

Bio. Sol.

23 MAI 1966.

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 20 211

Cote : B.

EFFET LITIÈRE ⁽¹⁾

III - INFLUENCE DE L'ANAÉROBIOSE SUR LA PRODUCTION DE COMPOSÉS ANTIMICROBIENS HYDROSOLUBLES

[S. BRUCKERT], Y. DOMMERMES, [P. WEINHARD] [D. BOYMOND]

Centre de Pédologie biologique du C.N.R.S., Vandœuvre-les-Nancy

RÉSUMÉ

Une litière de *Fagus silvatica* ne renfermant, au départ, aucun composé (d'origine végétale) doué d'activité antimicrobienne, s'enrichit considérablement en composés de ce type après une incubation en anaérobiose. Les composés antimicrobiens formés sont synthétisés par les microorganismes.

Lorsque l'anaérobiose est stricte, ces composés antimicrobiens comprennent en particulier de l'acide butyrique (600×10^{-6}) et de l'acide acétique (900×10^{-6}).

Lorsque l'anaérobiose est modérée, les composés antimicrobiens apparaissent également, mais ils n'ont pas été déterminés. Ces derniers composés jouent vraisemblablement un rôle important dans les sols soumis à une hydromorphie temporaire ou permanente, où leur action inhibitrice favoriserait la conservation et, par cela même, la migration des complexes organo-ferriques solubles.

SUMMARY

Anaerobiosis induces the accumulation of antimicrobial water soluble compounds in a litter of *Fagus silvatica* initially devoided of toxicity. The antimicrobial compounds which occur are synthesised by microorganisms.

When anaerobiosis is strict, butyric and acetic contents of water extract of the litter amount to 600×10^{-6} and 900×10^{-6} respectively; these concentrations are highly toxic against *Bacillus megaterium* at pH 4,6.

When anaerobiosis is not so strict, antimicrobial compounds occur too, but they have not been determined. These last compounds must play an important role in hydromorphic soils where they slow down the biodegradation rate of water soluble organo-ferric complexes, thus allowing the migration of this soluble form of iron.

(1) Etude effectuée dans le cadre de la R.C.P. 40 (Recherche coopérative sur programme n° 40). Manuscrit reçu le 18-10-1969.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Blattstreu von *Fagus sylvatica*, die anfangs keinerlei Substanzen (pflanzlichen Ursprungs) von antimikrobieller Wirkung enthält, werden solche Substanzen bei Einschluß unter anaeroben Bedingungen angereichert. Die neu entstandenen mikrobiell wirkenden Stoffe sind von Mikroorganismen gebildet worden.

Unter streng anaeroben Bedingungen enthalten die antimikrobiellen Substanzen insbesondere Buttersäure (600×10^{-6}) und Essigsäure (900×10^{-6}).

Bei gemäßigter Anaerobiose erscheinen antimikrobielle Substanzen ebenfalls; sie sind aber noch nicht bestimmt worden. Wahrscheinlich spielen sie eine wichtige Rolle in Böden, die zeitweilig oder dauernd wasserdurchtränkt sind. Hier begünstigen diese Substanzen wahrscheinlich die Erhaltung und wohl auch die Wanderung löslicher Komplexverbindungen aus Eisen und organischen Substanzen.

INTRODUCTION

Il est désormais établi que, dans certains types de sols forestiers, par exemple les podzols, la biodégradation de la matière organique est fortement inhibée. Parmi les hypothèses que l'on peut avancer pour expliquer cette inhibition, une des plus séduisantes est celle de l'intervention des composés hydrosolubles antimicrobiens d'origine végétale ou microbienne. Les observations de terrain suggèrent (1) que, sous certaines formations forestières, telles que les hêtraies, l'inhibition de la biodégradation ne peut être imputée aux composés libérés par les résidus végétaux eux-mêmes, mais pourrait l'être aux composés synthétisés par les microorganismes dans les litières en décomposition, (2) que, parmi les facteurs de l'environnement les plus favorables à la synthèse microbienne de ces composés, l'anaérobiose, qui est liée à l'hydromorphie, jouerait un rôle primordial.

