

1970.05-1

## Inhibition de la nitrification par les extraits aqueux de litière de hêtre (*Fagus silvatica*) (1)

PAR

G. BOQUEL \*, S. BRUCKERT \*\*, L. SUAVIN \*

\* Laboratoire de Microbiologie des Sols, O.R.S.T.O.M., 93-Bondy

\*\* Centre de Pédologie biologique, C.N.R.S., 54-Vandœuvre-les-Nancy

### INTRODUCTION

L'inhibition de la nitrification dans les sols forestiers, comme dans les sols de prairie, entraîne non seulement des perturbations sur le plan de l'activité microbienne, mais aussi sur le plan de la nutrition minérale azotée des plantes.

En effet, l'absence de nitrification a pour conséquence d'arrêter les réactions de minéralisation de l'azote au stade ammoniacal ; elle explique également, selon LIKENS *et al.* (1969), l'absence de lessivage d'azote minéral observé sous forêt : en effet, comme on le sait, l'entraînement de cet élément s'effectue presque totalement sous forme d'azote nitrique.

Ces observations ont incité quelques auteurs à rechercher les origines de l'inhibition de la nitrification et notamment à déterminer le rôle joué par les composés issus des végétaux au cours de leurs transformations chimiques et biologiques. BASARABA (1964) a étudié l'influence des tanins végétaux sur la nitrification ; MUNRO (1966) a trouvé que des extraits de racines de graminées contenaient des substances toxiques pour les nitrificateurs ; RICE (1965, 1969) a mentionné le pouvoir inhibiteur de certaines espèces d'*Euphorbia* sur les bactéries nitrifiantes et attribué leur toxicité à des acides tanniques.

Ces données n'apportent évidemment que des réponses très incomplètes au problème posé et tout spécialement au phénomène observé dans les sols forestiers. Pour ces raisons, on a estimé nécessaire d'entreprendre des recher-

(1) Étude effectuée dans le cadre de la R.C.P. 40 (Recherche coopérative sur programme n° 40).

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 4743

15 JUIN 1971

ches sur ces sols en région tempérée et en région tropicale, la présente note concernant le cas de sols sous hêtraie de l'Est de la France.

Des investigations récentes, s'appliquant à l'inhibition de certains éléments de la microflore des sols, ont mis en évidence l'action antimicrobienne de certains composés solubles émanant des litières (BECK *et al.*, 1969); de telles substances pouvant également être à l'origine de l'inhibition de la microflore spécifique de la nitrification, nous avons 1) recherché *in situ* l'existence de ces composés, 2) étudié au laboratoire l'intensité des processus d'inhibition intervenant au cours d'incubation aérobie ou anaérobie de litière de hêtre; dans ce cas on s'est efforcé de déterminer quelques-unes des substances formées au sein des litières et de tester leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis des nitrificateurs.

## I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. — MATÉRIEL VÉGÉTAL.

Les litières employées sont exclusivement des feuilles de hêtre (*Fagus silvatica*) récoltées sur le sol à différentes époques; elles proviennent des stations forestières suivantes :

1° *Station de la Sivrite*, Forêt de Haye département de Meurthe-et-Moselle. Le profil est celui d'un sol brun lessivé sur *terra fusca*, l'horizon de surface étant de type mull (DOMMERGUES et DUCHAUFOUR, 1966). Afin d'étudier des litières à diverses périodes de leur décomposition, on a prélevé le matériel aux dates ci-dessous :

- avril 1968 (litière ayant séjourné 6 mois sur le sol)
- octobre 1968 (litière fraîchement tombée)
- janvier 1969 (litière âgée de 3 mois)

2° *Station d'Azerailles*, département de Meurthe-et-Moselle. Le profil correspond à celui d'un sol brun lessivé, marmorisé, sur alluvions anciennes, l'horizon de surface étant de type mull acide.

