une litière de pin extraits au pyrophosphate de sodium, précipités par de l'acide chlorhydrique ou de l'acide sulfurique, centrifugés, lavés, puis redissous, dans chaque cas, par de la soude ou de l'ammoniaque N/10 ont donné approximativement les mêmes bandes, les mêmes couleurs et les mêmes fluorescences, mais les bandes ont été un peu plus affirmées dans le cas de la reprise des précipités d'acides humiques par l'ammoniaque que dans le cas de la reprise de ces mêmes précipités par la soude.

#### Références bibliographiques

##### Filtration sur gel séphadex

- BAILLY J.-R. et MARGULIS H. (1968) - Etude de quelques acides humiques sur gel de dextrane (I).  
Plant and Soil, 29, 3, 343-361.
- BAILLY J.-R. et TITTONEL E. (1972) - Etude de quelques acides humiques sur gel de dextrane (II).  
Plant and Soil, 37, 1, 57-80.
- BAILLY J.-R. (1973) - Spectroscopie U.V. visible des acides humiques non fractionnés et de certaines de leurs fractions obtenues sur gels de dextrans.  
Plant and Soil, 38, 2, 281-297.
- KUMADA K. et MIYARA E. (1973) - Sephadex gel fractionation of humic acids.  
Soil Sci. Plant Nutr., 19, 4, 255-263.
- STEPANENKO L.S. et MAKSIMOV O.B. (1976) - Investigation of humic acids by gel chromatography on sephadex in dimethyl sulfoxide.  
Soviet Soil Sci., 8, 5, 558-565.

##### Fluorescence

- Fluorescence. Theory, instrumentation and practice (1967)  
Guilbault G. éd.  
Marcel Dekker, Inc., New-York. 697 pages.



- LEVESQUE M. (1972) - Fluorescence and gel filtration of humic compounds.  
Soil Science, 113, 5, 346-357.
- MULLER-WEGENER U.(Von) (1977) - Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Huminsäuren.  
Z.Pflanzenernaehr.Bodenkd., 140, 5, 563-570.

COMPARAISON AVEC LES RESULTATS DE L'ELECTROPHORESE SUR PAPIER.  
ESSAI DE TABLEAU COMPARATIF.

Le fractionnement des acides humiques (dispersés en milieu basique) donne classiquement avec l'électrophorèse sur papier (cf. figure 2 et tableau 1) :

- a- une fraction d'acides humiques fixes ou peu mobiles, de couleur brune, et s'éloignant peu de la surface de dépose. Ces acides humiques correspondraient aux "acides humiques gris" (1)
- b- facultativement, des acides humiques moyennement mobiles, rarement groupés, mais formant le plus souvent un fond continu, principalement dans le cas des sols à humus grossier (anmor, ranker, sol ferrallitique sur basalte).
- c- une fraction d'acides humiques mobiles de couleur brun-jaune, ou de couleur brune dans le cas des sols organiques et des sols sur roches mélanocrates (basalte notamment). Ces acides humiques correspondraient aux "acides humiques bruns" (1)

Parfois aussi, une auréole argilo-ferrugineuse et plus ou moins humique se localise à quelque distance de la dépose, comme par exemple dans le cas des sols ferrallitiques rouges, très kaoliniques et peu organiques, dont il est difficile de bien purifier les acides humiques.

En ce qui concerne les fluorescences, une fluorescence de couleur jaune (ou orange en présence de dépôts humiques bruns) se manifeste aussitôt après la surface de dépose, que très souvent d'ailleurs elle recouvre. Cette fluorescence s'atténue et devient éventuellement plus jaune en se rapprochant du dépôt des acides humiques mobiles. Passé ce dépôt des acides humiques mobiles, se manifeste une autre fluorescence de couleur jaune-paille qui, d'abord très vive, s'atténue ensuite progressivement vers la tête de migration où s'observe parfois une légère fluorescence de couleur bleu-violacé.

La fluorescence de couleur jaune ou parfois orangée située entre les deux principaux dépôts d'acides humiques, non mobiles et mobiles, apparaît très nettement plus terne dans le cas des sols calcaires (sols bruns calcaires, rendzines). On peut aussi noter que, dans le cas des sols calcaires, les acides humiques peu mobiles qui demeurent à proximité de la surface de dépose ne sont généralement pas (ou que très peu) fluorescents.

(1) Nous pensons pour de multiples raisons, dont notamment celle de la couleur, qu'il vaudrait mieux abandonner ces appellations d'acides humiques "gris" et d'acides humiques "bruns".

