

50376
1992
95

61229

50376
1992
95

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

DE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

BIODEGRADATION DES ACIDES HUMIQUES
par
Streptomyces viridosporus

par



YANZE KONTCHOU CLOTAIRE



Soutenue le 13 Avril 1992 devant la Commission d'examen:

Président:	Professeur R. TAILLIEZ	U.S.T.L.
Rapporteurs:	Professeur P. VASSEUR	C.S.E., METZ
	Docteur R. BLONDEAU	U.S.T.L.
Examineurs:	Professeur M. SANCHOLLE	U.S.T.L.
	Docteur N. GSCHWIND	CIBA-GEIGY, SCHWEIZERHALLE SUISSE

N°d'ordre: 905



**CE TRAVAIL A ETE EFFECTUE AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
Batiment SN₂ 59655 VILLENEUVE D'ASCQ**

A tous les membres de la commission d'examen:

*Professeur Paule Vasseur (Centre des Sciences de l'Environnement de METZ),
Docteur N. Gschwind (Ciba-Geigy Schweizerhalle AG, SUISSE)
Professeur R. Tailliez, Professeur M. Sancholle, et Docteur R. Blondeau
(Université des Sciences et Technologies de LILLE)*

vont mon profond respect et mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout le personnel des laboratoires de Microbiologie, de Biochimie, de Cryptogamie et du Centre commun de R.M.N. de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Enseignants, Chercheurs, Techniciens et Secrétaires) pour m'avoir fait partager leurs connaissances et permis l'élaboration de ce travail dans une ambiance cordiale et chaleureuse.

Enfin, à mes parents, ma sœur, mes frères, Nathalie et tous mes amis, je dédie cette thèse, fruit de mes efforts qui parfois ont été difficiles à comprendre

RESUME

Les acides humiques sont des composés organiques complexes, formés de motifs aromatiques et aliphatiques hétérocondensés, et caractérisés par la présence de groupements carboxyliques responsables des principales propriétés de l'humus des sols. L'hétérogénéité de ces molécules explique en partie leur résistance exceptionnelle à la biodégradation; notre travail a été entrepris dans le but de comprendre le mécanisme de leur turn-over.

Les essais d'isolement de germes telluriques, par la méthode classique d'adaptation, ont permis d'éprouver l'activité d'une communauté bactérienne vis à vis des acides humiques incorporés comme unique source de carbone dans différents milieux de culture. Nos résultats démontrent que ces bactéries, contrairement à nos attentes, ne font qu'accentuer la maturation des molécules.

C'est en utilisant une bactérie mycélienne: *Streptomyces viridosporus* dont les activités ligninolytiques avaient été récemment signalées que nous avons pu mettre en évidence la biodégradation des acides humiques au laboratoire; l'activité minéralisatrice a été caractérisée en utilisant un acide humique de synthèse radioactif.

L'analyse en RMN des molécules humiques récupérées au cours de l'incubation et les dosages enzymatiques, montrent que les facteurs responsables de cette biodégradation sont probablement localisés à la surface des cellules bactériennes. La mise au point d'une technique de culture sous atmosphère d'oxygène pur, en supprimant la phase de sporulation de cette bactérie, devrait faciliter les analyses ultérieures.

SUMMARY

Humic acids are complex organic compounds, built up of polycondensed molecules containing aromatic as well as aliphatic structures, characterized by the presence of carboxylic groups responsible for the main properties of the soil humus. The heterogeneity of these molecules partially explains their high recalcitrance to biodegradation; our study was made with the aim to understand the mechanism of their turn-over.

Adaptation method for isolation of telluric germs permits us to improve the activity of a mixed bacterial community on the humic acids used as sole carbon supply in a liquid medium. Our results show, on the contrary, that these bacteria stress the maturation of the humic molecules.

With the use of a mycelian bacterium: *Streptomyces viridosporus* of which the ligninolytic activities were recently reported, the biodegradation of humic acids was realized in our laboratory. The mineralizing activity was demonstrated with the use of a synthetic radiolabelled humic acid.

The NMR analysis of the recovered humic molecules after incubation and the enzymatic assays, show that the factors responsible for this biodegradation were probably localized on the cell surfaces. The set up of a cultural method under pure oxygen atmosphere, and the suppression of the sporulation phase of this bacterium will probably make easier further analysis.

T A B L E D E S M A T I E R E S

- 0 0 0 -

I N T R O D U C T I O N

I. - GENERALITES SUR L'HUMUS ET LES ACIDES HUMIQUES	1
A. - <u>L'humus</u>	1
B. - <u>Les acides humiques</u>	3
II. - JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE	5

P A R T I E I : L E S S U B S T R A T S H U M I Q U E S

I. - LES ACIDES HUMIQUES	7
A. - <u>Extraction et purification des acides humiques</u> <u>d'un échantillon de sol</u>	7
B. - <u>Purification des acides humiques du commerce</u>	8
II. - SYNTHÈSE DES MELANOÏDINES	8
III. - ANALYSE DES COMPOSÉS HUMIQUES	9

PARTIE II : ACTION DES BACTERIES HETEROTROPHES SUR LES
COMPOSES HUMIQUES

INTRODUCTION	10
I. - MATERIEL ET METHODES	10
A. - <u>Sélection d'un consortium bactérien et modalités d'incubation</u>	10
B. - <u>Evolution de la population bactérienne au cours des incubations</u> ..	11
C. - <u>Modifications subies par les composés humiques</u>	12
II. - RESULTATS	12
A. - <u>La population bactérienne</u>	12
B. - <u>Les composés humiques</u>	14
III. - DISCUSSION - CONCLUSION	17

PARTIE III: ACTION DE STREPTOMYCES VIRIDOSPORUS SUR LES
ACIDES HUMIQUES

INTRODUCTION	19
I. - MATERIEL ET METHODES	20
A. - <u>Souche bactérienne, milieux et conditions de culture</u>	20
1 - La souche bactérienne	20
2 - Milieux de culture et modalités d'incubation	20
B. - <u>Appréciation de la croissance bactérienne et de la</u> <u>biodégradation des acides humiques</u>	21
1 - La croissance bactérienne	21
2 - Biodégradation des acides humiques	21
C. - <u>Utilisation de la mélanoïdine¹⁴C</u>	22
D. - <u>Essais enzymatiques</u>	22
II. - RESULTATS	23

A. - <u>Croissance bactérienne et décoloration des milieux de culture</u>	23
1 - Le milieu TK	23
2 - Le milieu TP	26
B. - <u>Changements dans la polydispersion des acides humiques</u>	31
C. - <u>Production de $^{14}\text{CO}_2$</u>	32
D. - <u>Activité enzymatique des filtrats de cultures</u>	33
 III. - DISCUSSION	 37

P A R T I E I V : A C T I V I T E D E S T R E P T O M Y C E S V I R I D O S P O R U S C U L T I V E
 EN PRESENCE D'OXYGENE PUR

INTRODUCTION	40
 I. - MATERIELS ET METHODES	 40
A. - <u>Croissance de S. viridosporus en présence d'acides humiques</u>	40
B. - <u>Etude de la minéralisation : utilisation de la mélanoïdine ^{14}C</u>	41
C. - <u>Préparation et utilisation des extraits acellulaires</u>	41
1 - Préparation des extraits acellulaires	41
2 - Activité des extraits acellulaires	42
 II. - RESULTATS	 44
A. - <u>Croissance de S. viridosporus et décoloration</u> <u>des acides humiques</u>	44
1 - Influence des sources de carbone et d'azote	48
2 - Influence des ions divalents	51
3 - Influence de l'azide de sodium	53
4 - Utilisation des mycélium et filtrats de culture	53
5 - Utilisation de la mélanoïdine ^{14}C	56
B. - <u>Activité des extraits acellulaires</u>	57

III. - DISCUSSION - CONCLUSION	59
A. - <u>Croissance de S. viridosporus et biodégradation</u> <u>des substances humiques</u>	59
B. - <u>Activité des extraits acellulaires</u>	62
C. - <u>Autres investigations</u>	63

P A R T I E V : E T U D E E N S P E C T R O S C O P I E D E S M O D I F I C A T I O N S S U B I E S
 P A R L E S A C I D E S H U M I Q U E S

INTRODUCTION	65
--------------------	----

I. - MATERIEL ET METHODES	65
A. - <u>Microorganismes utilisés</u>	65
B. - <u>Modalités de culture</u>	67
C. - <u>Extraction des acides humiques</u>	68
D. - <u>Analyse de la polydispersion des acides humiques</u>	68
E. - <u>Analyses chimiques des modifications subies par les</u> <u>acides humiques</u>	68
F. - <u>Analyses spectroscopiques</u>	69

II. - RESULTATS	70
A. - <u>Analyse en gel filtration</u>	70
B. - <u>Analyses chimiques</u>	72
C. - <u>Etude spectroscopique</u>	72
1 - UV-visible	72
2 - La RMN du carbone 13	73

III. - DISCUSSION - CONCLUSION	76
--------------------------------------	----

CONCLUSION GENERALE	79
---------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	81
---------------------	----

INTRODUCTION

I. - GENERALITES SUR L'HUMUS ET LES ACIDES HUMIQUES

A. - L'humus

Le carbone, élément fondamental de la vie, est présent dans tous les compartiments du système terrestre. Dans l'atmosphère, il représente environ 720.10^9 tonnes, essentiellement sous forme de CO_2 (LAMBERT, 1987). Par le biais de la photosynthèse, une partie de ce carbone atmosphérique, estimée à 150.10^9 tonnes, se retrouve chaque année dans les plantes sous forme de carbone organique (WITTAKER et LIKENS, 1973 ; STEPHENS et HEICKEL, 1975) ; une partie de ce carbone végétal peut ensuite constituer la biomasse d'origine animale et, par la respiration, un recyclage rapide du carbone est assuré. Dans le sol, des processus physico-chimiques et microbiens peuvent entraîner le carbone dans un cycle sédimentaire ou le convertir en carbone humique.

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

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

La rétention de l'eau et des éléments nutritifs a été l'une des premières propriétés caractéristiques de l'humus notée en 1761 par WALLERIUS ; en 1861, BERZELIUS propose la première classification des composés humiques et distingue :

- les acides humiques solubles en solution alcaline ;
- les acides créniques et apocréniques capables de former des complexes avec les métaux ;
- l'humine, composé organique inerte.

Actuellement, on distingue deux fractions :

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

Les géologues et les agronomes se sont intéressés plus particulièrement à la persistance dans le sol de ces composés humiques et, les analyses de datation au moyen du carbone 14 indiquent des temps de résidence moyens de l'ordre de plusieurs siècles (TAMM et OSTLUND, 1960 ; MARTEL et PAUL, 1974 ; JENKINSON et RAYMER, 1977). Dans les environnements particulièrement protecteurs comme les fonds marins, les temps de résidence seraient bien plus élevés. L'association avec les substances minérales et l'inaccessibilité aux enzymes extracellulaires sont les facteurs qui sont les plus souvent avancés pour expliquer cette stabilité. TIESSEN et STEWARD (1983), puis ANDERSON (1984) utilisent, eux aussi, la méthode au carbone 14 pour déterminer les différentes fractions de l'humus des chernozems canadiens et distinguent :

- les composés à minéralisation très rapide, se décomposant en quelques mois voire quelques années : il s'agit de biomolécules de matière végétale récente ;

- les composés à vitesse de minéralisation moyenne avec 50 % de minéralisation en 60 ans : il s'agit de composés aminés stabilisés sous forme de protéines ou de polypeptides par des liaisons étroites avec les smectites fines ;
- les composés très stables : ce sont des composés aromatiques peu hydrolysables, situés dans les microagrégats de taille moyenne. Ils constituent la fraction principale des acides humiques et une partie de l'humine.

Dans les écosystèmes terrestres, les fonctions de l'humus sont assez bien connues grâce à ses propriétés physiques, chimiques et biologiques.

Dans les eaux, il assure essentiellement le transport et la solubilisation des métaux, effet qui sera favorable ou non pour l'environnement lorsqu'il s'agit des métaux toxiques selon leur degré de solubilité dans l'eau à l'état libre. Des produits organiques de synthèse, tels que certains pesticides, peuvent également se fixer et être véhiculés par cette substance (REUTER et PERDUE, 1977 ; PERDUE, 1983).

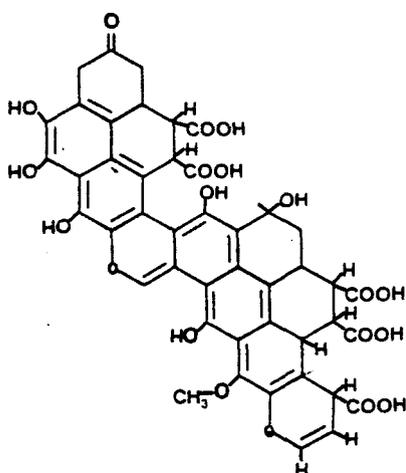
B. - Les acides humiques

Dans les sols, les acides humiques représentent la fraction principale des substances humiques extractibles. Le carbone représente de l'ordre de 50 à 55 % de leur poids sec, l'oxygène 30 à 35 %, l'hydrogène 4 à 6 % et l'azote 2 à 6 %. Sont également présents, le soufre et le phosphore à des concentrations généralement inférieures à 2 %.

Les spectres RMN du carbone 13 montrent que le carbone est en majeure partie de nature aromatique ; il se retrouve aussi sous forme aliphatique ou alicyclique et en partie dans les groupes carboxyliques responsables de l'électronégativité de la molécule (SCHNITZER et PRESTON, 1983). Des entités, tels que les hydrates de carbone, les acides aminés et les acides gras, sont identifiables dans les acides humiques après hydrolyse alcaline ou acide (BRINK et al., 1960 ; LIU et al., 1973 ; DEBYSER et al., 1978 ; ITTEKKOT et al., 1984). Les structures phénoliques, quinoniques et aromatiques ne peuvent

être détectées qu'après des dégradations oxydatives ou réductrices (FLAIG, 1970 ; RASHID, 1972).

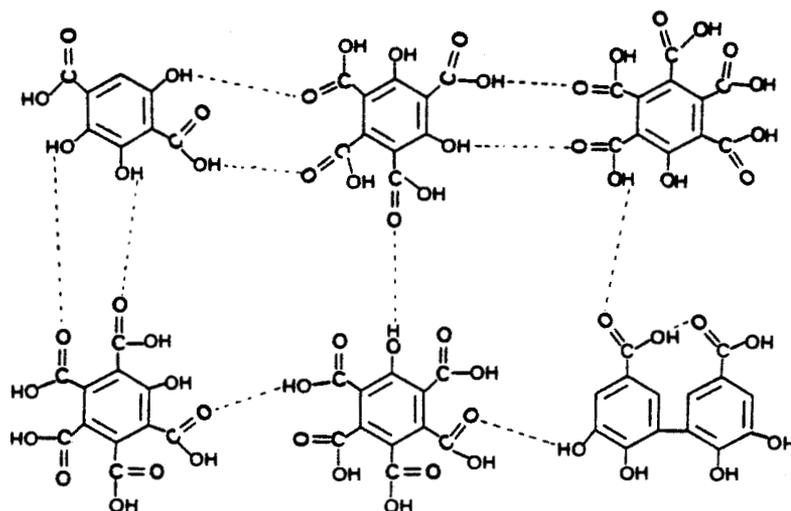
L'assemblage de ces constituants donne un édifice moléculaire dont la structure a fait l'objet de nombreuses spéculations. FUCHS a proposé un premier modèle en 1930 comportant des unités aromatiques avec des groupements carboxyliques et hydroxyles mais, la structure très condensée de ce modèle rendait peu compte des différentes propriétés de la molécule. De plus, FUCHS faisait abstraction des structures aliphatiques présentes dans ces composés.



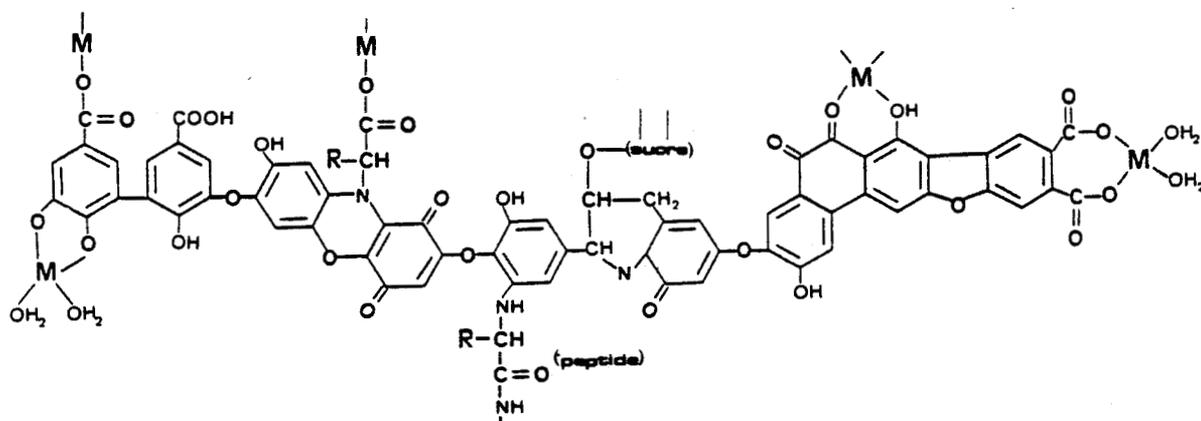
MODELE DE FUCHS 1930

A l'opposé de ce modèle, SCHNITZER et KHAN proposaient, en 1972, une structure comportant des petites unités reliées entre elles par des liaisons de faible énergie. Cette architecture cadrerait mal avec la grande stabilité de ces produits.

Actuellement, le modèle qui semble supporter le mieux les analyses chimiques et spectrales, tout en étant capable d'expliquer les propriétés des molécules humiques, est celui proposé par STEVENSON (1982). La présence de sites hydrophobes et hydrophiles, disposés chimériquement à la surface des macromolécules, permet d'expliquer la coexistence des fonctions tensioactives et de mouillabilité.



MODELE DE SCHNITZER ET KHAN 1972



MODELE DE STEVENSON 1982

II. - JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE

Les substances humiques représentent la plus grande réserve de carbone dans les sols et les eaux (AIKEN *et al.*, 1985). Outre une compréhension plus exacte du rôle joué par ces substances humiques dans le cycle du carbone, une connaissance plus profonde de la biodégradation de ces composés est nécessaire pour :

- maîtriser les pertes en matières organiques qui touchent les sols destinés aux cultures intensives ;
- améliorer la fertilisation minérale et organique des sols ;

- améliorer certaines technologies dans le domaine de la fabrication des composts, de l'épuration des eaux usées ou de l'utilisation de leurs résidus.

La résistance à la biodégradation des substances humiques peut s'expliquer par :

- la présence dans leurs molécules de structures atypiques,
- la diversité des motifs constitutifs de leur architecture,
- la non-reproductibilité des liaisons entre ces motifs,
- leur association avec les structures minérales du sol.

Ainsi, les acides humiques peuvent être définis comme un ensemble de composés électronégatifs, riches en carbone, de taille variable, de nature polycondensée et présentant une grande résistance à la biodégradation.

La photosynthèse fournissant constamment des précurseurs pour l'humification et la masse globale du carbone humique dans la biosphère étant relativement stable, il existe donc un processus inverse à l'humification qui assure la minéralisation de ces substances humiques et explique leur turn-over. Les processus responsables de cette minéralisation sont presque totalement méconnus.

Différents auteurs ont suggéré l'intervention de microorganismes hétérotrophes capables d'utiliser les acides humiques comme seule source de carbone (MATHUR, 1969 ; ZAYED et al., 1974 ; RIFAI et BERTHRU, 1980) pour expliquer le turn-over de l'humus. Dans le cadre de nos recherches, nous avons essayé, dans un premier temps, d'isoler de tels microorganismes hétérotrophes mais nous nous sommes vite rendu compte que, lorsque les substrats humiques utilisés étaient suffisamment purifiés ou issus d'une synthèse effectuée au laboratoire, ceux-ci n'étaient guère dégradés. Nous avons, par contre, obtenu des résultats intéressants en utilisant des microorganismes connus pour leurs activités ligninolitiques et l'essentiel de ce travail porte sur de tels microorganismes et particulièrement sur des bactéries mycéliennes du groupe des *Streptomyces*.

PARTIE I

LES SUBSTRATS HUMIQUES

I. - LES ACIDES HUMIQUES

A. - Extraction et purification des acides humiques d'un échantillon de sol

Les échantillons utilisés pour l'obtention des acides humiques proviennent essentiellement d'un sol de forêt et correspondent aux 10 premiers centimètres de terre située en-dessous de la litière.

Après stabilisation des échantillons au Laboratoire (2 à 3 jours à température ambiante), ceux-ci sont séchés à l'air libre, homogénéisés, tamisés sur maille de 1 mm et broyés au mortier. Les échantillons ainsi préparés peuvent être conservés à l'abri de l'humidité pendant plusieurs années.

Afin de connaître la richesse de l'échantillon en matière organique, un dosage de carbone organique est habituellement réalisé par la méthode de NELSON et SUMMER (1975) ; à 30 mg de terre broyée, on ajoute 5 ml de $K_2Cr_2O_7$ 1 M et 7,5 ml d'acide sulfurique concentré ; le mélange est porté à 150°C pendant 30 min. Après un refroidissement à température ambiante (15 à 30 min), 0,3 ml d'indicateur coloré est ajouté (0,1 g d'acide O-aminobenzoïque et 0,1 g de Na_2CO_3 dans 100 ml d'eau distillée) et le dosage s'effectue avec une solution de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 M (la réaction est arrêtée lorsque la coloration de la solution passe du violet au vert-bouteille). Pour ce dosage, le glucose est utilisé comme référence.

A partir des échantillons de terre broyée, une première extraction est réalisée avec une solution de pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$) 0,1 M à raison de 10 g de terre pour 100 ml de solution. Après 2 h d'agitation sous atmosphère d'azote, une centrifugation à 5 000 g pendant 15 min permet d'obtenir un surnageant qui après filtration sur filtre plissé est centrifugé à 15 000 g pendant 30 min. A partir du culot provenant de la première centrifugation, une seconde extraction est effectuée dans les mêmes conditions mais avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M. Les surnageants obtenus sont souvent mélangés et amenés à pH 1 par addition d'acide chlorhydrique 1 N. Après un maintien de 24 h à l'obscurité, le flocculat d'acides humiques est récupéré par centrifugation à 5 000 g pendant 10 min, puis solubilisé par

une solution de soude 0,1 M et à nouveau amené à pH 1 avec une solution de HCl 0,1 N.

Le flocculat d'acide humique, récupéré comme précédemment, est alors amené à pH 7,2 avec de la soude puis traité en ultracentrifugation à 50 000 g pendant 30 min.

Le surnageant obtenu est dialysé en utilisant des tubes de cellulose régénérée de type Spectra por 6 (Spectrum Medical Industries Inc) dont le seuil de coupure correspond à un poids moléculaire de 1 000. La dialyse se poursuit pendant plusieurs jours en présence d'eau distillée constamment renouvelée.

Les solutions humiques sont ensuite traitées sur une résine échangeuse de cations (Amberlite IR120, forme H⁺), amenées sous forme d'humates de sodium par addition de NaOH, concentrées sous vide et lyophilisées.

B. - Purification des acides humiques du commerce

Les acides humiques commercialisés par Aldrich ont parfois été utilisés comme substrat mais, compte-tenu de leurs teneurs en cendres et de leur faible solubilité dans l'eau, ils sont préalablement purifiés au Laboratoire : une solution à 5 % (P/V) d'acide humique dans NaOH 0,1 N est mise en agitation sous atmosphère d'azote pendant 2 h, puis elle est amenée à pH 1 avec HCl 1 M ; le flocculat obtenu est solubilisé avec de la soude 0,1 M et la solution est traitée à nouveau selon le même protocole (agitation, floculation, resolubilisation) et elle est finalement amenée à pH 7,2, centrifugée à 50 000 g et purifiée comme précédemment.

II. - SYNTHÈSE DES MELANOÏDINES

Les mélanoidines sont préparées par réaction de Maillard selon la technique proposée par HEDGES (1978) : un mélange de glucose (1 M) et de glycine (1 M) ou de glucose (1 M) et d'acide glutamique (1 M) dans du tampon phosphate 0,5 M pH 7 est soumis à une température de 70°C pendant 7 jours. Les polymères obtenus sont ensuite dilués avec de l'eau distillée, dialysés sur Spectra por 6 et lyophilisés.

Pour obtenir une mélanoïdine radioactive, le glucose uniformément marqué au carbone 14 (C.E.A. - Activité spécifique 10 G.Bq/m mole) est ajouté au mélange réactionnel.

III. - ANALYSE DES COMPOSES HUMIQUES

A l'exception de la ^{14}C -mélanoïdine et de l'acide humique commercial, les éléments majeurs des composés humiques (carbone, hydrogène et azote) sont dosés par pyrolyse au Centre de Microanalyses du C.N.R.S. de Vernaison.

L'estimation de la polydispersion des molécules est effectuée par gel filtration et l'estimation des poids moléculaires dominants est obtenue après calibrage des colonnes réalisé avec des protéines globulaires. Le gel Séphacryl S400 superfine (Pharmacia) a été préférentiellement utilisé ; sa capacité de filtration, comprise entre 2.10^4 d et 8.10^6 d, permet la chromatographie de l'ensemble des molécules humiques extraites selon notre procédé. D'autres gels, à savoir le Séphacryl S200, le Séphadex G25, G50 et G100 (Pharmacia) ont également été utilisés. Dans tous ces cas, le tampon Tris-HCl pH 9 (force ionique 0.05) a servi à l'élution.

PARTIE II

**ACTION DES BACTERIES
HETEROTROPHES SUR LES
COMPOSES HUMIQUES**

INTRODUCTION

Des travaux préliminaires ne nous ont pas permis d'isoler des clones bactériens capables de proliférer en utilisant les acides humiques comme seule source de carbone dans différentes conditions de culture en milieu liquide. Les mêmes résultats pouvaient-ils être envisagés à partir d'une communauté de bactéries (culture mixte) ? Une première série d'expériences, pour répondre à cette question, décrit les modalités de sélection et d'incubation de consortium bactériens et les résultats obtenus sont présentés dans cette partie de notre travail.

I. - MATERIEL ET METHODES

A. - Sélection d'un consortium bactérien et modalités d'incubation

Différents échantillons de terre ont été incubés dans un milieu liquide (à raison de 1 g pour 100 ml) contenant les acides humiques à concentration variable (0,25 g ; 0,5 g ; 1 g par litre), en agitation ou non, à différentes températures (28°C, 35°C, 40°C) et à l'obscurité pendant plusieurs mois. Cette technique d'adaptation de la microflore, après plusieurs transferts dans des milieux contenant les acides humiques comme seule source de carbone, a permis d'obtenir différentes microflores dont celle qui porte la nomenclature "16-3" utilisée ici. Cette microflore "16-3" a été retenue car elle a conservé un pouvoir de prolifération supérieur à celui de beaucoup d'autres cultures sélectionnées selon le même protocole ; son activité a été entretenue par des inoculations répétées à intervalles de 4 semaines dans un milieu contenant des acides humiques (0,5 g/l), du glucose (0,25 g/l) et des sels (en mg par litre d'eau distillée : KH_2PO_4 , 400 ; K_2HPO_4 , 1600 ; NH_4NO_3 , 500, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 ; FeCl_3 , 15 ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 ; KCl , 0,1 ; H_3BO_3 , 0,5 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ; pH 7,5).

Les cultures expérimentales ont été conduites en aérobiose dans des fioles erlen meyer de 500 ml et en anaérobiose dans les flacons plasma de 500 ml à raison de 200 ml de milieu/récipient ; les acides humiques (SF = sol de forêt ;

SJ = sol de jardin ; ST = sol de tourbière ; SC = sol cultivé) et les mélanoidines (MGG = glucose-glycine ; MGA = glucose-acide glutamique), stérilisés par filtration (membrane de porosité 0,45 μm), sont apportés à une concentration finale de 0,5 g/l dans la solution saline ci-dessus mentionnée, stérilisée par autoclavage. Pour les incubations en anaérobiose, cette solution est enrichie en nitrates (NaNO_3 , 1,5 g/l).

La communauté bactérienne, employée pour les inoculations, est âgée de 12 à 15 jours ; elle est récupérée par centrifugation et reprise dans la solution saline. Chaque flacon reçoit 10 ml de cette suspension bactérienne, soit approximativement $3 \cdot 10^7$ bactéries/ml dans le milieu d'incubation. Les flacons, destinés à l'incubation anaérobie, sont purgés avec l'hélium. Des échantillons témoins sont ensemencés avec le même inoculum préalablement tué par autoclavage. Les cultures ainsi préparées sont incubées à l'obscurité, à une température de 30°C pendant 90 à 100 jours.

Au terme des incubations, les milieux de culture sont centrifugés, éventuellement neutralisés et dialysés contre l'eau distillée dans les membranes Spectra por 6 ; les substances humiques ainsi récupérées, sont lyophilisées et conservées pour les analyses.

