



Prise en compte de la réactivité de différentes fractions des matières organiques du sol dans la prévision de la spéciation des métaux : cas du cuivre

Julien Sebastia

► To cite this version:

Julien Sebastia. Prise en compte de la réactivité de différentes fractions des matières organiques du sol dans la prévision de la spéciation des métaux : cas du cuivre. Sciences of the Universe [physics]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0009 . pastel-00003441

HAL Id: pastel-00003441

<https://pastel.hal.science/pastel-00003441>

Submitted on 27 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Présentée
pour obtenir le grade

Docteur de l'AgroParisTech
Spécialité : Environnement et agronomie

Par
Julien Sebastia

**Prise en compte de la réactivité de différentes
fractions des matières organiques du sol dans la
prévision de la spéciation des métaux : cas du cuivre**

Soutenue publiquement le 2 avril 2007
A l'Institut National d'Agronomie Paris-Grignon
devant le jury composé de :

Marc Benedetti
Pierre Chassin
Claire Chenu
Michel Baudu
Jean-Charles Munch
Alain Bermond
Isabelle Lamy

Professeur, Université Paris VII
Directeur de Recherche INRA
Professeur, AgroParis Tech
Professeur, Université de Limoges
Professeur, Institute for Soil Ecology, Neuherrberg
Professeur, AgroParis Tech
Chargée de Recherche, INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse



THESE

Présentée
pour obtenir le grade

Docteur de l'AgroParisTech
Spécialité : Environnement et agronomie

Par
Julien Sebastia

**Prise en compte de la réactivité de différentes
fractions des matières organiques du sol dans la
prévision de la spéciation des métaux : cas du cuivre**

Soutenue publiquement le 2 avril 2007
A l'Institut National d'Agronomie Paris-Grignon
devant le jury composé de :

Marc Benedetti
Pierre Chassin
Claire Chenu
Michel Baudu
Jean-Charles Munch
Alain Bermond
Isabelle Lamy

Professeur, Université Paris VII
Directeur de Recherche INRA
Professeur, AgroParis Tech
Professeur, Université de Limoges
Professeur, Institute for Soil Ecology, Neuhberg
Professeur, AgroParis Tech
Chargée de Recherche, INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Résumé

Le devenir des métaux dans les sols agricoles est d'un intérêt majeur si l'on veut maîtriser les risques pour l'environnement et pour les hommes. Un paramètre clé dans la prévision du devenir des métaux est la connaissance de leur spéciation (i.e. leur forme chimique et leur répartition entre les différentes phases réactives du sol). Cependant, cette spéciation est difficile à établir dans les milieux complexes comme le sol. Des modèles ont été développés pour prévoir cette spéciation. Dans ces modèles, la réactivité des Matières Organiques du Sol (MOS) est assimilée à celle de molécules modèles telles que les Substances Humiques (SH). Or les substances humiques ne sont pas représentatives de la diversité des fractions organiques dans les sols identifiées comme porteuses de métaux. De ce fait, pour prévoir à long terme le devenir des métaux dans les sols, il est nécessaire d'améliorer la prise en compte des MOS dans les modèles et d'y intégrer des fractions organiques autres que les SH. Pour atteindre cet objectif, on a étudié la réactivité avec le cuivre de quatre fractions des MOS susceptibles d'interagir avec les métaux dans les sols : les bactéries, les Matières Organiques Particulaires (MOP), la matière organique liée à la matrice minérale et les Matières Organiques Dissoutes (MOD). Ces différentes fractions organiques ont été isolées à l'aide d'extractions physiques ou chimiques pour trois échantillons de sol qui diffèrent par leur statut organique suite à des amendements organiques effectués pendant une quinzaine d'années, et leur réactivité a été étudiée par potentiométrie. La modélisation des données obtenues a permis de hiérarchiser et de quantifier la réactivité de ces différentes fractions des MOS, et d'introduire ces données de réactivité dans le programme de prévision de spéciation ECOSAT. Trois scénarios de prise en compte des MOS ont été utilisés pour prévoir la spéciation du cuivre : 1) réactivité des MOS décrite avec la base de donnée générique interne au programme ECOSAT 2) réactivité des MOS décrite en contraignant les teneurs en sites réactifs par la CEC du sol 3) réactivité des MOS décrite par la somme des réactivités des différentes fractions étudiées. Ces différents scénarios ont été testés et validés à l'aide de données expérimentales (fractionnements granulo-densimétriques, extractions séquentielles, cuivre dissous) sur les mêmes échantillons de sol avant ou après un ajout de cuivre.

Mots clés : Matières Organiques du Sol, Matières Organiques Particulaires, pool bactérien du sol, acides fulviques, spéciation, modélisation, fractions organiques, réactivité, cuivre

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'unité de Science du sol de l'INRA de Versailles et a été financée par l'INRA et la région Ile de France. Une partie de ce travail a été aussi financée par le projet ECODYN.

Je remercie Daniel Tessier de m'avoir accueilli au sein de l'ancienne unité Science du Sol de Versailles, nouvellement intitulée Physico-chimie et Ecotoxicologie des SolS d'Agrosystèmes Contaminés (PESSAC).

Je tiens à remercier Alain Bermond pour m'avoir épaulé tout au long de cette thèse.

Je remercie Marc Benedetti, Professeur à l'université de Paris VII et Pierre Chassin, Directeur de recherche à l'INRA de Bordeaux pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi que Claire Chenu, Professeur à l'AgroParis Tech, Michel Baudu, Professeur à l'université de Limoges et Jean-Charles Munch, Professeur à l'Institute for Soil ecology de Neuherberg pour leur participation à mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer en particulier ma profonde gratitude et reconnaissance à Isabelle Lamy, encadrante de ma thèse, qui m'a accordé sa confiance pour ce travail. Je la remercie pour sa grande disponibilité durant ces trois années ainsi que pour l'ensemble de ses critiques pertinentes qui ont fait avancer ce travail au quotidien.

Je remercie Folkert van Oort pour ses éclaircissements et conseils avisés en pédologie, mais également pour son enthousiasme et cette envie communicative de sensibiliser les gens à la pédologie. Au risque de blesser son orgueil hollandais, les Pays-Bas sont toujours aussi mauvais au football : Allez les Bleus !!!!!

Je remercie également Philippe Cambier pour les discussions et conseils que j'ai pu avoir au cours de cette thèse.

Tous mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont participé au projet ECODYN, pour leur gentillesse et les échanges que j'ai pu avoir avec eux. Je remercie plus particulièrement David Lejon, Lionel Ranjard et Pierre-Alain Marron (UMR Microbiologie et Géochimie des Sols, Dijon) de m'avoir reçu au sein de leur équipe, Jean Lévêque (UMR

Microbiologie et Géochimie des Sols, Dijon), Jean Martins (LTHE, Grenoble) et Lorenzo Spadini (LGIT, Grenoble) pour les échanges scientifiques que j'ai pu avoir avec eux.

J'exprime mes sincères remerciements à mon compatriote limousin et néanmoins collègue de bureau, Jérôme Labanowski (Post-Doc à l'unité), pour son aide et ses discussions. Par sa venue au laboratoire, nous avons pu créer un antre limousin au milieu de ces irréductibles parisiens. Vive le 87 libre...

Je tiens à remercier Sébastien Breuil, cet étrange personnage à trois yeux, pour son aide technique et sa bonne humeur tout au long de ce travail, pour l'ensemble des éclats de rire et tous les bons moments passés ensembles dans les laboratoires. Seb, la blouse te va si bien, change rien...