Ces observations nous ont amené à effectuer l'étude expérimentale rapportée ici, et destinée : (1) à vérifier si une litière ne renfermant à l'origine aucun composé (d'origine végétale) doué d'activité antimicrobienne, peut acquérir une telle activité par incubation en anaérobiose, (2) à essayer de déterminer la nature chimique des substances antimicrobiennes apparues éventuellement au cours de cette incubation anaérobie.

MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL ET MÉTHODES

La litière utilisée est composée exclusivement de feuilles de *Fagus sylvatica* récoltées sur le sol au mois de janvier et ne renfermant aucun composé antimicrobien hydrosoluble décelable par le test du *Bacillus megaterium* utilisé ici. Après séchage à l'air, la litière est broyée, puis distribuée dans des flacons serum de 250 ml munis d'un bouchon de caoutchouc, à raison de 10 g par flacon et humidifié à 300 %.

a. *Prétraitement des échantillons de litière.*

Les échantillons de litière sont soumis aux prétraitements suivants qui diffèrent suivant l'expérience considérée :

Première expérience.

1) Litière non stérilisée, puis préincubée en aérobiose (on aère en ouvrant chaque flacon tous les deux jours).

2) Litière stérilisée par rayonnement gamma (5 Mrads), puis préincubée en aérobiose comme en (1).

3) Litière stérilisée par rayonnement gamma (5 Mrads), puis réinoculée avec une suspension-dilution 10^{-1} de l'horizon 0-5 cm d'un sol brun lessivé sous hêtraie, à raison de 25 ml par flacon et préincubée en aérobiose comme en (1).

(4) Même traitement que (1), mais préincubation en anaérobiose (jarre anaérobie B.D.).

5) Même traitement que (2), mais préincubation en anaérobiose (jarre anaérobie B.D.).

6) Même traitement que (3), mais préincubation en anaérobiose (jarre anaérobie B.D.).

Deuxième expérience.

1) Litière non préincubée.

2) Litière préincubée en aérobiose (on aère en ouvrant chaque flacon tous les deux jours).

3) Litière préincubée en anaérobiose stricte dans un dessiccateur où l'on fait le vide, l'élimination de l'oxygène étant vérifiée par le test au bleu de méthylène (Society of American Bacteriologists, 1957).

4) Litière préincubée en anaérobiose modérée (on amène la litière à saturation avec de l'eau, l'humidité atteignant alors 500 % ; dans ce cas on ne fait pas le vide, mais on maintient les flacons fermés pendant toute la durée de la préincubation).

Remarques :

Dans les deux expériences, la préincubation a été effectuée à 28 °C et les traitements ont comporté trois répétitions.

Dans la deuxième expérience, on a utilisé un lot de litière différent de celui utilisé dans la première expérience, de sorte que l'extrait aqueux n'a pas présenté exactement la même activité.

b. *Préparation des extraits.*

Après la préincubation, on procède à l'extraction à l'eau (rapport d'extraction 1 : 10) des composés hydrosolubles des différents lots suivant un mode opératoire décrit par ailleurs (BECK *et al.*, 1969). Les extraits obtenus sont stérilisés par filtration (Millipore).

c. *Activité antimicrobienne.*

L'activité antimicrobienne est testée, sur les extraits ajustés aux pH 4,6 ou 5,2, avec *B. megaterium* suivant la technique de BECK *et al.* (1969). Rappelons ici que nous

désignons, sous le terme d'indice de croissance de *B. megaterium* (IB), le pourcentage suivant :

$$IB = \frac{\mu_f}{\mu_t} \times 100$$

où μ_f représente le taux de croissance de *B. megaterium* dans le milieu enrichi en extrait de feuille ou de litière et μ_t le taux correspondant obtenu dans le milieu témoin (milieu non enrichi en extrait).

L'activité antimicrobienne des extraits de litière est d'autant plus élevée que IB est faible : elle est maximale quand IB est égal à 0 ; elle est nulle quand IB est égal à 100. L'extrait de litière est stimulant quand IB dépasse 100.

d. Dosage des acides organiques dans les extraits de litière.