B. - Evolution de la population bactérienne au cours des incubations

Pour des incubations aussi longues en culture "batch", il était nécessaire d'apprécier l'activité bactérienne dans nos cultures ; la population bactérienne a été suivie par des numérations sur milieux gélosés (trypticase - soja - agar Biomérieux) à intervalle de 15 jours ; en outre, l'activité bactérienne a également été évaluée en utilisant des composés radiomarqués [D(U- ^{14}C)Glucose, activité spécifique 270 mCi/mMole CEA et de (Carboxy- ^{14}C)-acide benzoïque, activité spécifique 56,7 mCi/mMole CEA] selon le protocole suivant : 10 ml de milieu de culture, préalablement agité manuellement afin de disperser les bactéries, sont prélevés et mis en incubation en présence de 100 μl de composés marqués (concentration du glucose 50 $\mu\text{g/l}$, concentration de l'acide benzoïque 34 $\mu\text{g/l}$) à 35°C en agitation rotative pendant 1 h ; les cultures témoins reçoivent en plus 1 ml de solution de H_2SO_4 2 M. Dans ces flacons hermétiquement fermés, le $^{14}\text{CO}_2$

est piégé par 1 ml de KOH 0,1 M et la radioactivité de cette solution est mesurée par comptage en scintillation liquide.

Pour les flacons incubés en anaérobiose, l'activité dénitrifiante est évaluée à la fin de la période d'incubation par la quantité d'azote moléculaire produite : 1 ml de gaz est prélevé dans chaque flacon et analysé par chromatographie en phase gazeuse (Intersmat IG CII, gaz vecteur helium, colonne porapak S) à la station I.N.R.A. "Technologie alimentaire" de Villeneuve d'Ascq.

C. - Modifications subies par les composés humiques

Les modifications de la polydispersion ont été évaluées en gel filtration.

Les sucres totaux sont mesurés par la méthode au phénol sulfurique de LIU et al. (1973) en apportant une correction due à l'absorbance du complexe substance humique-acide sulfurique ; les résultats sont exprimés en mg de glucose par équivalent gramme de substance humique.

L'acidité carboxylique est déterminée par la méthode à l'acétate de calcium de SCHNITZER et GUPTA (1965). Les substances humiques sont utilisées sous leur forme protonée, obtenue par un traitement sur la résine échangeuse de cations Amberlite IR120 (Merck) et l'acide benzène carboxylique est utilisé comme référence.

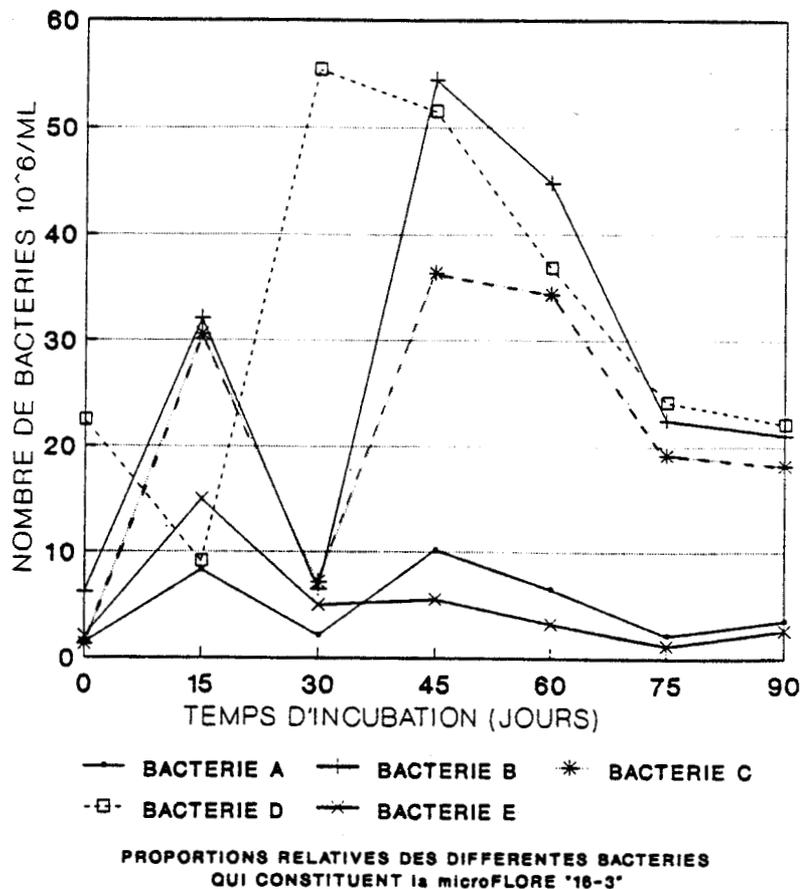
II. - RESULTATS

A. - La population bactérienne

La figure 1 présente la proportion relative des différentes bactéries qui constituent la microflore "16-3" au cours des incubations aérobies.

Des études taxonomiques nous ont permis d'assimiler la bactérie A au genre *Bacillus* et la bactérie D au genre *Pseudomonas* en se référant au "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Les autres bactéries de la population "16-3" n'ont pu être déterminées en considérant des critères simples.

Figure 1

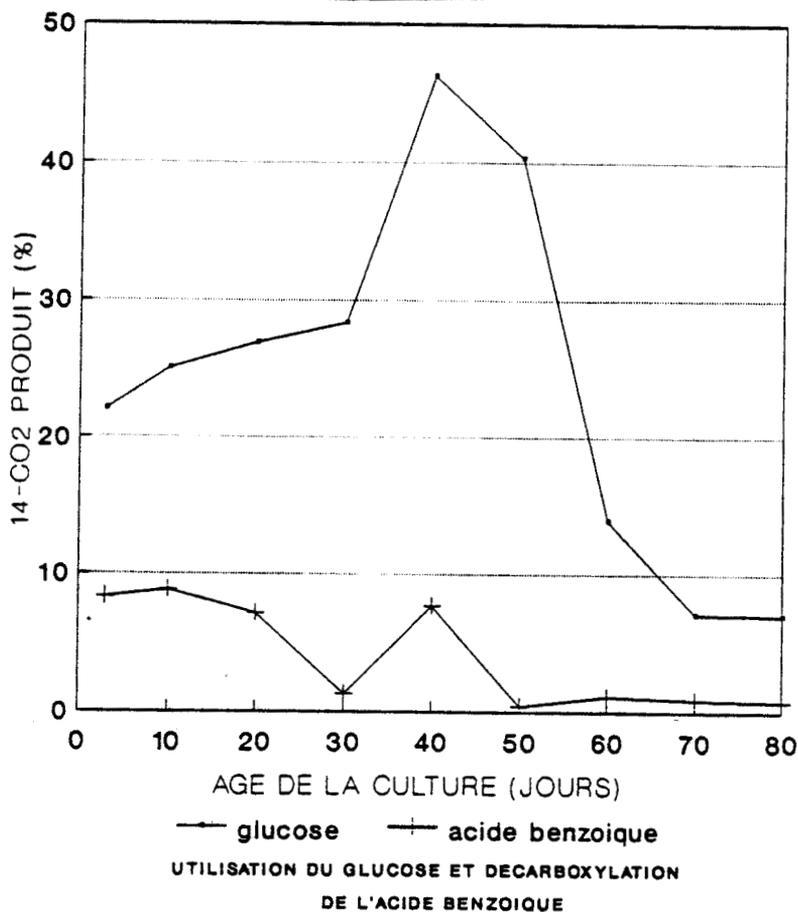


Des cinq bactéries qui constituent la microflore "16-3", on remarque un enrichissement relatif de trois d'entre elles en aérobiose (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. et un bâtonnet Gram-positif, non mobile et non fermentatif). En anaérobiose, seules deux de ces trois bactéries étaient dominantes (*Bacillus* et *Pseudomonas*) ; en culture pure, ces bactéries sont Gram-négatif ou variable et possèdent toutes une activité dénitrifiante.

La figure 2 présente l'utilisation du glucose marqué et la décarboxylation de l'acide benzoïque marqué au cours des incubations aérobies.

On remarque que l'utilisation du glucose radioactif est importante entre le 40^{ème} et le 60^{ème} jour d'incubation ; par contre, la décarboxylation de l'acide benzoïque ne montre que de petites variations au cours des 40 premiers jours et celle-ci devient ensuite insignifiante.

Figure 2



Le tableau 1 indique les teneurs en azote gazeux des flacons soumis à l'anaérobiose. Cette activité dénitrifiante est plus importante pour les échantillons SF2 et SC.

Tableau 1

	SF1	SF2	SJ1	SJ2	ST	SC	MGA	MGG
%N ₂	40.16	79.37	29.30	26.60	51.24	94.55	46.53	40.93

(Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au volume gazeux total des flacons.)

B. - Les composés humiques

Avant l'extraction des acides humiques, des analyses ont été effectuées afin de mieux caractériser les échantillons de sol utilisés à cet effet ; le tableau 2 présente ces caractéristiques. On remarque une richesse relative en carbone

organique du sol de forêt pour lequel le pH est relativement acide (pH 4,3) et en comparaison avec le sol cultivé, cette teneur en carbone organique est très élevée.

Tableau 2

	Carbone organique	pH	Roche mère
SF	17.40	4.30	Argile
SJ	7.10	8.20	Argile
ST	6.60	5.20	Sable Landenien
SC	3.50	7.10	Craie

(Le carbone organique est exprimé en pourcentage de poids par rapport à l'échantillon de terre.)

La composition élémentaire des différentes substances humiques ainsi que leur poids moléculaire dominant avant incubation sont donnés dans le tableau 3. On remarque très peu de différences dans les teneurs en carbone, hydrogène ou azote pour les composés naturels, bien que pour l'échantillon de sol de jardin, l'extraction à la soude donne des acides humiques plus riches en carbone ; on constate aussi que pour cet échantillon (SJ), les poids moléculaires dominants sont plus élevés. Les composés de synthèse, quant à eux, présentent des poids moléculaires dominants plus faibles, bien que pour les teneurs en carbone, hydrogène et azote, très peu de différences soient à signaler, si ce n'est l'importance relative de l'azote dans l'échantillon MGG en comparaison avec les autres.

Tableau 3

		C %	H %	N %	P.M. 10 ³
SF	AH1	52.63	5.28	3.07	28.50
	AH2	53.67	5.65	3.32	29.50
SJ	AH1	48.52	4.97	3.21	45.00
	AH2	63.65	5.64	3.79	49.00
SC	AH	49.19	4.87	3.31	33.00
ST	AH	51.89	5.13	2.76	29.50
MGG		52.47	5.63	5.44	9.20
MGA		52.39	5.28	2.75	6.30

Les valeurs relatives au Carbone (C), Hydrogène (H), et Azote (N) sont exprimées en pourcentage sans cendres.

AH1 et AH2 acides humiques extraits successivement au pyrophosphate de sodium et à l'hydroxyde de sodium.

Les résultats du tableau 4 représentent l'acidité carboxylique et la teneur en hydrates de carbone des différentes substances humiques récupérées à la fin des incubations.

Tableau 4

	COOH mg/g	COOH mg/g	COOH mg/g	SUCRES ug/mg	SUCRES ug/mg	SUCRES ug/mg
	Te	Ae	An	Te	Ae	An
SF1	3.48	3.91	3.91	76.85	62.17	62.50
SF2	2.78	3.21	3.00	115.24	109.34	109.34
SJ1	2.93	4.13	5.06	83.04	78.91	82.11
SJ2	2.83	3.80	3.15	90.95	73.55	84.00
ST	3.33	3.49	2.95	72.76	71.67	67.41
SC	3.99	4.13	4.55	114.74	111.37	100.17
MGG	3.00	2.70	2.90	13.60	12.10	14.30
MGA	4.27	3.71	3.91	28.53	28.63	28.43

Les teneurs en groupements carboxyles et en sucres sont des valeurs calculées en poids sec sans cendres. (Te=Temoin; Ae=Aerobiose; An=Anaerobiose.)

Les teneurs en groupements carboxyles des acides humiques sont très proches les unes des autres et sont comprises entre 2,79 et 3,99 meq/g ; l'incubation, en présence de la microflore "16-3", conduit généralement à une augmentation de celles-ci. Par contre, les substances humiques de synthèse, qui possèdent des valeurs en carboxyle plus faibles, perdent toutes une partie de cette acidité au cours de l'incubation.

Le contenu en hydrates de carbone dans les différents acides humiques est relativement variable ; on remarque cependant que les acides humiques, extraits par l'hydroxyde de sodium, sont plus riches que leurs homologues extraits au pyrophosphate de sodium. En présence de la microflore "16-3", on constate toujours une consommation de ces hydrates de carbone variant de 1 % (SJ1 anaérobiose) à 19 % (SF1 aérobiose). Les mélanoidines, par contre, ne subissent pratiquement pas de modifications au cours de l'incubation.

Les courbes obtenues en gel filtration pour les acides humiques, présentent dans l'ensemble des variations peu importantes en fin d'incubation même si dans certains cas (AH2 SJ en aérobiose et AH SC en anaérobiose), un léger déplacement vers les molécules plus petites est observé. Les composés humiques de synthèse ne présentent aucune diminution de poids moléculaire.

III. - DISCUSSION - CONCLUSION

Dans nos conditions expérimentales, les bactéries "16-3" sont inoculées après 12 à 15 jours d'incubation dans leur milieu d'entretien de façon à ce qu'elles aient utilisé leurs réserves ; ces paramètres sont très voisins des conditions oligotrophiques par ailleurs très fréquentes dans les environnements naturels (ROSZAK et COLWELL, 1987).

Les résultats donnés par le glucose ^{14}C montrent, en outre, que les bactéries n'ont pas été stimulées par la présence de source de carbone facilement assimilable dès le début de l'incubation ; le maximum d'activité obtenu entre le 40ème et le 60ème jour corrobore les résultats donnés par les dénombrements et traduit une certaine adaptation du consortium bactérien "16-3". Avec des expériences menées en chemostats, SHIMP et PFAEANDER (1985) ont également obtenu une population bactérienne aquatique adaptée à différentes concentrations d'acides humiques naturels ; ces auteurs ont montré que cette adaptation réduisait de manière significative l'utilisation par ces bactéries des phénols monosubstitués. TRANVIK et HOFLE (1987) montrent, au contraire, mais avec des cultures mixtes, que l'augmentation de la concentration en acides humiques est liée à une baisse de la dégradation des phénols.

Dans ces expériences comme dans les nôtres, il faut signaler que les substances humiques en solution peuvent influencer la croissance ou le métabolisme des bactéries par l'intermédiaire d'effets secondaires découlant de leurs propriétés physiologiques mises en évidence par VISSER (1985a).

Les mélanoïdines ont été préparées pour nos expériences de biodégradation compte-tenu de leurs similitudes avec les acides humiques révélés par les analyses élémentaires et spectroscopiques (MAL' et al., 1982 ; BENZING-PURDIE et RIPMEESTER, 1983 ; RUBINSZTAIN et al., 1984) et, de plus, avec ces composés, il était possible d'envisager des expériences avec un substrat radiomarqué.

Les modifications chimiques subies par les acides humiques au cours de l'incubation, sont caractérisées par une diminution de la teneur en hydrates de carbone. Comme les amino-acides, les sucres représentent les principaux éléments libérables par hydrolyse de l'humus terrestre ; d'après HAWORTH (1971), ils sont situés à la périphérie de la molécule et sont, par conséquent,

plus facilement accessibles aux bactéries. L'acquisition de groupements carboxyles supplémentaires est, par contre, plus sélective ; elle affecte surtout l'échantillon SJ, c'est-à-dire celui qui au départ en contenait le moins. D'après les analyses en RMN de PRESTON et SCHNITZER (1984), ces groupements carboxyles seraient pour la plupart fixés sur les structures aromatiques des acides humiques. Une évolution identique à celle que nous avons obtenue a été signalée par RAMUNI et al. (1987) avec des acides humiques extraits de milieux aquatiques incubés sous différentes conditions d'oxygénation.

Les mélanoïdines présentent très peu de modifications ; cette résistance à l'action microbienne est en accord avec les résultats obtenus en Laboratoire par IVARSON et BENZING-PURDIE (1987) qui ont suivi l'utilisation de l'oxygène par les bactéries provenant d'une suspension de terre. Les résultats d'inhibition de croissance obtenus par EINARSON et al. (1983), à partir de bactéries isolées d'aliments, vont dans le même sens.

Au cours de nos essais, aucune véritable biodégradation n'a donc pu être observée puisque la gamme de distribution des poids moléculaires est pratiquement inchangée après l'incubation. Des résultats semblables ont été obtenus par MARTIN et HAIDER (1979) au cours d'expériences d'incubation, dans différents sols, de polymères modèles d'acide humique ; ils notent une grande stabilité de ces polymères même en présence d'une source de carbone facilement assimilable incorporée conjointement avec les acides humiques.

La stimulation des microorganismes dénitrifiants, en présence d'acides humiques en solution, a déjà été signalée par VISSER (1985b) mais, dans le cas de la microflore "16-3", l'adaptation à la vie anaérobie ne peut être que momentanée car l'incubation continue dans un milieu totalement exempt d'oxygène conduit à son déclin. La présence de traces d'oxygène n'est d'ailleurs pas un obstacle à la respiration nitrates et elle est en accord avec les résultats de LLYOD et al. (1987) ; en se reportant aux travaux de SLEAT et ROBINSON (1984), un effet stimulant sur la dégradation dénitrificatrice peut être suggéré.

D'après ces résultats, nous pensons donc que la minéralisation des substances humiques n'intervient pas par un mécanisme de dégradation faisant intervenir des bactéries hétérotrophes capables de les utiliser comme seule source de carbone.

PARTIE III

ACTION DE

STREPTOMYCES viridosporus

SUR LES ACIDES HUMIQUES

INTRODUCTION

Alors que nous terminions nos analyses relatives à l'action des bactéries hétérotrophes sur les acides humiques, d'autres travaux menés dans notre Laboratoire (BLONDEAU, 1989) et dans un Laboratoire allemand (HAIDER et MARTIN, 1988) montraient qu'une véritable biodégradation des acides humiques pouvait être obtenue dans certaines conditions de milieu avec un champignon basidiomycète ligninolytique : *Phanerochaete chrysosporium*. Cette biodégradation s'accompagne d'une modification de la polydispersion de la molécule et d'une libération de CO_2 ; elle fait intervenir le métabolisme secondaire du champignon, avec probablement la participation de la lignine-péroxydase. Cependant, le pH utilisé pour la croissance de ce type de champignon (4,5) est peu compatible avec les conditions naturelles les plus fréquemment rencontrées dans les sites où la minéralisation de l'humus est active. De plus, il est difficile de comprendre qu'un même microorganisme ligninolytique puisse à la fois conduire à la synthèse d'un composé et à sa minéralisation. Or, c'est l'humification qui nécessite un pH acide et favorise l'activité des champignons ; au cours de la maturation de l'humus, le pH se neutralise au fur et à mesure que les molécules humiques s'accumulent dans les zones plus profondes du sol.

D'après RAMACHANDRA et al. (1987 et 1988), une bactérie mycélienne : *Streptomyces viridosporus*, est capable de produire une lignine-péroxydase similaire à celle de *Phanerochaete chrysosporium* mais dont l'activité se réalise à des valeurs de pH nettement supérieures à celles du champignon.

En milieu liquide, contenant les acides humiques, nous avons pu obtenir avec des cultures de *S. viridosporus* une décoloration significative. Si cette décoloration du milieu de culture est en relation avec une minéralisation des acides humiques, nous avons donc un microorganisme susceptible d'expliquer le turn over de l'humus dans la nature à un pH neutre ; les conditions optimales permettant cette minéralisation ainsi que les modalités précises de cette biodégradation sont étudiées dans ce chapitre.

I. - MATERIEL ET METHODES

A. - Souche bactérienne, milieux et conditions de culture

1 - La souche bactérienne

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une souche : *Streptomyces viridosporus* ATCC 39115 ; cette bactérie est entretenue au Laboratoire sur un milieu composé de : extrait de levure, 4 g ; extrait de malt, 10 g ; glucose, 4 g ; CaCl_2 , 550 mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg ; gélose, 15 g ; eau, 1000 ml. Ce milieu en tube incliné est ensemencé avec des spores de *S. viridosporus* puis incubé à 35°C pendant 72 h et laissé ensuite à la température du Laboratoire. Cette opération est renouvelée toutes les six semaines.

Pour des raisons pratiques et pour éviter les autoapports dans nos milieux de culture, les inoculum ont été préparés sur le milieu précédent non gélosé, réparti en tubes (25/200) munis de tiges de verre et disposés en position inclinée pour faciliter la prolifération des mycelium et stimuler la phase de sporulation (grâce à l'augmentation de la surface de contact avec l'oxygène de l'air). Après 2 à 4 semaines d'incubation à 35°C, les mycelium aériens sont récoltés dans de l'eau stérile et après agitation en présence de billes de verre (diamètre 3 mm), des suspensions de spores et de boutures mycéliennes utilisables pour les inoculations sont obtenues. Dans certains cas, ces suspensions, après un passage sur laine de verre stérile qui retient des débris mycéliens, sont uniquement composées de spores.

2 - Milieux de culture et modalités d'incubation

Les expériences sont effectuées en culture "batch" avec des flacons plasma de 500 ml contenant chacun 50 ml de milieu de culture.

Dans une première série d'expériences, deux types de milieu ont été principalement utilisés. La solution minérale de base est identique dans les deux cas : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 50 mg, CaCl_2 : 55 mg, FeSO_4 : 10 mg, NH_4NO_3 : 200 mg, 1 ml d'une solution de métaux ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 3 g,

H_3BO_3 : 4 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 0,5 g, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$: 0,5 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$: 2 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 3 g, H_2O : 1000 ml) par litre d'eau distillée.

Le premier milieu (TK) est tamponné à pH 8,0 avec du Tris-HCl 20 mM et reçoit en plus du KCl (100 mM) et du KH_2PO_4 (3 mM) ; le second (TP) est tamponné à pH 6,5 avec KH_2PO_4/Na_2HPO_4 20 mM et reçoit en plus NaCl (0,2 g/l). Après autoclavage à 110°C pendant 30 min, le glucose (0,25 %) et les acides humiques (0,025 %), stérilisés par filtration sur membrane de porosité 0,45 μm , sont incorporés dans chaque flacon.

Les milieux ainsi préparés sont inoculés avec la suspension de spores (approximativement 10^6 spores par flacon). Après une croissance initiale de 16 h à 35°C en culture statique, les flacons sont ensuite incubés selon le cas avec ou sans agitation (70 rpm).

B. - Appréciation de la croissance bactérienne et de la biodégradation des acides humiques

I - La croissance bactérienne

La croissance bactérienne, dans les différents milieux de culture, est déterminée par le poids sec du mycelium produit en cultures statiques ou des "pellets" obtenues en cultures agitées.

Le glucose consommé au cours de la croissance est évalué dans les filtrats de culture par la méthode au phénol sulfurique (DUBOIS et al., 1956) ; les protéines extracellulaires sont dosées par la méthode de LOWRY et al. (1951).

2 - Biodégradation des acides humiques

L'altération des acides humiques incorporés dans les cultures est évaluée par leur absorbance à 350 nm en comparaison avec un témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions ; cette longueur d'onde permet d'apprécier les variations de l'absorbance des acides humiques sans interférences avec les protéines excrétées au cours des incubations ou avec les différents éléments apportés dans le milieu de culture.

L'adsorption des acides humiques sur les cellules bactériennes a été évaluée en traitant ces cellules avec une solution de NaOH 0,2 M, pendant 24 h à température ambiante. Les acides humiques libérés sont dosés par leur adsorbance à 350 nm (les solutions étant ramenées au pH initial des milieux de culture).

Les modifications de la polydispersion des molécules humiques sont évaluées par chromatographie en gel filtration sur Séphacryl S400 superfine (Pharmacia) comme précédemment indiqué (cf. Partie I).

C. - Utilisation de la mélanoidine ^{14}C

L'activité minéralisante de *S. viridosporus* a été mise en évidence par la production de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de la mélanoidine (glucose + glycine) marquée. Pour ces expériences, les cultures sont incubées dans un milieu exempt d'acides humiques (avec parfois 1 mM d'alcool vératrylique qui est un inducteur de l'activité lignine-péroxydase chez *Phanerochaete chrysosporium*) et, à intervalles réguliers, la ^{14}C -mélanoidine est incorporée dans des flacons qui sont ensuite hermétiquement fermés. Le $^{14}\text{CO}_2$ est piégé par 2 ml de KOH 0,1 M placés dans un godet stérile disposé dans chaque flacon de culture. Après une incubation à 35°C, pendant 4 h en agitation, la radioactivité de la solution de KOH est mesurée en scintillation liquide.

D. - Essais enzymatiques

Les dosages de peroxydases extracellulaires sont réalisés à partir de filtrats de culture obtenus en passant les milieux de culture sur filtres de fibres de verre (Whatman GF/C). Pour ces dosages, 1 mM de substrat et 0,05 mM d'hydrogène peroxyde sont utilisés. Les réactions sont initiées par l'addition de l'hydrogène peroxyde et les variations de l'absorbance aux longueurs d'ondes appropriées sont suivies en continu au spectrophotomètre à 35°C. Des solutions contenant tous les réactifs, excepté le filtrat de culture, servent de témoins.

Avec le 2,4-dichlorophénol (Sigma) comme substrat, la réaction est effectuée dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 et le milieu contient en plus 0,8 mM de

4-aminoantipyrine (Aldrich) ; l'augmentation de l'absorbance est suivie à 510 nm.

Le 2,6-diméthoxyphénol (Aldrich) a été utilisé dans le tampon Tris-HCl pH 8 contenant 0,1 mM de sulfate de manganèse ; la réaction est suivie à 470 nm.

Enfin, pour le N-N-N'-N'-tétraméthyl-p-phénylène-diamine (Sigma), la réaction a été effectuée dans le tampon succinate de sodium 50 mM pH 5 et l'absorbance est suivie à 610 nm.

Avec tous ces substrats, une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzymes nécessaire pour entraîner une augmentation d'absorbance d'une unité par minute.

Les peroxydases ont été également analysées en électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 % d'acrylamide). Dans ce cas, les enzymes ont été révélés en utilisant une solution contenant 50 mM de tampon Tris-HCl pH 8, 5 mM de 2,6-diméthoxyphénol et 2 mM d'hydrogène peroxyde.

II. - RESULTATS

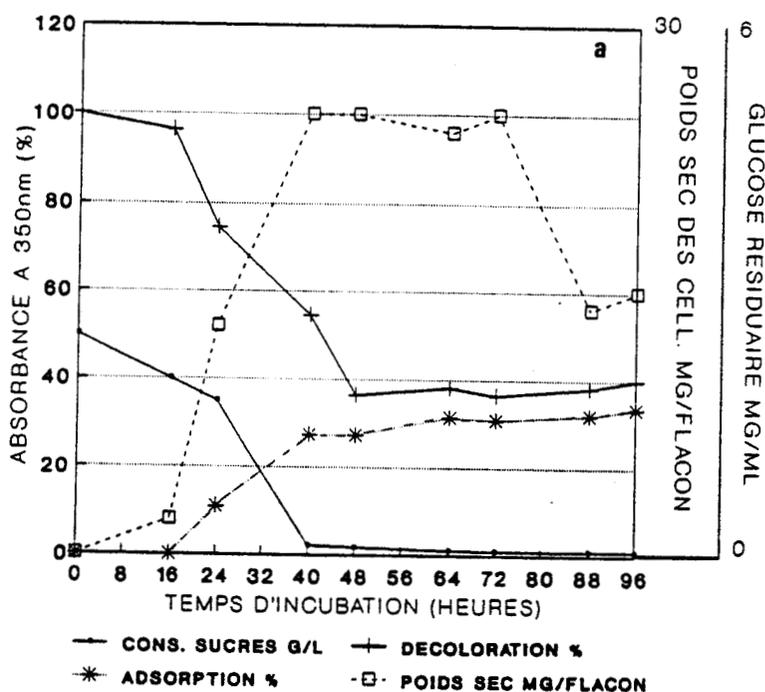
A. - Croissance bactérienne et décoloration des milieux de culture

I - Le milieu TK

La figure 3a présente la croissance bactérienne et la décoloration des acides humiques en culture agitée. L'activité décolorante apparaît nettement dès la 24^{ème} heure d'incubation et s'arrête à 48 h. Une partie de cette décoloration du milieu est due à l'adsorption des molécules humiques sur les cellules bactériennes ; cette adsorption est importante à 48 h d'incubation et augmente alors que la biomasse diminue.