Je tiens aussi à remercier Fanny Perreau pour son aide technique, sa bonne humeur et surtout pour ses éclats de rire qui ont résonnés dans tout le bâtiment de Science du Sol. Fanny, l'alcool c'est avec modération...

Je remercie aussi Martine, Virginie, les Jean-Pierre, Amélie, Nelly, Anne et toutes les personnes qui ont contribué par leur aide technique à faire avancer ce travail.

Je voudrais aussi remercier les secrétaires de l'unité Annick et Christiane, Nicole pour son aide dans la recherche bibliographique, ainsi que toute l'équipe de l'école doctorale qui entoure Mme Launay pour leur disponibilité, leur écoute et leur efficacité.

Un grand merci à tous les étudiants et permanents qui ont permis que ces trois années se déroulent dans la bonne humeur et ont contribué par nos discussions et rires à la réussite de ce travail. Alors merci à : Christelle, Jean-Paul, Danilo, Jamel, Mohamed, Diego, Daniel, Seb, Fanny...

Je remercie chaleureusement Edouard, Marie-Elise, et Evelyne pour toute la chaleur qu'ils m'ont témoignée durant ces deux dernières années ainsi que pour leur aide généreuse sur la fin de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Joëlle pour l'attention qu'elle a témoignée à mon égard, pour son soutien et pour son aide tout au long de cette thèse et pendant les périodes les plus difficiles.

J'exprime mon immense gratitude et tout mon amour à toute ma famille : Mes parents, Mon Frangin et Ma Petite Sœur, Michel et Françoise... Merci pour tout...

À mon papi...

Sommaire

Résumé

Remerciements

Introduction 1

Chapitre I. Les matières organiques du sol et leurs affinités avec les métaux..... 5

1. Les différentes fractions des Matières Organiques du Sol (MOS) 5

1.1. DEFINITIONS..... 5

1.2. LES CONSTITUANTS VIVANTS..... 6

1.3. LES MATIERES ORGANIQUES PARTICULAIRES "MOP" 7

1.4. LES SUBSTANCES HUMIQUES..... 8

1.5. LES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES (MOD) 9

2. Propriétés acido-basiques des MOS et complexation avec les métaux 10

2.1. LES SUBSTANCES HUMIQUES..... 10

2.2. LES BACTERIES EN TANT QUE COMPARTIMENT VIVANT DES MOS..... 13

2.3. LES MOP..... 14

2.4. LES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES (MOD) 15

3. Nature des MOS..... 16

3.1 FACTEURS INFLUENÇANT LA NATURE ET QUANTITE DES MOS..... 16

3.2. OUTILS DE CARACTERISATION DE LA NATURE DES MOS 16

3.3. NATURE ET REACTIVITE DES MOS 17

4. Les MOS dans la prévision de la spéciation des métaux dans les sols 17

4.1. PRISE EN COMPTE DES MOS DANS LA PHASE LIQUIDE 18

4.2. PRISE EN COMPTE DES MOS DANS LA PHASE SOLIDE 19

4.3. CONCENTRATION EN SITES..... 20

4.4. LES LIMITES DE CES APPROCHES 21

5. Objectif et Démarche	22
5.1 OBJECTIF DE LA THESE	22
5.3. DESCRIPTION DU SITE DE MACON	24
5.4. CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS	24
5.5. REPARTITION INITIALE DU CUIVRE DANS LES SOLS	25
5.6. REPARTITION DU CUIVRE APRES AJOUT	28
 Chapitre II. Statut organique des sols et réactivité des Substances Humiques... 31	
1. Statut organique des sols et influence des amendements organiques..... 31	
1.1. LOCALISATION DU CARBONE DANS LES FRACTIONS GRANULO-DENSIMETRIQUES.....	31
1.2. COMPOSITION DES SUBSTANCES HUMIQUES	32
1.3. NATURE DES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES.....	35
1.4. CONCLUSIONS	36
2. Réactivité vis à vis du cuivre des fractions fulviques..... 37	
2.1. RESULTATS MAJEURS (RESUME ARTICLE).....	37
 Chapitre III. Réactivité des Matières Organiques Particulaires 61	
1. Capacité d'Echange Cationique des MOP 61	
1.1 MODE OPERATOIRE	62
1.2 RESULTATS	63
1.3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	64
2. Mise en évidence d'une capacité d'adsorption du Cuivre par les MOP 64	
2.1. MODE OPERATOIRE	64
2.2. RESULTATS	65
3. Quantification de la réactivité des MOP..... 67	
3.1. RESULTATS MAJEURS (RESUME ARTICLE).....	67

Chapitre IV. Réactivité des bactéries du sol	91
1. Extraction des bactéries	92
2. Titrage potentiométrique et modélisation	92
2.1 TITRAGES POTENTIOMETRIQUES	92
2.1 MODELISATION	93
3. Résultats.....	95
3.1. PROPRIETE ACIDO-BASIQUES DU POOL BACTERIENS EXTRAITS	95
3.2. INTERACTION CUIVRE-BACTERIE	96
3.3. CONCLUSION	98
 Chapitre V. Relation entre devenir et impact du cuivre sur les bactéries après ajout de cuivre	 100
1. Cas du sol non-amendé (NA).....	101
1.1 RESULTATS MAJEURS (RESUME ARTICLE).....	101
2. Cas du sol amendé avec de la paille (S).....	102
2.1. REPOSE DES DESCRIPTEURS BIOLOGIQUES	102
2.2. EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DE LA SOLUTION DU SOL.....	103
2.3. SPECIATION THEORIQUE DU CUIVRE	105
2.4. CONCLUSIONS	106
3. Cas du sol amendé avec du compost de résineux (CC)	106
3.1. REPOSE DES DESCRIPTEURS BIOLOGIQUES	106
3.2. EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DE LA SOLUTION DU SOL.....	107
3.3. SPECIATION THEORIQUE DU CUIVRE	109
3.4. CONCLUSIONS	109
4. Relation entre le cuivre libre et l'intensité des impacts observés	110

Chapitre VI. Prévision de la spéciation du cuivre dans les sols : prise en compte des MOS	132
1. Réactivité des différentes fractions des MOS	132
1.1. AFFINITE AVEC LE CUIVRE	133
1.2. QUANTITE DE SITES TITRABLES	133
2. Modèle, scénarios et données d'entrée	135
2.1 LE MODELE MULTI-SURFACES UTILISE	135
2.2 DONNEES GENERALES D'ENTREE	136
2.3 PHASES MINERALES REACTIVES	136
2.4. LES 3 SCENARIOS DE PRISE EN COMPTE DES MOS	138
2.5. VALIDITE DES DONNEES D'ENTREE PAR LA CEC DU SOL	140
2.6. DONNEES DE VALIDATION	142
3. Résultats	142
3.1 CUIVRE EN SOLUTION	142
3.2. SPECIATION DU CUIVRE SUR LA PHASE SOLIDE	144
3.3. QUANTITE DE CUIVRE DANS LES MOP	148
Conclusions générales et perspectives	154
Références bibliographiques	157
Annexe A :	171
Annexe B :	173
Annexe C :	174
Annexe D :	175
Annexe E :	176
Annexe F :	177
Annexe G :	180
Annexe H :	182
Annexe I :	185
Annexe J :	186