Les litières ont été récoltées au mois de novembre 1968, mais ce sol présentant une activité biologique beaucoup plus faible que celle du précédent (activité ralentie par l'hydromorphie et la faible acidité du profil), il a été possible de récolter à la même date deux litières : la première, âgée de 1 mois, est constituée de feuilles tombées en octobre 1968; la seconde, âgée de 13 mois, constitue un A. de 2 cm environ, situé sous la précédente.

### B. — PRÉPARATION DES EXTRAITS AQUEUX DE LITIÈRES.

Le matériel végétal, séché à l'air et réduit en poudre par broyage, est traité en vue d'extraire les substances hydrosolubles, soit sans préincubation, soit à la suite de préincubation aérobie ou anaérobie; l'extraction des litières en présence d'eau distillée froide ( $p/v = 1/10$ ), réalisée par agitation, dure 30 minutes (BECK *et al.*, 1969). Les extraits obtenus, après centrifugation, sont stérilisés sur filtres Millipore de 0,45 micron.

### C. — PRÉINCUBATION DES LITIÈRES.

- *Préincubation en aérobiose* : la litière, humidifiée à 300 % (environ l'humidité équivalente) avec une suspension-dilution  $10^{-1}$  du sol sous-jacent (0-5 cm), est maintenue 4 semaines à 28° C.

- *Préincubation en anaérobiose* : la litière, humidifiée dans les mêmes conditions, est maintenue en anaérobiose stricte 4 semaines à 28° C dans un dessiccateur où l'on fait le vide.

A partir de ces litières, on prépare ensuite les extraits aqueux selon la technique décrite au paragraphe précédent, en tenant compte de l'humidité actuelle des échantillons, afin de respecter le rapport litière/eau : 1/10.

#### D. — ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE OU STIMULANTE DES EXTRAITS DE LITIÈRES.

##### 1° *Technique expérimentale utilisée* :

La méthode, destinée à mettre en évidence l'influence des extraits de litières sur la nitrification, consiste à comparer les teneurs en nitrates obtenues en fin d'incubation dans des milieux additionnés ou non (témoins) d'extraits à différentes concentrations.

Le milieu de culture utilisé est celui de MEIKLEJOHN (1965), modifié par BARKWORTH et BATESON (1965) par l'apport d'oligo-éléments ; la source azotée est le nitrite de sodium.

On prépare le milieu de culture concentré deux fois et on le répartit dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 25 ml par fiole :

- les lots témoins sont additionnés d'un égal volume d'eau pour obtenir 50 ml de milieu de culture normal.

- les lots devant recevoir les extraits sont additionnés de la quantité d'eau nécessaire pour obtenir un volume final de 50 ml.

Ces 2 lots sont stérilisés à l'autoclave ; ensuite les seconds reçoivent, de façon aseptique, des quantités définies d'extraits de litières préalablement stérilisés par filtration sur Millipore.

L'ensemencement se fait avec une souche de *Nitrobacter winogradskyi* : 1 ml d'inoculum provenant d'un milieu de culture où l'oxydation des nitrites en nitrates est terminée depuis 2 ou 3 jours. Les erlenmeyers sont mis 21 jours en incubation à 28° C. Ensuite, on dose les nitrates formés par la méthode au réactif phénol-disulfonique.

##### 2° *Expression des résultats.*

L'indice de nitrification IN est calculé à partir de la formule :

$$IN = \frac{X}{T} \times 100$$

X représentant la teneur en nitrate des milieux enrichis en extrait et T celle des milieux témoins sans extraits. Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 et stimulation lorsqu'il dépasse 100.

#### E. — ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES ORGANIQUES HYDROSOLUBLES PRÉSENTS DANS LES LITIÈRES.

La détermination des acides organiques intéresse essentiellement les composés aliphatiques, volatils ou non, et les acides phénols.

On isole ces substances à partir d'un volume d'extrait aqueux de litière contenant environ 2 mé d'acides.

1° *Acides volatils.*

Ces produits, libérés de leurs sels par agitation des extraits en présence de résine échangeuse de cations (Amberlite IR 120, forme H<sup>+</sup>), sont isolés par distillation ; le distillat, amené à pH 8,5 par la soude, est ensuite concentré sous vide.