Parmi les divers composés présents dans les extraits de litières, nous avons identifié plusieurs acides volatils, aliphatiques et phénols par chromatographie sur papier ; nous les avons séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice et dosés de façon automatique par photométrie directe de l'éluat en présence d'un indicateur coloré (o-nitrophénol) ; le protocole mis au point suit de très près la méthode de KESNER et MUNTWYLER (1966).

e. Elimination de la fraction anionique des extraits de litières par passage sur résine.

Cette opération s'effectue facilement par fixation des acides sur un échangeur d'anions (résine Dowex 1 \times 8) ; on obtient ainsi des extraits de composition sensiblement identique à celle des extraits non traités mais débarrassés de la fraction anionique.

RÉSULTATS

a. Mise en évidence de l'influence de l'anaérobiose et de l'origine microbienne des composés antimicrobiens (première expérience).

Il ressort clairement du tableau I que la *préincubation en aérobiose* n'entraîne pas la formation de composés antimicrobiens hydrosolubles actifs vis-à-vis de *B. megaterium*, sauf dans le cas de la litière non stérile ; mais l'activité antimicrobienne observée alors est très faible (IB = 80).

La *préincubation en anaérobiose* favorise au contraire l'accumulation de composés antimicrobiens hydrosolubles très actifs vis-à-vis de *B. megaterium* (IB = 0). Mais cette accumulation se manifeste seulement dans la litière non stérile ou stérile réensemencée ; la litière stérile est très peu active (IB = 77).

TABLEAU I

Activité antimicrobienne * d'extraits aqueux de litière de *Fagus silvatica* préincubée stérilement ou non, en aérobiose ou en anaérobiose (première expérience).

Antimicrobial activity of water extracts of sterile and non sterile Fagus silvatica litter aerobically and anaerobically preincubated (first experiment).

	Aucune stérilisation <i>Unsterile litter</i>	Stérilisation <i>Sterilized litter</i>	Stérilisation suivie de réensemencement <i>Sterilized and reinoculated litter.</i>
Préincubation aérobie <i>Aerobic preincubation</i>	80	100	100
Préincubation anaérobiose stricte <i>Anaerobic preincubation (strict anaerobiosis)</i>	0	77	0

* L'activité antimicrobienne des extraits aqueux est d'autant plus élevée que l'indice de croissance de *Bacillus megaterium* est faible ; elle est maximale quand cet indice est égal à 0 ; elle est nulle quand il est égal à 100. Il y a stimulation quand il dépasse 100.

Dans cette expérience effectuée en double exemplaire, l'indice de croissance de *B. megaterium* est déterminé au pH 5,2 ; dans les expériences faisant l'objet des tableaux II et III, il est déterminé aux pH 5,2 et 4,6.

b. *Influence de différents types de préincubation sur la teneur en acides organiques, le pH et l'activité antimicrobienne d'extraits de litière (deuxième expérience).*

L'analyse des acides organiques contenus dans les extraits montre que la préincubation en *aérobiose* entraîne une biodégradation de la plupart des acides organiques étudiés, cette biodégradation allant souvent jusqu'à leur disparition complète. Lors d'une préincubation en *anaérobiose stricte*, la biodégradation, quand elle existe, est en général moins importante qu'en aérobiose. L'acide acétique s'accumule en grande quantité ; sa teneur passe, en effet, de 47 à 874×10^{-6} ; quant à l'acide butyrique, qui n'existe pas dans l'extrait de litière non incubée, il atteint, dans l'extrait de litière incubée en anaérobiose stricte, une teneur de 589×10^{-6} . Lors d'une préincubation en *anaérobiose modérée*, la production nette des acides butyrique et acétique est beaucoup plus faible : la teneur des extraits à l'eau est alors seulement de 15×10^{-6} pour le premier acide et 97×10^{-6} pour le deuxième (tableau II).

TABLEAU II

Teneurs en acides organiques, pH et activité antimicrobienne * d'extraits aqueux de litière de *Fagus sylvatica* ayant subi différents prétraitements (deuxième expérience).

Organic acids content, pH and antimicrobial activity of water extracts of Fagus sylvatica litter submitted to different pretreatments (second experiment).