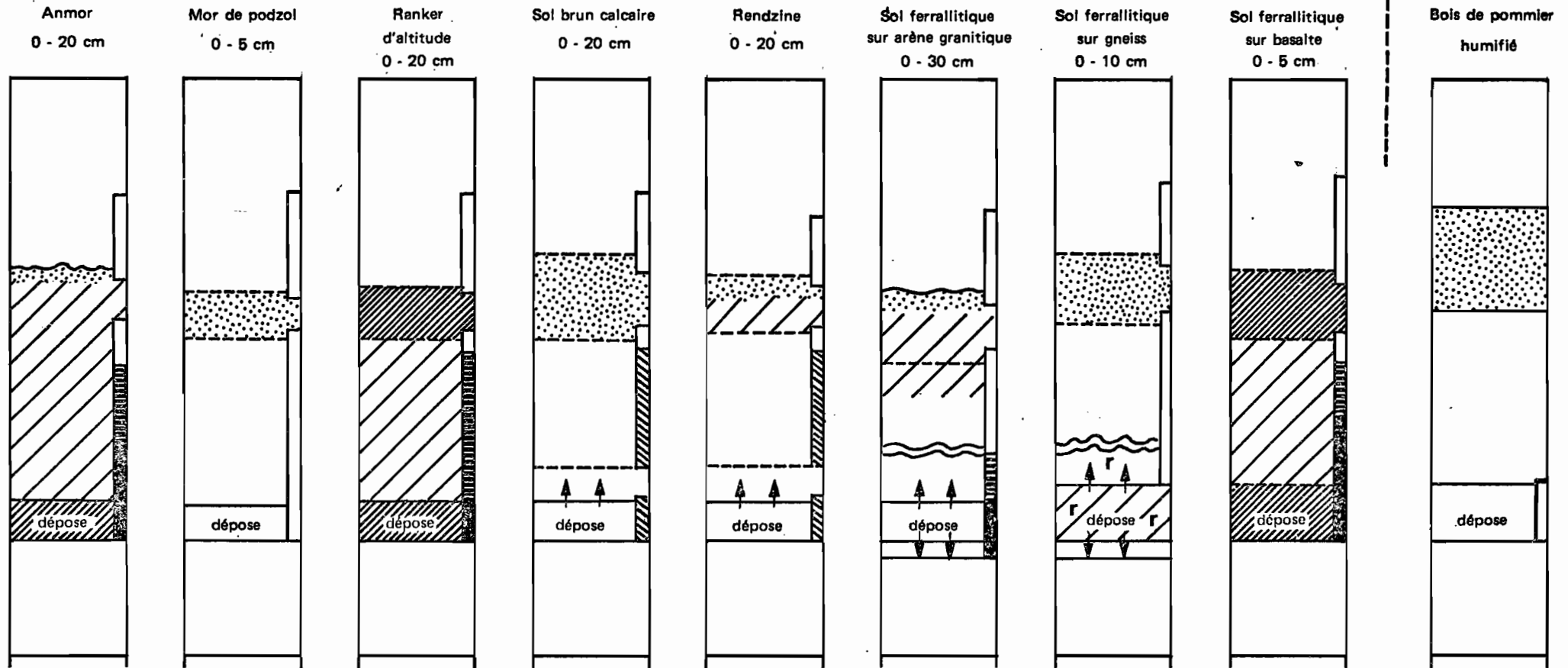
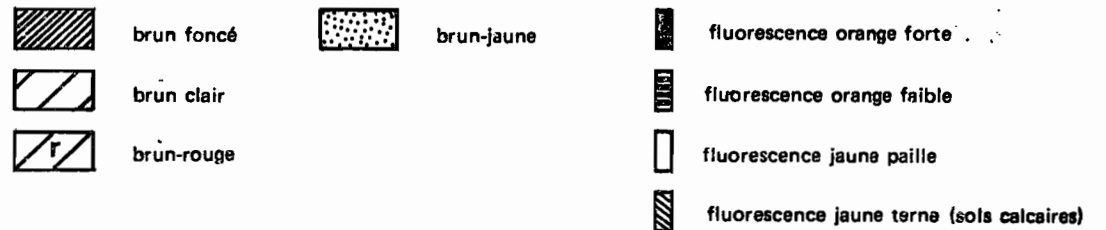
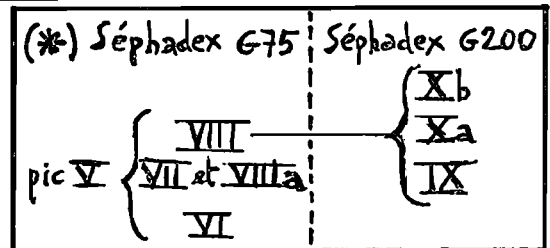