Listes des figures

Chapitre I

Figure 1.1 Les constituants des MOS (adapté de Plette, 1996 ; Calvet, 2003).....	6
Figure 1.2 Définition et propriétés des substances humiques (adapté de Stevenson, 1982 ; Aiken et al., 1985 ; Chenu et Bruand, 1998)	9
Figure 1.3 Résumé des facteurs influençant la quantité (à l'extérieur) et la qualité (proche du centre) des MOS présentes dans le sol (adapté de Chantigny, 2003 ; Marschner et Kalbitz, 2003)	16
Figure 1.4 Démarche adoptée pour l'amélioration de la prise en compte des MOS pour la prévision de la spéciation des métaux dans les sols.....	23
Figure 1.5 Distribution du cuivre dans les différentes fractions ganulo-densimétriques en pourcentage du cuivre initial total du sol.....	26
Figure 1.6 Distribution du cuivre initial obtenue par extractions séquentielles.....	27
Figure 1.7 Répartition centésimale de l'ajout du cuivre dans les différentes fractions granulométriques.....	29
Figure 1.8 Distribution de l'ajout de cuivre (250 ppm) obtenue par extractions séquentielles	29

Chapitre II

Figure 2.1 Distribution centésimale du carbone dans les différentes fractions granulométriques.....	32
Figure 2.2 Pourcentage de carbone organique du sol extrait par plusieurs extractions répétées de NaOH	33
Figure 2.3 Répartition centésimale du carbone organique extrait des SH entre AF et AH ...	33
Figure 2.4 Répartition centésimale du Cu dosé dans les AF et AH.....	34
Figure 2.5 Distribution moléculaire du carbone organique dissous par ultrafiltration en taille de poids moléculaire < 500, 500-3000, 3000-10000 et > 10000 Da	35
Figure 2.6 Pourcentage de Cu lié en présence d'AF extraits (R=4). AF extraits du sol total : ■ CC, ▲ S et ● NA et de la fraction < 20µm : □ CC, △ S et ○ NA.....	39

Chapitre III

Figure 3.1 Système pour déterminer la CEC des MOP “La moppette”	62
Figure 3.2 CEC mesurées pour les MOP à pH 4,5 et 6.....	63
Figure 3.3 Quantité de cuivre adsorbée par les MOP 200-2000 μm de NA, S et CC à pH 6 65	
Figure 3.4 Isotherme double surface de Langmuir appliquée aux données d’adsorption du Cu par les MOP 200-2000 μm extraites de S à pH 6.	66
Figure 3.5 Titration potentiométrique des MOP 50-200 μm CC en absence de Cu (symboles vides). Les résultats de la modélisation par FITEQL sont donnés en considérant 1 ou 2 sites	67
Figure 3.6 Titrages potentiométriques en absence ou en présence de cuivre (Rapport: ligand/Cu=8) avec les MOP 50-200 μm (symboles pleins) ou 200-2000 μm (symboles vides) extraites de S	68

Chapitre IV

Figure 4.1 Données des titrages acido-basiques pour les bactéries extraites de S (cercles) et CC (triangles). Les lignes sont le résultat de l’ajustement effectué par FITEQL en considérant 3 sites de surface.....	95
Figure 4.2 Exemple de spéciation théorique du cuivre en présence de bactéries extraites de S. Les triangles représentent les données expérimentales et les lignes les calculs effectués par FITEQL.....	97

Chapitre V

Figure 5.1 Schéma descriptif de l’étude en microcosme	101
Figure 5.2 Quantité de CO_2 dégagée par les sols S incubés pour trois types de microcosmes : H_2O (O), HCl (Δ) et Cu ($\square$).....	103
Figure 5.3 Evolution du pH et du COD des solutions du sol au cours de l’incubation pour S extraites des microcosmes Cu (pH $\square$, COD $\blacksquare$) et HCl/ CaCl_2 (pH Δ , COD $\blacktriangle$).....	104
Figure 5.4 Pourcentage de Cu récupéré en solution durant l’incubation ($t_0 = 100\%$) pour les sols S incubés avec HCl/ CaCl_2 (Δ) et Cu ($\square$).....	104
Figure 5.5 Distribution du COD en petites ($< 500 \text{ Da}$) et grosses molécules ($> 500 \text{ Da}$) pour les microcosmes HCl/ CaCl_2 (a) et Cu (b) pour les solutions du sol extraites de S.....	105

Figure 5.6 Quantité de CO ₂ dégagée par les sols CC incubés pour trois types de microcosmes : H ₂ O (O), HCl (△) et Cu (□).....	106
Figure 5.7 Evolution du pH et du COD des solutions du sol au cours de l'incubation pour CC extraites des microcosmes Cu (pH □, COD ■) et HCl/CaCl ₂ (pH △, COD ▲).	107
Figure 5.8 Pourcentage de Cu récupéré en solution durant l'incubation (t 0 = 100%) pour les sols CC incubés avec HCl/CaCl ₂ (△) et Cu (□).....	108
Figure 5.9 Distribution du COD en petite (< 500 Da) et grosses molécules (> 500 Da) pour les microcosmes HCl/CaCl ₂ (a) et Cu (b) pour les solutions extraites de CC.	108
Figure 5.10 Comparaison de la concentration en cuivre libre et de la quantité de cuivre "toxique" par quantité de biomasse pour les trois scénarios.....	111

Chapitre VI

Figure 6.1 Schéma conceptuel du modèle multi-surfaces utilisé (inspiré de Weng et al., 2001)	135
Figure 6.2 Schéma conceptuel du scénario 5 fractions.....	139
Figure 6.3 Répartition de la CEC entre les argiles, MOS et oxydes (Fer et Mn)	141
Figure 6.4 Concentration en Cu en solution mesurée et calculée pour les sols 60 avec les deux hypothèses de la forme chimique du fer en solution.....	143
Figure 6.5 Concentration en Cu en solution mesurée et calculée pour les sols 250 avec les deux hypothèses de la forme chimique du fer en solution.....	144
Figure 6.6 Distribution du cuivre dans les sols 60 entre les MOS, oxydes de Fe et Mn, obtenue par extractions séquentielles et par le calcul avec les trois scénarios de prise en compte des MOS.....	145
Figure 6.7 Distribution du cuivre dans les sols 250 entre les MOS, oxydes de Fe et Mn, obtenue par extractions séquentielles et par le calcul avec les trois scénarios de prise en compte des MOS.....	145
Figure 6.8 Distribution du cuivre entre les MOS, oxydes de Fe et Mn, obtenue par extractions séquentielles et par le calcul pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions après ajustement des constantes de complexation pour les sols 60 (A) et les sols 250 (B)	148
Figure 6.9 Quantités de cuivre liées aux MOP mesurées et calculées pour les sols 250.....	149
Figure 6.10 Quantités de cuivre liées aux MOP mesurées et calculées pour les sols 60.....	151

Listes des tableaux

Chapitre I

Tableau 1.1 Type et abondance des organismes vivants dans le sol	7
Tableau 1.2 Quelques groupements fonctionnels des substances humiques	11
Tableau 1.3 Exemples de teneur en métaux dans les MOP	14
Tableau 1.4 Hypothèses de modélisation pour les MOD	19
Tableau 1.5 Hypothèses de modélisation pour les MOS	20
Tableau 1.6 Caractéristiques géochimiques des échantillons composites	25
Tableau 1.7 Teneur en oxydes de Fe et Mn dans NA, S et CC	28
Tableau 1.8 Répartition du cuivre initial entre les MOP et les autres fractions de MOS.....	28
Tableau 1.9 Répartition de l'ajout de cuivre entre les MOP et les autres fractions de MOS	30

