

ETUDE QUALITATIVE DES ACIDES HUMIQUES TROPICAUX

- PAR ELECTROPHORESE SUR PAPIER -

- B. DABIN -

Introduction

(1963)

A la suite des travaux de DUCHAUFOR ET JACQUIN, il semble admis que dans l'extrait de sol au pyrophosphate de sodium à pH 10, on peut séparer trois formes essentielles de composés humiques :

- 1°) les composés non précipitables aux acides, ou acides fulviques,
- 2°) les composés précipitables aux acides ou acides humiques, lesquels se décomposent en acides humiques gris et acides humiques bruns.

Ces composés humiques semblent correspondre grosso modo à la taille des molécules.

- Les acides humiques gris ont les plus grosses molécules, sont les moins mobiles et sont fortement liés à la matière minérale du sol.
- Les acides humiques bruns ont des molécules plus petites, sont plus mobiles et beaucoup moins liés à la matière minérale.
- Les acides fulviques sont très mobiles et ne sont pratiquement pas liés à la matière minérale, ils sont très peu colorés.

Méthodes de fractionnement des acides humiques

(1951)

La méthode de fractionnement chimique de TIURIN permet de séparer les différentes formes d'humus mais elle est assez longue.

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

7 NOV. 1968

Collection de Référence

B

n° 12539

L'élucéophrase sur papier a déjà été utilisée par de nombreux chercheurs pour séparer les bases d'humus. Plus récemment, BUCHAUFOUR et JACQUIN ont utilisé l'élucéophrase complétée d'une séparation chimique par précipitation pour déterminer quantitativement les phosphoregènes d'acides humiques tels et d'acides humiques dans une eau de source (1963). BUCHAUFOUR a appliqué cette technique quantitative à quelques eaux thermales (eaux sulfatées, eaux chlorurées, eaux sodées, eaux bicarbonatées, eaux sulfatées, eaux chlorurées, etc.) et a mis en évidence une relation entre les teneurs de sel et les phosphoregènes solubles des différents types d'eaux. Sur une eau sulfatée également, C. THOMAS (1963) a utilisé la méthode de THURN, a obtenu des résultats à peu près équivalents.

En conclusion, les études faites par BUCHAUFOUR et JACQUIN sur les eaux de source, ainsi que celles de BUCHAUFOUR et THOMAS sur les eaux thermales ont permis d'instaurer le fractionnement des composés humiques pour la caractérisation des différents types de sel.

Méthode appliquée au S.O.S. Bathy.

Depuis plusieurs années, la technique mise au point par C. THOMAS (1963) au Laboratoire de pédochimie de Bathy. Cette méthode s'applique très bien à l'eau de source ou eau de mer car elle ne comporte qu'une seule extraction (la méthode BUCHAUFOUR comporte 4 extractions).

Méthode THOMAS (1963)

5 à 20 g. de sel (souvent la calcite en humus) sont mis en contact avec 100 ml. de solution de pyrophosphate de soude, 0,1 N (pH = 10).

On agite 9 heures et on laisse en contact une nuit.

La solution humique est ensuite séparée du sel par centrifugation.

Cette centrifugation ne doit pas être trop violente (3 000 t. mn), mais parfois l'argile reste en suspension avec l'humus, et cette argile peut causer des erreurs importantes dans les dosages chimiques ultérieurs.

Juste avant centrifugation, l'argile est précipitée par SO_4Na_2 (environ 3 g. pour 100 cc) (1)

Le liquide surnageant est décanté et filtré, parfois il est nécessaire de le laisser reposer une nuit pour éliminer toute l'argile en suspension.

- Sur une aliquote on dose le carbone par oxydation au mélange sulfureux avec titrage en retour au sel de Vanth.
- Sur une autre aliquote les acides humiques sont précipités par l'acide sulfurique concentré, et centrifugés ; la solution surnageante contient les acides fulviques.

Les acides humiques sont lavés par SO_4H_2 dilué, puis redissous dans la soude, et enfin le carbone est dosé par oxydation sulfureuse comme précédemment.

On obtient ainsi :

- le carbone des matières humiques totales,
- le carbone des acides humiques,

Le carbone des acides fulviques est calculé par différence,

le rapport $\frac{\text{C acide humique}}{\text{C acide fulvique}}$

est une caractéristique des divers types de sol (2)

Nous n'avons pas voulu modifier cette technique en raison de sa simplicité et des résultats reproductibles qu'elle donne depuis plusieurs années, nous avons pensé qu'il serait possible de la compléter par une électrophorèse sur papier de la fraction "acide humique".

Électrophorèse des "acides humiques"

a) Fractionation de la solution d'acides humiques

ooo

(1) Cette méthode a été mise au point à Bondy. Le chlorure de sodium qui a été parfois préconisé se comporte comme un réducteur en présence de bichromate en milieu sulfurique.

