# BIOCHEMICAL STUDIES ON HUMIC SUBSTANCES EXTRACTED FROM ORGANIC FERTILIZERS

**By**


## MOHAMED MAHMOUD IBRAHIM AFIFI

**B. Sc. Agric. Sci. (Agricultural Biochemistry), Fac. Agric., Cairo Univ., 1995**
**M.Sc. Agric. Sci. (Agricultural Microbiology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2002**


## THESIS

**Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of**

## DOCTOR OF PHILOSOPHY

**In**

## Agricultural Sciences
**(Agricultural Microbiology)**


**Department of Agricultural Microbiology**
**Faculty of Agriculture**
**Cairo University**
**EGYPT**


**2010**

APPROVAL SHEET

# BIOCHEMICAL STUDIES ON HUMIC SUBSTANCES EXTRACTED FROM ORGANIC FERTILIZERS

**Ph.D. Thesis**
**In**
**Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)**

**By**


## MOHAMED MAHMOUD IBRAHIM AFIFI

**B.Sc. Agric. Sci. (Biochemistry), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1995**
**M.Sc. Agric. Sci. (Microbiology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2002**


## Approval Committee

**Dr. SAMIR ALY EL-SAYED**.....
**Head Research of Microbiology, SWERI, ARC, Giza**

**Dr. NADIA FAHMY AMIN**.....
**Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Dr. WALEED DIAEDDEEN SALEH** .....
**Associate Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Dr. HUSSEIN EMAM MAKBOUL** .....
**Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Date: / /**

SUPERVISION SHEET

# BIOCHEMICAL STUDIES ON HUMIC SUBSTANCES EXTRACTED FROM ORGANIC FERTILIZERS

**Ph.D. Thesis**
**In**
**Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)**

**By**


## MOHAMED MAHAMOUD IBRAHIM AFIFI

**B.Sc. Agric. Sci. (Agricultural Biochemistry), Fac. Agric., Cairo Univ., 1995**
**M.Sc. Agric. Sci. (Agricultural Microbiology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2002**


SUPERVISION COMMITTEE


**Dr. HUSSEIN EMAM MAKBOUL**
**Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Dr. WALEED DIAEDDEEN SALEH**
**Associate Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Dr. MOAWAD KAMEL ZAHRA**
**Late Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University**

**Dr. MOSTAFA El-HOUSSENI MOHAMED**
**Head Research of Microbiology, SWERI, ARC, Giza**

# *DEDICATION*

*I dedicate this work to whom my heart felt thanks; to my dear wife, for giving me unlimited support, endless love and continuous encouragement, and my sons Abd El-Rahman and Soheib for their patience and help, as well as to my parents and brothers for all the support they lovely offered along the period of my post graduation.*

## *ACKNOWLEDGEMENT*

*First of all, I would like to express my endless thanks to ALLAH for giving me the ability to complete this work.*

*I would like to express my deepest sincere thanks, gratitude and appreciation to* ***Dr. Houssien Emam Makboul****, Professor of Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University for his kind supervision, suggesting the problem, continuous support, and sincere help with no limits, and his guidance through the course of study and revision the manuscript of this thesis.*

*I wish to express my deep thanks to* ***Dr. Waleed Diaeddeen Saleh*** *Associate Professor of Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his encouragement and helpful supervision.*

*I wish also to express my deep thanks to the soul of* ***Dr. Moawad Kamel Zahra*** *Late Professor of Microbiology Faculty of Agriculture, Cairo University.*

*I would like to express my deep thanks to* ***Dr. Mostafa El- Housseni Mohamed*** *Head Researcher, Soil, Water and Environment Research Institute; A.R.C., Giza for sharing in supervision, continuous encouragement and sincere help with no limits.*

*Grateful appreciation is also extended to all staff members and colleagues of Microbiology Department, Soil, Water and Environment Res. Institute; A.R.C., Giza*

*Finally, no words can express my great gratitude to all members of my family; especially* ***my parents*** *may God bless their soles, and my brothers and sisters, who give me strong support and endless love that made me able to overcome difficulties facing up during the completion of this work.*

# دراسات بيولوجية وكيميائية على المواد الهيومية المستخلصة من الأسمدة العضوية

رسالة مقدمة من

**محمد محمود إبراهيم عفيفى**
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة، ١٩٩٥
ماجستير فى العلوم الزراعية (ميكروبيولوجيا زراعية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ٢٠٠٢