Chapitre II

Tableau 2.1 Rapport Cu/Corg (en $\mu\text{g Cu/ mg Corg}$) pour les AF, AH.....	34
Tableau 2.2 Propriétés spectroscopiques des solutions extraites.....	36
Tableau 2.3 pKa des AF extraits du sol et de la fraction $< 20 \mu\text{m}$ obtenu par FITEQL.....	38

Chapitre III

Tableau 3.1 CEC des MOP après suivi du pH pendant l'étape de saturation au calcium	64
Tableau 3.2 Valeurs des constantes conditionnelles et capacités complexantes associées déterminées à pH 6.....	66
Table 3.3 Apparent stability constants of Cu-POM complexes computed by FITEQL. (mean $\pm$ standard error).....	86

Chapitre IV

Tableau 4.1 pKa et concentration en sites de surface trouvés dans la littérature	96
Tableau 4.2 Constantes de stabilité Cu-bactérie trouvées dans la littérature comparées à celles obtenues dans ce travail	98

Chapitre V

Tableau 5.1 Récapitulatif des réponses observées pour les différents descripteurs utilisés pour NA	102
Tableau 5.2 Enumérations des bactéries viables hétérotrophiques (VH) et résistantes au cuivre (Cu^R) pour les microcosmes H_2O et Cu aux 15 ^{ème} et 35 ^{ème} jours d'incubation (S) ...	103
Tableau 5.3 Spéciation théorique du cuivre calculée par ECOSAT dans les solutions du sol extraites des microcosmes HCl/CaCl_2 et CuCl_2 durant l'incubation (S).	105
Tableau 5.4 Récapitulatif des réponses observées pour les différents descripteurs utilisés pour NA et S.	106
Tableau 5.5 Enumérations des bactéries viables hétérotrophiques (VH) et résistantes au cuivre (Cu^R) pour les microcosmes H_2O et Cu aux 15 ^{ème} et 35 ^{ème} jours d'incubation (CC).107	107
Tableau 5.6 Spéciation théorique du cuivre calculée par ECOSAT dans les solutions du sol extraites durant l'incubation des microcosmes HCl/CaCl_2 et CuCl_2 durant l'incubation (CC)	109
Tableau 5.7 Récapitulatif des réponses observées pour les différents descripteurs utilisés pour NA, S et CC.	109

Chapitre VI

Tableau 6.1 Récapitulatif des constantes de complexation du cuivre avec les groupements carboxyliques pour les différentes fractions organiques étudiées.....	133
Tableau 6.2 Capacité de fixation du cuivre des fractions organiques extraites exprimée en g de matériau, en g de C de la fraction ou en g de C du sol.....	134
Tableau 6.3 Calcul de la CEC du cortège des argiles pour NA, S et CC	137
Tableau 6.4 CEC des différentes phases réactives de Na, S et CC.....	141
Tableau 6.5 CEC du sol et celle des MOS pour les scénarios NICA 50 et 5 fractions	146
Tableau 6.6 Rapport CEC MOS sur cuivre pour les sols 60 et 250	147
Tableau 6.7 Proportion de MOP 50-200 et 200-2000 μm réactives pour NA, S et CC.	150

INTRODUCTION

Introduction

Le sol est le support de nombreuses activités humaines, agricoles, urbaines ou industrielles. Depuis ces dernières décennies, l'ensemble de ces activités a contribué à un enrichissement plus ou moins élevé en Elément Traces Métalliques (ETM) des horizons superficiels des sols cultivés. Par exemple, l'utilisation intensive de bouillie bordelaise dans les sols de vignes a conduit à une importante accumulation de cuivre pouvant aller jusqu'à 1500 mg Cu kg⁻¹ de sol, alors que la teneur en cuivre sans apports anthropiques varie entre 5 et 30 mg Cu kg⁻¹ de sol (Besnard et al., 2001). Un autre exemple est l'irrigation de parcelles agricoles avec des eaux brutes usées pendant plus de 100 ans, qui a conduit à une forte accumulation en Pb, Zn, Cu et Cd dans les horizons de surface (Lamy et al., 2006). Un dernier exemple concerne la pollution des sols due à l'activité industrielle. De fortes accumulations de Zn et Pb dans les horizons de surface ont été observées pour des sols situés à proximité d'une ancienne zinguerie et plomberie (Fernandez-Cornudet et al., 2006). Aujourd'hui, malgré une forte diminution des teneurs en métaux dans les sources de contamination, il existe encore un apport de métaux dans les sols dû à l'activité humaine. En faible quantité, certains ETM appelés aussi oligo-éléments sont essentiels à la vie (ex Zn et Cu) mais deviennent toxiques à forte concentration. D'autres comme le Pb ou le Cd n'ont pas d'utilité connue et sont toxiques à des concentrations faibles. L'accumulation et le transfert des ETM dans les nappes phréatiques ou dans la chaîne alimentaire constituent un risque aussi bien pour l'écosystème naturel que pour l'homme.

Pour mieux appréhender ce risque, de nombreuses études se sont intéressées au devenir des métaux dans les sols contaminés. La connaissance de la teneur totale en métaux dans un sol est une étape importante pour évaluer le degré de la contamination, que l'on peut assimiler à un danger. Cette donnée est néanmoins insuffisante pour déterminer les risques de toxicité ou de transfert dans les nappes phréatiques et dans la chaîne alimentaire. La spéciation -c'est-à-dire les formes physico-chimiques sous lesquelles les métaux se trouvent dans le sol- est plus représentative du risque de ces polluants pour l'environnement et *in fine* pour l'homme.

La spéciation expérimentale des ETM est difficile à déterminer dans les sols car les métaux interagissent avec beaucoup de phases réactives (D'Amore et al., 2005). Différentes

stratégies de modélisation, avec des degrés de complexité variés, ont été développées pour déterminer la spéciation théorique des métaux dans les sols. Les plus sophistiquées reposent sur la combinaison de plusieurs modèles pour décrire les différentes phases réactives du sol comme les oxydes de fer, les Matières Organiques du Sols (MOS), les oxydes de manganèse et les argiles (Weng et al., 2001 ; Cancès et al., 2003 ; Lumsdon, 2004). En général, les résultats concordent avec les données expérimentales (extractions chimiques sélectives, spectroscopie d'absorption des rayons X, membrane échangeuse de cations...). Dans ces modélisations, la réactivité des MOS est généralement assimilée à celle de molécules modèles comme les substances humiques.

La prise en compte des MOS est importante en raison de leur réactivité connue vis-à-vis des métaux. Mais les MOS ont un rôle ambivalent dans le devenir des métaux dans les sols. En effet, elles représentent l'un des compartiments importants dans l'accumulation des ETM dans les sols (McBride et al., 1997 ; Almas et al., 2000 ; Sauve et al., 2000). Elles peuvent aussi faciliter la mobilisation des ETM (Sauvé et al., 2000 ; Nierop et al., 2002 ; Citeau, 2004). De plus, la dynamique des MOS peut être aussi perturbée par les métaux (Boucher et al., 2005b ; Kandeler et al., 1996). Par conséquent, la dynamique des métaux est liée à celle des MOS. Il apparaît alors nécessaire de relier ces deux dynamiques pour prévoir à long terme le devenir des métaux dans les sols. Cependant, il sera très délicat de relier ces deux dynamiques en utilisant les substances humiques comme molécules modèles pour décrire la réactivité des MOS. En effet, les substances humiques ne correspondent pas à des familles chimiques définies mais à des fractions définies opérationnellement. Par conséquent, les substances humiques ne peuvent pas être reliées à des fractions organiques dont le devenir ou la fonction est connue et modélisable dans les sols (Aiken et al., 1985 ; Balesdent, 1996, Wander, 2004). L'introduction de fractions organiques –réactives vis-à-vis des métaux- dans les modèles, autres que les substances humiques, semble donc être une étape nécessaire pour relier la dynamique des métaux à celle des MOS.