2° *Acides aliphatiques.*

Ces composés, également libérés de leurs sels, sont fixés sur résine échangeuse d'anions (Dowex 1 × 8, forme carbonate) ; ils sont ensuite déplacés de la résine par une solution de carbonate d'ammonium. Après élimination du carbonate par évaporation sous vide à 40° C, les acides aliphatiques sont libérés de leurs sels d'ammonium par passage sur une résine échangeuse de cations.

3° *Acides phénols.*

Les extraits aqueux de litières, concentrés à 40° C sous vide partiel, sont amenés à pH 1, puis traités par agitation en présence d'acétate d'éthyle en vue de séparer les acides phénols.

Les acides organiques ainsi purifiés sont identifiés et dosés par chromatographie selon les techniques décrites par BRUCKERT (1970).

## II. RÉSULTATS

A. — RÉSULTATS OBTENUS *IN SITU* : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE VIS-A-VIS DE *NITROBACTER* D'EXTRAITS AQUEUX DE LITIÈRE.

Tous les extraits issus des feuilles prélevées sur le terrain manifestent une activité antimicrobienne plus ou moins intense selon l'âge de la litière (séjour des feuilles sur le sol).

TABLEAU I

Influence de l'âge des litières prélevées *in situ*  
sur l'activité antimicrobienne de leurs extraits aqueux vis-à-vis de *Nitrobacter*

STATIONS	AGE DES LITIÈRES	CONCENTRATIONS DU MILIEU DE CULTURE EN EXTRAITS DE LITIÈRE				
		2,5 %	5 %	10 %	20 %	40 %
La Sivrite .....	litière fraîche	100	5	3	—	—
	3 mois	83	82	85	86	44
	6 mois	—	91	—	55	20
Azerailles .....	1 mois	100	86	33	0	0
	13 mois	112	99	67	2	1

N.B. — L'activité antimicrobienne est exprimée par l'indice de nitrification ; elle est nulle quand l'indice est égal à 100. Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 et stimulation lorsqu'il est supérieur à 100.

- La litière fraîche de la Sivrite fournit un extrait extrêmement toxique vis-à-vis de *Nitrobacter*, à la concentration faible de 5 % dans le milieu de culture. Par contre, dès le troisième mois, il faut apporter 40 % d'extrait de litière pour observer une inhibition notable de la nitrification (Tableau I).

- La litière de 1 mois de la station d'Azerailles présente une activité antimicrobienne intermédiaire entre celle observée pour la litière fraîche et pour la litière âgée de 3 mois de la Sivrite.

Il ressort donc de ces résultats que des litières de hêtre perdent progressivement *in situ* leur activité antimicrobienne. Néanmoins, une litière, même profondément modifiée (cas du prélèvement d'Azerailles, âgé de 13 mois), peut conserver ou acquérir à nouveau un pouvoir inhibiteur notable ; celui-ci serait lié aux conditions de la station défavorables à la biodégradation des composés responsables de l'activité antimicrobienne des litières, ou bien pourrait provenir d'un gain de composés hydrosolubles antimicrobiens émanant, soit de la litière âgée de 1 mois et située au-dessus, soit d'une néoformation de composés inhibiteurs d'origine microbienne.

## B. — RÉSULTATS OBTENUS AU LABORATOIRE : DISPARITION OU AUGMENTATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE D'EXTRAITS DE LITIÈRES SOUMISES A DEUX TYPES DE PRÉINCUBATIONS.

Avant de chercher à identifier certaines substances inhibitrices de la nitrification, il convient de déterminer les conditions les plus favorables à l'augmentation de l'activité antimicrobienne ; d'où l'idée de soumettre une litière de hêtre à une préincubation anaérobie, parallèlement à une préincubation aérobie, pour examiner la production éventuelle de composés antimicrobiens.