للحصول على درجة

**دكتوراه الفلسفة**

**فى**

**العلـوم الزراعيـة**
**(ميكروبيولـوجيا زراعية)**

**قســـم الميكروبيولـــوجيا الزراعية**
**كليـــة الزراعـــة**
**جامعـة القاهرة**
**مصـــر**

**٢٠١٠**

# دراسات بيولوجية وكيميائية على المواد الهيومية المستخلصة من الأسمدة العضوية

**رسالة دكتوراه الفلسفة**
**فى العلوم الزراعية**
**(ميكروبيولوجيا زراعية)**

**مقدمة من**


**محمد محمود إبراهيم عفيفى**
**بكالوريوس فى العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية) كلية الزراعة- جامعة القاهرة،١٩٩٥**
**ماجستير فى العلوم الزراعية (ميكروبيولوجيا زراعية) كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠٢**


لجنة الإشراف


**دكتور/ حسين إمام مقبول**
**أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية - كلية الزراعة - جامعة القاهرة**

**دكتور/ وليد ضياء الدين صالح**
**أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية المساعد- كلية الزراعة- جامعة القاهرة**

**المرحوم الدكتور/ معوض كامل زهرة**
**أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية - كلية الزراعة - جامعة القاهرة**

**دكتور/ مصطفى الحسينى محمد**
**رئيس بحوث الميكروبيولوجيا - معهد بحوث الاراضى والمياه والبيئة**
**مركز البحوث الزراعية- الجيزة**

# دراسات بيولوجية وكيميائية على المواد الهيومية المستخلصة من الأسمدة العضوية

**رسالة دكتوراه الفلسفة**
**في العلوم الزراعية**
**(ميكروبيولوجيا زراعية)**

**مقدمة من**


**محمد محمود إبراهيم عفيفى**
**بكالوريوس في العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية)- كلية الزراعة – جامعة القاهرة، ١٩٩٥**
**ماجستير في العلوم الزراعيـة (ميكروبيولوجيا زراعية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة،٢٠٠٢**


لجنة الحكم

**دكتور/ سمير على السيد**.....
**رئيس بحوث الميكروبيولوجيا – معهد بحوث الاراضى والمياه والبيئة - مركز البحوث الزراعية - الجيزة**

**دكتور/ نادية فهمى امين إمام**..... .....
**أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة**

**دكتور/ وليد ضياء الدين صالح** .....
**أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية المساعد- كلية الزراعة – جامعة القاهرة**

**دكتور/ حسين إمام مقبول**.....
**أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية - كلية الزراعة - جامعة القاهرة**

التاريخ / /

**Name of Candidate:** Mahamed Mahmoud Ibrahim Afifi **Degree:** Ph.D.
**Title of Thesis:** Biochemical Studies on Humic Substances Extracted from Organic Fertilizers
**Supervisors:** Dr. Hussein Emam Makboul
Dr. Waleed Diaeddeen Saleh
Late Dr. Moawad Kamel Zahra
Dr. Mostafa El-Housseni Mohamed
**Department:** Agricultural Microbiology **Approval: / /**

## ABSTRACT

This study was conducted to extract humic substances (HS) from different compost sources (comp.1, comp.2, comp.3, comp.4, comp.5) and biogas manure (Bio. m.6) by two different methods, either KOH (1N) (EPM) or NaOH (0.5N) (ESM). The humic substances were studied from the extracted quantity were used to determine the different properties of HS (Total acidity, Carboxylic groups and phenolic groups, atomic structure and IR absorption). HS were applied to determine germination % of (*Lepidium sativum* and *Phaseolus vulgaris* L. *Bronco*) and their effect on growth and yield of *Phaseolus vulgaris* L *Bronco*). In addition, their effect on root knot nematode (*M. incognita*) and soil borne diseases (*R. solani and F. solani*) were also studied. The obvious results: HS, humic acid (HA) and fulvic acids (FA) % recorded the highest percentage for the Bio. m.6 either extracted by (EPM) or (ESM), and HA/FA ratio was highest in comp.5 and Bio. m.6 (EPM) and recorded 1.65 and 1.74 respectively. Total acidity of both HA and FA achieved best results in both comp.3 (ESM) and comp.1 (EPM), phenolic groups were higher than carboxylic groups in HA and FA. Carboxylic /phenolic-OH ratios ranged between 0.238 to 0.848 and 0.282 to 0.935 in both humic and fulvic acids either extracted by (ESM) or (EPM) respectively. Total organic carbon gave best result in comp.2 and Bio.m.6 (EPM) in both HA and FA respectively. Total nitrogen in Bio. m. 6 and comp.4 (EPM) achieved highest results in HA and FA respectively, while the carbon / nitrogen ratio in HA was the highest in Bio. m. 6 (ESM) recorded 20.8:1 but the highest result in FA extracted from comp.2 by (EPM) which (recorded 37.3:1). Comp.1 and 4 (ESM) were very high in hydrogen % in HA, but FA was Bio. m. 6 (EPM) the best. Oxygen % in FA was higher than HA. Function groups were variable and differed in HA and FA. HA was the fastest to reach completely seedling and high germination % than FA in both *Lepidium* and *Phaseolus*. HA and FA were different enhance the *Phaseolus vulgaris* growth, but HA extracted from comp.1 (5ppm + 50ppm nitrogen) was superior in achieve the highest yield. HA enhanced all numbers of soil microorganisms in all concentrations in both comp.1 and Bio. m., but FA was the best to increase numbers of actinomycets in comp.5. Effect of HA and FA on soil borne diseases, FA extracted from Bio.m. had the highest significant inhibition % on (*R. solani and F. solani*). Fungi recorded 88.9 and 94.7 respectively. The effect on nematode (*M. Incognita*) *in vitro*, Vydate achieved the best results of inhibition % on hatching nematode egg, but HA (EPM) from comp.3 and FA (EPM) from Bio. m. were the best in reducing the number of surviving juveniles recorded 26.09 and 45.1% respectively, and achieved more increases than vydate .*In vivo*, FA (1g/l) dose (2 ml) achieved nearly more effect as Vydate (2 ml) in reduce the numbers of galls, final population, population build- up (Pf/Pi) and nematode reduction %. HA was the best in increasing plant growth in cow pea and tomato plants. FA increased the plant contents from phosphorus.