		Pas de préincubation	Préincubation aérobie	Préincubation anaérobie stricte	Préincubation anaérobie modérée
		<i>Non preincubated litter</i>	<i>Aerobically preincubated litter</i>	<i>Anaerobically preincubated litter (strict anaerobiosis)</i>	<i>Anaerobically preincubated litter (mild anaerobiosis)</i>
Teneur en acides organiques des extraits de litière (10 ⁻⁶)	<u>Volatils</u>				
	formique	36	0	0	0
	butyrique	0	0	589	15
	acétique	47	7,4	874	97
	<u>Aliphatique</u>				
	succ. + lact.	18,3	2,0	12,2	non dosés
	citrique	17,0	0	0	"
	oxalique	22,5	traces	7,5	"
	malique	14,0	0	0	"
	<u>Phénols</u>				
p-hydroxybenz.	2,5	0	1,3	non dosés	
vanillique	0,06	0	traces	"	
p-couramique	0,04	0	0	"	
pH des extraits		5,6	6,8	5,0	7,5
Indice de croissance de <i>Bacillus megaterium</i> (IB)	déterminé au pH 5,2	100	100	47	87
	déterminé au pH 4,6	-	64	0	0

* Voir note tabl. I.

L'acidification de l'extrait de litière induite, par l'incubation en anaérobiose stricte, peut s'expliquer par l'accumulation d'acides butyrique et acétique. Contrairement à l'incubation en anaérobiose stricte, l'incubation en anaérobiose modérée élève le pH, vraisemblablement à cause de l'ammonification très active. Ces résultats confirment, au moins en partie, ceux de NYKVIST (1963).

La production nette de composés antimicrobiens en anaérobiose, déjà montrée par la première expérience, est confirmée par la deuxième expérience. La comparaison des tests conduits aux pH 5,2 et 4,6 montre, en outre, que la toxicité de

ces composés antimicrobiens, dépend étroitement du pH : cette toxicité étant plus réduite au pH 5,2 (IB = 47 ; IB = 87) qu'au pH 4,6 (IB = 0).

On notera enfin que, dans la litière incubée en anaérobiose, apparaissent cinq composés phénoliques non identifiés que l'on a déjà signalé dans des fractions humiques de divers sols (BRUCKERT et al., 1967). Mais l'activité antimicrobienne de ces composés n'a pas encore été testée.

c. Nature des composés antimicrobiens produits en anaérobiose.

L'accumulation importante d'acides butyrique et acétique au cours de l'*anaérobiose stricte* allant de pair avec une activité antimicrobienne élevée, on est naturellement conduit à attribuer à ces acides la responsabilité, ou tout au moins une partie de la responsabilité de cette activité antimicrobienne. Effectivement l'acide butyrique et l'acide acétique sont toxiques pour *B. megaterium* aux doses de 600×10^{-6} et 900×10^{-6} , qui sont précisément les doses auxquelles ces acides existent dans les extraits de litière incubée en anaérobiose stricte (tabl. III). D'un autre côté, l'élimination de la fraction anionique des extraits par passage sur une résine Dowex réduit considérablement la toxicité de l'extrait de litière (test effectué

TABLEAU III

Activité antimicrobienne * de solutions d'acides butyrique et acétique et d'extraits de litière de *Fagus silvatica* préincubée en anaérobiose stricte, puis soumise à différents traitements. *Antimicrobial activity of organic acid solutions (butyric, acetic, butyric and acetic acids) and antimicrobial activity of water extracts of Fagus silvatica litter anaerobically preincubated and then submitted to 3 treatments (control; treated by a resin; treated by a resin, butyric and acetic acids being added after the treatment).*

		Solutions d'acides organiques <i>Organic acid solutions</i>			Extrait de litière préincubée en anaérobiose stricte <i>Water extract of litter preincubated under strict anaerobiosis</i>		
		Acide butyrique (600×10^{-6})	Acide acétique (900×10^{-6})	Acide butyrique (600×10^{-6}) + ac. acétique (900×10^{-6})	Non traité (témoin)	Passé sur résine	Passé sur résine + ac. butyr. (600×10^{-6}) + ac. acét. (900×10^{-6})
Indice de croissance de <i>Bacillus megaterium</i>	déterminé au pH 5,2	22	60	0	47	77	20
	déterminé au pH 4,6	0	0	0	0	312	0

* Voir note Tabl. I

au pH 5,2 : IB = 77) ou même induit un effet stimulant (test effectué au pH 4,6 : IB = 312) ; l'adjonction d'acides butyrique et acétique à l'extrait de litière passée sur résine restaure l'activité antimicrobienne de cet extrait (tabl. III, dernière colonne).