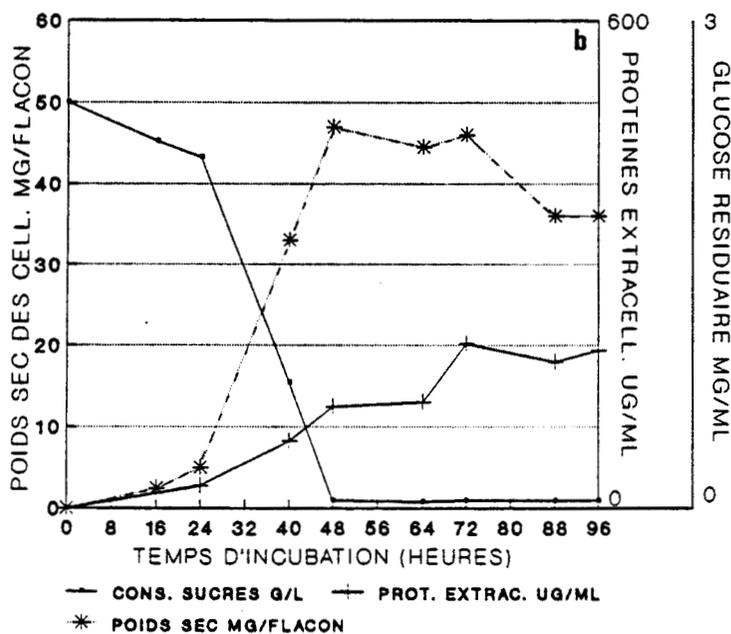
Figure 3

**CROISSANCE ET ACTIVITE DE *S. viridosporus*
EN CULTURE AGITEE pH:8.0 +A.H 0.025%**



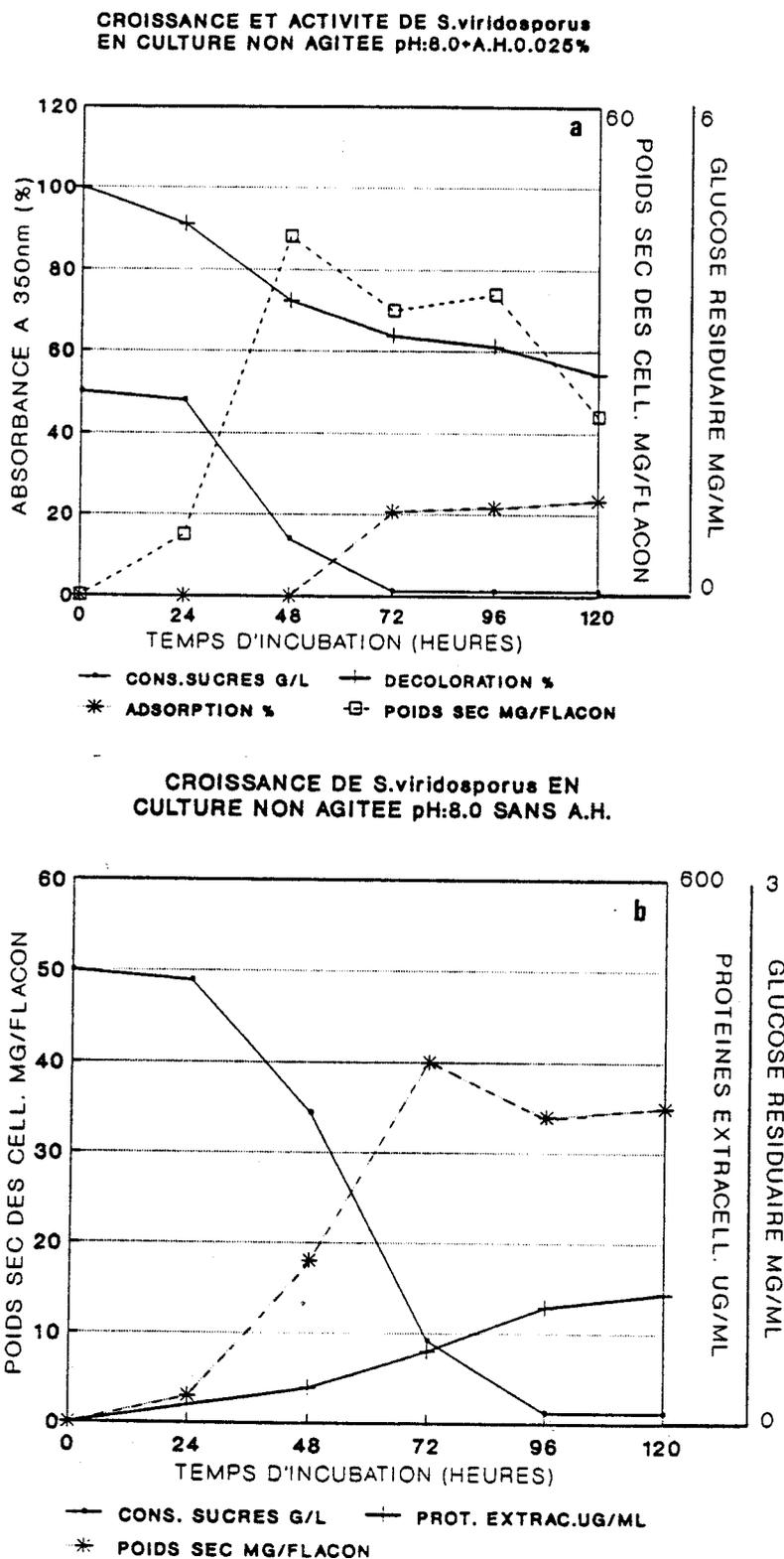
En absence d'acides humiques (Fig. 3b), la croissance de *S. viridosporus* apparaît plus tardivement mais elle est beaucoup plus importante. En relation avec cette période de latence, la consommation du glucose est décalée dans le temps.

**CROISSANCE DE *S. viridosporus* EN
CULTURE AGITEE pH:8.0 SANS A.H.**



La figure 4 montre les résultats obtenus en cultures non agitées. Le poids sec varie très peu que l'on soit ou non en présence d'acides humiques, mais la période de latence déjà observée est plus marquée que pour les cultures agitées (approximativement 24 h). Elle apparaît également dans le suivi de la consommation du glucose. La décoloration dans ces cultures statiques est moins rapide et également plus faible.

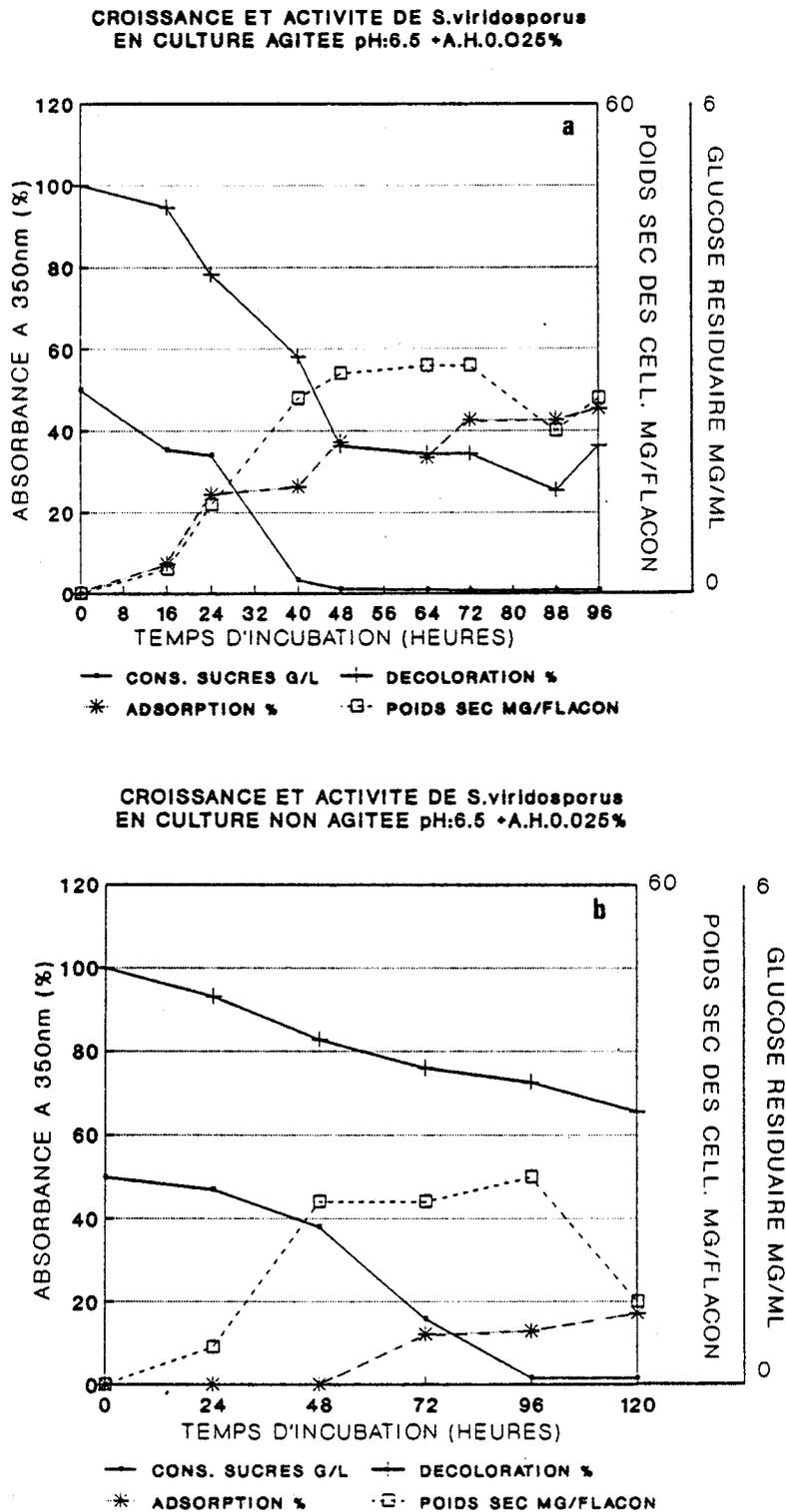
Figure 4



2 - Le milieu TP

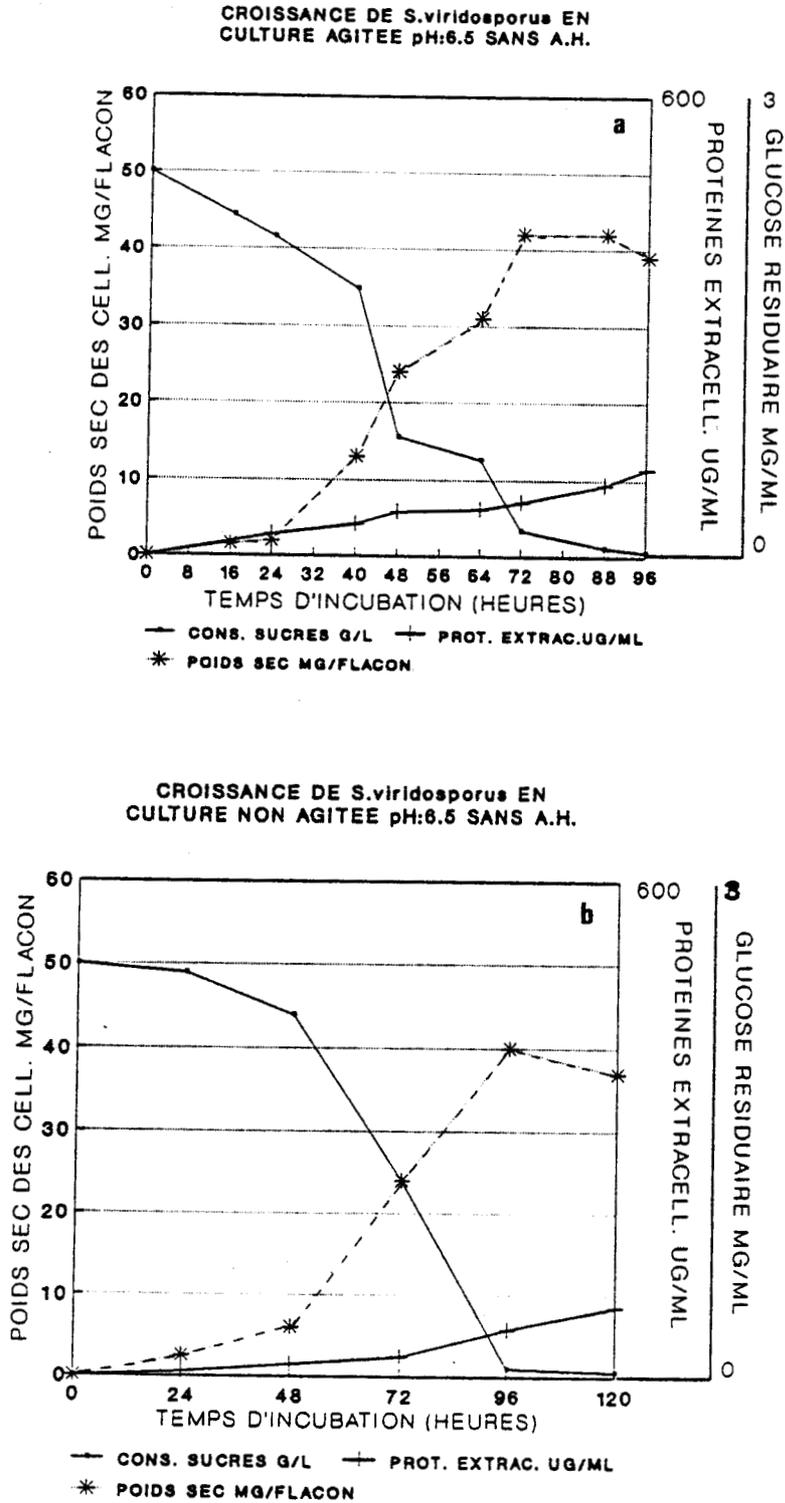
Comme le montre la figure 5, les résultats obtenus avec ce milieu légèrement acide sont comparables avec ceux obtenus avec le milieu TK. La vitesse de décoloration des cultures contenant les acides humiques est exactement la même en culture agitée, mais cette vitesse est plus faible en culture statique.

Figure 5



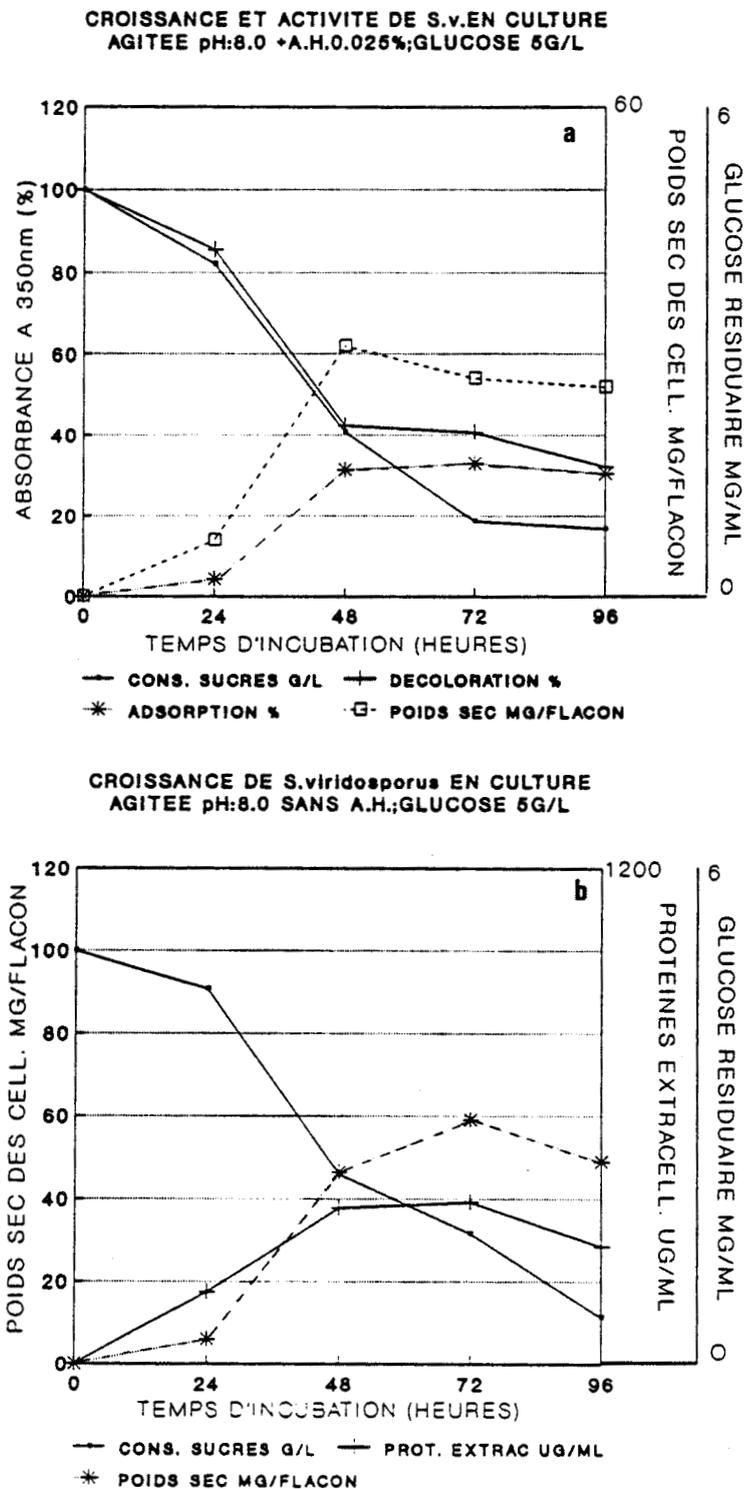
Dans les cultures sans acides humiques, on constate que la quantité de protéines extracellulaires est très différente (Fig. 6). En comparaison avec les cultures correspondantes effectuées à pH 8, elle est de 40 % à 70 % plus faible.

Figure 6



Compte-tenu de la consommation rapide du glucose, observée dans les cultures agitées (Figs 3 et 5), de nouvelles expériences ont été conduites avec le milieu TK mais en augmentant la concentration du glucose à 5 g/l. La figure 7 montre que dans ces cultures, la croissance de *S. viridosporus* et la production de protéines extracellulaires sont particulièrement importantes mais aucune différence significative n'a été observée quant à la vitesse de décoloration des acides humiques.

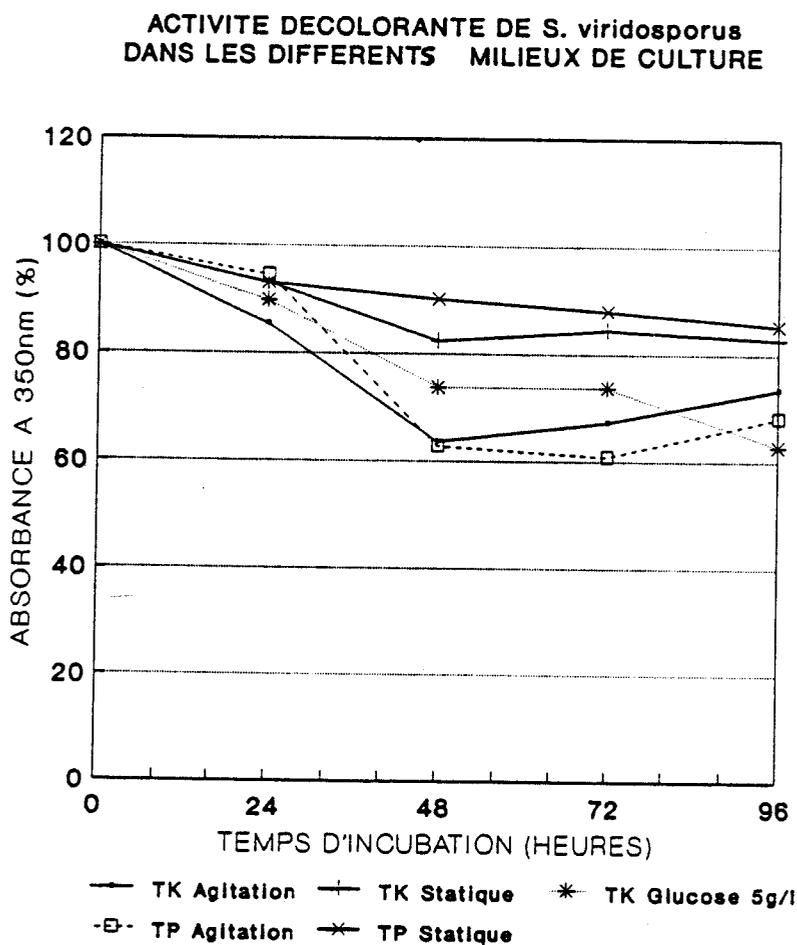
Figure 7



Lorsque *S. viridosporus* est cultivé dans des milieux ne contenant que les acides humiques comme seule source de carbone, on observe, après 48 h, une croissance résiduelle (4 à 5 mg de cellules/flacon), sans évolution future au cours de l'incubation (168 h). Par ailleurs, lorsque l'azote minéral est remplacé par une quantité équivalente d'azote organique (asparagine), aucune différence significative n'est observée dans les résultats.

Si on compare maintenant ces différentes conditions de culture, on remarque que les valeurs corrigées des décolorations (avec soustraction des molécules adsorbées sur les bactéries) atteignent approximativement le même maximum, mais à des temps d'incubation différents (Fig. 8).

Figure 8



En ce qui concerne l'influence du pH sur l'activité de *S. viridosporus*, le tableau 5 montre que cette activité peut être obtenue dans une gamme de pH allant de 6,5 à 8,5, avec de faibles différences relatives à la production de biomasse et à l'adsorption des molécules humiques sur les bactéries. Lorsque

le pH est inférieur à 6,5, la croissance bactérienne et l'activité décolorante deviennent vite insignifiantes. Notons, également, qu'aucune variation de pH par rapport au pH initial n'est observée au cours de l'incubation dans ces milieux.

Tableau 5

pH Initial	% de décoloration du milieu de culture	% des molécules humiques adsorbées aux cellules (b)	Poids sec des cellules mg/flacon
8.5	59.6 ±3.2	53.5	27.9 ±1.7
8.0	68.5 ±2.3	49.5	30.6 ±1.8
7.5	64.7 ±2.5	56.6	29.9 ±0.5
7.5 (c)	60.6 ±2.2	47.8	32.4 ±2.7
7.0	54.9 ±3.7	56.1	31.5 ±2.5
6.5	58.9 ±1.5	51.4	29.7 ±1.8
/.0	11.5 ±3.6	35.4	6.0 ±1.0

(a)= Moyenne de trois réplicats.

(b)= Pourcentage des molécules humiques adsorbées aux cellules donné par rapport à la décoloration totale du milieu de culture.

(c)= Changement du tampon Tris-HCl au tampon Phosphate de Na/K

Enfin, des expériences d'incorporation d'acides humiques (à raison de 0,25 %) dans une culture agitée âgée de 64 h montrent une adsorption rapide de ces acides humiques sur les "pellets" bactériennes (Tab. 6). Après une incubation d'une heure, les acides humiques récupérés par le traitement des "pellets" avec la NaOH correspondent exactement à la valeur de la décoloration du milieu de culture et ce n'est qu'après 3 h d'incubation qu'une décoloration "vraie" (non imputable à l'adsorption) peut être révélée.

Tableau 6

Temps (heure)	% de décoloration	% d'adsorption
1	8.46 ±1.40	7,88 ±0,60
2	16,11 ±2,18	N,D
3	16,88 ±1,02	14,02 ±1,83
6	17,50 ±0,98	12,04 ±1,03

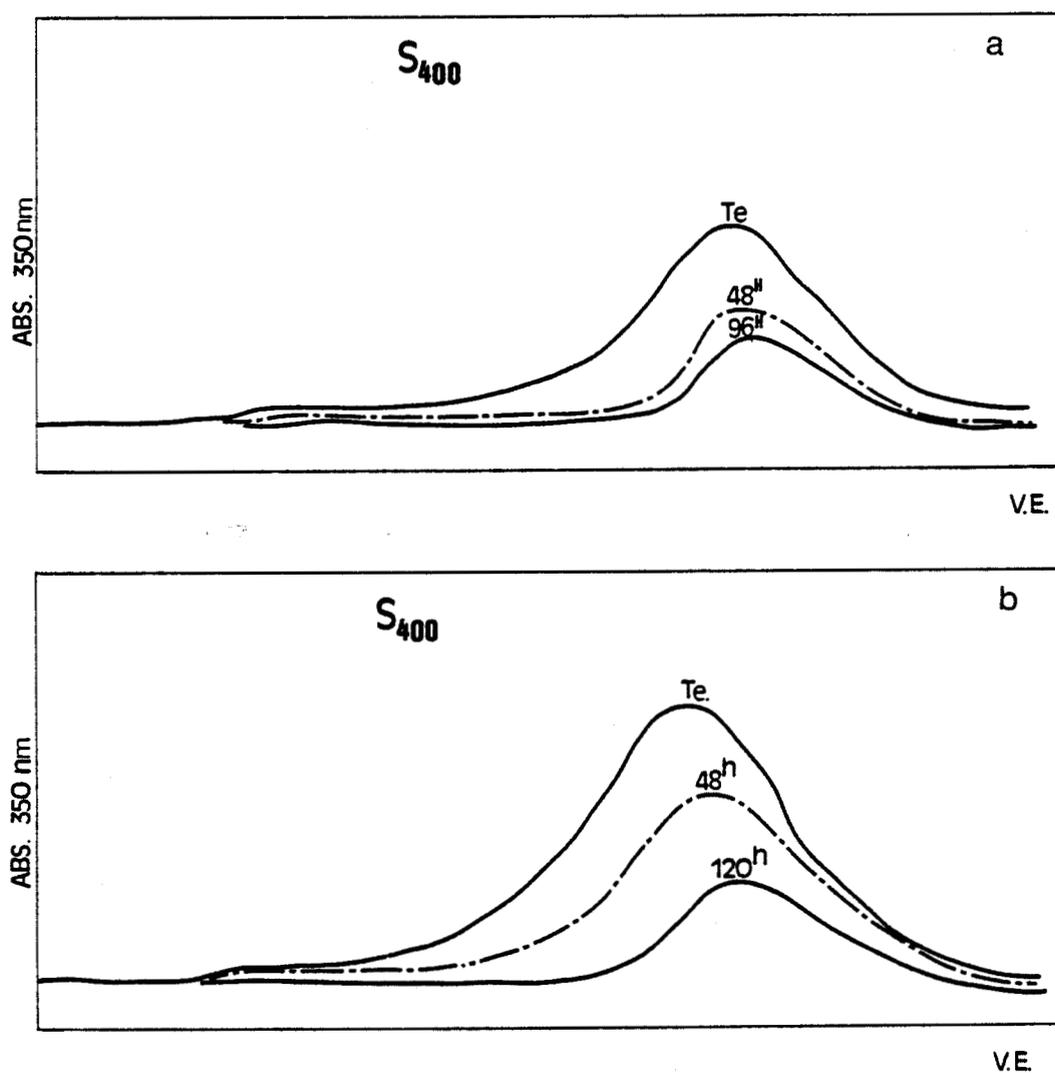
La décoloration et l'adsorption sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité d'acide humique initiale.

N.D= Non déterminé.

B. - Changements dans la polydispersion des acides humiques

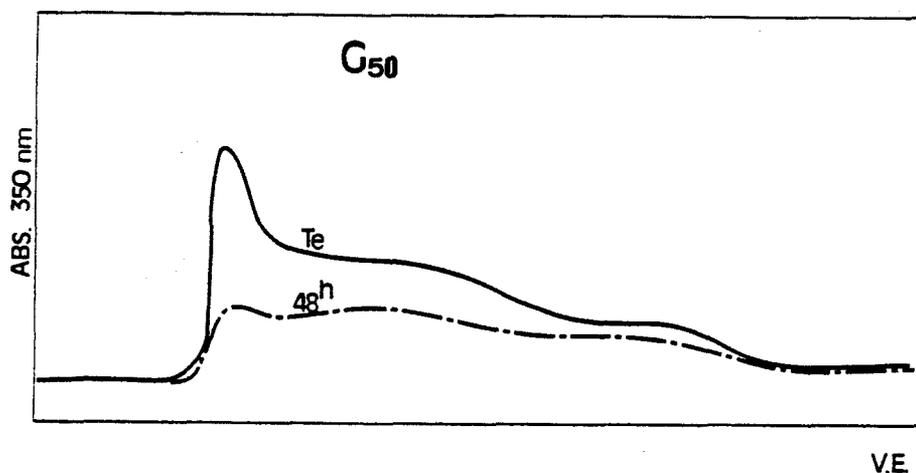
Les variations dans la polydispersion des acides humiques ont été étudiées à intervalles réguliers au cours de l'incubation. La figure 9 présente les changements de poids moléculaires obtenus après 48 et 96 h d'incubation à pH 8 sous agitation (9a) et après 48 et 120 h d'incubation à pH 8 sans agitation (9b). Les courbes obtenues à 72 et 96 h sous agitation étaient similaires ; en condition statique, des modifications mineures dans les profils des courbes étaient enregistrées à 48, 72 et 96 h d'incubation.

Figure 9



On note une réduction relative des poids moléculaires dominants après incubation, mais ces modifications sont beaucoup plus évidentes pour les poids moléculaires élevés. Aucune accumulation des composés à faible poids moléculaire n'est cependant enregistrée avec le Séphacryl S400 ; le passage des acides humiques sur Séphadex G50 (Fig. 10) conduit à la même conclusion.

Figure 10



Enfin, les témoins montrent que la réduction des hauts poids moléculaires ne résulte pas d'une liaison sélective de ces molécules sur les cellules bactériennes.

C. - Production de $^{14}\text{CO}_2$

L'apport de ^{14}C -mélanoïdine à différents moments de l'incubation dans les cultures agitées, réalisées avec le milieu TK, permet d'évaluer l'activité minéralisatrice (quantité de $^{14}\text{CO}_2$ produite) pendant une période définie (4 h), en fonction de l'âge de la culture. Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent une activité maximale entre 48 et 72 h d'incubation ; cette activité correspond (Fig. 3) au moment où la croissance est la plus importante. En considérant l'activité spécifique (quantité de $^{14}\text{CO}_2$ produit par mg de bactéries), les cultures de 24 h s'avèrent dans ce cas être les plus efficaces. On remarque aussi, dans ce tableau 7, que la présence de l'alcool vératrylique dans les milieux de culture n'apporte pas de variations significatives.

Tableau 7

Temps d'incubation (heures)	Conditions de culture. (b)	
	Sans alcool veratrylique	Avec alcool veratrylique
24	816 ±118	790 ±103
48	1343 ±77	1107 ±87
72	1266 ±143	1427 ±126
96	951 ±57	1235 ±31
120	1022 ±125	1013 ±92
168	638 ±111	752 ±44
Te (c)	183 ±23	

(A)=Résultat en dpm: moyenne de trois réplicats.