Figure 2 - Électrophorèse sur papier et fluorescence de divers acides humiques



ELECTROPHORESE SUR PAPIER		CHROMATOGRAPHIE SUR GEL SEPHADEX G 25 Fin		d'après BAILLY TITTONEL 1972		
		Fluorescences sous U.V.	Fluorescences sous U.V.			
Dépose ↓	Acides humiques fixes bruns	orange ou jaune (1)	Acides humiques grossiers bruns	jaune-paille	pic V <sup>(*)</sup>	grosses molécules
	Acides humiques peu mobiles		Acides humiques brun-jaune		pic IV	
	~~~~~(2)~~~~~	jaune ou orange (1)	Acides humiques intermédiaires brun-jaune	jaune-paille	pic III <sup>b</sup>	petites molécules
	Acides humiques intermédiaires moyennement mobiles (3)		Acides humiques brun à brun-jaune		pic III <sup>a</sup>	
Acides humiques mobiles brun-jaune	jaune-paille	Acides humiques brun-verdâtre (pigments végétaux)	jaune verdâtre violet	Zone II pic I?	très petites molécules	
		bleu violacé (avec tris-borate EDTA)				

- (1) fluorescence orange dans le cas de sols très organiques avec dépose d'ac. humiques bruns  
 (2) migration possible d'une bande argilo-ferrugine plus ou moins humique dans le cas de certains sols rouges ferrallitiques très kaolinisés et peu organiques  
 (3) éventuellement en tache ou plus généralement en fond continu brunâtre, notamment dans le cas de sols très organiques ou formés sur roches mélanocrates.



TABEAU 1 - ESSAI DE COMPARAISON ENTRE LE FRACTIONNEMENT DES ACIDES HUMIQUES SUR GEL SEPHADEX G 25 Fin ET LE FRACTIONNEMENT PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER AVEC INDICATION DES DIVERSES FLUORESCENCES.

Il n'est pas rigoureux de vouloir comparer les résultats de la chromatographie sur gel séphadex avec ceux de l'électrophorèse sur papier, car les principes de fractionnement des substances humiques ne sont pas les mêmes dans les deux cas. C'est principalement l'encombrement moléculaire et les processus d'adsorption qui jouent dans un cas, et la charge électrique dans l'autre. Mais, en fait, dans l'électrophorèse sur papier, ce sont aussi les plus petites molécules qui, à charge égale, migrent le plus facilement, d'où quand même la possibilité d'une comparaison (cf. tableau 1).

Si cette comparaison montre l'existence d'un certain parallélisme entre les différentes fractions d'acides humiques, il n'en est cependant pas de même pour les fluorescences, car, en effet, si dans le cas de la chromatographie sur gel séphadex les plus grosses molécules qui passent en tête de colonne s'avèrent généralement non fluorescentes, par contre, dans le cas de l'électrophorèse sur papier, les acides humiques fixes ou peu mobiles, jugés les plus grossiers, offrent souvent une très vive fluorescence de couleur orange ou jaune. On peut par suite penser que les molécules des substances responsables de cette fluorescence sont de petites molécules, peut-être de type glucidique, n'offrant pas de charge électrique et non liées aux acides humiques mobiles. Ces molécules fluorescentes facilement entraînées sur colonnes de gel ne migrent pas ou ne migrent que très peu dans le cas de l'électrophorèse sur papier. D'ailleurs, dans le cas des acides humiques extraits d'une brindille de pommier humifiée (cf. figure 2), cette fluorescence est même demeurée sur la surface de dépose, alors que les acides humiques, qui dans ce cas là étaient tous mobiles, n'offraient aucune fluorescence après migration.

La couleur bien jaune de la fluorescence, demeurée dans cet exemple sur la surface de dépose, nous laisse supposer que la fluorescence de départ qui est souvent de couleur orange doit en fait n'être qu'une fluorescence jaune modifiée par la présence de substances organiques brunes.

En conclusion, outre l'aspect quantitatif fort important dans tout travail de laboratoire, le fractionnement des acides humiques sur colonnes de gel séphadex nous semble préférable pour toute étude des substances fluorescentes présentes dans les acides humiques.

## CARACTERISATION DES SUBSTANCES HUMIQUES.

Diverses analyses peuvent être faites sur les substances humiques, telles par exemple celles conduisant à la connaissance du rapport C/N ou à l'étude de la capacité d'échange, mais nous ne traiterons ici que de la caractérisation des acides humiques par la spectrographie infra-rouge, la thermogravimétrie et la microscopie électronique.

Les échantillons doivent pour ces techniques être rigoureusement purifiés puis portés à sec, ce qui laisse toujours craindre une possible modification des fonctions chimiques, notamment aux pH trop basiques (acides humiques resolubilisés en milieu ammoniacal) ou trop acides (acides fulviques demeurant en solution après la précipitation des acides humiques par HCl).

Par ailleurs, de l'argile liée est toujours plus ou moins entraînée avec les acides humiques, et il est nécessaire de ne pas l'oublier. Il est par exemple essentiel en spectrographie infra-rouge de connaître les spectres d'absorption des argiles susceptibles d'être liées aux acides humiques.