**Key words:** humic acid, fulvic acid, *Meloidogyne incognita***,** *Rhizoctonia solani and Fusarium solani* and Vydate.

**اسم الطالب:** محمد محمود إبراهيم عفيفى **الدرجة:** دكتوراة الفلسفة
**عنوان الرسالة:** دراسات بيولوجية وكيميائية على المواد الهيومية المستخلصة من الأسمدة العضوية
**المشرفون :** **دكتور:** حسين إمام مقبول
**دكتور:** وليد ضياء الدين صالح
**المرحوم الدكتور:** معوض كامل زهرة
**دكتور:** مصطفى الحسينى محمد
**قسم:** الميكروبيولوجيا الزراعية **تاريخ منح الدرجة:** / /

## المستخلص العربي

الهدف الرئيسي لهذا البحث دراسة استخلاص المواد الهيومية من مصادر كمبوست مختلفة وهى (كومب ١، كومب٢، كومب٣، كومب٤، كومب٥) بالاضافة الى سماد البيوجاز (بيو) سواء بالصودا كاوية (٠.٥ع) أو بوتاسا كاوية( ١ع) وتم دراسة المواد الهيومية من حيث كميتها المفصولة من العينات السابقة وخواص المواد الهيومية وتشمل (الحموضة الكلية، المجاميع الكربوكسيلية والفينولية، التركيب الذرى و المجاميع الفعالة الممتصة عند أطوال موجية مختلفة بجهاز (IR) كما تم دراسات بعض التطبيقات للمواد الهيومية وتشمل ( التاثيرعلى نسبة الانبات لكلا من نباتات الجرجير والفاصوليا من نوع برنكو كما درست تاثيرها على نمو ومحصول نباتات الفاصوليا من نوع برنكو بالاضافة لتاثيرها على نيماتودا تعقد الجذورمن نوع (*Meloidogyne incognita*) وعلى الفطريات الممرضة للتربة من نوع (*Rhizoctonia and Fusarium solani*)