(b)=Culture agitée sans acide humique.

(c)= ^{14}C -melanoidine dans le milieu de culture nonensemencé.

Lorsque les expériences sont effectuées avec les filtrats de cultures, une légère activité minéralisatrice est enregistrée ; cette activité reste non significative, même en présence d'hydrogène peroxyde (0,1 mM). Des résultats identiques ont été obtenus avec des filtrats de cultures conduites en présence d'acides humiques ou d'alcool vératrylique incorporés au début de la culture.

Dans ces expériences, nécessitant le piégeage du $^{14}\text{CO}_2$ issue de la minéralisation de la ^{14}C -mélanoïdine par *S. viridosporus*, les valeurs élevées de $^{14}\text{CO}_2$ obtenues avec les témoins (milieu de culture non ensemencé) nous ont intrigué. Nous avons pu en trouver la raison : il s'agit d'une autooxydation due à la présence du cobalt et du manganèse dans les milieux.

D. - Activité enzymatique des filtrats de cultures

La présence de peroxydases extracellulaires a été mise en évidence dans nos deux milieux de culture. Les tableaux 8 et 9 donnent les résultats des activités enzymatiques obtenus avec les cultures réalisées dans le milieu TK, respectivement sous agitation et en condition statique.

Tableau 8

ACTIVITE ENZYMATIQUE DU FILTRAT DE CULTURE AGITEE (PH=8.0) DE *S. VIRIDOSPORUS* EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'ACIDE HUMIQUE.

Temps d'incubation (heures)	Activité enzymatique avec les substrats (10^{-3}u. enz./ml) suivants		
	NNN'N'T.M.P.D.	2,6 D.M.P	2,4 D.C.P.
48	19,30 \pm 1,1 (10,15 \pm 0,7)	13,11 \pm 1,0 (2,90 \pm 0,9)	2,02 \pm 0,5 (1,75 \pm 0,3)
64	20,75 \pm 1,9 (11,10 \pm 0,9)	24,80 \pm 2,2 (3,15 \pm 0,6)	0,57 \pm 0,1 (1,05 \pm 0,3)
72	3,95 \pm 0,4 (16,95 \pm 4,0)	21,10 \pm 2,1 (24,00 \pm 1,9)	1,12 \pm 0,1 (1,03 \pm 0,2)
88	9,25 \pm 2,7 (76,45 \pm 9,5)	29,70 \pm 4,8 (22,35 \pm 3,9)	1,52 \pm 0,1 (1,01 \pm 0,2)
96	14,15 \pm 2,2 (80,80 \pm 12,2)	33,20 \pm 5,0 (24,40 \pm 4,1)	1,54 \pm 0,3 (3,02 \pm 0,4)

(a)=Les valeurs entre parenthèses indiquent celles correspondant aux cultures sans acide humique. (Les résultats sont la moyenne \pm SD de deux réplicats de culture).

NNN'N'T.M.P.D.=NNN'N'Tetramethyl-p-phenylènediamine.

2,4 D.C.P.=2,4-Dichlorophenol. 2,6 D.M.P.=2,6-Dimethoxyphenol.

Tableau 9

ACTIVITE ENZYMATIQUE DU FILTRAT DE CULTURE NON AGITEE (PH:8,0) DE *S. VIRIDOSPORUS* EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'ACIDE HUMIQUE. (A)

Temps d'incubation (heures)	Activité enzymatique avec les substrats (10 ⁻³ U.enz./ml) suivants		
	NNN'N'T.M.P.D.	2,6-D.M.P.	2,4-D.C.P.
48	54,45 ±3,6 (20,35 ±0,4)	24,80 ±3,1 (27,10 ±2,1)	2,11 ±0,4 (3,96 ±1,0)
72	59,80 ±8,8 (8,75 ±3,9)	16,95 ±3,6 (14,35 ±1,5)	5,02 ±1,1 (0,99 ±0,4)
96	30,10 ±6,3 (10,40 ±0,5)	12,90 ±1,8 (15,51 ±1,3)	1,12 ±0,3 (1,50 ±0,4)
120	32,85 ±1,5 (19,65 ±0,5)	18,75 ±2,0 (24,50 ±1,5)	1,12 ±0,3 (1,50 ±0,4)

(a): Les valeurs entre parenthèses indiquent celles correspondant aux cultures sans acide humique. (Les résultats sont la moyenne ±SD de deux réplicats de culture).

Avec le N-N-N'-N'-tétraméthyl-p-phénylène-diamine, les filtrats provenant des cultures réalisées en présence d'acides humiques présentent toujours une activité enzymatique élevée qui décroît en fonction du temps d'incubation. Le phénomène inverse est observé pour les cultures incubées en absence d'acides humiques.

Les résultats obtenus avec le 2,6-diméthoxyphénol sont assez proches quelle que soit l'origine des cultures et ne montrent que des variations mineures au cours de l'incubation, exceptée la faible activité enzymatique relevée au début de l'incubation avec les cultures exemptes d'acides humiques. Notons que pour ces essais, l'oxydation du 2,6-diméthoxyphénol n'était pas optimale en absence du MnSO₄.

Avec le 2,4-dichlorophénol, de très faibles activités enzymatiques ont été enregistrées dans les différentes conditions expérimentales.

Les tableaux 10 et 11 montrent les résultats obtenus avec le milieu TP. On constate que ceux-ci sont presque toujours inférieurs à ceux obtenus avec le milieu TK, bien qu'évoluant de la même manière ; néanmoins, avec le N-N-N'-N'-tétraméthyl-p-phénylène-diamine, on a une augmentation de l'activité enzymatique au cours de l'incubation pour les milieux contenant les acides humiques et incubés en condition statique.

Tableau 10

ACTIVITE ENZYMATIQUE DU FILTRAT DE CULTURE AGITEE (PH:6.5) DE *S. VIRIDOSPORUS* EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'ACIDE HUMIQUE. (A)

Temps d'incubation (heures)	Activité enzymatique avec les substrats. (10 ⁻³ U.enz./ml) suivants.		
	NNN'N'T.M.P.D.	2,6-D.M.P.	2,4-D.C.P.
48	8,11 ±0,98 (7,00 ±1,30)	2,09 ±0,48 (1,25 ±0,51)	0 0
64	6,35 ±2,00 (6,40 ±1,20)	1,11 ±0,50 (0,53 ±0,13)	0 (0,55 ±0,09)
72	3,60 ±2,25 (5,10 ±0,75)	0 (0,51 ±0,03)	0 0
88	ND (15,35 ±2,40)	6,80 ±2,30 (8,70 ±1,55)	1,03 ±0,24 (2,01 ±0,52)
96	4,75 ±1,05 (28,60 ±3,15)	9,10 ±2,05 (16,41 ±4,70)	2,51 ±0,50 (1,50 ±0,25)

(a): Les valeurs entre parenthèses indiquent celles correspondant aux cultures sans acide humique. (Les résultats sont la moyenne ±SD de deux réplicats de culture).

Tableau 11

ACTIVITE ENZYMATIQUE DU FILTRAT DE CULTURE NON AGITEE (PH:6.5) DE *S. VIRIDOSPORUS* EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'ACIDE HUMIQUE. (A)

Temps d'incubation. (heures)	Activité enzymatique avec les substrats (10 ⁻³ U.enz./ml) suivants.		
	NNN'N'T.M.P.D.	2,6-D.M.P.	2,4-D.C.P.
48	19,15 ±4,80 (11,30 ±0,46)	1,10 ±0,20 (1,00 ±0,15)	0 0
72	27,95 ±2,85 (4,65 ±2,16)	1,00 ±0,18 (1,00 ±0,20)	0 (0,51 ±0,11)
96	43,00 ±2,60 (4,65 ±0,42)	1,02 ±0,20 (0,50 ±0,15)	0,49 ±0,11 (0,48 ±0,09)
120	41,35 ±1,72 (6,75 ±0,89)	0,50 ±0,17 (1015 ±0,20)	1,09 ±0,12 (0,53 ±0,08)

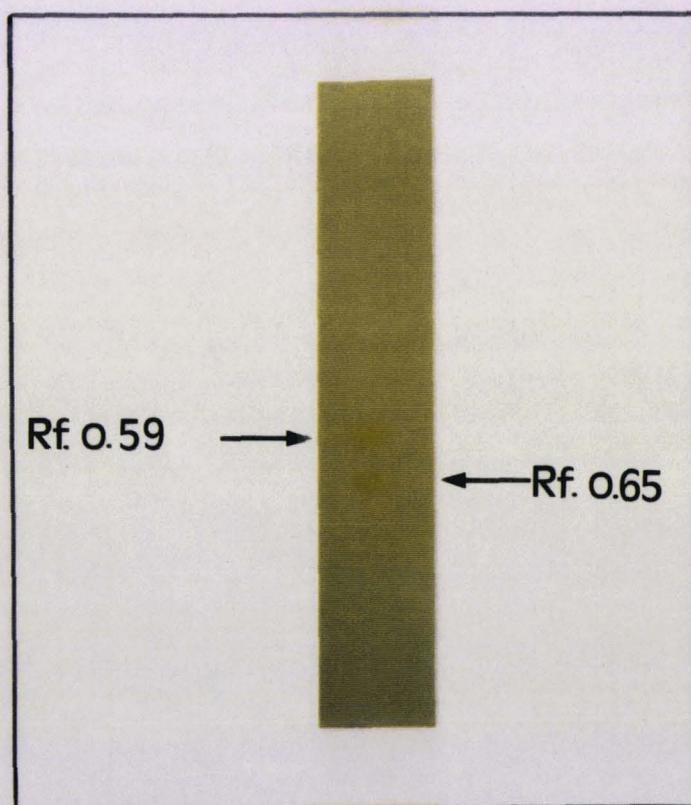
(a): Les valeurs entre parenthèses indiquent celles correspondant aux cultures sans acide humique. (Les résultats sont la moyenne ±SD de deux réplicats de culture).

Il faut enfin remarquer qu'aucune activité enzymatique n'a été obtenue à pH 8 ou à pH 5 avec d'autres substrats communément utilisés pour les peroxydases tels le 2-méthoxyphénol, le 1,4-diméthoxybenzène, le 3,3'-diméthoxy benzidine (O. dianisidine), le 1,2-dihydroxybenzène (catéchol), le 3,3'-diaminobenzidine et le 4-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-3-buten-one (vanillyl-acétone) ; pour ce dernier, les résultats sont négatifs aussi bien en absence qu'en présence de Mn^{2+} .

Les dosages effectués avec l'alcool 3,4-diméthoxybenzylique (alcool vératrylique) à pH 5 ont donné des résultats faibles et irréguliers pour l'ensemble des conditions culturales.

La figure 11 présente le résultat obtenu en électrophorèse. Deux bandes d'activité peroxydasique de Rf 0,59 et 0,65 sont révélées avec le 2,6-diméthoxyphénol comme substrat.

Figure 11



III. - DISCUSSION

La composition des milieux de cultures utilisés ici a été améliorée au cours de plusieurs essais au laboratoire car, la décoloration des molécules humiques sans adsorption de celles-ci sur les cellules bactériennes est difficile à obtenir. Les modalités de cette adsorption ne sont pas encore connues mais un phénomène similaire a déjà été décrit pour d'autres microorganismes (RUOCCO et BARTON, 1978).

Les résultats indiqués ci-dessus montrent donc que *S. viridosporus* est capable de décolorer les acides humiques en culture "batch". Cette décoloration nécessite la présence du glucose. Lorsque les cultures sont conduites avec les acides humiques comme seule source de carbone, la croissance résiduelle qui est obtenue peut s'expliquer par l'intervention des enzymes extracellulaires telles que les cellulases, les xylanases et les estérases produites par la bactérie (DEOBALD et CRAWFORD, 1987), qui permettrait l'assimilation de certaines fractions non aromatiques présentes à la périphérie des molécules humiques.

L'activité décolorante de *S. viridosporus* est plus importante en culture agitée ; de plus, elle est favorisée par les pH neutre à alcalin, entre 6,5 et 8,5. L'adsorption des molécules humiques sur les bactéries peut se comprendre car, dans la nature, les acides humiques se trouvent sous forme de composés insolubles associés aux cations métalliques ou aux colloïdes minéraux (MARTIN et al., 1980).

Une consommation rapide du glucose a été observée dans les cultures, mais l'augmentation de la concentration en glucose n'entraîne curieusement aucune décoloration supplémentaire ; ce phénomène peut s'expliquer par l'adsorption des molécules humiques sur les bactéries qui, à partir d'une certaine croissance, inhiberait les échanges cellulaires et les activités des enzymes liées aux membranes.

Si la présence de ces acides humiques peut entraîner des perturbations au niveau de la croissance et de l'activité bactérienne après un certain temps d'incubation, elle provoque au contraire une stimulation de la croissance et de l'assimilation du glucose au début de l'incubation. Ce phénomène est observable dans toutes les conditions expérimentales employées, y compris lorsque la concentration du glucose est plus élevée ; mais dans ce cas, les différences sont moins marquées. Cette action secondaire des acides humiques sur l'activité des bactéries hétérotrophes a déjà été remarquée par VISSER (1985) et BLONDEAU (1988) ; les résultats de HENSEN (1985) et TRANVIK (1988 et 1989) peuvent aussi être partiellement expliqués par cette action des acides humiques car ces auteurs constatent une activité bactérienne plus élevée dans l'eau des lacs incubée en présence de quantités importantes de substances humiques, en comparaison avec des cultures équivalentes contenant une quantité faible de molécules humiques. HAYAKAWA et NONOMURA (1987) ont d'autre part montré que les spores d'actinomycètes du sol sont activées au cours de leur germination par les acides humiques. Cette activité des acides humiques peut être attribuée à leurs propriétés surfactantes et chélatantes mises en évidence par CHEN et SCHNITZER (1978), TSCHAPEK et al. (1981) et LOBARTINI et al. (1988), qui induisent une amélioration des échanges entre les cellules bactériennes et le milieu environnant.

La dégradation des acides humiques par *S. viridosporus* est liée à la croissance et semble être dépendante du métabolisme primaire de la bactérie. Ce processus de dégradation est donc différent de celui de *Phanerochaete chrysosporium*, qui est caractéristique du métabolisme secondaire (BLONDEAU, 1989).

La mise en évidence d'une capacité minéralisatrice proprement dite par une culture ou par un filtrat de culture a été facilitée, dans notre cas, par l'utilisation de la ^{14}C -mélanoïdine. Dans ces expériences, l'alcool vératrylique a été utilisé comme inducteur d'enzymes de type lignine-péroxydase (CRAWFORD et al., 1987). Contrairement à *P. chrysosporium*, l'alcool vératrylique s'est montré inefficace sur la stimulation de l'activité minéralisatrice ; les très faibles activités minéralisatrices données par les filtrats de *S. viridosporus* prouvent que les deux microorganismes interviennent de façon différente sur les acides humiques.

A propos des essais enzymatiques, nous avons essayé, comme RAMACHANDRA et al. (1988), de mesurer l'activité lignine-péroxydase de nos filtrats de culture avec le 2,4-dichlorophénol ; il a été préféré à l'alcool vératrylique en raison de sa haute sensibilité ; de plus, d'après TIEN et al. (1986), les essais d'oxydation de l'alcool vératrylique donnent des activités difficilement appréciables à pH supérieur à 5. En se référant aux travaux de PASZCZYNSKY et al. (1986), le 2,6-diméthoxyphénol permet la mise en évidence des Mn-péroxydases.

Ces analyses enzymatiques montrent la présence de peroxydases dans le filtrat de *S. viridosporus*, mais l'activité lignine-péroxydase est très faible en comparaison des résultats obtenus par RAMACHANDRA et al. (1988) et de PASTI et al. (1990) qui ont utilisé la même bactérie mais en l'incubant dans un milieu contenant une quantité relativement importante d'extrait de levure. Dans nos expériences, nous avons vérifié l'absence d'interaction entre les acides humiques et le 2,4-dichlorophénol mise en évidence par BOLLAG et al. (1980).

L'activité Mn-péroxydase décelée avec le 2,6-diméthoxyphénol est intéressante à considérer car, en présence des groupements OH-phénoliques, ces enzymes agissent en générant les Mn^{3+} à partir du Mn^{2+} (GLEN et GOLD, 1985 ; PASZCZYNSKI et al., 1986) ; ces ions Mn^{3+} peuvent alors diffuser et oxyder *in situ* des composés complexes telles que ces molécules d'acides humiques.

Les importantes activités obtenues avec le N-N-N'-N'-tétraméthyl-p-phénylène-diamine s'expliquent par la spécificité plus large des peroxydases vis-à-vis de ce substrat.

PARTIE IV

ACTIVITE DE

STREPTOMYCES viridosporus

CULTIVE EN

PRESENCE D'OXYGENE PUR

INTRODUCTION

Si les cultures de *Streptomyces viridosporus*, incubées en présence d'air, dégradent les acides humiques, on peut toutefois noter une forte adsorption des molécules humiques sur les pellets en cultures agitées et une formation importante de mycélium aérien (métabolisme secondaire) dans les cultures statiques. En outre, la faible activité enzymatique révélée dans les filtrats de cultures représente un argument supplémentaire à l'appui d'une modification des conditions de culture de cette bactérie.

Etant donné que la minéralisation des acides humiques semble avant tout dépendre d'un métabolisme de type oxydatif, avec une intervention possible des formes activées de l'oxygène ou de radicaux libres, nous avons donc essayé de cultiver le *S. viridosporus* en présence d'une atmosphère d'oxygène pur. Les premiers résultats étant encourageants, nous avons poursuivi un certain nombre d'expériences au cours desquelles des modifications étaient apportées au milieu de culture et parallèlement recherché l'activité des extraits acellulaires de cette bactérie.

I. - MATERIELS ET METHODES

A. - Croissance de *S. viridosporus* en présence d'acides humiques

Les cultures ont été conduites dans des flacons plasma de 500 ml contenant 50 ml de milieu TK. Après inoculation par les spores de *S. viridosporus*, ces flacons sont fermés par des bouchons de caoutchouc sertis d'une capsule en aluminium, puis ensuite purgés stérilement pendant 1 à 2 min par environ 10 l d'oxygène pur. Cette opération est renouvelée chaque jour pendant toute la durée de l'incubation. Ces cultures, réalisées en présence d'oxygène, ont été menées dans des milieux complémentés selon le cas par du glucose (0,25 ou 0,5 %), de l'extrait de levure (0 ; 0,1 ou 0,6 %), de Tween 80 (0,05 %) ou de Triton X100 (0,1 %) et du NH_4NO_3 (0,2 ou 0,4 g/l). Dans l'un des essais, le glucose a été remplacé par une quantité équivalente (en carbone) de pyruvate, d'acétate, de lactate ou de citrate.

Nous avons également étudié l'influence de différents ions divalents (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , ...). Etant donné l'importance du fer dans les différents enzymes ou transporteurs, impliqués dans le métabolisme induit par la présence de cet excès d'oxygène, nous avons essayé de comparer la teneur des sidérophores des cultures conduites sous oxygène par rapport aux cultures classiques incubées sous air. Ces sidérophores ont été recherchés dans des milieux de cultures déficients en fer selon la méthode proposée par SCHWYN et NEILAND (1987). Le principe de la méthode consiste en une libération d'un colorant (chrome azuro) lié au fer par un ligand (sidérophore) pour lequel l'affinité est plus forte pour le fer, selon l'équation :



L'absorbance est mesurée à 630 nm.

B. - Etude de la minéralisation : utilisation de la mélanoïdine ^{14}C

La mélanoïdine ^{14}C est utilisée, ici encore, pour apprécier l'activité minéralisatrice proprement dite. Les cultures contenant cette mélanoïdine ^{14}C (0,01 %, P/V) sont incubées pendant 96 h à 35°C. Au terme de cette incubation, les cellules sont centrifugées (4 000 g pendant 15 min) ; les culots cellulaires sont remis en suspension dans une solution de NaOH 0,01 N puis à nouveau centrifugés ; cette étape de lavage est renouvelée 2 fois. Les surnageants sont mélangés et amenés à 100 ml avec la solution de lavage. Les cellules sont, quant à elles, traitées avec 5 ml d'acide sulfurique concentré pendant environ 16 h ; les lysats obtenus sont amenés à 50 ml avec la solution de NaOH 0,01 N. La radioactivité des différentes solutions est alors mesurée par comptage en scintillation liquide. Le pourcentage de minéralisation est exprimé en comparaison avec des cultures non inoculées, incubées dans les mêmes conditions.

C. - Préparation et utilisation des extraits acellulaires

1 - Préparation des extraits acellulaires

Les bactéries cultivées dans le milieu TK sont récupérées sur filtre nylon, lavées 2 fois à l'eau distillée puis placées dans le tampon succinate de sodium

20 mM, pH 5,5. Elles sont alors traitées pendant 9 min aux ultrasons (Branson Sonifer B30). Les extraits acellulaires sont obtenus par centrifugation réfrigérée du broyat de sonication à 50 000 g pendant 30 min. Le surnageant est ensuite filtré (porosité 1 μm) et conservé à 4°C (= extrait brut).

Ces extraits bruts ont été purifiés selon le protocole proposé par MAGNUSSON et al. (1991) avec quelques modifications. Les extraits sont saturés à 40 % par du sulfate d'ammonium et laissés pendant 6 h à 4°C. Après une centrifugation réfrigérée à 30 000 g pendant 30 min, les culots sont rejetés et les surnageants sont à nouveau traités avec du sulfate d'ammonium jusqu'à 90 % de saturation, puis centrifugés comme précédemment. Les culots récupérés sont solubilisés dans le tampon succinate 20 mM, pH 5,5, dialysés pendant 18 h contre le même tampon puis conservés à 4°C pour les analyses.

2 - Activité des extraits acellulaires

Ces extraits sont utilisés dans deux cas : soit pour déceler leur activité de décoloration en présence des acides humiques ou leur activité de minéralisation en présence de mélanoidine ^{14}C , soit pour la recherche de la présence d'enzymes.

Dans le premier cas, les extraits acellulaires proviennent de cultures âgées de 96 h (dépourvues d'acides humiques). Les expériences ont été menées dans des flacons plasma de 125 ml contenant 10 ml de mélange réactionnel composé de : tampon succinate 50 mM, pH 5,5 ; extraits acellulaires (3 à 4 mg de protéines/ml) ; acides humiques (0,01 %, P/V) ou mélanoidine ^{14}C (0,005 %, P/V) ; certains flacons reçoivent en plus du MnSO_4 (0,1 mM) et de l'hydrogène peroxyde (0,1 mM). Les flacons sont alors incubés à 37°C pendant 18 h en présence d'air ou d'oxygène. La décoloration est mesurée à 350 nm ; des flacons, contenant l'extrait acellulaire traité à 100°C pendant 5 min et incubés dans les mêmes conditions, servent de témoins.

Dans le deuxième cas, les enzymes recherchés dans les extraits acellulaires sont des oxydases et des peroxydases. L'activité enzymatique est appréciée en utilisant des substrats à une concentration de 1 mM (le N-N-N'-N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine : TMPD et le N-N-diméthylphénylènediamine : DMPD) en

présence ou non d'hydrogène peroxyde 0,05 mM selon le système enzymatique. Dans le cas des peroxydases, la réaction est initiée par l'apport de l'hydrogène peroxyde ; les réactions sont suivies pendant 7 min à 30°C au spectrophotomètre. Des échantillons, contenant l'extrait préalablement traité à 100°C pendant 5 min, servent de témoin. Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzymes nécessaires pour apporter une variation d'une unité de densité optique par minute. Certains essais sont réalisés en présence de $MnSO_4$ (0,1 mM) ; le tampon utilisé est le succinate (50 mM) à pH 6 et pH 5. Les réactions sont suivies à 610 nm pour le TMPD et à 515 nm pour le DMPD.

Les protéines totales ont été séparées par électrophorèse non dénaturante en gradient (6-12 %) d'acrylamide. Pour ce travail, les extraits ont été concentrés de façon à obtenir une solution d'environ 12 mg de protéines/ml. Des protéines standard (Sigma) ont également été employées pour l'estimation des poids moléculaires.

Pour la révélation des enzymes, les substrats, précédemment cités, ont été utilisés. Après un bref lavage des gels dans de l'eau distillée, ceux-ci sont immergés soit dans une solution contenant du tampon succinate 50 mM pH 6, du TMPD 4 mM en présence ou non de H_2O_2 4 mM, soit dans une solution composée de : tampon succinate 50 mM pH 6, DMPD 6 mM, $MnSO_4$ 0,1 mM et H_2O_2 4 mM. Après un séjour d'environ 10 min à 37°C, les bandes d'activité enzymatique apparaissent colorées.

Les protéines totales sont révélées par la coloration au bleu de coomassie R-250 dans le mélange méthanol-eau-acide acétique (45-45-10) selon la méthode de SWITZER et al. (1979).

Pour la recherche des cytochromes P-450, les bactéries ont été soniquées dans le tampon phosphate 100 mM pH 7,4. L'extrait acellulaire a été obtenu selon la méthode proposée par TROWER et al. (1988) avec une modification puisque la phényl-méthyl-sulfonylfluoride (PMSF), inhibiteur des protéases à sérine, a été remplacée par la L-1-tosylamide-2-phényl-éthylchlorométhyl ketone (TPCK).

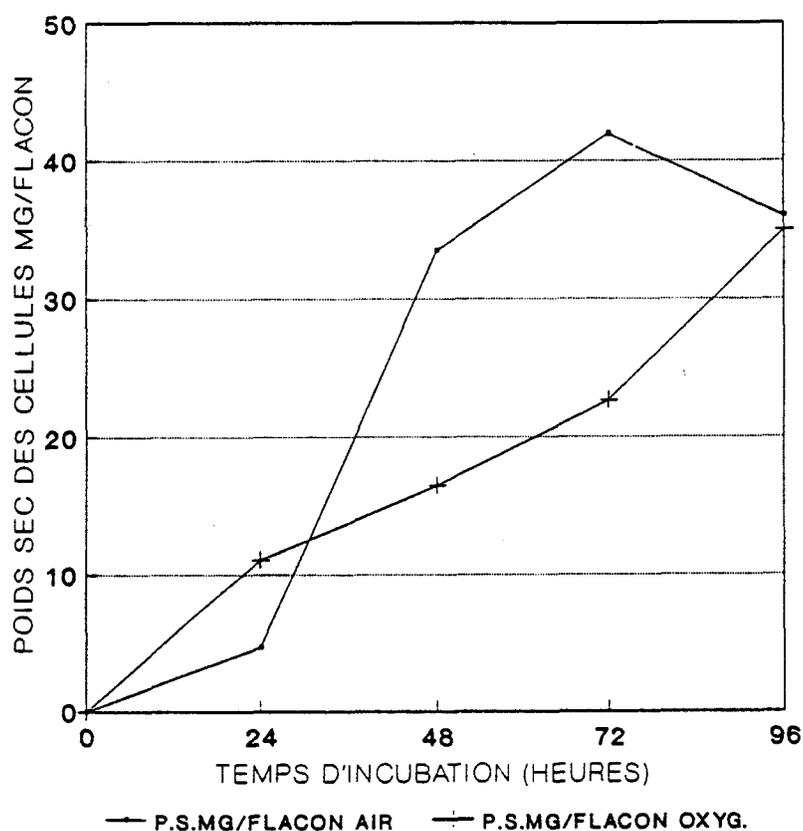
II. - RESULTATS

A. - Croissance de *S. viridosporus* et décoloration des acides humiques

La figure 12 présente la croissance de *S. viridosporus* en présence d'oxygène ou d'air, dans les cultures dépourvues d'acides humiques. On remarque que la croissance démarre plus rapidement en présence d'oxygène et qu'elle augmente régulièrement au cours de l'incubation. En aérobiose classique, la culture devient nettement plus importante à 48 h d'incubation puis se stabilise. Il est très important de signaler que pour les cultures purgées avec l'oxygène, elles sont totalement dépourvues de mycélium aérien. Ces résultats sont également obtenus quand les cultures contiennent les acides humiques (0,025 %, P/V).

Figure 12

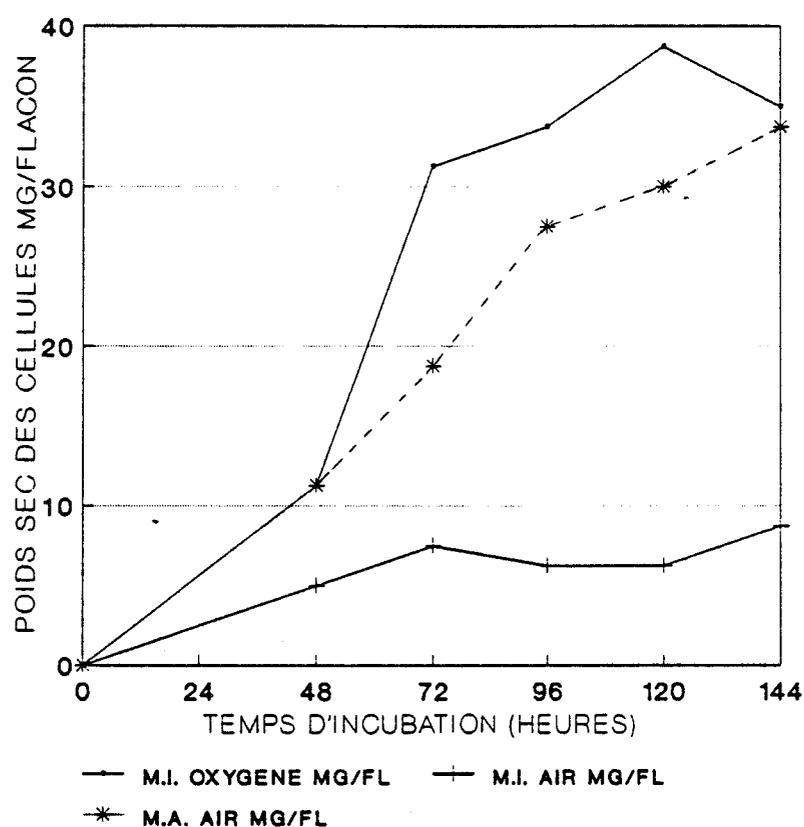
CINETIQUE DE CROISSANCE DE *S.v.A* pH:8.0
SOUS OXYGENE ET SOUS AIR



Lorsque, dans une nouvelle expérience, nous faisons la différence entre le mycélium aérien et le mycélium immergé, nous constatons (Fig. 13) que le mycélium immergé prend de l'importance à 48 h d'incubation pour les cultures menées en présence de 100 % d'oxygène, alors que dans les cultures sous air, le mycélium aérien est beaucoup plus important. Lorsque l'on considère l'ensemble de la biomasse, elle est plus faible au début et en fin d'incubation pour les cultures en présence d'oxygène.