Le but de ce travail est d'améliorer la prise en compte des MOS dans la prévision de la spéciation des métaux dans les sols. Pour atteindre cet objectif, ce travail se décompose en trois volets. Le premier consiste en l'extraction et l'étude de la réactivité de différentes fractions organiques du sol. Le second volet porte sur une étude en dynamique de l'impact du cuivre sur le sol. Le dernier volet est l'étude de différents scénarios de prise en compte des MOS dans la modélisation de la spéciation du cuivre dans les sols. Le cuivre a été utilisé au

cours de ce travail d'une part parce qu'il peut être toxique, participant majoritairement à la pollution des sols, d'autre part parce qu'il est reconnu comme ayant une forte affinité avec la matière organique. De ce fait, le cuivre a servi aussi de sonde de réactivité au cours de ce travail.

↳ Le premier chapitre présente une revue bibliographique sur les connaissances des relations entre différentes fractions organiques et les métaux dans les sols. Il expose aussi les domaines qu'il reste encore à étudier pour mieux caractériser les relations de ces fractions organiques des MOS avec les métaux. Ce chapitre détaille les manières dont les MOS sont prises en compte dans la modélisation, et conclut sur les objectifs et la démarche de ce travail.

↳ Le second chapitre correspond à l'étude de la réactivité des substances humiques dans le but de caractériser la réactivité des Matières Organiques Dissoutes (MOD) et celle des matières organiques liées aux minéraux du sol. Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'un article : "Changes in soil organic matter chemical properties after organic amendments" par Sebastia, Labanowski et Lamy, accepté à Chemosphère. Cet article présente les changements de caractéristiques (propriétés acido-basiques et réactivité vis-à-vis du cuivre) des MOS par le biais des acides fulviques extraits sur le sol total et dans la fraction $< 20 \mu\text{m}$.

↳ Le troisième chapitre correspond à l'étude de la réactivité des Matières Organiques Particulaires (MOP) dont le but est de mieux caractériser l'interaction MOP-métaux. Une partie de ce chapitre a fait aussi l'objet d'un article : "Chemical properties of soil POM size fractions: buffer capacity and Cu affinity" par Sebastia, van Oort et Lamy, soumis à European Journal of Soil Science. Cet article présente les propriétés acido-basiques des MOP ainsi que leur affinité avec le cuivre.

↳ Le quatrième chapitre correspond à l'étude de la réactivité d'un pool de bactéries extrait directement du sol. Ce chapitre compare les données de réactivité de la littérature (obtenues avec des souches de bactéries cultivées) avec les données de réactivité obtenues pour un pool de bactéries indéterminées extrait directement du sol. Cette étude a pour objectif de montrer si l'on peut transposer la réactivité de bactéries cultivées en laboratoire à la réactivité d'un pool bactérien extrait du sol.

↳ Le cinquième chapitre fait l'objet d'une étude en dynamique de l'impact d'un ajout de cuivre sur le sol et plus particulièrement sur les bactéries. Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à Soil Biology and Biochemistry : "Impact of added copper on soil

bacteria and copper modeling in soil: a dynamic study" par Sebastia, Lejon, Chaussod, Ranjard et Lamy. Cet article tente de relier impact et devenir du cuivre. Dans ce chapitre, nous avons aussi étudié l'influence du statut organique des sols sur l'impact du cuivre. Une partie des données expérimentales obtenues au cours de ce chapitre a été utilisée au Chapitre VI.

↳ Dans le sixième chapitre, nous avons abordé la modélisation de la spéciation du cuivre dans nos sols. Différents scénarios de prise en compte des MOS dans la prévision de la spéciation des métaux ont été testés et validés à l'aide des données expérimentales.

Pour finir, nous concluons sur les principaux résultats obtenus au cours de ce travail et nous présentons différentes perspectives concernant les pistes à suivre, pour améliorer la prise en compte des MOS dans la prévision de la spéciation des métaux dans les sols.

Chapitre I.

Les matières organiques du sol et leurs affinités avec les métaux

Chapitre I. Les matières organiques du sol et leurs affinités avec les métaux

1. Les différentes fractions des Matières Organiques du Sol (MOS)

1.1. Définitions

La Matière Organique du Sol (MOS) est une fraction du sol en perpétuel renouvellement. L'apport et l'accumulation de résidus de matière organique fraîche font suite à la mort des végétaux et des organismes du sol et aux transformations biologiques, physiques et chimiques que cette matière organique fraîche subit (Chenu et Bruand, 1998). Une définition des MOS est donnée par Feller (1997).

« La MOS est l'ensemble des constituants organiques d'un sol, morts ou vivants, d'origine végétale, animale ou microbienne, fortement transformés ou non »

Mais dans la suite de ce manuscrit, l'appellation MOS au pluriel (Les Matières Organiques du Sol) sera préférée car cette appellation met plus en évidence une hétérogénéité dans la nature des constituants organiques du sol (e.g. constituants non vivants ou vivants, molécules simples ou macromolécules...) comme le précise la définition de Schnitzer (1991)

« La MOS est constituée de l'ensemble des organismes vivants du sol, des résidus organiques à différents stades de leur évolution, des débris végétaux grossiers, des macromolécules ou molécules simples »

Ainsi, les MOS qui ne représentent que quelques pourcents du poids du sol, peuvent être divisées en trois fractions principales qui sont en constante évolution, interagissant les unes avec les autres (Figure 1.1).

①- Les constituants vivants représentent environ 15 % des MOS et regroupent des micro-organismes (bactéries, champignons, algues et actinomycètes), la pédofaune (protozoaires, acariens, vers de terre, nématodes, insectes) et les racines des végétaux (Olah et al., 1978).

②- Les débris constitués de morceaux de racines, d'animaux, de feuilles et de branches de différentes tailles plus ou moins décomposés par les êtres vivants du sol. De quelques centimètres à quelques micromètres, cette fraction est également appelée Matières

Organiques Particulaires (MOP) ou Fraction Légère (LF) suivant le protocole d'extraction (Gregorich et al., 2006)

③- L'humus, constitué de composés organiques issus de la dégradation des résidus végétaux ou animaux par les micro-organismes utilisant les résidus organiques comme source d'énergie. Le terme humus englobe des molécules que l'on peut classer chimiquement : protéines, acides gras, polysaccharides, lignines, esters, sucres, alcools, acides organiques... et d'autres molécules chimiquement complexes regroupées sous le terme de substances humiques (Kononova, 1961).

Les constituants non vivants c'est-à-dire l'humus et les débris végétaux et animaux constituent la majorité des MOS (environ 85 %).