### 1° Influence de deux types de préincubations sur l'activité antimicrobienne d'extraits aqueux de litière.

Lors de la *préincubation en aérobiose* les litières étudiées perdent toute activité antimicrobienne :

- la litière de la Sivrite, âgée de 3 mois, ne présente aucune activité antimicrobienne à la concentration de 60 %. On note même une stimulation (IN = 120) pour des concentrations en extrait allant de 15 à 45 % (Tableau II) ;

- les litières d'Azerailles sont également dépourvues de toute activité antimicrobienne vis-à-vis de *Nitrobacter*, même à la concentration de 40 % ; toutefois, on ne note aucune stimulation.

Quant à la *préincubation en anaérobiose stricte*, elle induit dans la litière de 3 mois de la Sivrite l'accumulation de composés antimicrobiens très actifs (Tableau III) ; en effet, l'extrait aqueux de la litière ainsi préincubée inhibe totalement la nitrification pour une concentration en extrait de 20 %.

### 2° Essai de détermination des composés responsables de l'inhibition de la nitrification.

La préincubation en anaérobiose de feuilles de hêtre, à l'inverse de la préincubation en aérobiose, induisant l'accumulation dans les litières de

TABLEAU II

Influence d'une préincubation aérobie sur l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Nitrobacter* d'extraits aqueux de différentes litières de hêtre

STATIONS	AGE DES LITIÈRES	CONCENTRATIONS DU MILIEU DE CULTURE EN EXTRAITS DE LITIÈRE								
		2,5 %	5 %	10 %	15 %	20 %	30 %	40 %	45 %	60 %
La Sivrite.	3 mois	—	—	—	119	—	126	—	119	100
Azerailles.	1 mois	100	103	98	—	98	—	98	—	—
	13 mois	103	103	103	—	103	—	101	—	—

N.B. — L'activité antimicrobienne est exprimée par l'indice de nitrification ; elle est nulle quand l'indice est égal à 100. Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 et stimulation lorsqu'il est supérieur à 100.

TABLEAU III

Influence d'une préincubation anaérobie sur l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *Nitrobacter* d'extraits aqueux de litière de 3 mois (sivrite)

TRAITEMENTS	CONCENTRATIONS DU MILIEU DE CULTURE EN EXTRAITS DE LITIÈRE				
	2,5 %	5 %	10 %	20 %	40 %
Sans préincubation .....	83	82	85	86	44
Préincubation en anaérobiose ..	100	97	39	0	—

N.B. — L'activité antimicrobienne est exprimée par l'indice de nitrification ; elle est nulle quand l'indice est égal à 100. Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 et stimulation lorsqu'il est supérieur à 100.

composés antimicrobiens solubles, il nous a paru logique de rechercher les substances responsables de l'inhibition parmi certains acides organiques synthésés par les microorganismes en conditions anaérobies. Dans ce but, on a déterminé la quantité des divers acides identifiés dans les extraits de la litière de la Sivrite âgée de 3 mois, soumise ou non à une préincubation (Tableau IV).

- L'extrait de litière, obtenu avant toute préincubation, contient de faibles quantités d'acides volatils (formique et acétique), d'acides aliphatiques (succinique, lactique, citrique, malique et oxalique) et des traces d'acides phénols (p-hydroxybenzoïque).

- L'extrait de litière préincubée en aérobie ne contient plus que des traces d'acide acétique ; la décomposition des autres acides organiques présents dans la litière avant préincubation est quasi totale.

TABLEAU IV

Composition en acides organiques d'extraits aqueux de litière soumise ou non à une préincubation (Teneur  $\times 10^{-6}$ )

NATURE DE L'ACIDE	LITIÈRE (SIVRITE) AGÉE DE 3 MOIS		
	NON PRÉINCUBÉE	PRÉINCUBÉE EN AÉROBIOSE	PRÉINCUBÉE EN ANAÉROBIOSE STRICTE
Formique .....	36	0	0
Butyrique .....	0	0	684
Acétique .....	47	7	588
Succinique, lactique .....	18	2	12
Citrique .....	17	0	0
Oxalique .....	22	traces	7
Malique .....	14	0	0
p-hydroxybenzoïque .....	2,5	0	1
Vanillique .....	0,06	0	traces
p-coumarique .....	0,04	0	0

- L'extrait de litière préincubée en anaérobiose contient des quantités importantes d'acides acétique ( $600 \times 10^{-6}$ ) et butyrique ( $300 \times 10^{-6}$ ) synthétisés par les microorganismes.