Figure 13

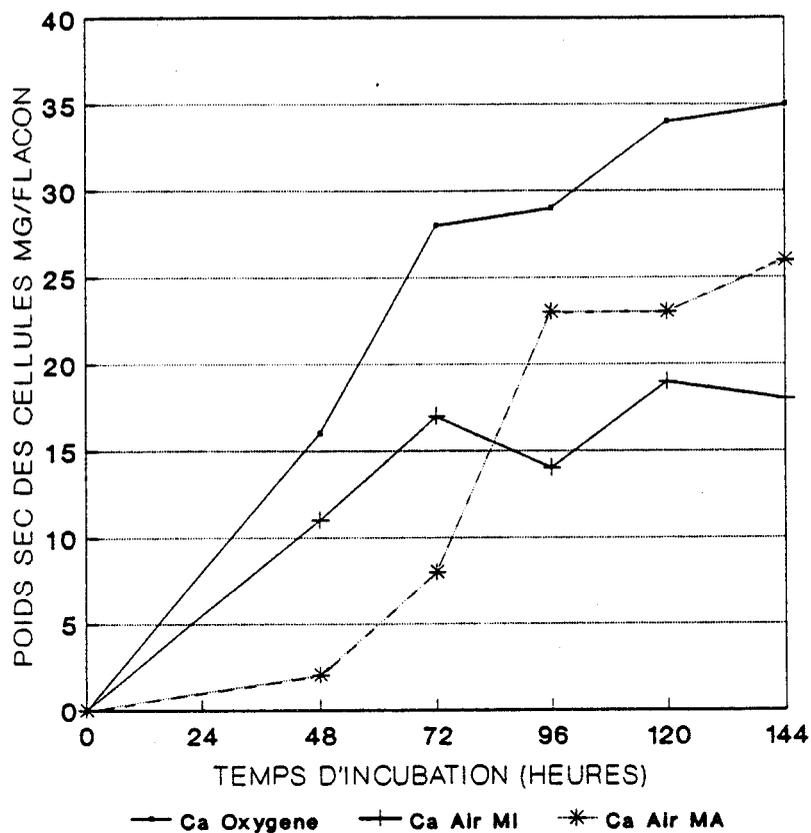
DEVELOPPEMENT DES MYCELIUM AERIEN ET
IMMERGE DE *S.v.* SOUS OXYGENE ET AIR



En présence d'une concentration plus importante en CaCl_2 (5 mM), les résultats de la figure 14 montrent que la croissance (mycélium aérien + mycélium immergé) de *S. viridosporus* est plus importante que celle des milieux ne contenant que 0,5 mM de CaCl_2 et ce surtout en fin de culture ; le mycélium immergé est ici 2 à 4 fois plus important.

Figure 14

INFLUENCE DU CALCIUM ET DE L'OXYGENE
SUR LA CROISSANCE DE *S. viridosporus*



La décoloration observée dans les milieux contenant les acides humiques et incubés en présence d'oxygène (Fig. 15) est plus importante que celle des milieux incubés en aérobiose classique.

En comparaison avec les résultats précédents (Fig. 15), la décoloration dans les milieux contenant du CaCl_2 5 mM (Fig. 16) est plus importante que dans les cultures correspondantes ayant la concentration classique de CaCl_2 , mais l'adsorption des acides humiques sur le mycélium est beaucoup plus intense.

Figure 15

ACTIVITE DECOLORANTE DE S.v.EN CULTURE
A pH:8.0 +A.H.0.025% SOUS OXYGENE ET AIR

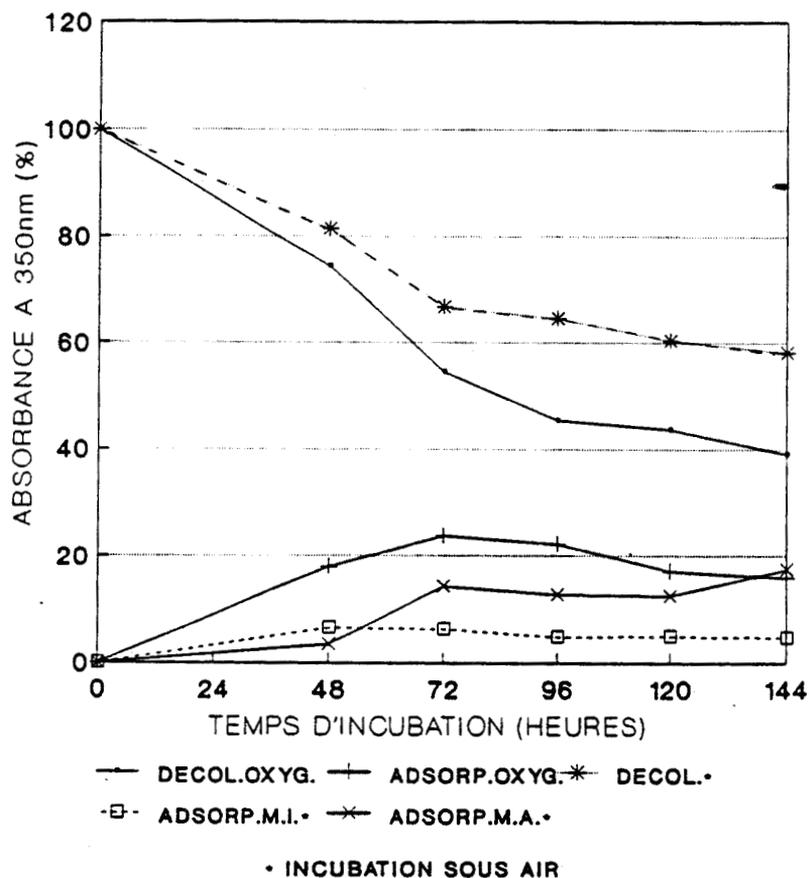
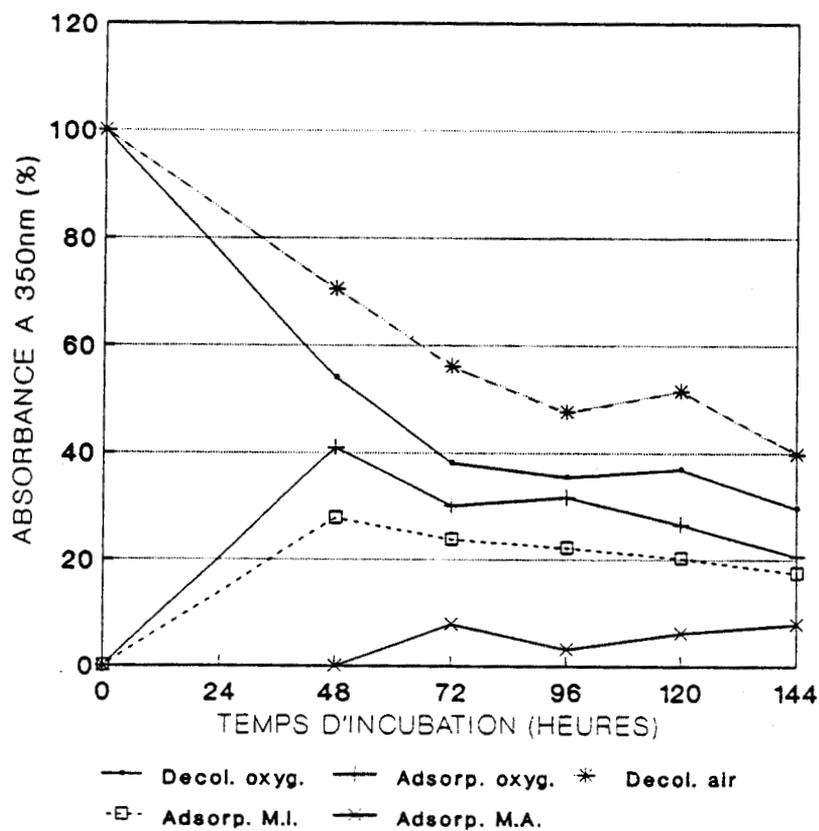


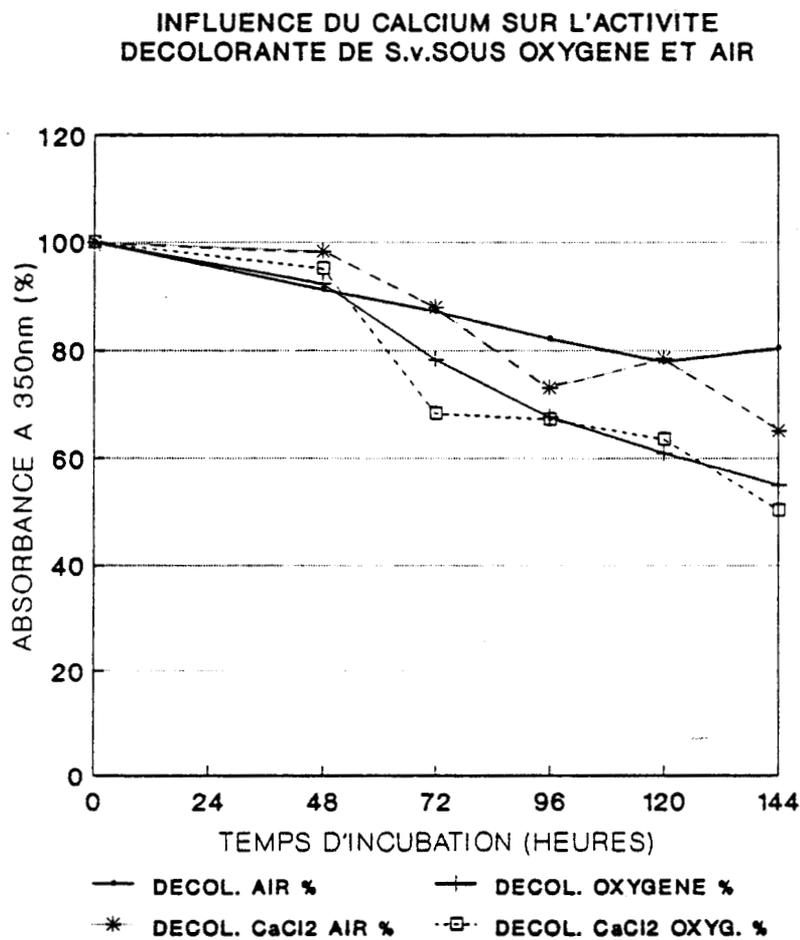
Figure 16

ACTIVITE DECOLORANTE DE S.v.EN PRESENCE
DE CaCl₂•5mM SOUS OXYGENE ET AIR.



Si l'on exprime maintenant la décoloration nette en défalquant la décoloration due aux molécules humiques adsorbées sur les bactéries (Fig. 17), on constate qu'elle n'est pas très différente les 48 premières heures de l'incubation. Si l'activité décolorante de *S. viridosporus* semble être régulière pour les milieux contenant 0,5 mM de CaCl_2 , elle ne l'est pas pour ceux plus riches en CaCl_2 (5 mM). Les cultures traitées à l'oxygène sont toujours plus efficaces que les cultures correspondantes menées en aérobiose classique.

Figure 17

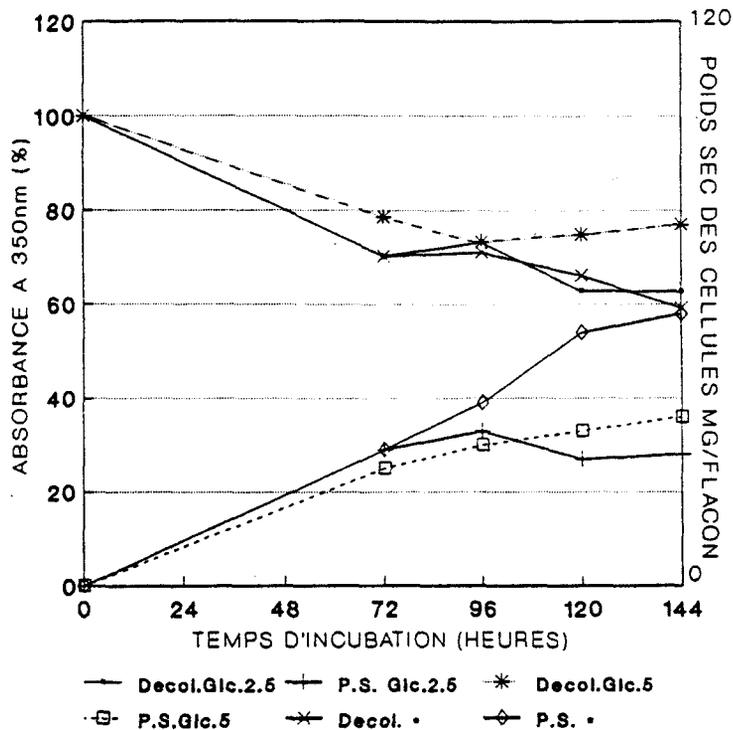


1 - Influence des sources de carbone et d'azote

Les résultats, représentés dans la figure 18, montrent qu'un apport de glucose (2,5 g/l) et de NH_4NO_3 (0,2 g/l), après 72 h d'incubation, stimule la croissance ; en comparaison avec les cultures plus riches en glucose (5 g/l), au début de l'incubation, la décoloration est aussi stimulée par cet apport.

Figure 18

CROISSANCE ET ACTIVITE DE S.v. SOUS
OXYGENE ;Glc-2.5 ET 5g/L;NH4=0.4g/l



* + Glc 2,5 g/l NH₄NO₃ 0,2 g/l à 72 h.

Le tableau 12 rassemble les résultats obtenus avec un apport d'extrait de levure dans les milieux de culture (avant leur inoculation). L'activité décolorante de *S. viridosporus* n'est jamais stimulée par cet apport, même lorsque la croissance est beaucoup plus élevée.

Tableau 12

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EXTRAIT DE LEVURE SUR LA CROISSANCE DE *S. VIRIDOSPORUS* ET LA DECOLORATION DU MILIEU DE CULTURE APRES 72 HEURES D'INCUBATION EN PRESENCE D'OXYGENE.

%w/v en extrait de levure	%de décoloration (a)	Poids sec des cellules (mg/flacon)
0%	29,31 ±1,05	33,67 ±2,36
0,05%	21,05 ±2,86	32,18 ±1,24
0,10%	27,58 ±0,01	49,53 ±0,42
0,25% (b)	17,24 ±3,72	29,47 ±1,17

(a):Les résultats de décoloration tiennent compte de la fraction des acides humiques adsorbées sur le mycelium.

(b):milieu exempt de glucose 0,25%.

Le Tween 80 et le Triton X100 ont été choisis ici car leurs propriétés chimiques pouvaient permettre la libération des enzymes de surface chez *S. viridosporus*. Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13

ACTION DU TWEEN 80 ET DU TRITON X 100 SUR LA DECOLORATION DU MILIEU DE CULTURE A PH 8.0

%w/v en tween 80 et en triton X 100	Temps d'incubation	
	4 jours	6 jours
0%	42,86	46,94
Tween 80 0,10	22,45	42,86
Tween 80 0,10 (a)	20,41	32,65
Tween 80 0,05	18,34	27,57
Tween 80 0,05 (a)	14,29	ND
Triton X 100 0,10	0	0
Triton X100 0,05	0	0
Triton X100 0,01 (a)	10,20	ND

(a):milieu exempt de glucose 0,25%w/v

La décoloration exprimée en pourcentage par rapport à la quantité d'acide humique initiale est la moyenne de deux réplicats.

Le lactate, le pyruvate, l'acétate et le citrate ont été pris comme substrats carbonés plus facilement utilisables que le glucose. Le tableau 14 indique les résultats donnés par ces composés. La tendance générale est à la baisse aussi bien pour la croissance que pour l'activité décolorante de *S. viridosporus*.

Tableau 14

DECOLORATION DU MILIEU DE CULTURE ET CROISSANCE DE *S. VIRIDOSPORUS* EN PRESENCE D'INTERMEDIARIES DU METABOLISME DU GLUCOSE APPORTES EN EQUIVALENT-CARBONE PAR RAPPORT AU GLUCOSE 0,25%w/v

Source de carbone	%de décoloration	Poids sec mg/flacon
Glucose	56,25 ±3,38	31,24 ±1,17
Pyruvate	10,42 ±2,94	15,82 ±0,96
Acetate	36,11 ±5,20	27,40 ±2,17
Lactate	5,56 ±0,98	4,13 ±0,21
Citrate	13,19 ±0,08	20,12 ±1,40

Les mesures sont effectuées après cinq jours d'incubation en présence d'oxygène et les résultats sont la moyenne ±SD de trois réplicats.

Les résultats de décoloration des milieux contenant la mélanoidine sont donnés dans le tableau 15 ; on remarque que ceux-ci sont toujours plus importants pour les cultures sous oxygène. Si la croissance est stimulée par la concentration en glucose ou par l'apport de l'extrait de levure, la biodégradation de la mélanoidine n'est pas pour autant augmentée.

Tableau 15

DECOLORATION DE LA MELANOIDINE (MGG) SOUS NOS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES PAR *S. VIRIDOSPORUS* APRES UNE PERIODE D'INCUBATION DE 96 HEURES DANS LE MILIEU TK

Conditions de culture.	% de décoloration du milieu	Poids sec mg/flacon
Ae	27,43 ±1,30	42,50 ±0,50
O ₂	41,32 ±4,28	38,17 ±1,41
O ₂ EL1	31,25 ±1,47	53,11 ±1,63
O ₂ G5	40,28 ±1,30	42,28 ±1,63

Les résultats sont la moyenne ±SD de trois réplicats. La décoloration est exprimée par rapport à des témoins non ensemencés incubés dans les mêmes conditions. (Ae: culture menée en aérobiose classique; O₂: culture menée en présence d'oxygène; EL1 et G5 milieu contenant respectivement de l'extrait de levure (0,1%w/v) et du glucose (0,5%w/v)).

2 - Influence des ions divalents

Le MnCl₂ est présent à différentes concentrations (0, 3 et 30 mg/l) dans les cultures en atmosphère d'oxygène pur car l'intervention d'une Mn-péroxydase était supposée dans la biodégradation des substances humiques ; en relation avec le manganèse, la déficience totale en calcium a été étudiée. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau 16. L'absence de ces ions semble affecter la croissance de *S. viridosporus* au début de l'incubation ; en ce qui concerne la décoloration, elle semble stimulée par le manganèse pour les mélanoidines alors qu'avec les acides humiques, elle est toujours importante.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MANGANESE ET EN CALCIUM SUR LA DECOLORATION DE LA MELANOÏDINE (MGG) ET DES ACIDES HUMIQUES INCUBES EN PRESENCE D'OXYGENE PAR *S. VIRIDOSPORUS*

Substrat	Milieu	Temps d'incubation (heures)			
		60		120	
		Décoloration	Poids sec	Décoloration	Poids sec
MGG	Te	36,05	32,50	32,94 ±1,27	29,42 ±1,12
	A	34,30	28,50	36,67 ±3,33	34,67 ±0,47
	B	35,47	35,25	41,96 ±1,48	37,67 ±0,47
	C	31,40	27,50	41,18 ±1,92	36,33 ±1,25
A.H.	Te	41,88	31,25	46,93 ±1,30	30,18 ±0,90
	A	35,47	26,50	51,46 ±1,09	36,04 ±0,58
	B	41,03	27,50	52,63 ±1,72	36,04 ±0,58
	C	23,08	23,75	35,53 ±1,04	31,50 ±0,84

Les résultats obtenus a 60 heures sont la moyenne de deux réplicats et a 120 heures sont la moyenne ±SD de trois réplicats. Te=milieu TK ; A, B, C sont le milieu TK contenant respectivement en mg/l MnCl₂:0 ; MnCl₂:30 ; CaCl₂:0.

La déficience en fer a été obtenue en procédant par des techniques d'épuisement par transferts successifs de spores en germination (culture de 24 à 48 h) dans des milieux dépourvus en fer ; au bout de 3 à 4 transferts, nous avons des milieux pratiquement exempts de fer pour lesquels la croissance était comparable aux milieux correspondants contenant du fer. Dans ces milieux, au bout de 72 h d'incubation, nos résultats montrent une inhibition d'environ 50 % de la dégradation des substances humiques.

Afin de mieux comprendre le rôle des ions divalents dans la biodégradation des substances humiques, nous avons essayé de les complexer en incorporant de l'EDTA à 0,5 mM dans nos milieux de culture ; la décoloration a été suivie au cours de l'incubation et le poids du mycélium sec a été mesuré en fin de culture (6 jours). Les résultats sont reportés dans le tableau 17. On remarque que si la croissance bactérienne est peu affectée, la biodégradation des acides humiques ou des mélanoidines est réduite énormément.

Tableau 17

INFLUENCE DE L'E.D.T.A. 0,5 MM SUR LA CROISSANCE DE *S. VIRIDOSPORUS* ET SUR LA DECOLORATION DE LA MELANOÏDINE (MGG) ET DES ACIDES HUMIQUES EN PRESENCE D'OXYGENE.

Substrats	Milieu	% de décoloration			Poids sec mg/flacon a 144 heures
		Temps d'incubation 48	96	(heures) 144	
MGG	Te	21,47 ±2,88	32,20 ±0,01	25,99 ±0,80	31,34 ±2,49
	E.D.T.A	9,60 ±1,20	14,12 ±1,60	16,38 ±2,11	29,67 ±1,25
A.H.	Te	24,11 ±1,00	44,20 ±1,36	45,29 ±2,23	28,67 ±1,27
	E.D.T.A	12,41 ±1,00	20,29 ±1,85	30,80 ±2,56	31,34 ±1,70

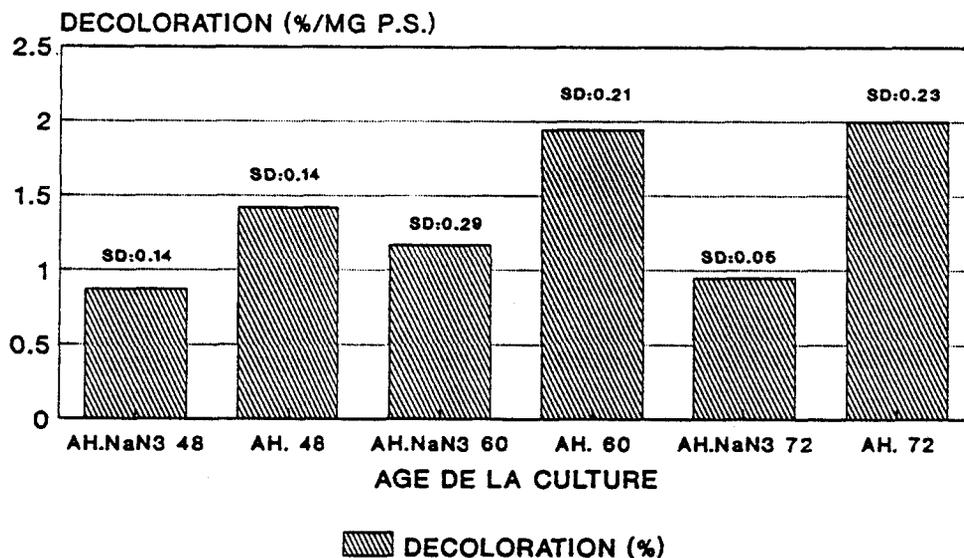
Te=milieu TK ; E.D.T.A.=milieu TK contenant l'E.D.T.A. (Les résultats sont la moyenne ±SD de trois réplicats. La décoloration est exprimée par rapport à des témoins non ensemencés incubés dans les mêmes conditions).

3 - Influence de l'azide de sodium

L'azide de sodium a été utilisé dans cette expérience afin de bloquer le métabolisme oxydatif de *S. viridosporus*. Les cultures sans acides humiques ont été incubées pendant une période plus ou moins longue ; puis les acides humiques sont incorporés à différents temps de l'incubation : la croissance et la décoloration sont mesurées 48 h après ; dans certains flacons, l'azide de sodium (NaN_3) est ajouté à raison de 5 mM en concentration finale, 12 h avant l'incorporation des acides humiques. Les résultats présentés dans la figure 19 montrent que la décoloration de ces milieux contenant de l'azide de sodium est environ 3 fois moins importante par rapport aux milieux n'en contenant pas (15 % et 48 % de décoloration respectivement). Cette figure représente la décoloration en fonction de la biomasse bactérienne, ce qui traduit mieux l'activité de *S. viridosporus*.

Figure 19

INFLUENCE DE NaN_3 SUR LA DECOLORATION DES A.H. PAR *S. viridosporus*



LES CULTURES RECOIVENT LES AH. 12H APRES
 NaN_3 ET LA DECOLORATION EST MESUREE
APRES 48 HEURES DE CONTACT.

4 - Utilisation des mycélium et de filtrats de culture

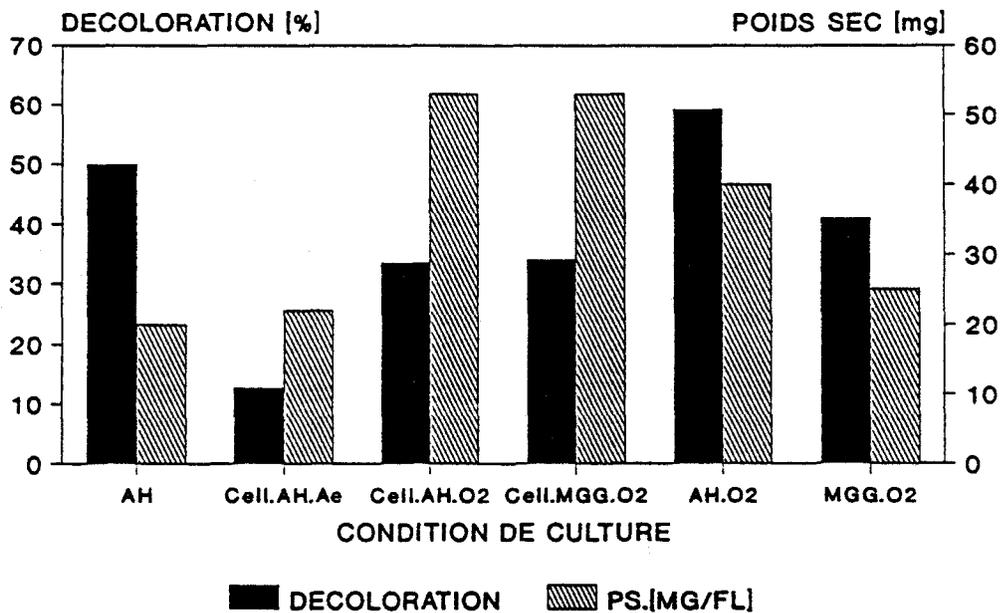
Dans cette expérience, les cultures sont menées sous oxygène en présence d'acides humiques ou de mélanoidines, jusqu'à l'obtention de 50 % de décoloration des acides humiques. Les cellules sont récupérées par centrifugation (2 000 g pendant 15 min) puis remises en suspension dans le

milieu TK dépourvu en fer, calcium et magnésium, de manière à les concentrer 10 fois. Cette suspension est alors incorporée dans un milieu neuf à 20 % en volume. Les surnageants sont, quant à eux, filtrés stérilement (porosité 0,45 μm), supplémentés avec le milieu TK concentré 10 fois (10 %, V/V) et inoculés avec une suspension de spores ; les cultures sont incubées à 35°C, la croissance de *S. viridosporus* et la décoloration des substances humiques sont suivies au cours de l'incubation pour les filtrats et évaluées après 72 h pour les cellules.

La figure 20 donne les résultats obtenus avec les cellules en comparaison des cultures inoculées avec des spores. On constate que, hormis les cultures menées en aérobiose classique, on a une augmentation du poids sec ; la biodégradation des substances humiques est, par contre, moins importante.