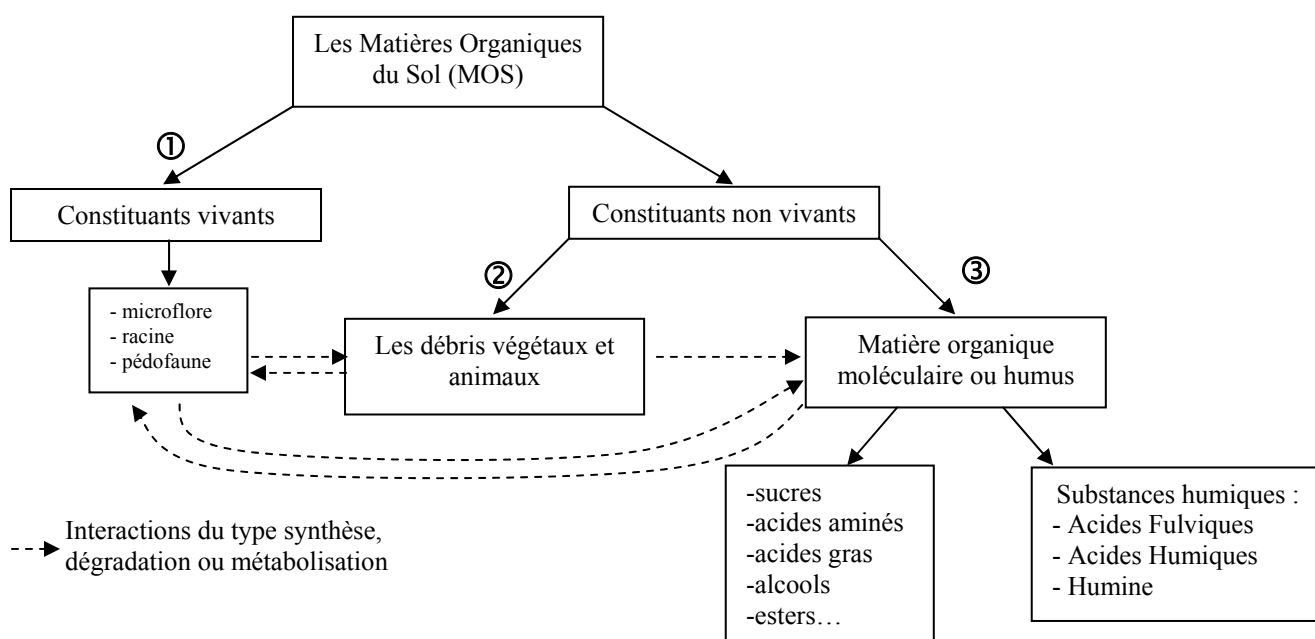


Figure 1.1 Les constituants des MOS (adapté de Plette, 1996 ; Calvet, 2003)

1.2. Les constituants vivants

1.2.1. Généralités

Une grande variété d'organismes vivants réside dans les sols : vers de terre, nématodes, insectes, acariens, protozoaires, micro-organismes. Parmi eux, les micro-organismes constituent quelques pourcents de la teneur en carbone des MOS, mais ils se chiffrent par millions voire par milliards par gramme de sol (Tableau 1.1). Ces micro-organismes, regroupés sous le terme de microflore incluent des bactéries, champignons, algues et actinomycètes.

Les êtres vivants du sol	Nombre (/g de sol)	Biomasse (kg/ha)
Bactéries	10^6 - 10^{10}	300-3000
Actinomycètes	10^5 - 10^7	500-5000
Champignons	10^4 - 10^6	50-500
Protozoaires	10^4 - 10^5	7-200
Algues	10^3 - 10^5	50-200
Faune	10^3 - 10^4	500-2000

Tableau 1.1 Type et abondance des organismes vivants dans le sol (Chenu et Bruand, 1998)

Il existe un lien étroit entre les différents êtres vivants du sol dont chacun à un rôle dans le devenir des MOS dans les sols (Balesdent, 1998). Cependant, lors d'une pollution métallique, les micro-organismes sont la fraction du vivant la plus affectée dans un sol en raison de leur faible taille et de leur grande surface spécifique (Jansen et al., 1994). D'autre part, il a été montré que les micro-organismes du sol peuvent immobiliser une part non négligeable de métaux mais aussi favoriser la mobilité des métaux dans les sols (Ledin et al., 1996 ; Ledin, 2000 ; Wu et al., 2006).

D'après le Tableau 1.1, les bactéries sont les micro-organismes les plus nombreux dans les sols et sont donc intéressantes à ce titre à étudier.

1.3. Les Matières Organiques Particulaires "MOP"

Les MOP sont composées principalement de résidus de plantes encore reconnaissables associés avec des micro-organismes - tels que des hyphes de champignons et bactéries- mais aussi des charbons dont la proportion est reliée à l'historique du site : culture sur brûlis, feu... (Molloy et Speir, 1977 ; Spycher et al., 1983 ; Gregorich et Ellert, 1995 ; Wander, 2004).

Balesdent et al. (1991) définissent les MOP de façon opérationnelle comme étant les résidus organiques $> 50 \mu\text{m}$ séparés par fractionnement granulo-densimétrique. Cependant d'autres études ont montré que des MOP peuvent être isolées entre 20 et 50 μm (Ducaroit et Lamy, 1995) ou que des particules organiques libres peuvent être aussi observées dans la fraction argileuse ($< 2 \mu\text{m}$) (Chenu et Plante, 2006). L'ensemble de ces travaux suggère que les MOP existent au niveau de toute l'échelle granulométrique d'un sol.

Ainsi, Christensen (2001) définit "la matière organique non complexée" comme un pool transitoire entre la litière d'une part et l'association organo-minérale. Il s'agit d'une

fraction des MOS qui ne comprend pas des composés de la litière (>2mm) et qui n'est pas incorporée dans des complexes organo-minéraux.

Les MOP peuvent représenter entre 15-40 % des MOS dans les horizons de surface de sols sous végétation permanente, alors que dans les sols cultivés, les MOP représentent généralement moins de 10 % des MOS.

Ces fractions organiques ont été étudiées en particulier pour leur labilité et leur temps de résidence dans les sols (Balesdent, 1996). Leur turn-over est plus faible que celui de la litière mais plus rapide que celui de la matière organique liée aux argiles ou aux limons (Christensen, 2001). Du fait de leur labilité, les MOP ont été proposées comme index de qualité des MOS (Haynes, 2000 ; Wander, 2004). En effet, la proportion des MOP dans les sols est affectée par le type de végétation, les pratiques agricoles et d'autres facteurs comme le climat, le type de sol et l'activité de la microfaune (Balesdent et al., 1998 ; Christensen, 2001).

Les MOP ont été aussi étudiées pour leurs teneurs en métaux dans les sols plus ou moins contaminés. Les travaux montrent toujours un enrichissement des MOP en métaux par rapport à la teneur dans les sols (e.g. Ducaroir et Lamy, 1995 ; Flores-Vélez et al., 1996 ; Balabane et al., 1999 ; Besnard et al., 2001). Les MOP seront donc des fractions organiques intéressantes à étudier à ce titre.

1.4. Les substances humiques

Largement étudiées par la communauté scientifique, les substances humiques (SH) constituent la fraction organique majeure dans les sols. Les premiers essais d'extraction des substances humiques ont été effectués par Achard en 1786 (Stevenson, 1982 ; Schnitzer, 1991). Il appliqua une solution alcaline à de la tourbe et obtint une solution noire qui précipita après acidification. Ces premières extractions faites par Achard ouvrirent un grand nombre de travaux sur les substances humiques, qui continuent encore aujourd'hui.

Les SH sont définies comme "une série de substances de poids moléculaire relativement haut de couleur marron à noire, issues de réactions de synthèses secondaires" (Stevenson, 1982) ou "comme un ensemble de substances organiques naturellement présentes dans tous les environnements terrestres et aquatiques. Elles résultent de la dégradation des résidus d'animaux et végétaux." (Aiken et al., 1985).

Les SH ne correspondent pas à des familles chimiques définies et, par conséquent, il est difficile de définir leur structure moléculaire. De ce fait, les SH ne correspondent pas à des

fractions organiques dont le devenir, et la fonction dans le sol peuvent être discriminés simplement (Aiken et al., 1985 ; Balesdent, 1996).