### 3° Activité antimicrobienne, vis-à-vis de *Nitrobacter*, des acides acétique et butyrique.

Pour estimer l'activité antimicrobienne des acides acétique et butyrique aux doses existant dans l'extrait de litière, préincubée en anaérobiose, on a utilisé des teneurs en acides organiques équivalentes à celles contenues dans les extraits.

Les résultats obtenus démontrent l'effet toxique des acides acétique et butyrique vis-à-vis de *Nitrobacter* (Tableau V) ; néanmoins, l'inhibition observée s'avère inférieure à celle obtenue avec l'extrait de litière préincubée en anaérobiose (Tableau III) : en effet, les doses maximales d'acides, équivalentes à la concentration de 40 % en extrait, inhibent beaucoup moins la nitrification que l'extrait lui-même ; ce dernier empêche même tout développement de *Nitrobacter* à la concentration de 20 %.

On peut donc admettre que les acides acétique et butyrique sont en partie responsables de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de litière préincubée en anaérobiose, mais que d'autres substances inhibitrices non identifiées sont également présentes dans l'extrait.

TABLEAU V

Activité antimicrobienne, vis-à-vis de *Nitrobacter*, des acides acétique et butyrique

SOLUTION D'ACIDES UTILISÉE	CONCENTRATIONS CORRESPONDANTES EN EXTRAIT			
	5 %	10 %	20 %	40 %
Acide acétique ( $600 \times 10^{-6}$ ) .....	100	100	80	82
Acide butyrique ( $700 \times 10^{-6}$ ) .....	100	89	80	68
Acide acétique ( $600 \times 10^{-6}$ ) et Acide butyrique ( $700 \times 10^{-6}$ ) .....	100	86	82	54

N.B. — L'activité antimicrobienne est exprimée par l'indice de nitrification ; elle est nulle quand l'indice est égal à 100. Il y a inhibition lorsque l'indice est inférieur à 100 et stimulation lorsqu'il est supérieur à 100.

### III. CONCLUSION

Les recherches conduites *in situ* montrent que les litières fraîches de hêtre renferment des composés hydrosolubles présentant une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de *Nitrobacter*, puisque des concentrations de 10 à 20 % d'extraits (obtenus par agitation de 10 g de litière en poudre dans 100 ml d'eau) suffisent à inhiber la nitrification.

Au cours de leur décomposition sur un sol à humus de type mull, ces litières perdent leur activité antimicrobienne, selon un processus déjà observé par BECK *et al.* à l'occasion d'une étude portant sur *Bacillus megaterium* ; mais cette détoxication s'effectue plus lentement vis-à-vis de *Nitrobacter* que de *B. megaterium* ; il en résulte que le premier de ces deux microorganismes (*Nitrobacter*) est plus sensible que le second aux composés antimicrobiens des litières.

Dans le cas des sols particulièrement acides, situés en station soumise à des conditions anaérobies (au moins temporaires), l'activité antimicrobienne des litières peut, semble-t-il, persister encore plus longtemps, soit par suite du ralentissement de la biodégradation des composés antimicrobiens d'origine végétale apportés par les retombées, soit par suite de la synthèse *in situ* de composés inhibiteurs d'origine microbienne.

L'étude expérimentale conduite au laboratoire révèle qu'une préincubation en anaérobiose d'une litière de hêtre, présentant à l'origine une activité antimicrobienne modérée, accroît considérablement cette activité, alors qu'une préincubation en aérobiose la fait disparaître. L'accroissement d'activité antimicrobienne consécutif à l'anaérobiose peut s'expliquer par l'accumulation, en quantité suffisante, d'acides acétique et butyrique. Mais l'expérience suggère que d'autres composés antimicrobiens pourraient également intervenir.