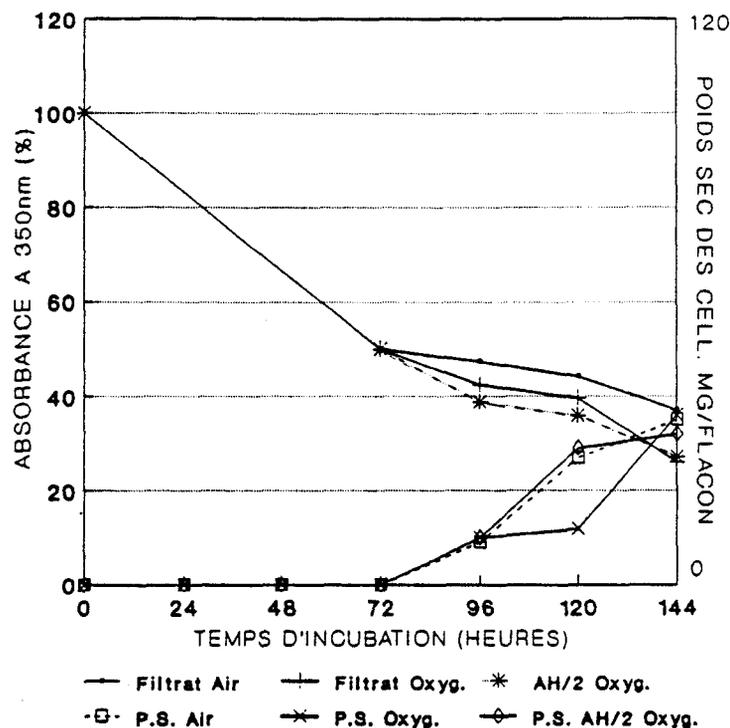
Figure 20

CROISSANCE ET ACTIVITE DECOLORANTE DES
CELLULES DE *S.v.* ISSUES DE CULTURE
DONNANT 50% DE DECOLORATION



Pour les filtrats (Fig. 21), on remarque que la décoloration des acides humiques se poursuit mais celle-ci est beaucoup plus faible que celle mesurée dans un milieu neuf où les acides humiques sont à une concentration presque semblable (0,0125 %).

Figure 21

CROISSANCE ET ACTIVITE DECOLORANTE
DE S.v SUR LES FILTRATS DE CULTURE

Dans une autre expérience de ce type, les cultures contenant les acides humiques ou non, ont été menées pendant 96 h en atmosphère d'oxygène. Les cellules sont alors récupérées comme précédemment et inoculées dans un milieu neuf. Le surnageant des cultures est pour partie conservé dans l'état, et pour partie dialysé avec des tubes (type Spectra por 6) dont les seuils de coupure sont de 1 000 d et 8 000 d respectivement. Les différentes fractions de dialyse ($< 1\ 000\ d$, $> 1\ 000\ d$, $< 8\ 000\ d$, $> 8\ 000\ d$) et la fraction non dialysée sont stérilisées par filtration (porosité $0,45\ \mu\text{m}$). Du milieu neuf concentré 5 fois est ajouté à ces filtrats (20 %, V/V) et du glucose à 0,25 % en concentration finale. Les solutions sont réparties dans des flacons stériles (50 ml/flacon) et sont inoculées avec une nouvelle suspension de spores. Les cultures sont alors incubées en atmosphère d'oxygène ou en aérobose classique ; l'apparition et la maturation du mycélium aérien (couleur verte) sont observées au cours de l'incubation, et ces observations sont données dans le tableau 18. Avec les cellules, aucune formation du mycélium aérien n'a été enregistrée, bien qu'une augmentation du poids sec (non mentionnée dans ce tableau) ait été observée ; dans les conditions d'aérobose classique, menées avec la suspension de spores, on a toujours formation et maturation du mycélium aérien.

Tableau 18

APPARITION ET/OU MATURATION DU MYCELIUM AERIEN DE *S. VIRIDOSPORUS* EN CULTURE DANS DES MILIEUX PREPARES A PARTIR DE MILIEU (PH:8.0) RECUPERES APRES 72 HEURES D'INCUBATION.

fraction de milieu utilisé.	Temps d'incubation (heures)				
	24	48	72	96	120
<1000	±	+	M	M	M
>1000	-	+	+	+	M
<8000	-	+	+	M	M
>8000	-	+	+	+	M
Cell 1	-	-	-	-	-
Filtr 1	-	+	+	+	M
Cell 2	-	-	-	-	-
Filtr 2	-	+	+	+	M
TK.	-	+ M	M	M	M

(Les différentes fractions de milieu utilisées sont obtenues après des filtrations sur GFC suivies ou non de dialyses.) - pas d'apparition de mycelium arien

±=faible apparition ; +=bonne apparition ; M=maturation des spores.

1 et 2 cultures respectivement sans et avec acides humiques 0.025%.

5 - Utilisation de la mélanoïdine ^{14}C

Le tableau 19 montre les résultats obtenus avec la mélanoïdine radioactive. On remarque que la décoloration est plus importante dans les cultures contenant 5 mM de CaCl_2 mais que c'est aussi dans ces cultures que le taux de minéralisation est le plus faible.

Tableau 19

DECOLORATION ET MINERALISATION DE LA ^{14}C -MELANOÏDINE PAR *S. VIRIDOSPORUS* APRES 96 HEURES D'INCUBATION DANS LE MILIEU TK.

Milieu	% de décoloration	% de minéralisation
O ₂	22,62 ±1,20	13,47 ±0,63
Ae (a)	15,79 ±1,38	11,48 ±0,95
Ca 5	40,44 ±4,43	9,26 ±1,76
EL 1	20,01 ±4,85	12,04 ±0,80
G 5	26,06 ±3,57	13,72 ±1,57

(a): culture menée en aerobiose classique; Ca ,EL 1 ,G 5 ,milieu contenant respectivement: CaCl_2 5mM ;extrait de levure 1 g/l et glucose 5 g/l

Les résultats de décoloration et de minéralisation sont la moyenne ±SD de trois réplicats par rapport a des témoins non ensemencés incubés dans les mêmes conditions.

B. - Activité des extraits acellulaires

Les résultats de l'activité des extraits acellulaires sont présentés dans le tableau 20. Ils montrent que ces extraits sont actifs sur les acides humiques et que la décoloration se réalise plus facilement lorsque l'incubation s'effectue sous atmosphère normale que sous oxygène pur. Les essais de minéralisation de la mélanoïdine n'ont cependant donné de succès.

Tableau 20

DECOLORATION DES ACIDES HUMIQUES SOUMIS A L'ACTION DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *S. VIRIDOSPORUS*.

Conditions	Ae (a)	O ₂ (a)	Ae	O ₂	P.Ae (a)	P.O ₂ (a)
% de décoloration	23,62 ±2,03	14,62 ±1,29	29,89 ±1,58	26,39 ±3,08	34,08 ±1,23	32,76 ±0,88

(a) :milieu contenant H₂O₂:100 µM et MnSO₄:100 µM . P=extrait acellulaire purifié comme indiqué dans Matériels et méthodes. Les résultats sont exprimés par rapport à des milieux contenant les extraits dénaturés par la chaleur et sont la moyenne ±SD de trois réplicats.

Les activités enzymatiques ont été mesurées après 48 h, 72 h et 96 h d'incubation. Le tableau 21 présente les résultats obtenus avec le TMPD exprimés en milliunités (10⁻³ U.enzymatique) par mg de protéines. Cette activité est très importante dans les extraits provenant des cultures âgées de 48 h et réalisées sous oxygène (non complémentées avec l'extrait de levure). A partir de 72 h, elle devient comparable à celle qui est mesurée dans les extraits des cultures réalisés sous air.

Tableau 21

ACTIVITE ENZYMATIQUE DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *S. VIRIDOSPORUS* A DIFFERENTS MOMENTS DE L'INCUBATION ET DOSABLE PAR LE NNN'N' TETRAMETHYL-P-PHENYLENEDIAMIQUE.

Age de la culture	Condition de culture			
	Ae (a)	O ₂ (a)	A.H. O ₂	EL 4 O ₂ (a)
48 Heures	438,01 ±25,29	1085,78 ±179,65	ND	312,99 ±28,39
72 Heures	445,18 ±78,02	515,29 ±87,73	456,05 ±52,72	157,87 ±21,99
96 Heures	646,78 ±138,02	635,33 ±174,46	ND	ND

Les résultats exprimés sont en mU/mg de protéines et sont la moyenne ±SD de trois réplicats. (a) :milieu sans acide humique. ND non déterminé. EL 4: milieu contenant 4g/l d'extrait de levure.

Les activités données par le DMPD (Tab. 22) sont assez faibles en comparaison avec les précédentes mais la valeur la plus élevée est encore obtenue avec les extraits provenant des cultures aérobies incubées pendant 48 h. Le $MnSO_4$ n'apporte aucune stimulation des activités enzymatiques.

Tableau 22

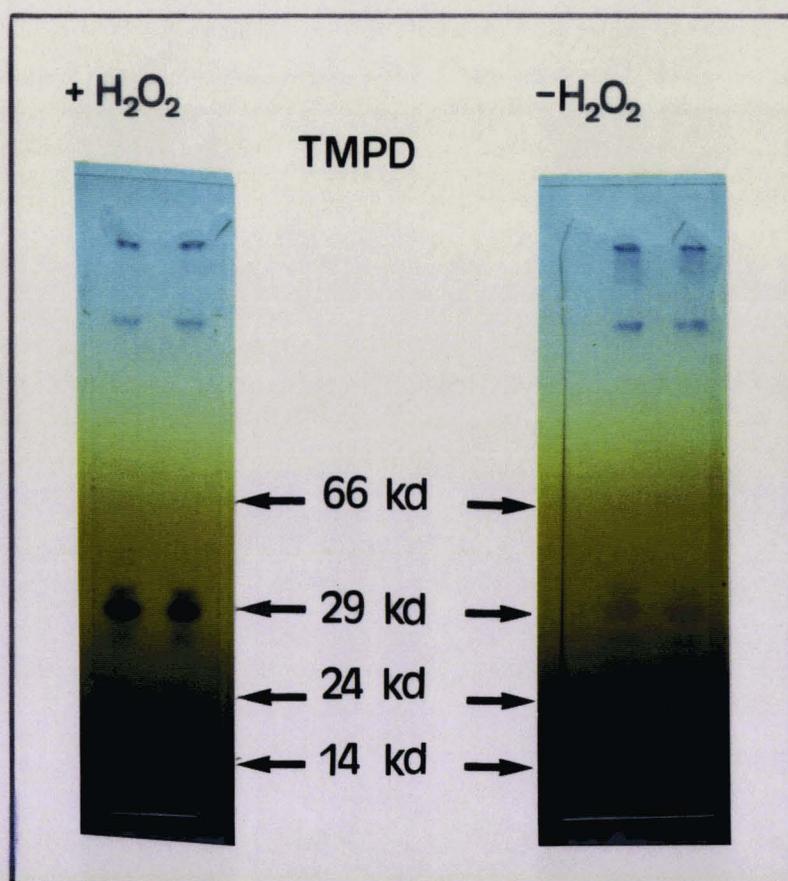
ACTIVITE ENZYMATIQUE DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE *S.VIRIDOSPORUS* A DIFFERENTS MOMENTS DE L'INCUBATION ET DOSABLE PAR LE NN DIMETHYL-P-PHENYLENEDIAMINE.

Age de la culture	Condition de culture			
	Ae (a)	O ₂ (a)	A.H. O ₂	EL 4 O ₂
48 Heures	25,01 ±3,72 (23,42 ±5,65)	34,74 ±6,10 (38,03 ±5,27)	ND (ND)	3,48 ±0,47 (ND)
72 Heures	22,79 ±2,83 (23,15 ±3,99)	22,79 ±1,16 (19,95 ±2,01)	20,94 ±3,42 (22,21 ±2,96)	1,80 ±0,46 (1,53 ±0,53)
96 Heures	30,56 ±5,39 (ND)	16,19 ±1,54 (ND)	ND (ND)	ND (ND)

Les résultats exprimés sont en mU/mg de protéines et sont la moyenne ±SD de trois réplicats. (Les valeurs entre parenthèses représentent les dosages effectués en présence de $MnSO_4$ 100uM.)
(a)=milieu sans acides humiques .ND=non déterminé.

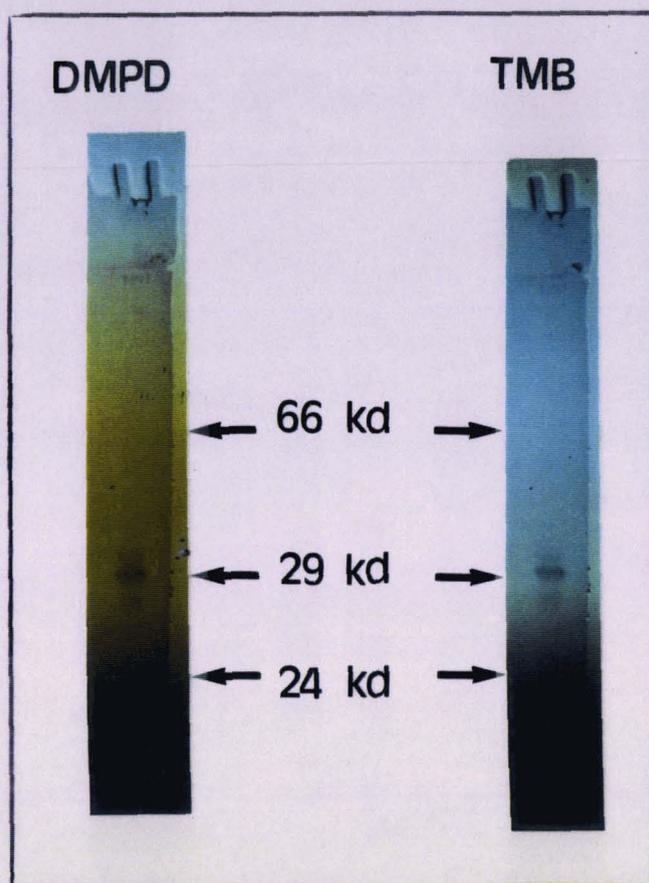
La figure 22 présente le profil électrophorétique révélé avec le TMPD. En absence d'hydrogène peroxyde dans le mélange de révélation, on note l'apparition de 4 bandes d'activité assez distinctes les unes des autres, alors qu'en présence d'hydrogène peroxyde, 3 nouvelles bandes apparaissent.

Figure 22



Avec le DMPD (Fig. 23), 3 bandes d'activité centrées autour de 29 000 d sont révélées.

Figure 23



Enfin, la recherche du cytochrome P450 n'a donné aucun résultat positif après plusieurs essais réalisés à partir de différents extraits acellulaires.

III. - DISCUSSION - CONCLUSION

A. - Croissance de *S. viridosporus* et biodégradation des substances humiques

En cultivant *S. viridosporus* en présence de 100 % d'oxygène, nous remarquons une inhibition de la formation du mycélium aérien. Le fait que le poids sec des cellules cultivées sous atmosphère d'oxygène soit inférieur à celui des cellules provenant des cultures en aérobiose classique peut se comprendre car, au cours de la formation du mycélium aérien, on a accumulation d'éléments minéraux nécessaires à la formation des spores.

S. viridosporus, cultivé en présence d'oxygène, ne produit plus de mycélium aérien lorsqu'il est transféré dans un milieu neuf et incubé dans les conditions d'aérobiose classique. En utilisant les filtrats des cultures en présence d'oxygène, nous avons essayé de vérifier si seule l'action de l'oxygène était à

considérer dans cette inhibition. De fait, le retard de la formation de mycélium aérien dans les cultures menées avec les différentes fractions de filtrats et inoculées par des spores laisse suggérer l'existence d'un facteur extracellulaire présent dans ces filtrats.

La décoloration des acides humiques et les mesures de la radioactivité de la mélanoidine ^{14}C montrent que *S. viridosporus* minéralise les substances humiques. Dans nos conditions expérimentales, comme il était difficile de saturer les flacons en oxygène et en même temps de piéger le $^{14}\text{CO}_2$ produit par les bactéries, la minéralisation est mise en évidence par la diminution de la radioactivité dans les cultures.

La stimulation de l'activité bactérienne, en présence d'oxygène, a été signalée pour d'autres microorganismes par différents auteurs (REID et SEIFERT, 1982 ; THOMAS et PERA, 1983 ; RAMUNNI et al., 1987 ; LLYOD et al., 1987). Dans nos expériences, l'inhibition de la formation du mycélium aérien n'est pas levée en présence de CaCl_2 (5 mM), alors que, en présence d'air, MASAHIRO-NATSUME et al. (1989) trouvent une stimulation de la formation des spores chez les *Streptomyces* et SALAS et al. (1983) montrent une accumulation de ce calcium au cours de la formation du mycélium aérien.

La forte décoloration du milieu de culture, en présence de 5 mM de CaCl_2 , peut s'expliquer par l'adsorption des molécules humiques sur les cellules bactériennes, puisque la fraction humique décrochée avec NaOH 0,2 M est importante.

La stimulation de la croissance, observée avec 30 mg/l de MnSO_4 et avec le chlorure de calcium à 5 mM, est en accord avec les conclusions de ABBAS et EDWARDS (1989 et 1990) qui montrent le même phénomène avec *S. coelicolor* ; ces deux cations divalents, auxquels il faudrait ajouter le Mg^{2+} et le Fe^{2+} , interviendraient également de manière importante dans l'activité décolorante de *S. viridosporus* puisque l'apport de l'EDTA (0,5 mM), dans les milieux de culture contenant des substances humiques, réduit de manière significative leur décoloration. Les ions métalliques jouent un rôle important dans le métabolisme oxydatif et dans de nombreuses biosynthèses (WEINBERG, 1970 ; BEHAL, 1986).

L'inhibition de la décoloration du milieu par l'azide de sodium, révèle également l'importance du métabolisme oxydatif chez *S. viridosporus* ; le fait que cette inhibition soit plus importante avec les cultures plus âgées peut se comprendre car, pendant cette période, le métabolisme des bactéries est très peu orienté vers la production de biomasse.

Le Triton X100 s'est avéré particulièrement toxique pour *S. viridosporus*, mais cette toxicité ne surprend pas car c'est un solubilisant des membranes cellulaires. Dans notre cas, nous espérons favoriser, par sa présence, la libération des enzymes membranaires, comme avec le Tween.

L'extrait de levure est utilisé dans une gamme de concentration de 0,01 % à 0,6 % en présence ou non de glucose (0,25 %). La concentration en extrait de levure de 0,6 % correspond à la valeur utilisée par CRAWFORD et al. (1977) pour cultiver cette même bactérie dans le but de dépolymériser la lignine. La biodégradation des substances humiques n'est pas plus importante lorsque l'extrait de levure est incorporé seul dans les cultures ; par contre, celle-ci était nettement stimulée si le glucose est toujours présent dans le milieu. Ce phénomène se comprend puisque nos expériences prouvent que l'activité minéralisatrice est toujours étroitement dépendante du catabolisme du glucose. En cultivant *S. chromofuscus* A2 et *S. viridosporus* T7A, PASTI et al. (1991) montrent la relation entre la croissance, le pH du milieu, l'assimilation du glucose et des acides aminés dans le cadre de la dégradation de la lignine. Ils concluent que, dans le cas d'incorporation conjointe de glucose et d'acides aminés dans un milieu de culture, le glucose est préférentiellement utilisé et retarde ainsi l'assimilation des acides aminés.

Les autres substrats carbonés (lactate, acétate, pyruvate et citrate) ont été utilisés comme sources de carbone facilement assimilables, destinées à accélérer le métabolisme des bactéries (= dégradation des molécules humiques). Les résultats n'ont pas été concluants puisque la décoloration n'a pas été plus importante.

Le fait que la décoloration se poursuit dans les filtrats de culture réinoculés par une suspension de spores, laisse penser que le ralentissement de la décoloration observé autour de 96 à 120 h d'incubation n'est pas la

conséquence d'une dégradation sélective des molécules humiques mais serait dû à l'épuisement progressif du milieu de culture, associé à un vieillissement des cellules.

Les expériences, basées sur l'emploi de la mélanoidine ^{14}C , prouvent que les substances humiques sont bien minéralisées par *S. viridosporus* ; la méthode d'évaluation de la radioactivité associée aux cellules pouvait éveiller quelques critiques car le traitement par l'acide sulfurique concentré provoque, dans certains cas, des décarboxylations avec départ de CO_2 . Avec des témoins de lyse acide, nous avons pu montrer que dans nos conditions expérimentales, l'acide sulfurique n'entraînait aucune décarboxylation de la mélanoidine ^{14}C et que ce traitement conduisait à une lyse totale des mycéliums avec liquéfaction des constituants cellulaires et probablement des hydrolyses au niveau de la mélanoidine.

B. - Activité des extraits acellulaires

Avec les extraits acellulaires de *S. viridosporus*, nous avons mesuré une décoloration des acides humiques mais pas de minéralisation de la mélanoidine ^{14}C . Une inhibition des enzymes peut être envisagée et, dans cette hypothèse, d'autres polymères de synthèse, tels les polycondensats synthétisés par réactions d'autooxydation, devraient être testés.

Contrairement à notre attente, l'activité des extraits acellulaires a été moins importante en présence d'une atmosphère saturée en O_2 ; cette inhibition de l'activité enzymatique peut être attribuée à la toxicité de l'oxygène, évoquée par plusieurs auteurs (TABAK et COOKE, 1968 ; ARCHIBALD et FRIDOVICH, 1981 ; BAR-LEV et KIRK, 1981 ; REID et SEIFERT, 1982).

En ce qui concerne les analyses enzymatiques, de nombreux substrats tels : l'acide ferrulique, l'O-dianisidine, l'A.B.T.S., le guaïacol, le catéchol, l'acide gentisique, l'acide vanilique, le 2-5-dihydroxybenzoate, l'acide protocatéchique, l'alcool benzylique, le 2-4-dichlorophénol, le 2-6-diméthoxyphénol, la tolidine, le 3-3'-diméthyl-(1,1'-biphényl)-4,4'-diamine, le 3-3', 5-5'-tétraméthylbenzidine (TMB), le DMPD et le TMPD, communément employés pour les dosages d'oxydases, oxygénases et peroxydases, ont été testés en présence de ces

extraits acellulaires ; seuls les quatre derniers et dans une moindre mesure le 2-6-diméthoxyphénol ont donné des réactions positives. En considérant leur structure, une similitude se retrouve et peut, en partie, expliquer leur réactivité.

Le N-N-N'-N'-tétraméthyl-p-phénylène diamine a servi en tant que donneur d'électrons pour des monooxygénases par WIMALASENA et al. (1991). En électrophorèse, plusieurs enzymes TMPD actives sont révélées mais le fait que l'on obtienne des bandes d'activité supplémentaires lorsque l'hydrogène peroxyde est ajouté au mélange de révélation tend à montrer que ce substrat est aussi utilisable pour l'analyse des peroxydases. Contrairement à ces résultats, découlant de l'électrophorèse, l'apport de l'hydrogène peroxyde n'entraîne pas de modifications observables dans les cinétiques enzymatiques. Des activités oxydases ont également été mesurées avec ce même substrat chez *Escherichia coli* par LORENCE et al. (1988).

Les systèmes peroxydasiques ont été mis en évidence avec le N-N'-diméthyl-p-phénylène diamine, mais les activités obtenues sont faibles. En électrophorèse, trois bandes sont révélées (ces bandes d'activité ont également été détectées avec le **TMB** ; de plus, elles correspondent aux bandes dont la couleur est intensifiée par l'apport de l'hydrogène peroxyde avec le TMPD). L'apport du $MnSO_4$ dans le mélange réactionnel entraîne peu de variations et traduit la faible activité mesurée avec le 2-6-diméthoxyphénol, substrat utilisé pour les Mn-péroxydases (PASZCZYNSKI et al., 1986).

C. - Autres investigations

En relation avec les systèmes enzymatiques pouvant provoquer l'altération des molécules humiques, les formes actives de l'oxygène ont été recherchées à la fois sur les cellules, les débris membranaires, les extraits acellulaires et le filtrat de culture de *S. viridosporus*, incubé sous oxygène (en absence d'acides humiques) selon différents procédés :

- l'hydrogène peroxyde dans les filtrats de culture en utilisant la catalase (280 U/ml) ou des peroxydases avec des substrats spécifiques, tels que

l'acide 2-2'-Azino-bis-(3-éthylbenz thiazoline)-6-sulfonique (ABTS) et l'O-dianisidine ;

- l'anion superoxyde (O_2^-) à la fois sur les cellules et dans le filtrat de culture selon les techniques proposées par BEAUCHAMPS et FRIDOVICH (1971) et HIRAI et al. (1991) avec le Nitro bleue de tétrazolium, en présence d'inhibiteurs de l'activité cellulaire (HgCl_2 , NaN_3) ou de compétiteur (superoxyde dismutase) ;
- le radical hydroxyle (OH^\cdot) à partir des cellules par la méthode de BORS et al. (1979) avec le p-nitrosodiméthyl aniline et les compétiteurs du radical hydroxyle suivant : benzoate, thiourée et acide α -céto- γ -méthiol butyrique ;
- enfin, la muréxide a été utilisée pour essayer de mettre en évidence le superoxyde et le radical hydroxyle selon la technique de TORREILLES et al. (1989).

Dans nos conditions d'expérimentation, il a été difficile de montrer de manière rigoureuse la présence de l'une ou l'autre de ces formes actives de l'oxygène. Le fait que seule l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité cellulaire (NaN_3 et HgCl_2) ait donné les résultats attendus avec ces différents composés, nous pensons que ces formes de l'oxygène joueraient un rôle dans la décoloration des substances humiques.

PARTIE V

**ETUDE EN SPECTROSCOPIE
DES MODIFICATIONS SUBIES
PAR LES ACIDES HUMIQUES**

INTRODUCTION

Avec la bactérie *S. viridosporus*, deux microorganismes sont donc potentiellement capables en laboratoire de dégrader les acides humiques puisque nous avons vu, précédemment, que des champignons basidiomycètes tel que *P. chrysosporium* possédait cette activité. Ces microorganismes, qui n'utilisent pas les acides humiques comme seule source de carbone et d'énergie, présentent cependant des différences quant aux modalités de biodégradation des acides humiques. Dans le cas de *S. viridosporus*, la dégradation commence dès le début de la croissance et à un pH voisin de la neutralité alors que *P. chrysosporium*, qui nécessite pour sa croissance un pH acide (voisin de pH 4), attaque les molécules humiques seulement lorsque son métabolisme secondaire est initié par la déficience d'un élément dans le milieu de culture. Comme il n'est guère possible d'envisager des analyses chimiques très précises de ces substances en cours de dégradation, nous avons essayé de voir si les spectres donnés par la résonance magnétique nucléaire du carbone ¹³ pouvaient fournir de plus amples informations sur les modalités d'attaque de ces acides humiques. Dans cette optique, nous avons utilisé deux souches de champignons basidiomycètes : *P. chrysosporium* et *Trametes versicolor* et deux souches de *Streptomyces* : *S. viridosporus* et un *Streptomyces* provenant d'une collection que nous avons isolé nous-même. Ce travail a été réalisé en collaboration avec B. DEHORTER, du laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. La récupération sélective des molécules humiques contenues dans les milieux de culture et indispensable pour ce type d'analyse, a été obtenue en utilisant leurs propriétés chélatantes.

I. - MATERIEL ET METHODES

A. - Microorganismes utilisés

Les microorganismes de collection, *S. viridosporus* ATCC 39115, *P. chrysosporium* ATCC 34541 et *Trametes versicolor* DSM 3086, ont été utilisés dans nos essais.

L'isolement de la souche de *Streptomyces* sp. a été obtenu en utilisant le milieu suivant : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; KCl : 1,71 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; CaCO_3 : 0,02 g ; extrait de levure : 0,01 g ; agar : 17 g ; acide humique (Aldrich) : 0,5 g ; glucose : 1 g ; cycloheximide : 0,05 g ; H_2O : 1000 ml. Les sels minéraux et l'acide humique sont stérilisés séparément par autoclavage à 110°C pendant 30 min ; la cycloheximide, l'extrait de levure et le glucose sont stérilisés par filtration (porosité 0,2 μm).

En utilisant différents échantillons de terre, un certain nombre de colonies, présentant une auréole de décoloration sur ce milieu gélosé, ont été prélevées et, après un repiquage sur le même milieu, seules les souches donnant des résultats reproductibles ont été indexées et conservées dans notre collection (Tab. 23) (la ou les lettres indiquent l'origine du sol et le chiffre le numéro affecté à la souche bactérienne).

La souche utilisée pour ce travail porte la nomenclature SB4.

Tableau 23

PROPORTION RELATIVE DES ACTINOMYCETES ISOLES DU SOL ET NOMBRE DE SOUCHES BACTERIENNES RETENUES DANS NOTRE COLLECTION.

Origine de la terre	Nombre total de bacteries 10^5	Nombre total d'actinomycètes 10^5	Nombre d'actinomycètes retenus.
A:Sous litière de bois Phalempin	38	18	2 (A ₁₂ ; A ₁₄)
B:Sous litière de bois Phalempin	145	37	2 (B ₆ ; B ₇)
C:Sous peuplier U.S.T.L.F.A	19	8	1 (C ₃)
E:Forêt Sterling Ecosse	156	35	3 (E ₁ ; E ₆ ; E ₇)
L:Longuyon petite forêt	16	6	0
M:Jardin Marcq-en-Baroeul	75	30	1 (M ₃)
R:Sol cultivé Roncq	11	4	1 (R ₅)
S:Serre SN2 U.S.T.L.F.A.	9	2	1 (S ₂)
P:Sol cultivé Perone	61	15	1 (P ₁)
V:Vigne du Massif central	65	13	0
BP:Briey petite forêt prélèvement profond=30cm	66	30	0
BS:Briey petite forêt prélèvement sous litière	44	3	0
SB:Sous-bois du Massif central	19	7	3 (SB ₁ ; SB ₃ ; SB ₄)

(Le nombre de bacteries est exprime par gramme de terre)

Les champignons *P. chrysosporium* et *T. versicolor* sont entretenus sur le milieu dont la composition en gramme par litre est la suivante : extrait de malt : 20 ; peptone de Soja : 3 ; gélose : 15 ; pH 5,6 ; l'incubation est réalisée à 28°C. Ce milieu est également utilisé pour la préparation des cultures destinées aux inoculations.