Il a été suggéré par plusieurs auteurs de procéder à une attaque fluorhydrique préalable des acides humiques pour détruire ces argiles. N'ayant pas encore expérimenté cette technique, nous en ignorons l'efficacité et les conséquences possibles sur la bonne conservation des molécules humiques. DUPUIS et RATSIMBAZAFY (1977) indiquent que ce traitement détermine en spectrographie infra-rouge une nette augmentation des bandes de vibration correspondant aux CH aliphatiques et une diminution plus ou moins complète de la bande  $-C=C-$  localisée à  $1505\text{ cm}^{-1}$ .

### I - Caractérisation des acides humiques par la spectrographie infra-rouge.

Le tableau n°2 ci-joint, établi essentiellement d'après les données des auteurs cités en fin de paragraphe, indique les fonctions ou groupements correspondant aux principales bandes d'absorption des acides humiques.

Les diverses données des auteurs sont parfois fort différentes et, comme le montre le tableau figurant dans le livre de SILVERSTEIN et CLAYTON BASSLER (1968), les diverses fonctions ont des bandes d'absorption qui très souvent se superposent. Il peut aussi y avoir des interférences avec les impuretés.

Il demeure donc toujours très délicat d'interpréter une spectrographie infra-rouge d'acides humiques (cf. à ce sujet les remarques de RUSSELL et ANDERSON, 1977).

Certaines bandes sont cependant réputées avoir une signification plus sûre que d'autres. Ainsi :

la bande  $2920\text{ à }2930\text{ cm}^{-1}$  ( $=3,42\text{ à }3,41\text{ microns}$ ) correspondrait aux groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  des chaînes aliphatiques.

la bande  $1710\text{ à }1730\text{ cm}^{-1}$  ( $=5,85\text{ à }5,78\text{ microns}$ ) traduirait bien le groupement  $\text{C=O}$  des fonctions acides  $-\text{CO}_2\text{H}$  ou cétoniques  $-\text{CO}-$ . Les humus très acides manifestent souvent une absorption plus forte dans la bande  $1720$  que dans la bande  $1610\text{ cm}^{-1}$ .

la bande  $1600\text{ à }1610\text{ cm}^{-1}$  ( $=6,25\text{ à }6,21\text{ microns}$ ) indiquerait l'importance des noyaux aromatiques et des liaisons  $-\text{C}=\text{C}-$ . Il en serait de même pour la bande  $1505\text{ à }1510\text{ cm}^{-1}$  ( $=6,65\text{ à }6,62\text{ microns}$ ) indiquant une structure proche de celle de la lignine.

Longueurs d'onde		Liaisons, groupements, fonctions et impuretés.	
en microns	en $\text{cm}^{-1}$		
2,94	<u>3400</u>	groupements -OH	
3,24	<u>3090</u>	liaisons C-H aromatiques	
3,26	<u>3070</u>		
3,33			<u>3000</u>
3,38	<u>2960</u>	groupements $\text{CH}_2$ et $\text{CH}_3$ des <u>chaines aliphatiques</u> (cf. aussi 1445)	Pond d'absorption traduisant le degré de polymérisation (ac. humiques > ac. fulviques)
3,41	<u>2930</u>		
3,42	<u>2920</u>		
3,45	<u>2900</u>		
3,51	<u>2850</u>		
4,00	2500	(palier) gr. $-\text{CO}_2\text{H}$	
5,00			<u>2000</u>
5,78	<u>1730</u>	liaisons $\text{C}=\text{O}$ des fonctions acides $\text{CO}_2\text{H}$ et cétoniques	<u>1730</u>
5,79			<u>1725</u>
5,85	<u>1710</u>		$>\text{C}=\text{O}$ acides carboxyliques aldéhydes cycliques et acycliques cétones, quinones
5,90			<u>1695</u>
5,99			<u>1670</u>
6,06	1650	résidus protéiques, amides (cf. aussi 1550 et 1538)	
6,10	<u>1640</u>	accroissement des teneurs en N au cours de l'humification des matériaux ligneux (N-H, C=N)	
6,21	<u>1610</u>	fonctions acides estérifiées	
6,21	<u>1610</u>		
6,25	<u>1600</u>	liaisons $-\text{C}=\text{C}-$ des <u>noyaux aromatiques</u> (cf. aussi 1505-1510)	
6,45	<u>1550</u>	résidus protéiques, amides (cf. aussi 1650)	<u>1550</u>
6,50	<u>1538</u>		liaisons $-\text{C}=\text{C}-$ des noyaux aromatiques
6,58			<u>1520</u>
6,62	<u>1510</u>	liaisons $-\text{C}=\text{C}-$ , structures proches de celles de la <u>lignine</u>	
6,65	<u>1505</u>		
6,85	<u>1460</u>	groupements $\text{CH}_2$ des <u>chaines aliphatiques</u> (cf. aussi 2930-2920)	
6,90	<u>1450</u>		
6,99	<u>1430</u>		
7,04	<u>1420</u>	groupements $\text{CH}_2$ , $\text{COO}^-$	
7,14	<u>1400</u>		
7,25	1380	fonctions acides estérifiées	
8,00	<u>1250</u>	augmentation des fonctions $\text{CO}_2\text{H}$ au cours de l'humification, ou modifications dues à l'action de l'acide sulfurique utilisé pour la précipitation des ac. hum.	
8,20	<u>1220</u>		
8,47			<u>1180</u>
9,01	<u>1110</u>	mélange d'aldéhydes	
9,01	<u>1110</u>		
9,05	<u>1105</u>		impuretés siliceuses $\text{Si-O-Si}$ et $\text{Si-O-C}$ liaisons $\text{Si-O}$ des argiles
9,52	<u>1050</u>	hydrates de carbone	
9,61	<u>1040</u>		
9,75			<u>1025</u>

TABLEAU 2 - IDENTIFICATION DES PRINCIPALES BANDES D'ABSORPTION  
DES ACIDES HUMIQUES EN SPECTROGRAPHIE INFRA-ROUGE

En conclusion, nous pensons que la spectrographie infra-rouge ne peut guère servir à la caractérisation des acides humiques, mais qu'elle peut éventuellement aider à en suivre les modifications chimiques. L'estérification des acides humiques se traduit ainsi par une diminution du pic  $1720\text{ cm}^{-1}$  et une augmentation des pics  $1610$  et  $1380\text{ cm}^{-1}$ .

#### Références bibliographiques

- CHEN Y., SENESI N. et SCHNITZER M. (1978) - Chemical and physical characteristics of humic and fulvic acids extracted from soils of the mediterranean region. *Geoderma*, 20, 2, 87-104.
- DUPUIS T. et RATSIMBAZAFY A.C. (1977) - Contribution à l'étude de la matière organique humifiée de sols hydromorphes de Madagascar et de ses formes de liaison avec le fer. *Cah. ORSTOM, Sér. Pédol.*, XV, 2, 143-156.