وأوضحت النتائج التالى: أعلى نسب للمواد الهيومية الكلية وحامض الهيوميك و حامض الفالفيك كانت فى عينة (بيو) سواء المستخلصة بالصودا أو البوتاسا كما كانت نسبة الهيوميك للفالفيك اعلى قيمة لها فى كومب ٥ والبيو المستخلصين بالبوتاسا مسجلتا ١.٦٥و ١.٧٤ على التوالى. الحموضة الكلية فى كلا من الهيوميك والفالفيك حققت أفضل قيمة لها فى كومب ٣ (مستخلص بالصودا) وكومب ١ (مستخلص بالبوتاسا) وكانت المجاميع الفينولية اعلى من المجاميع الكربوكسيلية فى كلا من حامضى الهيوميك والفالفيك.وتراوحت نسبة المجاميع الكربوكسيلية الى الفينولية مابين ٠.٢٣٨-٠.٨٤٨ و٠.٢٨٢-٠.٩٣٥ فى كلا المسخلصين الصودا والبوتاسا لكلا من الهيوميك والفالفيك على التوالى وكانت نسبة الكربون العضوى افضل فى كومب٢ وسماد البيو لمستخلصين بالبوتاسا فى كلا من الهيوميك والفالفيك، وكانت نسبة لنيتروجين الكلى اعلى فى كلا من عينتى (بيو) و (كومب ٤) المستخلصين بالبوتاسا. بينما كانت نسبة الكربون الى النيتروجين فى حامض الهيوميك سجلت اعلى قيمة لها فى عينة (بيو) المستلخص بالصودا مسجلة ٢٠.٨ :١ولكن فى الفالفيك كانت ٣٧.٣: ١ فى (كومب٢) المستخلص بالبوتاسا بينما كانت العينات المستخلصة من (كومب ١، ٤ ) بالصودا سجلوا أعلى قيمة فى نسبة الهيدروجين فى الهيوميك فى حين الفالفيك اعلى قيمة كانت فى (بيو) المستخلص بالبوتاسا. أما نسبة الاوكسجين فى الفالفيك كانت أعلى من الهيوميك. المجاميع الفعالة تراوحت مابين الزيادة والنقصان فى كلا من الهيوميك والفالفيك. أما بالنسبة لبعض التطبيقات كان حامض الهيوميك الاسرع فى الوصول لاعلى نسبة انبات فى كلا من الجرجير والفاصوليا فى كل المعاملات. بالاضافة أن الهيوميك والفالفيك المستخلصين ادوا الى تحسن النمو فى الفاصوليا ولكن الهيوميك المستخلص من (كومب١ بتركيز ٥ ملجم/ لتر + ٥٠ملجم نيتروجين) كان احسنهم على الاطلاق فى زيادة المحصول. كما أن الهيوميك عمل على زيادة الاعداد الكلية لميكروبات التربة فى كلا من (كومب١ وبيو) بينما تفوق الفالفيك فى زيادة اعداد الاكتينوميستات فى (كومب٥). وفى دراسة تاثير الهيوميك والفالفيك على ممرضات التربة حقق الفالفيك المستخلص من (بيو) أعلى نسبة تثبيط عل كلا من فطريات (*R . solani and F. solani*) مسجلا ٨٨.٩ ٩٤.٧ % على التوالى. وفى دراسة التاثير على النيماتودا معمليا حقق المبيد النيماتودى (الفايديت) اعلى نسبة تثبيط فى فقس البيض ولكن الهيوميك المستخلص بالبوتاسا من (كومب٣) والفالفيك المستخلصين بالبوتاسا من (بيو) حققا اعلى نسبة تثبيط على اليرقات وسجلا ٢٦.٠٩ و ١.٤٥% على التوالى ومتفوقين على الفايديت. بينما فى تجربة الاصص كان الفالفيك بتركيز ١جم/لتر) بالجرعة الثنائية حقق نتائج متقاربة مع الفايديت (٢مللى) فى تخفيض أعداد الجولز والاعداد الاولية بالنسبة للاعداد النهائية للنيماتودا بالتربة بالاضافة لاختزال اعداد النيماتودا الكلية. وكان الهيومك اكثر تاثيرا على نمو نباتات الطماطم ولوبيا العلف، بينما كان الفالفيك موثرا على محتوى النباتات من عنصر الفوسفور.

**الكلمات الدالة**: حامض الهيوميك، حامض الفالفيك، نيماتودا تعقد الجذور( *Meloidogyne incognita*) ، فطريات التربة الممرضة (*Rhizoctonia and Fusarium solani*) و الفايديت.

# CONTENTS


| | Pages |
|---|---|
| **INTRODUCTION**..... | **1** |
| **REVIEW OF LITERATURE**..... | **3** |
| **1. Background**……..……..…….…….....……..... | **5** |
| **2. Extraction and purification of humic substances** …….……. | **9** |
| **3. Determination of humic substances, humic, fulvic acids and HA /FA ratio (humic index (HI))**……...…… | **12** |
| **4. Properties of humic substances**……..…… | **13** |
| **6. Effect of humic substances on**..... | **19** |
| a. Seed germination……...……...……... | **19** |
| b. Plant growth and yield……..……..... | **21** |
| c. Soil microorganisms…….……...……... | **27** |
| d. Soil borne diseases ……..……....…….. | **30** |
| e. Nematode …….…….……..…… | **31** |
| **7. Effect mechanisms of humic substances on plant growth and yield**……..……...…….…… | **33** |
| **MATERIALS AND METHODS**……..... | **40** |
| **1. Materials**…….……...…….. | **40** |
| **2. Methods**……..…….…...…….……...……..…… | **42** |
| **3. Media used** ……..…...……..…….…… | **53** |
| **RESULTS AND DISCUSSION**……..... | **56** |
| **1. Characteristics of compost and biogas samples**…….…... | **56** |
| **2. Humic substances, humic and fulvic acid percentage and HA/FA ratio**..... | **59** |
| **3. Properties of humic substances extracted from different composts and biogas manure**……..…….. | **61** |
| a. Total acidity and acidic groups of humic substances…..…… | **61** |
| b. Elementary analysis of humic and fulvic acids.……...…... | **65** |
| c. Infrared analysis of humic and fulvic acids samples……..... | **70** |
| **4. Effect of humic and fulvic acids concentrations on germination of *Lepidium sativum* and *Phaseolus vulgaris* L. *Bronco***.……..……...…… | **76** |
| a. Germination percentage of *Lepidium sativum*……...…….. | **76** |