Donc, les SH sont définies opérationnellement et classées en fonction de leur solubilité en trois fractions (Schnitzer, 1991) :

↳ L'humine : fraction des substances humiques insolubles à tout pH.

↳ Les Acides Humiques (AH) : fraction des substances humiques insolubles à pH acide (<1).

↳ Les Acides Fulviques (AF) : fraction des substances humiques solubles à tout pH.

Néanmoins, les substances organiques regroupées dans chacune de ces différentes fractions possèdent des propriétés chimiques semblables.

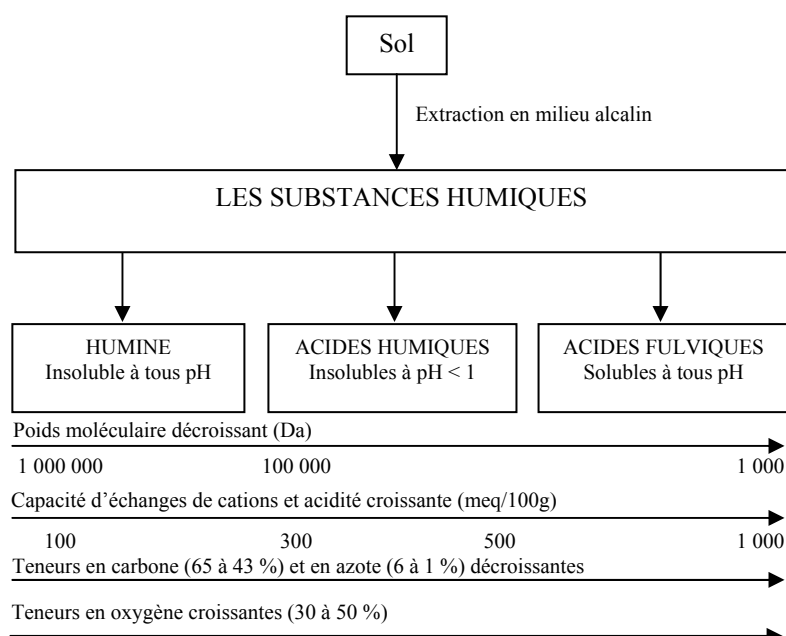


Figure 1.2 Définition et propriétés des substances humiques (adapté de Stevenson, 1982 ; Aiken et al., 1985 ; Chenu et Bruand, 1998)

Fraction majoritaire des MOS, les SH ont été beaucoup étudiées pour leurs propriétés acido-basiques et l'affinité avec les métaux en raison de leur facilité d'extraction et de purification. Ce sont des matériaux de choix qui ont été utilisés pour caractériser la réactivité des MOS (e.g. Fiol et al., 1999 ; Cancès et al., 2003 ; Lumsdon et al., 2004 ; Plaza et al., 2005c)

1.5. Les Matières Organiques Dissoutes (MOD)

Les MOD sont constituées d'un mélange de composés organiques présents en solution. Une faible partie des MOD est composée principalement de molécules organiques de faible poids moléculaire qui peuvent être identifiées chimiquement comme les acides organiques, les

sucres et les acides aminés... Mais une grande partie des MOD est constituée de macromolécules complexes de haut poids moléculaire comme des substances humiques (Harter et Naidu, 1995 ; Kalbitz et al., 2000 ; Strobel, 2001)

Les MOD proviennent de la litière, de la décomposition des MOS, des exsudats des racines et de la biomasse microbienne (principalement des communautés dites "décomposeurs"). Ces communautés de décomposeurs regroupent une large variété de bactéries, champignons, protistes et invertébrés (Olah et al., 1978).

Les micro-organismes ont un rôle ambivalent, à la fois consommateur et producteur des MOD (Lundquist et al., 1999a). Parmi les micro-organismes, les champignons seraient les agents les plus importants dans le processus de production des MOD car ils dégradent la matière organique de façon incomplète (Moller et al., 1999). Certains composés des MOD sont connus pour leur affinité avec les métaux participant, ainsi à leur mobilisation vers les horizons profonds des sols (Citeau, 2004)

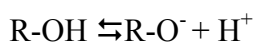
2. Propriétés acido-basiques des MOS et complexation avec les métaux

2.1. Les Substances Humiques

2.1.1. Propriétés acido-basique

Les substances humiques sont des composés polyfonctionnels c'est-à-dire possédant un grand nombre de groupements fonctionnels hydrophiles (Tableau 1.2). En fonction du pH du milieu, certains groupes fonctionnels des substances humiques peuvent s'ioniser. Cette ionisation conduit à l'apparition de charges négatives qui donnent aux substances humiques la capacité à complexer les cations et donc les métaux.

↪ Cette charge négative provient de la dissociation de groupements phénoliques, carboxyliques, alcooliques mais aussi certains groupements moins abondants comme les groupements soufrés. L'équilibre correspondant est le suivant :



Les domaines de valeurs de pH où cette dissociation a lieu sont les suivants :

↪ Les groupements sulfoniques (-SO₃H) s'ionisent à pH < 2. Cette observation a été effectuée sur des acides fulviques extraits d'un mélange sol, ce dernier ayant reçu des boues de station d'épuration (Sposito et Holtzclaw, 1977).

↪ Les groupements carboxyliques (-COOH) s'ionisent entre pH 4-6 (Perdue, 1985).

↪ Les groupements phénoliques (R-OH) s'ionisent entre pH 9-11 (Perdue, 1985).

↪ Et enfin, les groupements amines et thiols se dissocient entre pH 8.5-12.5 (Karlsson, 2005).

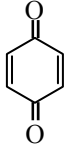
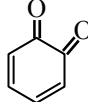
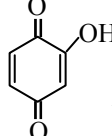
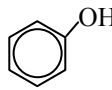
Groupes azotés	Groupes oxygénés aliphatiques	Groupes oxygénés aromatiques	Groupes soufrés et phosphatés
$-\text{NH}_2$ <i>Amine primaire</i> $=\text{NH}$ <i>Imine</i> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$ <i>Amide</i>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{H} \end{array}$ <i>Aldéhyde</i> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}- \end{array}$ <i>Cétone</i> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array}$ <i>Acide carboxylique</i> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OR} \end{array}$ <i>Ester</i> $\text{R}-\text{CH}_2-\text{OH}$ <i>Alcool</i> $-\text{HC}=\text{CH}-\text{OH}$ <i>Enol</i> $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2$ <i>Ether</i>	 <i>Quinone</i>  <i>Quinone</i>  <i>Hydroxyquinone</i>  <i>Phénol</i>	$-\text{SH}$ <i>Thiol</i> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{S}-\text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ <i>Acide sulphonique</i> $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <i>Acide phosphorique</i>

Tableau 1.2 Quelques groupements fonctionnels des substances humiques (Ross, 1994 ; Calvet, 2003)

Les groupements carboxyliques (COOH) ou phénoliques (ϕ -OH) contribuent en grande majorité au caractère acide des substances humiques avec souvent plus de 50% de celui-ci dû aux groupements carboxyliques. La teneur en groupements fonctionnels acides dans les substances humiques exprimée en mole de groupements réactifs est généralement comprise entre 3 et 14 eq H^+/kg SH d'après Milne et al. (2001).

Il semble difficile de prédire la teneur de sites réactifs des MOS à l'aide de données génériques. En effet, Milne et al. (2001) ont déterminé des paramètres génériques qui permettent d'estimer la concentration en sites réactifs pour une large variété de substances humiques avec une erreur de 20%.