- FLAIG W., BEUTELSPACHER H. et RIETZ E. (1975) - Chemical composition and physical properties of humic substances. in: "Soil Components", Vol.1 Organic components; John E. Gieseking éd., Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New-York.
- RUSSELL J.D. et ANDERSON H.A. (1977) - Comment on "Spectroscopie infra-rouge de quelques fractions d'acides humiques obtenues sur Séphadex". *Plant and Soil*, 48, 2, 547-548.
- SCHEFFER F. (Von), ZIECHMANN W. et SCHLUTER H. (1959) *Über Huminsäuren aus Polyoxybenzolen. 4. Mitteilung. Über die Anwendung der Papierelektrophorese zur Trennung von Huminsäuren und die Charakterisierung der gewonnenen Fraktionen.* *Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde*, 85, 1, 32-43.
- SCHNITZER M. (1978) - Humic substances : chemistry and reactions. in : *Soil organic matter*", Schnitzer M. et Khan S.U. éd. *Developments in soil science n°8*, Elsevier scientific publ. Company (Amsterdam, Oxford, New-York), 319 pages.
- SILVERSTEIN R.M. et CLAYTON BASSLER G. (1968) *Identification spectrométrique des composés organiques.* Masson et Cie, Gauthier-Villars éd. (Paris), 225 pages.
- TAN K.H. (1978) - Formation of metal-humic acid complexes by titration and their characterization by differential thermal analysis and infrared spectroscopy. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 2, 123-129.

## II - Caractérisation des acides humiques par la thermogravimétrie.

Pour cette technique, comme pour la précédente, les substances humiques doivent être fournies sèches à l'air et bien purifiées.

Au cours de l'échauffement de l'échantillon, la perte de poids s'effectue généralement en quatre paliers, à savoir, dans l'ordre :

a- une perte de poids entre 20° et approximativement 150° correspondant au départ de l'eau libre, plus ou moins fortement retenue.

b- une perte de poids correspondant aux chaînes périphériques des molécules d'acides humiques. Cette perte de poids s'effectue lentement et d'une manière bien régulière.

c- une perte de poids correspondant aux noyaux des molécules d'acides humiques. Dans nos expériences, cette perte de poids s'est manifestée plus lentement que pour les chaînes périphériques, dans le cas des acides humiques d'un mor gras de podzol et d'un ranker d'altitude (Mt Aigoual), et plus rapidement, dans le cas des acides humiques d'une rendzine, d'un sol brun calcaire, de deux sols rouges ferrallitiques sur roches cristallophylliennes et d'un sol brun ferrallitique sur basalte.

f- une dernière et très lente perte de poids se manifeste au dessus de 450 à 500° et correspond à l'eau de constitution des impuretés argileuses, comme le montre l'analyse d'échantillons plus ou moins purifiés et donc plus ou moins riches en argiles.

D'après FLAIG, BEUTELSPACHER et RIETZ (1975), la perte de poids à 150° correspond à la décomposition des glucides, et à 450° à la minéralisation des bitumes. Dans le cas des acides humiques d'un anmor, nous avons effectivement constaté une perte de poids entre 570° et 700° correspondant très vraisemblablement à des formes d'acides humiques très condensés, c'est à dire à des acides humiques fortement carbonés.

L'interprétation des courbes demeure là encore très délicate, car il est bien évident que les décompositions se chevauchent, aussi est-il nécessaire de définir une règle arbitraire pour l'interprétation des courbes.

Après divers essais, nous avons convenu :

a- de ne considérer la perte de poids de l'échantillon qu'entre 150 et 450°, sauf dans quelques rares cas particuliers, comme, par exemple, dans le cas des acides humiques de l'anmor ou celui de l'existence, dans la courbe, d'angles bien marqués aux abords des deux températures limites.

b- de ramener la courbe ainsi délimitée à des segments dont les points d'intersection sont définis par les tangentes aux courbes. Normalement, on distingue deux segments, mais, dans le cas où l'on en distingue trois, le segment médian est divisé en deux au bénéfice de chacun des deux segments qui l'encadrent (cas de l'anmor par exemple, en considérant pour cet échantillon la perte de poids jusqu'à 630°).

En appliquant ces quelques règles, nous avons obtenu les résultats suivants pour une dizaine d'échantillons de sols de nature variée. (cf. tableau 3).



	Observations	noyau périphérie	en %			Total n+p+r	noyau noy+pér. x 100
			noyau/périphérie	résidu	①		
anmor	jusqu'à 550°	0,46	11/24	11,8	46,8	31 %	
	jusqu'à 630°	1,55	45/29	"	85,8	61 %	
mor gras de podzol	jusqu'à 450°	0,24	10/42	18,8	70,8	19 %	
ranker d'altitude	"	0,53	18/34	15,3	67,3	35 %	
sol brun calcaire	"	0,49	20/41	16,9	77,9	33 %	
rendzine	"	0,54	19/35	22,0	76,0	35 %	
sol ferrallitique sur arène granitique	"	0,83	19/23	51,5	93,5	45 %	
sol rouge ferrallitique sur roche crist.	"	0,76	13/17	57,3	87,3	43 %	
sol rouge ferrallitique sur roche crist.	"	0,86	16/18,5	54,6	89,1	46 %	
sol brun ferrallitique sur basalte (andosol)	"	0,74	13/17,5	48,8	79,3	43 %	