b. Germination percentage of *Phaseolus vulgaris* L. *Bronco*….. **79**

**5. Effect of humic and fulvic acid concentrations on growth and yield of (*Phaseolus valgaris* L. *Bronco*)**……..... **82**

a. Comp.1……..…….…….…….…….... **82**

b. Comp.5 ……..……..……...……..... **85**

c. Biogas manure……..……...… **85**

**6. Effect of humic and fulvic acid concentrations on soil microorganisms**…….……. **89**

a. Comp.1……..…….……..…….…….... **89**

b. Comp.5 ……..……..……...……..... **92**

c. Biogas manure……...……...… **92**

**7. Effect of humic and fulvic acids on growth of some soil borne diseases in *vitro***……. **100**

**8. Effect of humic and fulvic acid concentrations extracted from different sources on *M. incognita***……...….. **104**

a. *In vitro* tests ……...…. **104**

b. Reproduction of *M. incognita* and plant growth response of tomato and cow pea *in vivo*…….…….…..... **107**

**SUMMARY**…….. **112**

**REFERENCES** ……... **121**

**ARABIC SUMMARY** …….…….

# INTRODUCTION

The technology of composting is considered the best process to convert wastes to stabilized organic manures for improve the physical, chemical and microbiological properties of Egyptian soils (Afifi, 2002). The use of compost is an economical solution for the agronomic problem and its application to soil is an acceptable way to improve soil fertility and plant growth, mainly by affecting its physical and chemical properties (Senesi *et al.,* 1996 and Larcheveque *et al.,* 2006). However, land-application of unstable compost could be harmfull to plants, by introducing of phytotoxic compounds (Senesi *et al*., 1996) deficiency of nitrogen and oxygen concentrations (Iglesias-Jime´nez, Perez-Garcia, 1989 and Shi *et al.,* 1999) and reduction in plant yield and generation of unpleasant odours (Veeken *et al.,* 2000). For success in compost application in the field, ensuring safety is based on the use of reliable criteria for testing compost maturity. The important indicator of compost maturity is the content of its humic substances, which is considered the major soil organic matter component, up to 65% to 75%.

Humic substances are extremely versatile and critical components of the natural soil-ecosystem, where they have persisted for hundreds of years (Mayhew, 2004). They are the most widely used distributed organic products of biosynthesis on the surface of the earth, exceeding the amount of organic carbon contained in all living organisms by approximately one order of magnitude (Mayhew, 2004). They provide concentrated and economical form of organic matter that can replace humus depletion caused by conventional fertilization

methods in soil. The addition of humic substances to soil can stimulate plant growth beyond the effect of mineral nutrients alone. Humic substances are extensively used all over the world due to their benefits in agricultural soils, especially in soils with low organic matter. They form an integral part of the ecosystem as they play an important role in global cycling of nutrient and carbon. In the 21$^{th}$ century Levinsky (2005) demonstrated that it was less expensive to grow plants in mineral nutrients solution with added humic substances, than using nutrient solution alone. On the other hand, products containing humic substances provide economically and ecologically friendly solution by increasing plant nutrient and reducing the use of conventional fertilizers (Tarhans, 2003).

Although the benefits of organic fertilizers were well known, many farmers are not convinced enough to move away from the use of conventional chemical fertilizers. These could be partly attributed to limited supply of high quality organic fertilizers. Therefore, many studies on organic fertilizers to replace conventional chemical fertilizers are needed in Egypt. It is important to consider studies toward finding ways of making organic fertilizers, and other compounds necessary for farming, available on a large scale application. The current study aimed to provide practical technology for extraction of humic and fulvic acids from compost materials and biogas manure to produce valuable qualities of humic substances and sufficient quantities suitable for large-scale production and methods for application in Egypt.