(2) Les détails techniques de la méthode figurent dans les Cahiers de Pédologie de l'O.R.S.T.O.M., 1963, n° 3, page 51 - 53.

En opérant sur une quantité de sol plus importante, par exemple 60 g. pour 300 cc de solution, on peut effectuer les prises pour les dosages de matière humique totale, et d'acide humique, et compte tenu de la teneur en carbone des acides humiques, effectuer une troisième prise, contenant par exemple 25 à 50 milligrammes de carbone (calculer la prise en fonction des dosages précédents).

Sur cette prise, les acides humiques sont précipités par SO_4H_2 concentré, centrifugés, séparés des acides fulviques, et lavés plusieurs fois par SO_4H_2 dilué (N/10).

Après lavage, les acides humiques sont redissous dans la soude normale, environ 1 cc pour 25 mg de carbone.

Il est nécessaire d'avoir une solution d'acides humiques assez épaisse et de concentration constante pour tous les essais.

Cette solution est conservée dans un tube à hémolyse bien bouché.

b) Electrophorèse proprement dite

La solution est déposée avec une micropipette sur une bande de papier filtre (arche 302 - ³⁴Whatman n° 1) et soumise à l'electrophorèse.

Mode Opératoire

1°) Préparation de la bande de papier

La bande de papier est découpée dans le sens perpendiculaire à la trame du papier (perpendiculaire à la longueur des fibres) on peut le vérifier d'après l'incurvation de la bande sous son propre poids.



bande parallèle à la trame

bande perpendiculaire à la trame

.../...

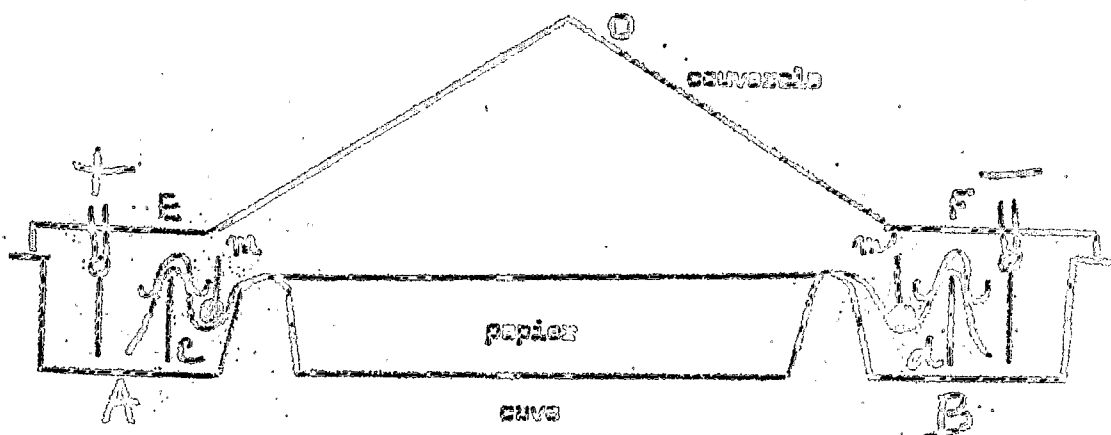
La largeur est de 8 cm, la longueur d'au moins 33 cm, fonction de la zone utilisée.

La bande de papier est trempée dans une solution tampon :

phosphate monopotassique 6 g. 8 + soude 1 g. 20 par litre
ajusté à pH 7,4 avec NaOH N/5.

Après trempage, la bande est appuyée entre deux feuilles de papier filtré sec, puis placée sur la cuve à électrophorèse.

La cuve à électrophorèse utilisée est le modèle "JOUAN", type Coll. n. 5. grand



modèle, la cuve est en plexiglass moulé. La solution est placée dans deux compartiments aux extrémités A et B. Dans chacun des compartiments, plonge une électrode et --

La bande de papier est fixée sur deux barrettes c et d à l'aide de pinces E et F, et tendue entre les deux compartiments par des poids m m'.

La cuve porte un couvercle D en forme de toit.

Ce couvercle est très important, d'une part il empêche l'évaporation du liquide de la bande de papier, d'autre part, il évite que les gouttelettes de condensation ne retombent sur les bandes de papier.

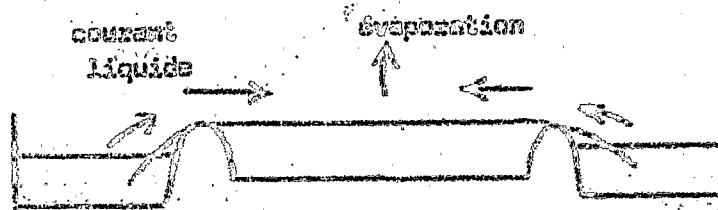
Influence de la migration des molécules.