① La somme "perte de poids noyau + perte de poids périphérie + résidu" n'égale pas 100, car il est aussi une perte de poids de l'échantillon en deçà de 150° et au delà de 450°. Cette perte de poids est ici d'environ 7 à 20% pour les sols ferrallitiques, 22 à 24% pour les sols calcaires, 29% pour le mor de podzol, 33% pour le ranker d'altitude et une valeur très variable pour l'anmor en fonction de la température finale choisie (plus de 50% à 550°, mais 14% à 630°).

TABLEAU 3 - RESULTATS D'ANALYSES THERMOGRAVIMETRIQUES D'ACIDES HUMIQUES.

Ces résultats montrent les faits suivants :

a- en dépit de la purification des acides humiques par le froid et le gel, un très important résidu demeure toujours dans le cas des acides humiques des sols ferrallitiques et souligne la complexation étroite de ces acides avec les argiles.

b- la perte de poids supposée dépendre des noyaux des molécules humiques représente dans le cas des sols ferrallitiques environ 45% de la perte de poids totale imputée aux seules molécules humiques, alors que pour les autres sols (ranker d'altitude, sol brun calcaire et rendzine), elle ne représente qu'environ 35%. Dans le cas du mor de podzol, elle représente même moins de 20%. Dans le cas de l'anmor, elle représente une fraction d'autant plus importante qu'on pousse plus loin la décomposition, compte-tenu, dans ce cas là, de la nature bitumineuse des acides humiques (31% jusqu'à 550°, 61% jusqu'à 630°).

c- le noyau serait donc plus important dans les acides humiques des sols ferrallitiques que dans les acides humiques des autres sols. Il serait, par contre, fort peu important dans le cas des acides humiques du mor de podzol. Toutefois, le résidu (issu

essentiellement des argiles) est 2 à 3 fois plus élevé dans les sols ferrallitiques que dans les autres sols, aussi peut-on supposer qu'à partir de 150°, il y a interférence avec l'eau de constitution des argiles qui commence théoriquement à se libérer au dessus de 110°, ce qui rend malheureusement ces résultats très discutables et sans grande valeur scientifique en ce qui concerne la caractérisation des acides humiques.

En conclusion, l'analyse thermopondérale ne nous paraît pouvoir servir à la caractérisation des acides humiques que si ceux-ci sont rigoureusement purs, et il est nécessaire que leur purification, leur concentration et leur dessiccation (à pH si possible voisin de la neutralité) n'en modifient pas la nature chimique. La préparation des échantillons demeure fondamentale.

Quant à l'interprétation des courbes, elle reste très délicate, plus ou moins arbitraire et souvent sujette à caution.

#### Références bibliographiques.

- CHEN Y., SENESI N. et SCHNITZER M. (1978) . . . . .  
cf.référence p.14 ou p.21 .
- KONCHITS V.A. et CHERNIKOV V.A. (1977) - Analyse thermogravimétrique différentielle d'acides humiques isolés par des méthodes différentes (en russe).  
Izvestiya Timiryazevskoj Sel'skokhozyaïstvennoj Akademii, n°2, 88-98 (cité dans Soils and Fertilizers, 1978, 40, 8, f.4136).

#### III - Caractérisation des acides humiques par la microscopie électronique.

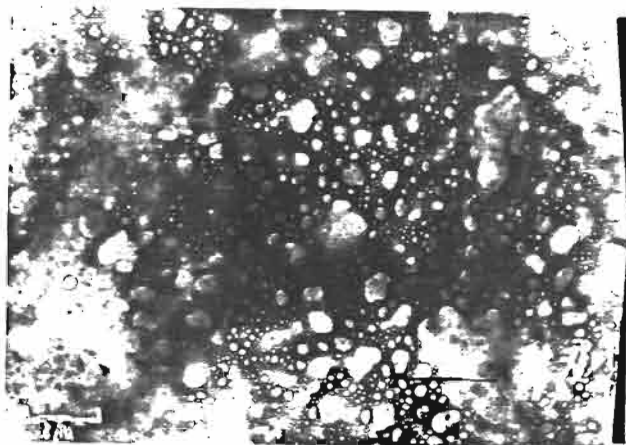
CHEN et SCHNITZER (1976) ont montré l'influence du pH sur l'aspect des acides fulviques et des acides humiques. D'après les photographies obtenues par ces auteurs au microscope électronique, à bas pH (2 à 3), les acides fulviques apparaissent essentiellement comme des fibres allongées et disposées en paquets. Avec l'augmentation du pH (4 à 7), ces fibres tendent à former un filet plus serré à structure spongieuse. Au dessus de pH 7, une orientation des fibres apparaît. A pH 8, un voile se forme; il s'épaissit à pH 9 et, à pH 10, il tend à se granuler.

D'après ces deux auteurs, il en est de même pour les acides humiques avec toutefois apparition des stades de transition à des pH plus élevés : l'orientation des fibres ne se manifeste ainsi qu'à pH 10.

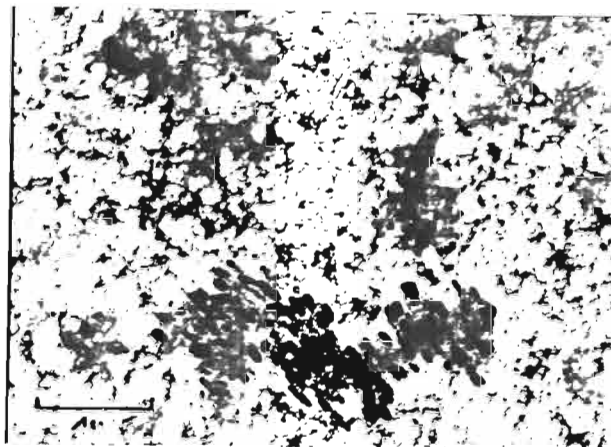
Le pH de l'échantillon influence donc fortement l'aspect des acides humiques.

Pour nos essais, nous avons lavé les acides humiques précipités à l'acide, puis nous les avons redissous par de l'ammoniaque N/10, ce qui fait qu'ils étaient donc à pH basique. La présence d'impuretés, contrairement à ce qu'il en est pour les techniques précédentes, peut être intéressante à étudier, par exemple dans le cas des sols organiques, des sols calcaires ou des sols argileux.

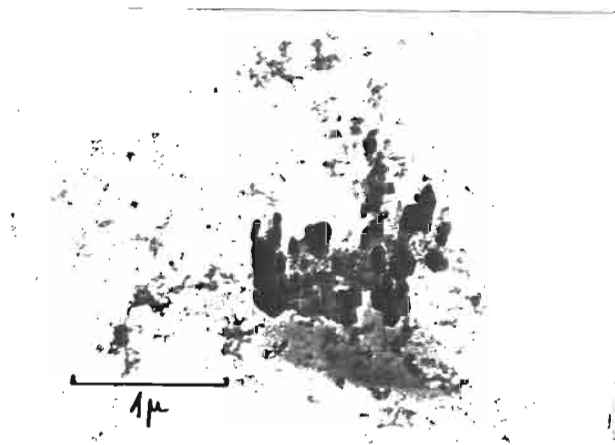
Une microgoutte de la solution humique ainsi préparée est diluée, avant d'être disposée sur une grille porte-échantillon qui est séchée plusieurs jours à l'air, préalablement à son passage au microscope électronique.



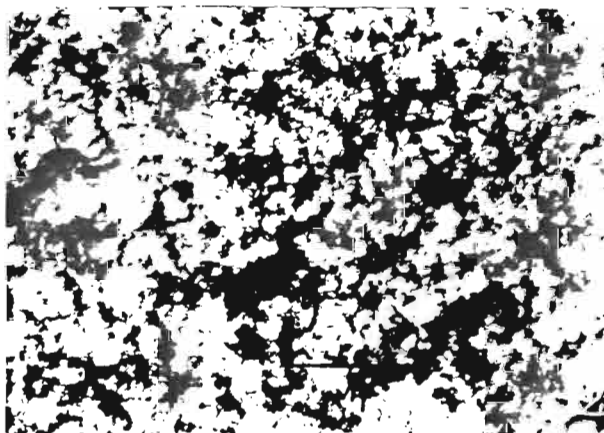
1- Gel humique en cours de dessiccation rapide sous l'effet de la chaleur du microscope.



2- amorph



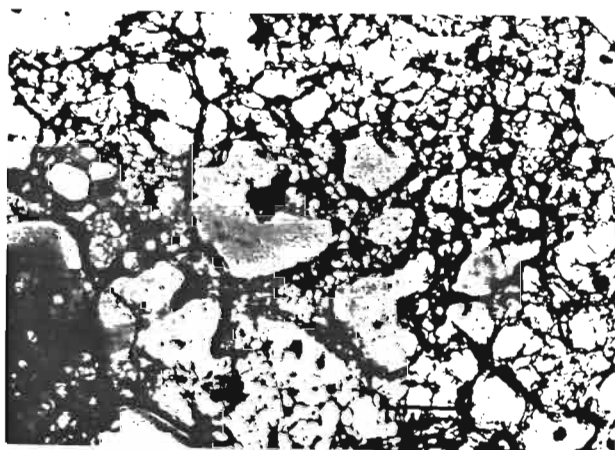
3- amorph  
liaison intime des matières organiques avec les argiles.



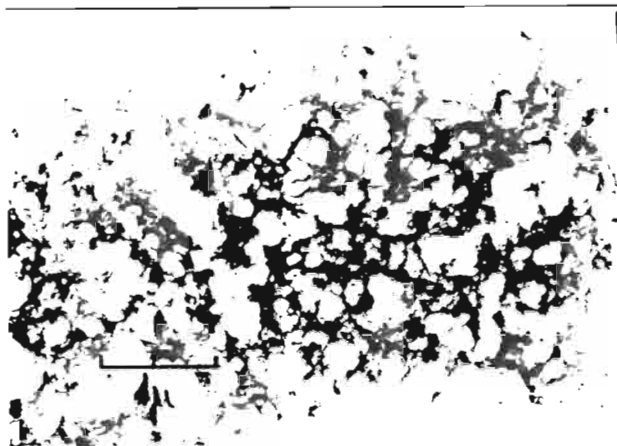
4- ranker du mont Aigoual.  
aspect granuleux des ponts



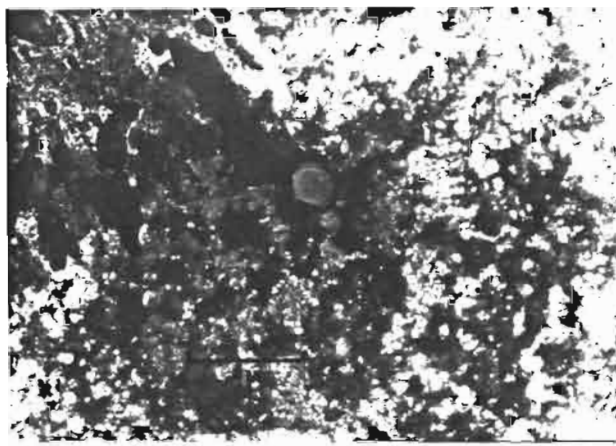
5- mor de podzol  
dispersé en milieu basique



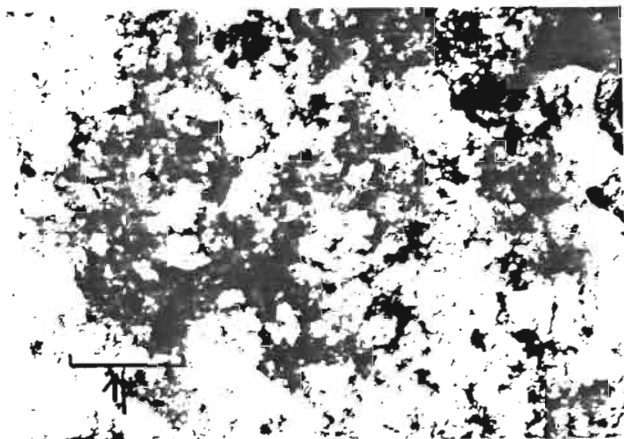
6- mor de podzol  
floculé en milieu acide



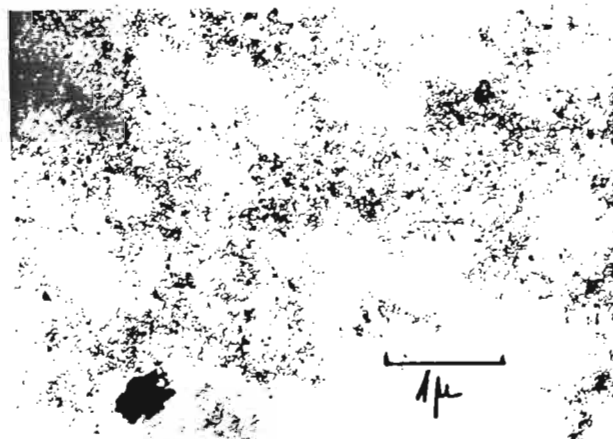
7- sol brun calcaire.  
aspect épais des ponts.



8- rendzine.  
analogie avec le sol brun  
calcaire.