En ce qui concerne les extraits de litière incubée en anaérobiose modérée, leur activité antimicrobienne ne peut être attribuée aux acides butyrique et acétique car leur teneur est alors inférieure au seuil de toxicité.

CONCLUSION

La préincubation en anaérobiose d'une litière de *Fagus sylvatica* induit l'accumulation dans cette litière de composés antimicrobiens synthétisés par les microorganismes.

Dans le cas de l'anaérobiose stricte, les composés actifs sont l'acide butyrique et l'acide acétique qui s'accumulent à des doses suffisantes pour inhiber *B. megaterium* : soit 600×10^{-6} pour l'acide butyrique et 900×10^{-6} pour l'acide acétique. Ces résultats se rapprochent des observations de HENTGES (1969) relatives à l'inhibition de *Shigella flexneri* par des coliformes (*Klebsiella* et *Escherichia*) et de GOEFFERT et HICKS (1969) relative à l'inhibition de *Salmonella typhimurium* par l'acide acétique apporté à la dose de 1000×10^{-6} .

Dans le cas de l'anaérobiose modérée, de tels acides ne s'accumulent pas en quantité suffisante pour atteindre le seuil de toxicité. Cependant les litières acquièrent une activité antimicrobienne importante ; mais nous ne connaissons pas encore les composés responsables de cette inhibition. Il est d'ailleurs probable qu'il sera difficile de les déterminer directement dans les extraits de litières : pour les isoler, il faudra vraisemblablement recourir à des modèles simplifiés constitués par des cultures pures se développant sur substrats synthétiques. Si l'anaérobiose stricte apparaît rarement *in situ* dans les litières forestières, l'anaérobiose modérée y semble assez fréquente et les résultats expérimentaux présentés ici permettent de supposer qu'une litière dépourvue de toxicité, à l'origine, peut s'enrichir en composés antimicrobiens synthétisés par des microorganismes semi-anaérobies. De tels composés interviendraient *in situ* en ralentissant la biodégradation de la matière organique et, en particulier, celle des complexes organo-métalliques ; cette intervention expliquerait l'intensité remarquable des phénomènes de migration du fer dans les sols soumis à une hydromorphie temporaire ou permanente. Les premières observations effectuées *in situ* (TOUTAIN *et al.*, 1970) tendent à valider cette hypothèse : en effet, les sols sous hêtraie, caractérisés par une migration importante des composés organo-ferriques, présentent souvent en surface un horizon riche en substances antimicrobiennes.

BIBLIOGRAPHIE

- BECK G., DOMMARGUES Y. et VAN DEN DRIESSCHE R., 1969. — L'effet litière. II. Etude expérimentale du pouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des feuilles et des litières forestières vis-à-vis de la microflore tellurique. *Æcol. Plant.*, IV, p. 237-266.
- BRUCKERT S., JACQUIN F. et METCHE M., 1967. — Contribution à l'étude des acides phénols présents dans les sols. *Bull. Ecol. Nat. sup. agr. Nancy*, 9, 2, 73-92.
- GOEFFERT J. M. et HICKS R., 1969. — Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 97, 2, 956-958.
- HENTGES D. J., 1969. — Inhibition of *Shigella flexeneri* by the normal intestinal flora. II. Mechanisms of inhibition by coliform organisms. *J. Bacteriol.*, 97, 2, 513-517.
- KESNER L. et MUNTWYLER E., 1966. — Automatic determination of weak organic acids by partition column chromatography and indicator titration. *Anal. Chem.*, 38, 9, 1164-1168.
- NYKVIST N., 1963. — Leaching and decomposition of water soluble organic substances from different types of leaf and needle litters. *Stud. forest. suecica*, 3, 3-31.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1957. — *Manual of microbiological methods*. McGraw-Hill, New-York.
- TOUTAIN F., BRUCKERT S., WEINHARD P. et DOMMARGUES Y., 1970. — (en préparation).