Les molécules d'humus jouent le rôle d'ions et migrent vers l'anode (pôle +). Cette migration est d'autant plus rapide que la molécule est plus petite (c'est-à-dire humiques moins plus mobiles).

En dehors du courant électrique, d'autres facteurs peuvent jouer sur la migration, en particulier les courants liquides dans le papier.

Si les niveaux de la solution tiennent dans les compartiments latéraux ne sont pas horizontaux, il peut se produire un phénomène de siphonnage par les bandes de papier (veiller à ce que les niveaux soient égaux à l'aide d'un siphon).

L'évaporation qui se produit, soit en raison des courants d'air, soit par l'échauffement sous l'action du courant électrique est maximum au centre des bandes de papier.



Cette évaporation provoque une aspiration de liquide de part et d'autre de la bande de papier, d'où deux courants liquides en sens inverses qui s'attirent au centre de la feuille de papier.

Même sans l'établissement du courant électrique, les acides humiques peuvent migrer, mais ils s'arrêtent au centre du papier.

Avec le courant électrique, les acides humiques dépassent le centre du papier; ils s'arrêtent lorsque leur vitesse de migration sous l'action de la différence de potentiel, est égale à la vitesse de migration due aux courants liquides circulant en sens inverse.

Il est nécessaire de réduire au minimum ces courants liquides dus à l'évaporation et qui perturbent fortement l'électrophorèse, d'où la nécessité d'un couvercle.

Il existe également un phénomène d'électroosmose qui attire les solutions liquides vers le pôle, cette électroosmose augmente avec la proximité des électrodes, d'où la nécessité d'effectuer le dépôt au moins à 5 cm de l'extrémité du papier côté cathode.

Le courant provoque l'enrichissement en sodium de la solution placée au pôle où il est au pôle, d'où la nécessité d'abaisser le cours de la migration pour utiliser plusieurs fois la solution tampon (coloriser le pH des solutions aux deux pôles).

2°) Dépose et développement du courant

Le dépôt se fait avec une micropipette de 100 μm^3 , on dépose environ 40 μm^3 de solution liquide le long d'une ligne droite de 3 cm, c'est-à-dire on laisse 1 cm à droite de part et d'autre du bord du papier - avec une solution liquide très concentrée, 20 μm^3 peuvent suffire. Cette solution liquide doit être un peu plus ou moins visqueuse. Comme il a été déjà dit, le dépôt se fait à 5 cm de l'extrémité du papier, côté cathode.

Les électrodes sont placées et le courant électrique établi. Le courant électrique peut provenir par un bloc d'alimentation de courant continu (modèle JDU11, P.D. 5(1), etc).

Sur des bandes de 20 cm de long (distance entre les deux compartiments contenant la solution) et pour 4 bandes, le courant est de 150 à 200 volts avec une intensité de 10 à 15 milliamperes. C'est surtout la différence de potentiel qui compte (7 à 10 volts/cm), l'intensité varie avec le nombre des bandes, la concentration de la solution, la température, etc.

La migration est rapide au début puis ralentit, le temps normal est 3 heures, les acides liquides bruns se déplacent sur 10 à 12 cm. Les acides liquides gris peuvent également s'élever plus ou moins suivant la nature de l'humus.

.../...

3°) Séchage et lecture

Lorsque la migration est terminée, on coupe le courant, on retire rapidement les bandes de papier en évitant de faire couler du liquide à la surface, et on les fait sécher rapidement sous un épiradiateur à infrarouges, les bandes étant posées horizontalement sur deux baguettes de verre. Après séchage, la bande est découpée suivant la dimension de la bande de lecture.

Lecture

La lecture se fait à l'aide d'un densitométriseur optique. Il en existe plusieurs modèles.

Nous disposons du modèle photovolt semi automatique. Un système de crémaillère permet de faire glisser la bande de papier devant la source lumineuse, une cellule enregistre les variations de densité optique dues au rapprochement de la bande de papier.

Cette densité optique est lue sur un cadran.

La crémaillère porte également une tablette qui coulisse sous une échelle graduée qui se trouve dans l'axe du spot lumineux, on dispose un papier d'enregistrement sur la tablette, cette bande se déplace en même temps que la bande d'électrophorèse.

Les lectures de densité optique sont inscrites point par point sur la bande de papier à l'aide de l'échelle graduée.

En joignant les points obtenus, on obtient un diagramme ou électrophorogramme.

Certains modèles de lecteurs sont entièrement automatiques, et donnent une courbe d'intégration des surfaces.

Interprétation des diagrammes

D'après DUCHAUFOR et JACQUIN, les humus gris représentent une bande grise d'un cm maximum à partir de la dépose donnant sur le diagramme un pic étroit bien distinct.