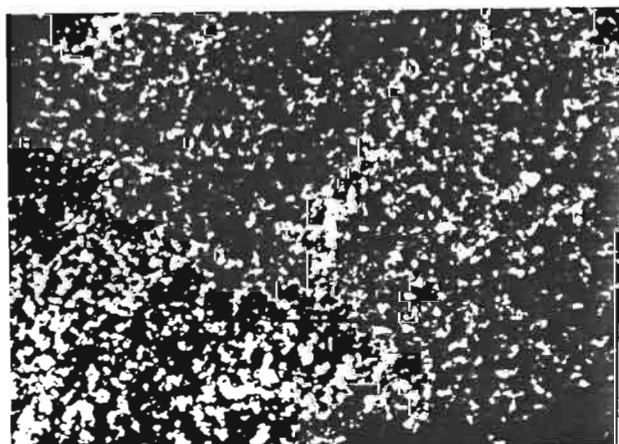
9- sol brun ferrallitique sur  
basalte. Structure spongieuse  
à large maille avec amas humo-  
argileux de type amorphe.



10- sol rouge ferrallitique sur  
arène granitique.  
aspect punctiforme avec absence  
de liaisons.



11- Sol rouge ferrallitique sur roche cristallophyllienne. -12  
dispersé en milieu basique : aspect punctiforme avec absen-  
ce de liaisons.



floculé en milieu acide ;  
aspect globuleux grossier.

L'expérience prouve qu'au microscope électronique, on ne peut observer le gel humique que pendant un très court laps de temps, car sous l'effet de la chaleur ce gel se dessèche très rapidement : de grands trous se forment, puis dans les ponts de la trame ainsi créée se développent de multiples cavités. On ne peut donc observer à loisir que la trame des acides humiques déshydratés.

Nous donnons dans ce rapport photocopie d'une douzaine de photographies prises au microscope électronique simple (cf. planches I et II).

Nous voyons que :

- dans le cas des acides humiques de l'anmor (photos 2 et 3), on observe une étroite liaison entre ces acides et les argiles. Peut-être l'intercalation d'acides humiques très carbonés entre les micelles argileuses (photo 3) explique t-elle la texture de "beurre" très caractéristique au toucher de l'anmor.

- dans le cas des acides humiques du ranker d'altitude (photo 4), on note un aspect finement granulé des ponts.

- dans le cas des acides humiques du mor de podzol (photos 5 et 6), on constate une nette différence entre l'aspect des acides humiques dispersés en milieu basique et l'aspect de ces mêmes acides flocculés en milieu acide. Dans ce dernier cas, les mailles du "filet" sont beaucoup plus larges et une grande élasticité (et donc solidité) des ponts humiques s'observe à la dessiccation.

- dans le cas des acides humiques des sols calcaires (sol brun calcaire-photo 7, et rendzine-photo 8), on a un aspect massif et plus ou moins grossier des ponts lié vraisemblablement à la nature calcique des acides humiques.

- dans le cas du sol brun ferrallitique sur basalte (andosol) (photo 9), on observe une structure spongieuse à large maille avec de très nombreux amas humo-argileux à allophanes.

- par contre, dans les sols rouges ferrallitiques sur roches cristallophyliennes (photos 10 à 12), les acides humiques desséchés ont un aspect punctiforme très caractéristique avec absence de liaisons. On sait d'ailleurs que dans ces sols, la stabilité structurale n'est pas liée aux acides humiques, mais plus généralement aux acides fulviques, au oxydes de fer, et parfois à la silice. Les acides humiques de ces sols rouges ferrallitiques, précipités en milieu acide, offrent un aspect globuleux grossier (photo 12).

En conclusion, la caractérisation des acides humiques par la microscopie électronique est une technique délicate dans laquelle on n'observe qu'un aspect artificiel de substances organiques isolées des autres éléments du sol et fortement déshydratées. Néanmoins, nous pensons que l'étude des acides humiques et des complexes argilo-humiques au microscope électronique peut apporter des résultats intéressants, pour autant que les observations soient assez nombreuses et faites sur des échantillons bien préparés et à des pH bien définis, ce qui nécessite toujours un assez long travail.

La possibilité d'utiliser un microscope électronique à balayage donne, avec le relief, des possibilités d'observation évidemment bien supérieures à celles que peut offrir un microscope électronique ordinaire, comme le montrent notamment les belles photographies publiées par CHEN, SENESI et SCHNITZER (1978).

### Références bibliographiques

- CHEN Y. et SCHNITZER M. (1976) - Scanning electron microscopy of a humic acid and of a fulvic acid and its metal and clay. Soil Sci.Soc.Am.J., 40, 5, 682-686.
- CHEN Y., SENESI N. et SCHNITZER M. (1978) - Chemical and physical characteristics of humic and fulvic acids extracted from soils of the mediterranean region. Geoderma, 20, 2, 87-104.
- SENESI N., CHEN Y. et SCHNITZER M. (1977) - Aggregation-dispersion phenomena in humic substances. in "Soil organic matter studies", Vol.II, pp.143-156. Proc.Symp.Braunschweig (6-10 sept.1976). Int.atomic energy agency, Vienna, 1977.

### RECHERCHE D'INFLUENCES POSSIBLES SUR L'HUMIFICATION.

Dans le cadre de la recherche des facteurs susceptibles de déterminer les rythmes saisonniers que nous avons mis en évidence dans les processus d'humification (en dehors de la température, de l'humidité, de la lumière et du champ électrique naturel)(BACHELIER, 1977), nous avons étudié successivement les influences possibles d'un champ électrique artificiel, de l'ionisation de l'air et d'un champ magnétique tournant.

#### I - Influence possible d'un champ électrique artificiel

Pour cette étude, ont été utilisées des piles du commerce et des électrodes de différente nature (or, argent, aluminium), mais il s'est avéré impossible, en dehors de toute solution tampon, d'établir un courant électrique dans un matériel végétal (sciure ou feuille) sans y créer immédiatement une électrolyse et un gradient de pH allant d'un pH basique (électrode négative et réductrice) à un pH acide (électrode positive et oxydante).