Quant à la disparition de l'activité antimicrobienne des litières en aérobiose elle s'explique par la biodégradation des composés responsables de cette activité.

#### RÉSUMÉ

Les litières fraîches de hêtre contiennent des substances hydrosolubles présentant une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de *Nitrobacter*.

*In situ*, les litières subissent progressivement au cours de leur décomposition une détoxication dont l'importance est fonction des conditions du milieu : dans un sol à mull parfaitement aéré, la litière perd son activité antimicrobienne plus rapidement que dans un sol à mull acide, à hydromorphie temporaire nette ; dans ce dernier cas, l'activité antimicrobienne de la litière se maintient à un niveau plus élevé, par suite, soit d'un ralentissement de la biodégradation des composés antimicrobiens, soit de la biosynthèse de nouveaux composés toxiques.

Au laboratoire, après *préincubation en aérobiose* les litières de hêtre perdent leur activité antimicrobienne. Par contre, après *préincubation en anaérobiose*, une litière de hêtre accroît son activité antimicrobienne par l'accumulation d'acide acétique, d'acide butyrique et d'autres substances non déterminées.

#### SUMMARY

Fresh beech litters contain water-soluble substances presenting a strong antimicrobial activity against *Nitrobacter*.

*In situ*, litters are progressively detoxicated during decomposition; the importance of this detoxication depends on ecological conditions: in a well aerated mull, the litter is more rapidly detoxicated than in an acid mull, with an obvious temporary hydromorphy; in the last case, the antimicrobial activity of the litter stays at a higher level, either because of the slower biodegradation of the antimicrobials compounds or because of the biosynthesis of new antimicrobial compounds.

In the laboratory, after an *aerobic preincubation*, the beech litter is detoxicated. On the contrary, after an *anaerobic preincubation*, the antimicrobial activity of the litter is increased by the accumulation of acetic acid, butyric acid and other undetermined substances.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BARKWORTH (H.), BATESON (M.), 1965. — The population level of presumptive *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* in some english soils. *Plant and Soil*, **22**, (2): 220-229.
- BASARABA (J.), 1964. — Influence of vegetable tannins on nitrification in soil. *Plant and Soil*, **21**: 8-16.

- BECK (G.), DOMMARGUES (Y), VAN DEN DRIESSCHE (R.), 1969. — L'effet litière. II - Étude expérimentale du pouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des feuilles et des litières forestières vis-à-vis de la microflore tellurique. *Écol. Plant.*, **4**: 237-266.
- BRUCKERT (S.), 1970. — Méthodes d'analyse des acides organiques et des composés phénoliques présents dans le sol. *Note technique du Centre de Pédologie, C.N.R.S., Nancy*, **9**: 1-13.
- DOMMARGUES (Y.), DUCHAUFOR (P.), 1966. — Caractérisations pédologiques et microbiologiques des stations lorraines R.C.P. 40. *Rev. Écol. Biol. Sol.*, **3** (4): 533-547.
- LIKENS (G. E.), BORMANN (F. H.), JOHNSON (N. M.), 1969. — Nitrification : importance to nutrient losses from a cutover forested ecosystem. *Science*, **163**: 1205-1206.
- MEIKLEJOHN (J.), 1965. — Microbiological studies on large termite mounds. *Rhod. Zamb. Mal. J. agric. Res.*, **3** (2): 67-79.
- MUNRO (P. E.), 1966. — Inhibition of nitrifiers by grass root extracts. *J. appl. Ecol.*, **3**: 231-238.
- RICE (E. L.), 1965. — Inhibition of nitrogen-fixing and nitrifying bacteria by seed plants. II - Characterization and identification of inhibitors. *Physiol. Plant.*, **18**: 255-268.
- 1969. — Inhibition of nitrogen-fixing and nitrifying bacteria by seed plants. VI - Inhibitors from *Euphorbia supina*. *Physiol. Plant.*, **22**: 1175-1183.