B. - Modalités de culture

Les inoculum bactériens sont préparés à partir de spores comme indiqué dans la Partie III. Pour *P. chrysosporium*, l'inoculum est constitué par une suspension de spores issues de cultures en tubes inclinés, âgées de 10 à 15 jours. Elle est préparée dans de l'eau stérile et passée sur laine de verre stérile ; en ce qui concerne *Trametes versicolor*, l'inoculum est constitué par une suspension mycélienne obtenue par broyage du mycélium issu des tubes inclinés dans de l'eau stérile (en présence de billes de verre et d'une agitation au vortex).

Les cultures de *S. viridosporus* ont été conduites avec le milieu TK à pH 8 et celles du *Streptomyces SB4* avec le milieu TP à pH 6,5 (dans nos conditions expérimentales, ce milieu permet une croissance plus importante de cette souche). Les cultures ont été conduites en agitation à 70 rpm en aérobiose.

Pour les champignons *P. chrysosporium* et *T. versicolor*, les cultures ont été conduites dans des fioles de Roux contenant 100 ml de milieu de base contenant en mg/l : KH_2PO_4 : 200 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 50 ; CaCl_2 : 10 ; thimine : 5 ; solution minérale : 1 ml (nitrilotriacétate : 500 mg ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3000 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 500 mg ; NaCl : 1000 mg ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 100 mg ; CoSO_4 : 100 mg ; CaCl_2 : 82 mg ; ZnSO_4 : 100 mg ; CuSO_4 : 100 mg ; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 10 mg ; H_3BO_3 : 10 mg ; Na_2MoO_4 : 10 mg ; H_2O : 100 ml) ; ce milieu de base, proposé par KIRK *et al.* (1978), contient en plus 56 mM de glucose, 1,2 mM de NH_4NO_3 , l'ensemble tamponné avec 20 mM de tampon tartrate de sodium, pH 4,5.

Pour toutes les cultures, les acides humiques, stérilisés par filtration (0,45 μm), ont été incorporés à raison d'une concentration finale de 0,05 % ; les incubations sont réalisées à l'obscurité à 35°C.

C. - Extraction des acides humiques

Pour récupérer les acides humiques des milieux de culture après incubation, nous avons utilisé une colonne de gel chélateur (Chelating Sepharose 6B Pharmacia) ; les microorganismes sont d'abord séparés du milieu de culture par filtration sur fibre de verre (GF/C Whatman), les filtrats sont concentrés en évaporation-rotative et dialysés en utilisant des tubes Spectra por 6 en présence d'eau distillée. Les acides humiques sont alors repris dans un tampon (A) acétate de sodium 0,05 M pH 5,5 + 0,1 M NaCl avant leur traitement sur le gel.

Le gel, préalablement lavé avec de l'eau distillée, est saturé par une solution de FeCl_3 50 mM et après avoir éliminé l'excès de FeCl_3 , par des passages d'eau distillée, le gel est équilibré avec le tampon A. La solution contenant les acides humiques est alors passée sur le gel ; les molécules non retenues par le gel sont éliminées par lavage avec le tampon A puis avec environ un volume d'eau distillée. L'élution des acides humiques est effectuée avec NaOH 0,1 M et la solution obtenue est rapidement neutralisée, dialysée et les acides humiques conservés à l'état lyophilysé comme précédemment. Le gel est ensuite régénéré par un traitement avec une solution de NaCl 0,1 M contenant 0,05 M d'EDTA.

D. - Analyse de la polydispersion des acides humiques

Les variations de la polydispersion des molécules humiques ont été évaluées en gel filtration comme précédemment, ce en utilisant les gels Séphacryl S400 Superfine et S200 Superfine (Pharmacia).

E. - Analyses chimiques des modifications subies par les acides humiques

Les analyses chimiques, effectuées sur les différents échantillons d'acides humiques, ont porté essentiellement sur les groupements fonctionnels carboxylique et 1,2-dicarboxylique et sur la teneur en hydrates de carbone.

L'acidité carboxylique et les sucres totaux sont mesurés par la méthode de SCHNITZER et GUPTA (1965) et la méthode de LIU et al. (1973) respectivement comme indiqué précédemment (première partie de ce travail).

Les structures 1,2-dicarboxylates sont déterminées selon la méthode proposée par ARAI et KUMADA (1983). Cette méthode est basée sur l'interaction du

résorcinol avec les structures dicarboxyles en milieu acide : à 0,25 ml d'une solution d'acide humique (2 mg/ml), on ajoute 0,25 ml de résorcinol (400 mg/ml) et 0,75 ml de H_2SO_4 concentré ; l'ensemble est porté à 130°C pendant 5 min puis refroidi dans de la glace ; 150 ml d'eau distillée sont alors ajoutés et la solution obtenue est amenée à pH 11 avec une solution de NaOH 2,4 N, puis complétée à 250 ml avec de l'eau distillée. Une lecture est effectuée au spectrophotomètre à 490 nm et les dicarboxyles sont exprimés en mM/g ; l'acide O.phtalique est utilisé comme référence.

F. - Analyses spectroscopiques

Une analyse spectroscopique rapide est d'abord obtenue par la réalisation des spectres UV-visibles (spectrophotomètre Beckman DU-8B, longueurs d'onde comprises entre 200 et 500 nm), les échantillons d'acides humiques sont solubilisés dans de l'eau distillée.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un phénomène qui apparaît lorsqu'on soumet un noyau atomique à deux champs magnétiques perpendiculaires : l'un est constant et de forte intensité, l'autre de plus faible intensité oscille dans un éventail déterminé de radiofréquences ; cette action des différents champs magnétiques est capable de faire résonner les noyaux atomiques. Les spectres obtenus sont caractéristiques des différents modes de liaisons dans la molécule étudiée. Les noyaux les plus souvent étudiés en RMN sont 1H , ^{13}C et ^{31}P .

Nous avons utilisé la RMN du carbone 13, selon la méthode proposée par PRESTON et BLACKWELL (1985). Le spectromètre utilisé est un Brucker AM400 du Centre Commun de RMN de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Les spectres RMN sont réalisés à 100.62 MHz à partir des tubes (5 mm de diamètre) contenant 100 mg d'acides humiques solubilisés dans 1,5 ml de soude Deuterée (NaOD) 0,125 M, avec un temps d'acquisition de 0,16 sec., un angle de pulse de 45° et un interval de pulse de 0,56 sec. Pour chaque spectre, environ 150 000 balayages sont enregistrés ; la ligne de base est obtenue en annulant les cinq premières mesures de la FID (Free Induction Decay) et un facteur de correction de 50 Hz est alors appliqué. Toutes les mesures spectrales et énergétiques sont exprimées en Hertz et les déplacements chimiques sont donnés en ppm (partie pour million). Les études quantitatives sont effectuées à partir des courbes d'intégration.

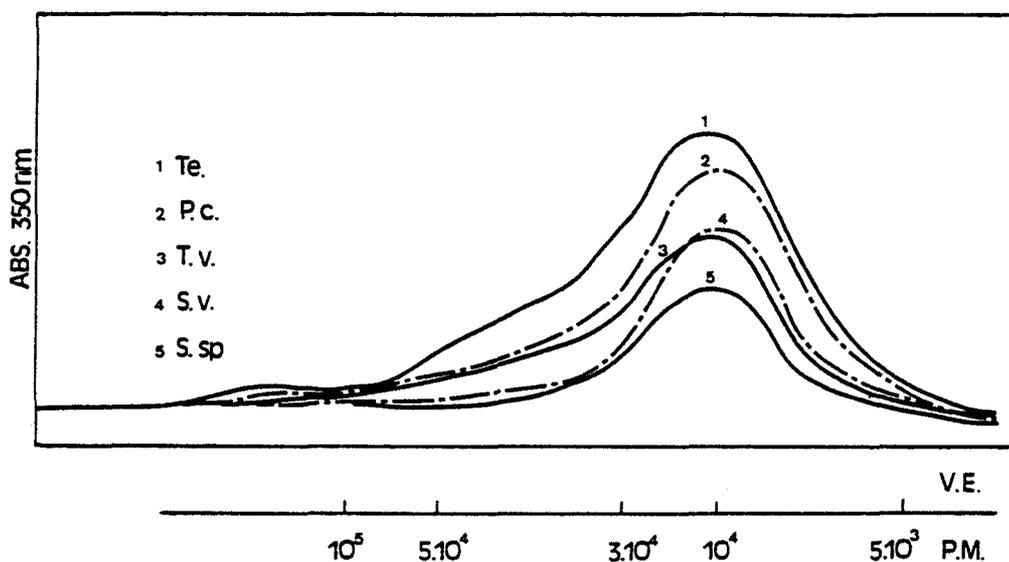
II. - RESULTATS

Au cours de cette expérience, les acides humiques ont été récupérés lorsqu'ils avaient perdu environ 30 % de leur quantité initial, ce qui correspond à une période d'incubation de 5 à 8 jours pour les champignons et de 3 à 5 jours pour les *Streptomyces*. Avec *P. chrysosporium*, une culture a été poursuivie plus longtemps de façon à atteindre une perte de 60 % de la quantité des acides humiques incorporés au départ. Une expérience d'incubation a été menée sans inoculation de germes de façon à récupérer un échantillon d'acides humiques servant de témoin.

A. - Analyse en gel filtration

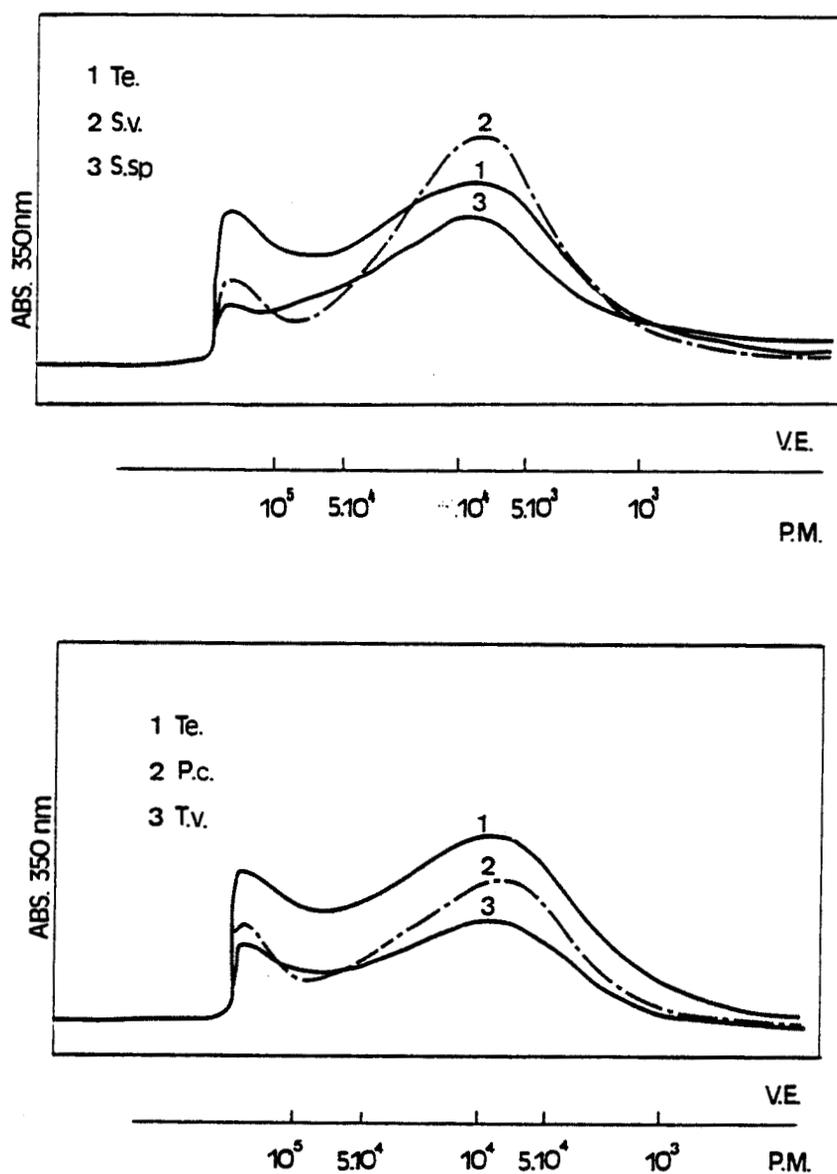
La figure 24 montre les résultats obtenus sur Séphacryl S400 pour les échantillons récupérés après une perte de 30 % des acides humiques incorporés au départ. Que ce soit pour les champignons ou pour les bactéries, on note une petite diminution de taille pour l'ensemble des molécules.

Figure 24



En utilisant le Séphacryl S200, un effet plus prononcé peut être observé pour les molécules à poids moléculaires élevés (une baisse d'environ 50 % des molécules exclues) ; de plus, pour *S. viridosporus*, une accumulation de produits intermédiaires semble se dessiner s'il faudrait se fier à l'importance de la fraction de molécules chromatographiées sur ce gel (Fig. 25).

Figure 25



Le résultat donné par les acides humiques soumis à l'action prolongée de *P. chrysosporium* est assez voisin de ceux présentés ci-dessus.

B. - Analyses chimiques

Le tableau 24 donne les résultats obtenus. On remarque que la teneur en groupements carboxyliques est toujours plus faible que le témoin lorsque les acides humiques ont été incubés en présence des champignons, alors que l'inverse est observé à propos de l'incubation avec les bactéries. En ce qui concerne les teneurs en 1,2- dicarboxyles, on a en général une diminution de ces fonctions mais les valeurs sont toujours relativement faibles. Les teneurs en sucres présentent, par contre, des variations assez hétéroclites.

Tableau 24

TENEUR EN GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES, EN GROUPEMENTS 1-2-DICARBOXYLIQUES ET EN HYDRATES DE CARBONE ESTIMEE PAR ANALYSES CHIMIQUES.

Echantillon d'acide humique	Groupements carboxyliques meq/g	Groupements 1-2-dicarboxyliques mM/g	Hydrates de carbone ug/mg
Te.	3,42 ±0,16	1,84	64,67 ±0,24
P.c.	3,03 ±0,24	1,34	71,16 ±1,69
T.v.	3,36 ±0,25	1,81	62,67 ±0,47
S.v.	3,99 ±0,19	1,67	71,67 ±1,43
S.sp	3,53 ±0,14	1,57	66,67 ±1,65

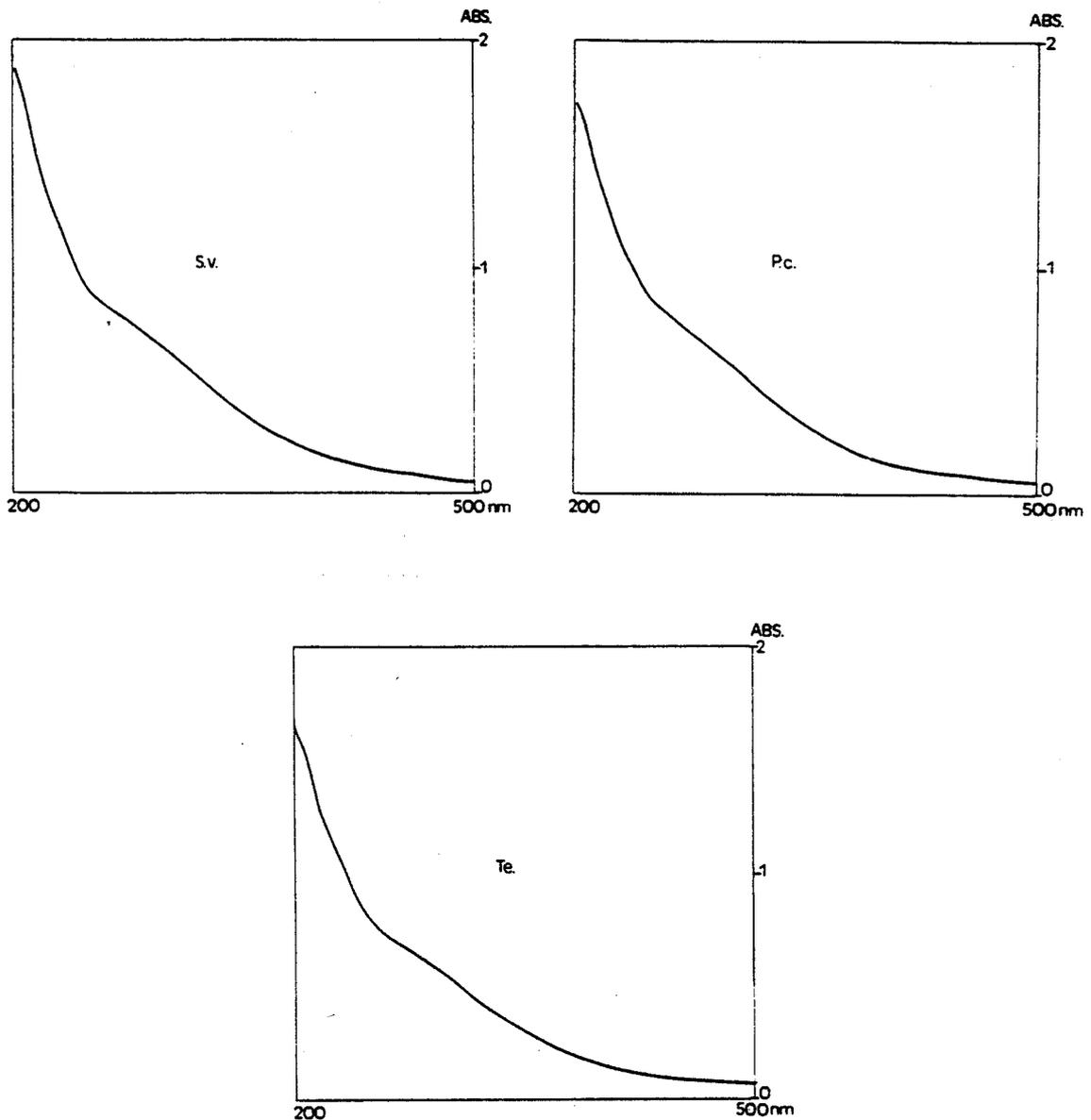
Te=témoin; P.c.,T.v.,S.v.,et S.sp acides humiques récupérés des cultures de *P.chrysosporium*, *T.versicolor*, *S.viridosporus*, *Streptomyces sp* respectivement après 30% de décoloration du milieu de culture. (Les valeurs tiennent compte de la teneur en cendres et sont la moyenne ±SD de 3 réplicats.)

C. - Etude spectroscopique

1. - UV-visible

La figure 26 montre les tracés obtenus pour *P. chrysosporium* (30 %), *S. viridosporus* et le témoin d'acide humique non soumis à l'activité microbienne ; les spectres obtenus avec les autres microorganismes sont identiques. On remarque que ces spectres ne présentent pas de différences notables.

Figure 26



SPECTRES UV-VISIBLE DES ACIDES HUMIQUES RECUPERES APRES INCUBATION

2 - La RMN du carbone 13

Les spectres des acides humiques, provenant des cultures de champignons et d'actinomycètes, sont donnés respectivement sur les figures 27 et 28. Le spectre, correspondant à la culture prolongée en présence de *P. chrysosporium*, est présenté dans la figure 29.

Figure 27

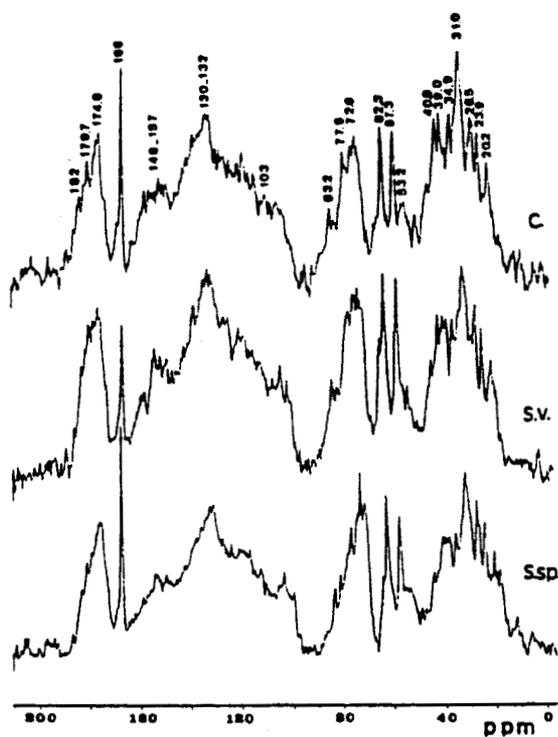


Figure 28

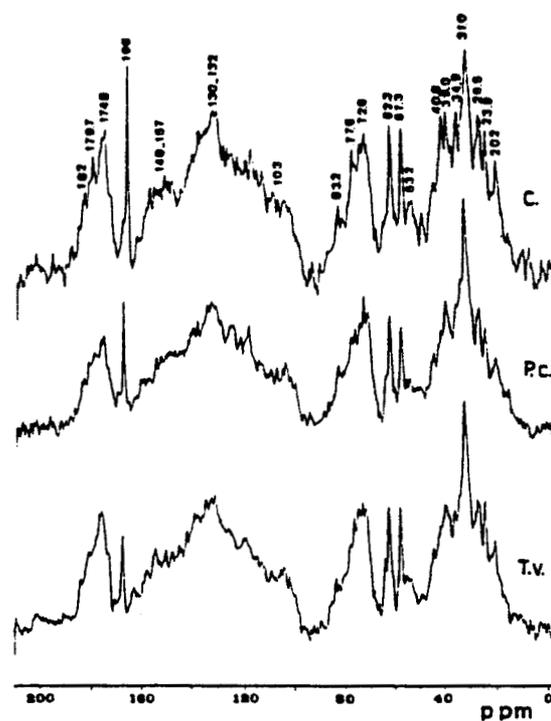
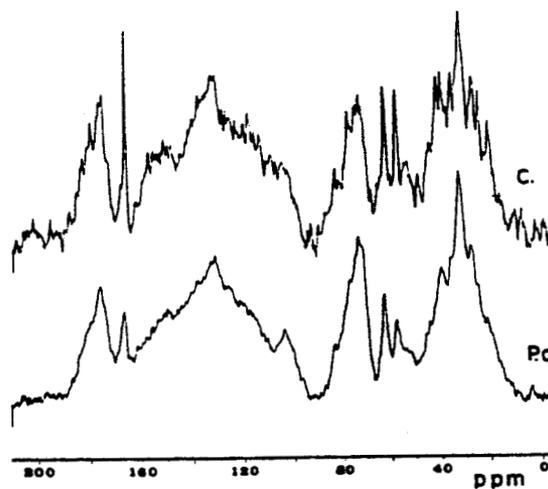


Figure 29



SPECTRES RMN DES ACIDES HUMIQUES RECUPERES APRES INCUBATION

Les spectres peuvent être divisés en quatre régions : la région correspondant au carbone aliphatique (C-alkyl) de 10 à 48 ppm, celle des hydrates de carbone (O-C-alkyl) entre 48 et 110 ppm, des aromatiques (aryl-C) entre 110 et 165 ppm et la région des carboxyles entre 165 et 190 ppm. Il faut aussi noter la résonance obtenue à 166 ppm, due au bruit de fond et peut-être aussi à la présence de carbonates (HATCHER, 1980 ; SKJEMSTAD *et al.*, 1983).

Dans la région des carbones aliphatiques, qui comprend aussi les groupements alkyl des acides aminés et ceux qui sont substitués aux noyaux aromatiques, les pics obtenus à 20,2, 23,9 et 26,5 ppm (correspondants au groupement $-\text{CH}_2-$), à 31,0 ppm $[(\text{CH}_2)_n]$ et à 34,9 et 39,0 sont les caractéristiques des spectres des acides humiques témoins mais sont également présents dans tous les spectres. On note cependant l'absence du pic à 40,8 ppm dans les spectres résultant de l'action des deux champignons ; selon SCHNITZER et PRESTON (1983), PRESTON et BLACKWELL (1985), ce pic pourrait être dû en partie à la présence des acides aminés (bien que la persistance d'un déplacement chimique voisin de 40,0 ppm ait été notée dans des échantillons d'acides humiques hydrolysés avec HCl 6 N par PRESTON et SCHNITZER, 1984).

Dans la région des hydrates de carbone, les pics à 57,3 et 62,3 ppm représentent les groupements $-\text{CH}_2\text{OH}$ et ceux de 72,6 à 77,6 et 83,2 ppm sont caractéristiques des structures $\text{CH}(\text{OH})$. Ils sont présents dans tous les spectres présentés dans les figures 27 et 28 ; le pic centré à 57,3 ppm, que l'on pourrait attribuer au carbone des méthoxyles (HATCHER et al., 1980 ; SKJEMSTAD et al., 1983 ; WILSON et al., 1987), a tendance à disparaître dans les acides humiques plus dégradés (Fig. 29). Les carbones anomériques des carbohydrates (acétal), signalés autour de 103 ppm (HATCHER et al., 1980 ; NEWMAN et al., 1980 ; SKJEMSTAD et al., 1983), présentent, par contre, un signal plus intense dans le cas des acides humiques attaqués par les bactéries.

La région des carbones aromatiques présente peu de pics distincts avec un maximum autour de 130-132 ppm, indiquant une large proportion de carbones portant des substituants aliphatiques et de carbones situés dans des structures aromatiques condensées (GONZALEZ-VILA et al., 1983). La région située entre 148 et 157 ppm, visible dans l'échantillon témoin et indiquant la présence des carbones aromatiques O- et N-substitués (DEREPPE et al., 1980, GONZALEZ-VILA et al., 1983), est peu évidente pour les autres échantillons, excepté celui qui provient de l'activité de *S. viridosporus*.

Le pic représentant les carbones des carboxyles, observé à 174,8 ppm, peut être aussi attribué aux carbones des amides ou des esters et les pics mineurs obtenus à 179,7 et 182 ppm correspondent vraisemblablement aux carbonyles et quinones (SKJEMSTAD et al., 1983).

Le tableau 25 présente les résultats quantitatifs des différents types de carbone obtenus par intégration des spectres RMN du ^{13}C (le pic à 166 ppm étant exclus). La proportion des carbones aromatiques est la même pour le témoin et tous les autres échantillons d'acides humiques. Pour les échantillons provenant de l'attaque bactérienne, la proportion des carbones aliphatiques a diminué par rapport au témoin, mais cette différence est compensée par une élévation de la proportion des carbones des groupements O-alkyl. Ce résultat est en accord avec la teneur en hydrates de carbone obtenue par les dosages pour *S. viridosporus* (Tab. 24) ; cette corrélation n'est pas vérifiée dans le cas de *P. chrysosporium* en ce qui concerne la teneur en sucres mais pour les groupements carboxyliques, la faible proportion obtenue par l'intégration du spectre est en accord avec les résultats issus des analyses chimiques.

Tableau 25

ABONDANCE RELATIVE DES DIFFERENTS TYPES DE CARBONE OBTENU PAR INTEGRATION DES SPECTRES DE R.M.N. DU CARBONE 13.

Echantillon d'acide humique.	C-alkyl %	C-O-alkyl %	C-aryl %	C-carboxyle %
Te.	26,7	26,0	37,5	9,8
P.c. 30%	27,1	26,6	37,9	8,4
P.c. 60%	27,2	26,2	37,7	8,9
T.v.	27,6	24,9	37,9	9,6
S.v.	22,5	29,5	38,2	9,8
S.sp	25,5	27,4	37,3	9,8

Te=témoin; P.c. 30%,P.c. 60% acides humiques récupérés des cultures de *P.chrysosporium* après 30 et 60% de décoloration respectivement. T.v.,S.v.,S.sp acides humiques récupérés des cultures de *T.versicolor*,*S.viridosporus*,*Streptomyces sp* après 30%de décoloration respectivement.(Les résultats sont le pourcentage par rapport au carbone total).

III. - DISCUSSION - CONCLUSION

Les propriétés chélatantes des substances humiques nous ont permis de récupérer les acides humiques à partir des milieux de culture ; par la spectroscopie UV-visible, nous obtenons des spectres caractéristiques des acides humiques (SCHNITZER, 1971 ; TSUTSUKI et KUWATSUKA, 1979).

La spectroscopie RMN du carbone 13 nous a permis de comparer de manière relativement fine des acides humiques soumis à l'attaque des microorganismes. Le spectre donné par l'échantillon témoin d'acide humique non soumis à l'activité des microorganismes est assez proche de ceux qui ont été obtenus par d'autres auteurs à partir d'acides humiques terrestres (NEWMAN et al., 1980 ; PRESTON et RIPMEESTER, 1982 ; SKJEMSTAD et al., 1983).

Afin d'éviter la contamination éventuelle des acides humiques par les produits excrétés par les microorganismes, nous avons arrêté volontairement nos cultures après avoir atteint seulement 30 % de décoloration des milieux. Néanmoins, les nouveaux signaux qui sont apparus, tels les acétals à 103 ppm, peuvent refléter tout aussi bien une attaque microbienne que la présence de produits microbiens récupérés en même temps que les acides humiques.

Les différents signaux du carbone 13 ont été attribués sur la base de données bibliographiques et les modifications spectrales, relevées entre les acides humiques soumis à l'action des bactéries et le témoin, sont relativement mineures. Les spectres, résultant de l'action fongique, semblent être plus modifiés.