Il a toutefois été constaté une différence caractéristique entre l'humification des matériaux ligneux et l'humification des matériaux feuillus : il apparaît que les matériaux ligneux brunissent rapidement à l'électrode - (pH basique), alors que les matériaux feuillus brunissent d'abord à l'électrode + (pH acide), puis à l'électrode - (pH basique), et surtout là les nervures (matériel ligneux).

Diverses expériences et dosages nous ont montré qu'en fait les matériaux feuillus brunis en milieu basique étaient à poids égal bien plus riches en acides humiques que les matériaux feuillus brunis en milieu acide. Le pH acide favorise par contre fortement la production des acides fulviques, surtout dans les matériaux ligneux, à tel point que si ces acides évoluent un tant soit peu et se polycondensent, on peut parfois trouver plus d'acides humiques dans une sciure acide et de couleur claire que dans une sciure basique et brunie.



## II - Influence possible de l'ionisation de l'air.

Nous avons, pour étudier cette influence possible, maintenu pendant 2 mois des échantillons de sciure et de paille humidifiés au contact d'ioniseurs du commerce producteurs d'ions négatifs.

L'humification des matériaux végétaux a été proportionnelle à leur perte de poids et donc à l'activité biologique qui s'y est manifestée.

Mais, par rapport aux témoins conservés à la même température dans une autre enceinte, nous n'avons pas constaté de différences caractéristiques ni dans la moyenne des pertes en poids, ni dans la moyenne des humifications. Ceci, compte-tenu de la simplicité de notre technique expérimentale.

Nous ne pensons pas que l'ionisation de l'atmosphère puisse être cause des rythmes saisonniers constatés par nous dans les processus d'humification.

## III - Influence possible d'un champ magnétique tournant.

Des échantillons de sciure ont été disposés au dessus d'un agitateur magnétique en marche, toute élévation de température étant évitée.

Par rapport à des échantillons témoins placés à bonne distance, il n'apparaît pas que le champ magnétique tournant ait eu la moindre action, tant sur la perte de poids de l'échantillon que sur son humification.

En conclusion, nous n'avons donc toujours pas trouvé jusqu'à présent de facteurs qui, en dehors de la température, de l'humidité, de la lumière, du champ électrique naturel ou artificiel, de l'ionisation de l'air et des variations du champ magnétique, puissent déterminer les rythmes saisonniers constatés dans les processus d'humification.

REFERENCE DE QUELQUES OUVRAGES GENERAUX SUR LES MATIERES ORGANIQUES  
DU SOL. ( par ordre chronologique inversé )

- Soil organic matter (1978)  
Schnitzer M. et Khan S.U. editors; Developments in soil science n°8,  
Elsevier scientific publishing company (Amsterdam, Oxford, New-York)  
319 pages.  
    SCHNITZER M. - Humic substances : chemistry and reactions.  
    LOWE L.E. - Carbohydrates in soil.  
    KOWALENKO C.G. - Organic nitrogen, Phosphorus and Sulfur in  
        soils.  
    KHAN S.U. - The interaction of organic matter with pesticides.  
    CAMPBELL C.A. - Soil organic carbon, Nitrogen and Fertility.  
    BIEDERBECK V.O. - Soil organic sulfur and Fertility.
- Soil components, Vol.1 : Organic components (1975)  
John E.Giesecking editor; Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg, New-  
York), 534 pages.  
    FLAIG W., BEUTELSPACHER H., RIETZ E. - Chemical composition  
and physical properties of humic substances.  
    GREENLAND D.J. et OADES J.M. - Saccharides.  
    PARSONS J.W. et TINSLEY J. - Nitrogenous substances.  
    ANDERSON G. - Other organic phosphorus compounds.  
    ANDERSON G. - Sulfur in soil organic substances.  
    BRAIDS O.C. et MILLER R.H. - Fat, Waxes, and resins in soil.  
    BABEL U. - Micromorphology of soil organic matter.  
    KONONOVA M.M. - Humus of virgin and cultivated soils.  
    Index
- MENDEZ J. et LOJO M.I. (1972) - Humus  
Universidad de Salamanca; Acta salmanticensia, ciencias 41, 187 pages.
- FELBECK G.T., Jr. (1971) - Chemical and biological characterization  
of humic matter.  
in "Soil Biochemistry", Vol.2, pp.36-59.  
A.D.Mc.Laren et J.Skujins editors. Marcel Dekker, Inc. (New-York).
- PREVOT A.R. (1970) - Humus. Biogenèse, Biochimie, Biologie.  
Ed. de la Tourelle (Saint-Mandé), 342 pages.
- KONONOVA M.M. (1966) - Soil organic matter, its nature, its role  
in soil formation and in soil fertility (2e édition).  
Pergamon Press ed. (Oxford, Londres, New-York, Paris), 544 pages.

Compte-rendus de colloques

- Humic substances. Their structure and fonction in the biosphere  
(1975). Proc.Int.meeting, Nieuwersluis (Pays-Bas), 29-31 mai 1972.  
Povoledo D. et Golterman H.L. editors 368 pages.  
Wageningen, Centre for agricultural publishing and documentation.
- Biodégradation et humification (1974)  
Rapport du 1er Coll.Int.1974; Univ.Nancy 1, Laboratoire de Botani-  
que et de Microbiologie, Pierron éd. - 57206 Sarreguemines.
- Symposium on the degradation of lignin in geological environments  
(1964).  
Geochimica et cosmochimica acta, Vol.28, n°10, 1505-1623.