Dans le cas des choroèmes, ils signalent un second pic pouvant migrer jusqu'à 2 cm de la dépose, et qu'ils appellent G.Ch. (humus gris choroémiques).

Entre la limite des humus gris et le centre du diagramme, on a les acides humiques intermédiaires I

Du milieu jusqu'à l'extrémité opposée à la dépose, on a les acides humiques bruns B

Dans le cas des sols tropicaux, on observe généralement deux taches d'acides humiques situées de part et d'autre d'une zone claire intermédiaire donnant un minimum sensiblement au centre du diagramme.

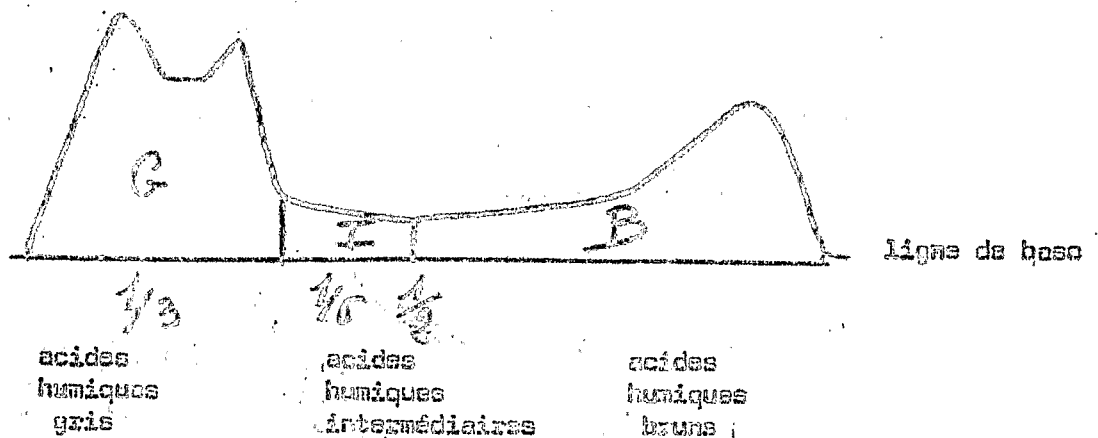
La tache foncée située près de la dépose et qui représente les humus gris, s'étale fréquemment sur 3 ou même 4 cm présentant un ou deux ou plusieurs pics suivant les cas, parfois une courbe d'étalement régulier avec un maximum au milieu.

Il est difficile de déterminer la limite des humus gris et des humus intermédiaires.

La longueur totale du diagramme étant de 9 à 12 cm, la bande des humus gris a été limitée arbitrairement au 1/3 de la longueur totale du diagramme, soit 3 à 4 cm.

La bande des humus intermédiaires s'étend entre le 1/3 et la moitié du diagramme, soit 1/6.

La bande des humus bruns s'étend du centre à l'extrémité du diagramme, soit 1/2.



On détermine séparément les surfaces de chacune des fractions :

S E = Surface des acides humiques gris

S I = Surface des acides humiques intermédiaires

S B = Surface des acides humiques bruns

S T = Surface totale.

Si l'on connaît par dosage chimique la quantité totale des acides humiques, soit

q T %, la quantité de chaque fraction sera :

$$q E \% = q T \times \frac{S E}{S T}$$

$$q I \% = q T \times \frac{S I}{S T}$$

$$q B \% = q T \times \frac{S B}{S T}$$

Des essais réalisés au laboratoire de Hardy ont montré que dans des sols faiblement fossilifères de R.C.A., il existait une corrélation très hautement significative entre l'indice d'instabilité I_p des sols (soit x) et le rapport :

$$\frac{S B + S I}{S T} \quad (\text{soit } y)$$

Forme des humus bruns et intermédiaires

Humus total

$$y = 36,69 + 3,6 x$$

La répartition des différentes fractions entre elles, ainsi que la forme des diagrammes est caractéristique des types de sols.

BIBLIOGRAPHIE

BICHMAYEUR P.H. et JACQUIN F. (1963) - Recherche d'une méthode d'extraction et de fractionnement des composés humiques contenants par Glucosylphosphates. Ann. Agron. 14 (6), p. 805-810.

TRUMAN I.V. (1951) - Vers une méthode d'analyse pour l'étude comparative des constituants de l'humus des sols. Acad. Sci. U.R.S.S. Trav. Inst. Sols Douchobourov, 20, 32 p.

BICHMAYEUR P.H. et DUBREUIL Y. (1963). Etude des composés humiques de quelques sols tropicaux et subtropicaux. Sols Africains, vol. 8, n° 1, janvier, p. 5-23

TRUMAN (I.V.) (1953). Quelques observations sur l'extraction de l'humus des sols : méthode au pyrophosphate de sodium. Cahiers de pédologie, O.R.S.T.O.M. n° 3, p. 49-71.