Dans le cas du *P. chrysosporium*, la dégradation des molécules humiques est, tout au moins pour partie, due à l'action d'enzymes lignolytiques extracellulaires (HAIDER et MARTIN, 1988 ; BLONDEAU, 1989). DODSON et al. (1987), WALDNER et al. (1988) ont, quant à eux, montré la production de ces enzymes peroxydasiques par *T. versicolor*. Ces activités extracellulaires fongiques ne sont toutefois pas très oxydatives puisqu'aucune augmentation de la teneur en groupements carboxyliques n'a été notée, contrairement aux résultats obtenus avec la lignine (KIRK et CHANG, 1975 ; CHUA et al., 1982). Aucune modification de la teneur en carboxyles n'a également été trouvée pour les échantillons d'acides humiques soumis à l'action des *Streptomyces*, contrairement aux résultats que nous avons obtenus précédemment avec les bactéries hétérotrophes cultivées en présence d'acide humique représentant la seule source de carbone présente (cf. Partie II).

L'absence du pic à 40,8 ppm (acides aminés) dans les échantillons soumis à l'activité des champignons est probablement une conséquence de la composition de leur milieu de culture limité en azote. La réduction du signal situé à 57,3 ppm (méthoxyl) et correspondant au spectre des acides humiques soumis à l'incubation prolongée peut être le résultat de l'activité déméthylase de la lignine-péroxydase, mise en évidence par TIEN (1987).

La diminution de la teneur en groupements aromatiques O- et N-substitués peut correspondre à une activité de biodégradation plus significative des champignons et du *Streptomyces* sp. Le spectre, résultant de l'activité de *S. viridosporus*, est en effet particulier avec son faible pourcentage en carbone aliphatique qui n'est apparemment pas la conséquence d'une biodégradation puisque cette différence est presque entièrement compensée par un plus fort pourcentage des groupements O-alkyl. Ce résultat peut aussi être expliqué par l'importante adsorption des molécules humiques sur les cellules qui pourrait être plus efficace avec des molécules riches en alkyl par rapport à celles qui contiennent des carbones O-alkyl.

CONCLUSION GENERALE

Les acides humiques représentent une fraction de la matière organique du sol, caractérisée par sa grande résistance à la biodégradation. Cette propriété est facilement mise en évidence lorsque l'extraction de ces molécules est suivie d'une étape de purification destinée à éliminer les substances non humifiées. L'utilisation de gels chélatants, permettant de récupérer sélectivement ces molécules humiques, ou des composés de synthèse, obtenus par réaction de Maillard et présentant la même biorésistance que les acides humiques, nous ont permis d'approfondir certaines investigations.

L'objectif de nos premiers essais était d'étudier le comportement des bactéries telluriques en présence d'acides humiques comme seule source de carbone et d'énergie. En utilisant comme inoculum une communauté de bactéries hétérotrophes sélectionnée par adaptation et des périodes d'incubation de l'ordre de 100 jours, nous avons constaté que les molécules humiques subissaient des modifications mineures qui pouvaient être considérées plutôt comme un processus de maturation des molécules.

C'est à la suite de certains résultats prouvant que le champignon ligninolytique *P. chrysosporium* était également capable de minéraliser les acides humiques que nous avons été amené à nous intéresser à l'activité de *S. viridosporus*, bactérie filamenteuse ligninolytique elle aussi. Nos résultats montrent que cette bactérie, en présence d'une source de carbone assimilable, est capable de dégrader les acides humiques. Le pH, qui favorise cette activité, est voisin de la neutralité, ce qui le différencie du champignon qui nécessite un pH acide.

Une autre différence importante entre les deux microorganismes concerne les modalités de la biodégradation : celle-ci ne semble pas pouvoir se réaliser dans le milieu extracellulaire avec le *Streptomyces* alors que les filtrats fongiques sont toujours actifs, mais par contre, elle accompagne la croissance de la bactérie alors que chez le *Phanerochaete*, elle n'apparaît qu'après la croissance primaire, lorsque le métabolisme secondaire est induit. En relation probable avec cette absence d'activité extracellulaire, il ne nous a jamais été possible d'obtenir une dégradation des acides humiques par *S. viridosporus* en évitant l'adsorption des molécules humiques sur les cellules. Ce résultat nous a conduit à suggérer l'intervention d'un mécanisme de biodégradation localisé

(totalement ou en partie) à la surface des cellules. Dans le but d'activer cette biodégradation, des cultures ont été réalisées sous atmosphère d'oxygène pur. Cette modalité d'incubation supprime les possibilités de sporulation, mais le *Streptomyces* conserve ses propriétés de dégradation. Des extraits acellulaires, préparés à partir de ces cultures, sont capables de décolorer *in vitro* les acides humiques, mais nous n'avons pas pu prouver leurs capacités minéralisatrices.

Le mécanisme précis qui permet l'attaque des molécules humiques par *S. viridosporus* n'a pu être caractérisé. Des activités péroxydasiques et oxydasiques ont été détectées dans les cellules ou le milieu de culture mais le lien direct avec la minéralisation n'a pu être montré. Une attention particulière a été donnée à la recherche d'enzymes ligninolytiques, équivalentes à la lignine péroxydase et la Mn-péroxydase de *P. chrysosporium* mais leurs activités étaient toujours faibles.

Aucun intermédiaire de biodégradation n'étant susceptible d'être isolé lors de l'attaque des molécules humiques par les microorganismes ligninolytiques, nous avons essayé d'aborder ce problème en examinant l'évolution du spectre de RMN du ^{13}C de ces molécules au cours de l'incubation. Les résultats montrent que les modifications touchent un peu la structure des acides humiques soumis à l'attaque des champignons, mais pratiquement pas celle des acides humiques récupérés des cultures bactériennes, ce qui peut être mis en relation avec la nécessité d'un contact préalable avec les cellules avant toute possibilité de dégradation.

Dans la nature, l'exigence d'un contact entre le microorganisme et le substrat ne semble pas représenter un facteur défavorable pour les acides humiques puisque ceux-ci sont insolubilisés sous forme d'association organominérale. Le mode de croissance mycélienne des *Streptomyces* doit, d'autre part, faciliter ces contacts. Cependant, comme cette croissance cellulaire semble indissociable de l'activité minéralisatrice des *Streptomyces*, c'est l'apport d'un élément nutritif facilement assimilable qui conditionnerait alors le turn over de l'humus du sol.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBAS A. and C. EDWARDS, 1989
Effects of metals on a range of *Streptomyces* species.
Appl. Environ. Microbiol. 55 : 2030-2035.
- ABBAS A. and C. EDWARDS, 1990
Effects of metals on *Streptomyces coelicolor* growth and actinorhodin production.
Appl. Environ. Microbiol. 56(3) : 675-680.
- AIKEN G.R., D.M. McKNIGHT, R.L. WERSHAW and A.J. MacCARTHY, 1985
In : "Humic substances in soil, sediment and water".
Wiley-Interscience, New-York, 692 p.
- ANDERSON D.W. and E.A. PAUL, 1984
Organomineral complexes and their study by radiocarbon dating.
Soil Sci. Soc. Am. J. 48(2) : 298-301.
- ARAI S. and K. KUMADA, 1983
The determination of 1,2-dicarboxylate structure in humic acid by fluorescein formation.
Geoderma 31 : 151-162.
- ARCHIBALD S.F. and I. FRIDOVICH, 1981
Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*.
J. Bacteriol. 145(1) : 442-451.
- BAR-LEV S.S. and T.K. KIRK, 1981
Effects of molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 99 : 373-378.
- BEAUCHAMP C. and I. FRIDOVICH, 1971
Superoxide dismutase improved assays and assay applicable to acrylamide gels.
Analyt. Biochem. 44 : 276-287.
- BEHAL V., 1986
Enzymes of secondary metabolism : regulation of their expression and activity.
In : "Regulation of secondary metabolite formation". KLEINKAUF H. (Ed.),
Proceeding of the 16th Workshops Conference Hoescht Gracht Castle,
1985. VCH Verlagsgesellschaft MBH, Weinheim Federal Republic of
Germany.
- BENZING-PURDIE L. and J.A. RIPMEESTER, 1983
Melanoidins, and soil organic matter : evidence of strong similarities
reveled by ¹³C C-P-MAS NMR.
Soil Sci. Am. J. 47 : 56-61.
- BERZELIUS J.J., 1861
In : "Humus chemistry" Genesis - Composition - Reaction. STEVENSON
F.J. (Ed.), Wiley-Interscience, New-York, 1982, 443 p.
- BLONDEAU R., 1988
Evolution des acides humiques soumis à l'activité d'une microflore
bactérienne hétérotrophe.
Science du Sol 26(1) : 41-50.

- BLONDEAU R., 1989
Biodegradation of natural and synthetic humic acids by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.
Appl. Environ. Microbiol. 55(5) : 1282-1285.
- BOLLAG J.M., S.Y. LIU and R.D. MINARD, 1980
Cross coupling of phenolic humus constituents and 2-4-dichlorophenol.
Soil Sci. Soc. Am. J. 44 : 52-56.
- BORS W., C. MICHEL and M. SARAN, 1979
On the nature of biochemically generated hydroxyl radicals. Studies using the bleaching of p-nitrosodimethylaniline as a direct assay.
Eur. J. Biochem. 95 : 621-627.
- BRINK R.H., P. DUBACH and D.L. LYNCH, 1960
Measurements of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone.
Soil Sci. 89 : 157-166.
- CHEN C.L. and M. SCHNITZER, 1978
The surface tension of aqueous solutions of soil humic substances.
Soil Sci. 125 : 7-15.
- CHUA M.G.S., C.L. CHEN, H.M. CHANG and T.K. KIRK, 1982
¹³C NMR spectroscopy study of spruce lignin degraded by *Phanerochaete chrysosporium*.
Holzforschung 36 : 165-172.
- CRAWFORD D.L., 1977
Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains.
Appl. Environ. Microbiol. 35(6) : 1041-1045.
- CRAWFORD R.L. and D.L. CRAWFORD, 1987
¹⁴C(lignin)-lignocellulose and ¹⁴C-milled wood lignins. Preparation, characterization and uses.
Met. Enzymol. 161 : 18-31.
- DEBYSER Y. et F. GADEL, 1978
Etude des composés humiques, des kérogènes et de la fraction hydrolysable dans les sédiments.
In : "Géochimie organique des sédiments marins profonds". ORGON II, Atlantique - NE - Brésil. Edition C.N.R.S., Paris, pp. 339-356.
- DEOBALD L.A. and D.L. CRAWFORD, 1987
Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 : 158-163.
- DEREPPE J.M., C. MOREAUX and Y. DEBYSER, 1980
Investigation of marine and terrestrial humic substances by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy.
Org. Geochem. 2 : 117-127.
- DODSON P.J., C.S. EVANS, P.J. HARVEY and J.M. PALMER, 1987
Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyses C α -C β cleavage in a lignin model compound.
FEMS Microbiol. Lett. 42 : 17-22.

- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON *et al.*, 1956
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Chem. 28 : 350-356.
- EINARSON H., S. BENKT-GORAN and E. CAJ, 1983
Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products.
J. Agric. Food Chem. 31 : 1043-1047.
- FLAIG W., 1960
In : "Structural chemistry of soil humus substances". FELBECK G.T. (Ed.), 1965.
Adv. Agron. 17 : 327-368.
- FUCHS W., 1930
In : "Humus chemistry. Genesis - Composition -Reactions". STEVENSON F.J. (Ed.), 1982. Willey-Interscience, New-York, 443 p.
- GLENN J.K. and M.H. GOLD, 1985
Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Biochem. Biophys. 242 : 329-341.
- GONZALEZ-VILA F.J., H.D. LUDEMANN and F. MARTIN, 1983
¹³C NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives.
Geoderma 31 : 3-15.
- HAIDER K.M. and J.P. MARTIN, 1988
Mineralization of ¹⁴C-labelled humic acids and of humic acid bound ¹⁴C-xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium*.
Soil Biol. Biochem. 20(4) : 425-429.
- HATCHER P.G., R. ROWAN and M.A. MATTINGLY, 1980a
¹H and ¹³C NMR of marine humic acids.
Org. Geochem. 2 : 77-85.
- HATCHER P.G., D.L. VAN DER HART and W.L. EARL, 1980b
Use of solid-state ¹³C NMR in structural study of humic acids and humin from holocene sediments.
Org. Geochem. 2 : 87-92.
- HAWORTH R.D., 1971
The chemical nature of humic acid.
Soil Sci. 111 : 71-79.
- HAYAKAWA M. and H. NONOMURA, 1987
Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycete.
J. Ferment. Technol. 65 : 501-510.
- HEDGES I.I., 1978
The formation and clay mineral reactions of melanoidins.
Geochim. Cosmochim. Acta 42 : 69-76.

- HESSEN D.O., 1985
The relation between bacterial carbon and dissolved humic compounds in oligotrophic lakes.
FEMS Microbiol. Ecol. 31 : 215-223.
- HIRAI K.I., K. MORIGUCHI and G.Y. WANG 1991
Human neutrophils produce free radicals from the cell zymosan interface during phagocytosis and from the whole plasma membrane when stimulated with calcium ionophore A23187.
Experim. Cell Res. 194 : 19-27.
- ITTEKKOT V., W.G. DEUSER and E.T. DEGENS, 1984a
Seasonality in the fluxes of sugars, aminoacids, and aminosugars to the deep ocean : Sargasso sea.
Deep-Sea Res. 31 : 1057-1069.
- ITTEKKOT V., E.T. DEGENS and S. HONJO, 1984b
Seasonality in the fluxes of sugars, aminoacids and aminosugars to the deep ocean : Panama bassin.
Deep-Sea Res. 31 : 1071-1083.
- IVARSON K.C. and L.M. BENZING-PURDIE, 1987
Degradation of melanoidins by soil microorganism under laboratory conditions.
Can. J. Soil Sci. 67 : 409-414.
- JENKINSON D.S. and J.H. RAYER, 1977
The turn over of soil organic matter in some of the rothamsted classical experiments.
Soil Sci. 123 : 298-305.
- KIRK T.K. and H.M. CHANG, 1975
Decomposition of lignin by white-rot fungi. II - Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce.
Holzforschung 29 : 56-64.
- KIRK T.K., E. SCHULTZ, W.J. CONNORS, L.F. LORENZ and J.G. ZEIKUS, 1978
Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Microbiol. 117 : 277-285.
- KRIEG N.R. and J.G. HOLT, 1984
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
Williams and Wilkins Ed., Baltimore, vol. 1.
- LAMBERT G., 1987
Le CO₂ dans l'atmosphère.
La Recherche 189 : 778-787.
- LIU D., P.T.S. WONG and B.J. DUTKA, 1973
Determination of carbohydrates in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method.
Water Res. 7 : 741-746.

- LLOYD D., B. LYNNE and K.J.P. DAVIES, 1987
Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions : the rule rather than the exception.
FEMS Microbiol. Ecol. 45 : 185-190.
- LOBARTINI J.C. and G.A. ORIOLI, 1988
Absorption of iron Fe-humate in nutrient solutions by plants.
Plant Soil 106 : 153-157.
- LORENCE R.M., C. KIMBERLY and R.B. GENNIS, 1988
Trypsin proteolysis of the cytochrome d complex of *E. coli* selectively inhibits ubiquinol oxydase activity while not affecting N-N-N'-N'-tetramethyl-p-phenylenediamine oxydase activity.
J. Biol. Chem. 263(11) : 5271-5276.
- LOWRY O.H., N.H. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, 1951
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- MAGNUSON T.S., D.L. CRAWFORD, M.A. ROBERTS and G. HERTEL, 1991
Immunologic relatedness of extracellular ligninases from the Actinomycetes *Streptomyces viridosporus* T7A and *Streptomyces badius* 252.
Appl. Bioch. Biotech. 28/29 : 433-443.
- MAL' S.S., Z.M. SLIVKA et coll., 1982
Comparative study of melanoidins and humic acid.
Pochvovedenye 9, 66-73
- MARTEL J.A. and E.A. PAUL, 1974
The use of radiocarbon dating of organic matter in the study of soil genesis.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 38 : 501-506.
- MARTIN J.P. and K. HAIDER, 1979
Biodegradation of ¹⁴C-labeled and cornstalk lignins, phenols, model phenolase humic polymers and fungal melanins as influenced by readily available carbon source and soil.
Appl. Environ. Microbiol. 38 : 283-289.
- MARTIN J.P. and K. HAIDER, 1980
A comparison of the use of phenolase and peroxidase for the syntehsis of model humic acid-typed polymers.
Soil Sci. 44 : 983-988.
- MARTIN J.P., K. HAIDER and G. KASSIM, 1980
Biodegradation and stabilization after 2 years of specific crop, lignin and polysaccharide carbons in soils.
Soil Sci. 44 : 1250-1255.
- MASAHIRO N., K. YASUI and S. MARANO, 1989
Calcium ion regulates aerial mycelium formation in Actinomycetes.
J. Antibiotics 42(3) : 440-447.
- MATHUR S.P., 1969
Microbial use of podzol Bh. fulvic acids.
Can. J. Microbiol. 15 : 677-680.
- NELSON D.W. and L.E. SOMMERS, 1975
A rapid and occurate procedure for estimation of organic carbon in soils.
Proc. Ind. Acad. Sci. 84 : 456-462.

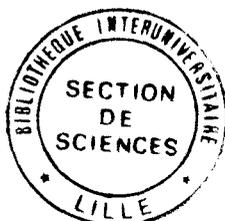
- NEWMAN R.H., K.R. TATE, P.F. BARRON and M.A. WILSON, 1980
Towards a direct, non destructive method of characterising soil humic substances using ^{13}C NMR.
J. Soil Sci. 31 : 623-631.
- NEWMAN R.H. and K.R. TATE, 1984
Use of alkaline soil extracts for ^{13}C NMR characterization of humic substances.
J. Soil Sci. 35 : 47-54.
- PASTI M.B., D.L. CRAWFORD, A.L. POMETTO III and M.P. NUTI, 1990
Lignin-solubilizing ability of Actinomycetes isolated from Termite (Termitidae) Gut.
Appl. Environ. Microbiol. 56(7) : 2213-2218.
- PASTI M.B., S.R. HAGEN, R.A. KORUS and D.L. CRAWFORD, 1991
The effects of various nutrients on extracellular peroxidases and acid precipitable polymeric lignin production by *S. chromofuscus* A2 and *S. viridosporus* T7A.
Appl. Microsc. Biotechnol. 34 : 661-667.
- PASZCZYNSKI A., Van-Ba HUYNH and R. CRAWFORD, 1986
Comparison of ligninase I and peroxidase M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Biochem. Biophys. 244(2) : 750-765.
- PERDUE E.M., 1983
Association of organic pollutants with humic substances : partitioning equilibria and hydrolysis kinetics.
In : "Aquatic and terrestrial humic materials". CHRISTMAN R.F. and E.T. GJESSING (Eds), Ann. Arbor Science Publishers, Ann. Arbor Michigan, pp. 441-460.
- PRESTON C.M. and J.A. RIPMEESTER, 1982
Application of solution and solid-state ^{13}C NMR to four organic soils, their humic acids, fulvic acids, humins and hydrolysis residues.
Can. J. Spectrosc. 25(4) : 99-105.
- PRESTON C.M. and M. SCHNITZER, 1984
Effects of chemical modifications and extractants on carbon-13 NMR spectra of humic materials.
Soil Sci. Soc. Am. J. 48 : 305-311.
- PRESTON C.M. and B.A. BLACKWELL, 1985
Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid : signal to noise optimization, quantitation and spin-echo techniques.
Soil Sci. 139(1) : 88-96.
- RAMACHANDRA M., D.L. CRAWFORD and A.L. POMETTO III, 1987
Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp. : a comparative study of wild-type and genetically manipulated strains.
Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2754-2760.

- RAMACHANDRA M., D.L. CRAWFORD and G. HERTEL, 1988
Characterization of an extracellular lignin-peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*.
Appl. Environ. Microbiol. 54 : 3057-3063.
- RAMUNNI A., R. SCIALDONE and D. FELLACA, 1987
Decomposition of humic acids by incubation in a soil water extract under various conditions of oxygen availability.
Plant and Soil 97 : 15-23.
- RASHID M.A., 1972
Quinone content of humic compounds isolated from the marine environment.
Soil Sci. 113 : 181-188.
- REID D.I. and K.A. SEIFERT, 1982
Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration, and lignin degradation by white-rot fungi.
Can. J. Bot. 60 : 252-260.
- REUTER J.H. and E.M. PERDUE, 1977
Importance of heavy metal organic matter interactions in natural waters.
Geochim. Cosmochim. Acta 41 : 325-334.
- RIFAI N. et G. BERTRU, 1980
La biodégradation des acides fulviques.
Hydrobiologia 75 : 181-184.
- ROSZAK D.B. and L.L. COLWELL, 1987
Survival strategies of bacteria in the natural environment.
Microbial Rev. 51(3) : 365-379.
- RUBINSZTAIN Y., P. IOSELIS, R. IKAN and Z. AIZENSHTAT, 1984
Investigation on the structural units of melanoidins.
Org. Geochem. 6 : 791-804.
- RUOCCO J.J. and L.L. BARTON, 1978
Energy-driven uptake of humic acids by *Aspergillus niger*.
Can. J. Microbiol. 24 : 533-536.
- SALAS J.A., J.A. GUIJARRO and C. HARDISSON, 1983
High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination.
J. Bacteriol. 155 : 1316-1323.
- SCHNITZER M. and U.C. GUPTA, 1965
Determination of acidity in soil organic matter.
Soil Sci. Amer. Proc. 29 : 274-277.
- SCHNITZER M., 1971
Characterization of humic constituents by spectroscopy.
In : "Soil biochemistry". McLAREN A.D. and J. SKUJINS (Eds), Dekker Marcel, New-York, vol. 2, pp. 60-95.
- SCHNITZER M. and S.U. KHAN, 1972
Humic substances in the environment.
Dekker M. (Ed.), Enc., New-York, p. 327.

- SCHNITZER C. and C.M. PRESTON, 1983
Effects of acids hydrolysis on the ^{13}C NMR spectra of humic substances.
Plant and Soil 75 : 201-211.
- SCHWYN B. and J.B. NEILAND, 1987
Universal chemical assay for the selection and determination of Siderophores.
Analyt. Biochem. 160 : 47-56.
- SHIMP R. and K.F. PFAENDER, 1985
Influence of naturally occurring humic acids on biodegradation of mono-substituted phenols by aquatic bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 49(2) : 402-407.
- SKJEMSTAD J.O., R.L. FROST and P.F. BARRON, 1983
Structural units in humic acids from south Eastern Queensland soils as determined by ^{13}C NMR spectroscopy.
Aust. J. Soil Res. 21 : 539-547.
- SLEAT R. and J.D. ROBINSON, 1984
The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds.
J. Appl. Bacteriol. 57 : 381-394.
- SNEATH P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT, 1986
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Ed., Baltimore, vol. 2.
- STALEY J.T., M.P. BRYANT, N. PFENNIG and J.G. HOLT, 1989
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Ed., Baltimore, vol. 3.
- STEPHENS G.R. and G.H. HEICKEL, 1975
Agricultural and forest products as sources of cellulose.
Biotechnol. Bioenz. Symp. 5 : 27-42.
- STEVENSON F.J., 1982
Humus Chemistry. Genesis - Composition - Reactions.
Wiley-Interscience, New-York, 443 p.
- SWITZER R.L., C.R. MERRIL and S. SHIFRIN, 1979
A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 98(1) : 231-238.
- TABAK H.H. and W.B. COOKE, 1968
The effect of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi.
Bot. Rev. 34 : 126-252.
- TAMM C.O. and H.G. OSTLUND, 1960
Radio carbon dating of soil humus.
Nature 185 : 706-707.
- THOMAS E.L. and K.A. PERA, 1983
Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans* : uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide.
J. Bacteriol. 154(3) : 1236-1244.

- TIEN M., T.K. KIRK, C. BULL and J.A. FEE, 1986
Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxydation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds.
J. Biol. Chem. 261 : 1677-1687.
- TIEN M., 1987
Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications.
C.R.C. Crit. Rev. Microbiol. 15 : 141-168.
- TIESSEN H., J.W.B. STEWART and H.W. HUNT, 1984
Concepts of soil organic matter transformations in relation to organo-mineral particle size fractions.
Plant and Soil 79 : 287-295.
- TRANVIK L.J. and M.G. HOFLE, 1987
Bacterial growth in mixed cultures on dissolved organic carbon from humic and clear waters.
Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1672-1677.
- TRANVIK L.J., 1988
Availability of dissolved organic carbon for planktonic bacteria in oligotrophic lakes of differing humic content.
Microbiol. Ecol. 16 : 311-322.
- TRANVIK L.J., 1989
Bacterioplankton growth, grazing mortality and quantitative relationship to primary production in a humic and clear water lake.
J. Plankton Res. 11 : 985-1000.
- TROWER M.K., S.F. SARIASLANI and F.G. KITSON, 1988
Xenobiotic oxidation by cytochrome P-450 enriched extracts of *Streptomyces griseus*.
Bioch. Bioph. Res. Comm. 157(3) : 1417-1422.
- TSCHAPEK M., C. WASOWSKI and R.M. TORRES SANCHEZ, 1981
Humic acid as a colloidal surfactant.
Plant Soil 63 : 261-271.
- TSUTSUKI K. and S. KUWATSUKA, 1978
Chemical studies on soil humic acids. III - Nitrogen distribution in humic acids.
Soil Sci. Plant Nutr. 24(4) : 561-570.
- VISSER S.A., 1985a
Physiological action of humic substances on microbial cells.
Soil Biol. Biochem. 17 : 457-462.
- VISSER S.A., 1985b
Effect of humic acids numbers and activities of microorganisms within physiological groups.
Org. Geochem. 8 : 81-85.

- WALDNER R., M.S.A. LEISOLA and A. FIECHTER, 1988
Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi.
Appl. Microbiol. Biotechn. 29 : 400-407.
- WALLERIUS J., 1761
In : "Soil organic matter". KONONOVA M.M. (Ed.), Pergamon Press Ltd,
Oxford, 450 p.
- WEINBERG E.D., 1970
Biosynthesis of secondary metabolites : role of trace metals.
Adv. Microbiol. Physiol. 4 : 1-44.
- WHITTAKER R.H. and G.E. LIKENS, 1973
Carbon and the biosphere.
In : "Aquatic and terrestrial humic materials". CHRISTMAN R.F. and
E.T. GJESSIN (Eds), Ann. Arbor Science Publishers, Michigan.
U.S. Atomic Energy Commission. A.E.C. Symposium n°30, 281-302.
- WILLIAMS S.T., M.E. SHARPE and J.G. HOLT, 1989
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
Williams and Wilkins Ed., Baltimore, vol. 4.
- WILSON M.A., A.M. VASSALO, E.M. PERDUE and J.M. REUTER, 1987
Compositional and solid state nuclear magnetic resonance of humic and
fulvic acid fractions of soil organic matter.
Analyt. Chem. 59 : 551-557.
- WIMALASENA K. and W.D. SHYAMALI, 1991
N-N'-N'-N'-tetramethyl-1-4-phenylenediamine : a facile electron donor and
chromophoric substrate for dopamine β -monooxygenase.
Bioch. Bioph. Res. Comm. 175(3) : 920-927.
- ZAYED M.N., S.M. TAHA, A.S. HAMED and L. ZOHDY, 1974
Studies in humic acid decomposing bacteria. III - Some by products of the
biological decomposition of humic acid.
Zbl. Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene. 129 : 539-548.



PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

C. YANZE KONTCHOU and R. BLONDEAU
EFFECT OF HETEROTROPHIC BACTERIA ON DIFFERENT HUMIC
SUBSTANCES IN MIXED BATCH CULTURES
Canadian journal of soil science 70:51-59 (Feb:1990)

C. YANZE KONTCHOU and R. BLONDEAU
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROGEN PEROXIDE
PRODUCING *Aerococcus sp.* FROM SOIL SAMPLES
FEMS Microbiology letters 68(1990)323-328

C. YANZE KONTCHOU and R. BLONDEAU
BIODEGRADATION OF SOIL HUMIC ACIDS BY *Streptomyces viridosporus*
Canadian journal of Microbiology 38:1991 in press

B. DEHORTER, C. YANZE KONTCHOU and R. BLONDEAU
¹³C NMR SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF SOIL HUMIC ACIDS RECOVERED
AFTER INCUBATION WITH SOME WHITE ROT FUNGI AND ACTINOMYCETES
Soil Biology and Biochemistry (1992) in press



SUMMARY

Humic acids are complex organic compounds, built up of polycondensed molecules containing aromatic as well as aliphatic structures, characterized by the presence of carboxylic groups responsible for the main properties of the soil humus. The heterogeneity of these molecules partially explains their high recalcitrance to biodegradation; our study was made with the aim to understand the mechanism of their turn-over.

Adaptation method for isolation of telluric germs permits us to improve the activity of a mixed bacterial community on the humic acids used as sole carbon supply in a liquid medium. Our results show, on the contrary, that these bacteria stress the maturation of the humic molecules.

With the use of a mycelian bacterium: *Streptomyces viridosporus* of which the ligninolytic activities were recently reported, the biodegradation of humic acids was realized in our laboratory. The mineralizing activity was demonstrated with the use of a synthetic radiolabelled humic acid.

The NMR analysis of the recovered humic molecules after incubation and the enzymatic assays, show that the factors responsible for this biodegradation were probably localized on the cell surfaces. The set up of a cultural method under pure oxygen atmosphere, and the suppression of the sporulation phase of this bacterium will probably make easier further analysis.