Or, la teneur en sites est utilisée comme donnée d'entrée de modèle et détermine la quantité de métaux pouvant être complexée par les substances humiques. L'utilisation de données génériques comme données d'entrée des modèles pourrait donc conduire à une grande sous ou surestimation de la quantité de métaux liée aux SH.

2.1.2.. Interaction avec les métaux

Les substances humiques du fait de leur charge négative sont réactives vis-à-vis des métaux. L'émergence de nouvelles techniques de spectrométrie dans les années 60 à 80, comme la spectrométrie d'infrarouge (IR) ou la spectrométrie de résonance de spin électronique (ESR) a permis de montrer l'importance des groupes carboxyliques et phénoliques des substances humiques dans la complexation des métaux et d'élucider comment les métaux se complexent avec les substance humiques (Schnitzer et Skinner, 1965 ; Piccolo et Stevenson, 1982).

Ainsi les substances humiques peuvent former avec les métaux différents types d'association suivant le métal impliqué et sa concentration (Hatira et al., 1990 ; Murray et Linder, 1983 ; Andreux, 1997). Les études faites par ESR ont permis de montrer l'existence de deux niveaux de liaison dans l'association métaux-substances humiques : complexe de sphère interne et externe. En effet, lorsque la concentration est faible, les liaisons covalentes se forment préférentiellement pour donner des complexes monodentés ou bidentés (complexe de sphère interne) alors qu'à concentrations plus élevées, les liaisons deviennent plus ioniques (complexe de sphère externe) (Ross, 1994). L'EXAF a été utilisée plus récemment pour étudier la complexation du Cd, Cu et HgCH₃ avec les groupements fonctionnels de substances humiques par Karlsson (2005). Celui-ci confirme l'existence de complexes de sphère interne entre les métaux étudiés et les substances humiques.

Dans les sols, les ETM se localisent principalement dans les fractions fines (Ducaroir et Lamy, 1995 ; Flores-Vélez et al., 1996 ; Besnard et al., 2001). Or ces fractions fines sont généralement riches aussi en carbone organique, provenant de l'adsorption physique ou chimique de molécules organiques à la surface des minéraux (Yariv et Cross, 2002).

La nature de l'association organo-minérale rend complexe la séparation physique de la matière organique de la matrice minérale, dans l'objectif d'isoler le carbone organique correspondant. L'extraction chimique en particulier l'extraction des substances humiques en milieu alcalin des fractions fines semble être la meilleure approche pour pouvoir étudier la réactivité de la matière organique localisée dans ces fractions. La comparaison de la réactivité de la matière organique des fractions fines du sol avec celle de la matière organique des fractions grossières, nous permettra de mieux comprendre la localisation des métaux dans les fractions fines du sol.

2.2. Les bactéries en tant que compartiment vivant des MOS

2.2.1. Propriétés acido-basiques

La paroi cellulaire des bactéries est composée d'un grand nombre de polymères contenant des groupements fonctionnels qui, suivant le pH, peuvent se déprotoner. Les principaux groupements fonctionnels sont (Plette, 1996 ; Fein et al., 1997 ; Guiné et al., 2006) les groupements carboxyliques ($R-COOH$), phosphomonoesters ($R-OPO_3H_2$), phosphodiesteres ($(RO)_2-P(OH)_2$), amines ($R-NH_3$) et hydroxyles ($R-OH$).

Fein et al. (1997) montrèrent que les propriétés acido-basiques des bactéries peuvent être modélisées par 3 sites d'acidités distinctes :

↳ Les sites acides comprenant les groupements carboxyliques et phosphodiesteres de $pK_a < 5,5$

↳ Les sites neutres comprenant les groupements phosphomonoesters de $pK_a \approx 7$

↳ Les sites basiques comprenant les groupements amines et hydroxyles de $pK_a > 8$

Dans la littérature, des souches de bactéries cultivées extraites du sol ou non sont essentiellement étudiées. Ces différents travaux montrent que les constantes de dissociation varient peu entre différentes souches et types de bactéries (Fein et al., 1997 ; Markai et al., 2003 ; Dittrich et Sibling, 2005 ; Guiné et al., 2006). Néanmoins, pour une souche donnée, ces constantes de dissociation varient suivant la phase de croissance des bactéries (Daughney et al., 2001). Les teneurs en site peuvent varier d'un facteur 10 entre différentes souches et espèces de bactéries (Fein et al., 1997 ; Markai et al., 2003 ; Guiné et al., 2006)

2.1.2. Interaction avec les métaux

Le fait que les bactéries possèdent des groupements à charge négative variable situés sur leur paroi leur confère une capacité à fixer les métaux.

Yee et Fein (2001) ont proposé des paramètres génériques pour décrire les propriétés acido-basiques et l'adsorption du Cd à la surface des bactéries pouvant être utilisé par défaut dans les modèles. Cependant, l'ensemble des résultats de Yee et Fein (2001) a été obtenu sur 9 souches de bactéries cultivées en laboratoire pour une même phase de croissance. Or dans les sols réside un grand consortium de variété d'espèces et de souches de bactérie ayant des différentes phases de croissance à un temps donné.

Par conséquent, la transposition de ces données génériques pour décrire la réactivité du compartiment bactérien du sol semble délicate. L'extraction d'un pool bactérien du sol et

l'étude de ses propriétés acido-basiques et d'adsorption des métaux peuvent être une alternative d'acquérir des données plus "intégratives" de la réactivité des bactéries du sol.

2.3. Les MOP

Les MOP ont des teneurs élevées en métaux et leur facteur d'enrichissement (ETM dans les MOP / teneur totale du sol en ETM) peut varier de 1 à 12 suivant l'ETM et la taille des MOP considérées (Besnard et al., 2001 ; Balabane et van Oort, 2002 ; Lamy et al., 2002). En effet, quelles que soient l'origine de la pollution et la teneur en métaux du sol, les MOP sont enrichies en métaux (Tableau 1.3).

Sol	Métaux et teneurs dans les sols étudiés	Exemples de teneur en Cu et Pb dans les MOP	Origine de la pollution	Références
Sol limoneux de culture (Aisne)	57 mg Pb/kg 49 mg Cu/kg Cd, Cr, Ni, Zn	623 mg Pb/kg 928 mg Cu/kg (50-100µm)	Boues de station d'épuration	(Ducaroir and Lamy, 1995)
Sol viticole sableux acide (Beaujolais)	209 mg Cu/kg	6200 mg Cu/kg (50-100µm)	Bouillie bordelaise	(Flores-Vélez et al., 1996)
Sol de culture faiblement contaminé (Site de Mortagne du nord)	59 mg Pb/kg Zn, Cd	401 mg Pb/kg (50-100µm)	Retombée métallurgique	(Balabane et al., 1999)
Sol viticole calcaire (Champagne)	248 mg Cu/kg	2000 mg Cu/kg (50-200µm)	Bouillie bordelaise	(Besnard et al., 2001)
Horizon OLn, OLv, Ah sous pelouse métallicole (Site de Mortagne du nord)	6496 mg Pb/kg Zn	12000 mg Pb/kg (50-200µm)	Site d'un ancien crassier	(Balabane and van Oort, 2002)
4 sols avec un gradient de pollution (Site Metal Europ)	975 mg Pb/kg 35,3 mg Cu/kg Zn, Cd,	3112 mg Pb/kg 294 mg Cu/kg (50-100µm)	Retombée métallurgique	(Lamy et al., 2002)

Tableau 1.3 Exemples de teneur en métaux dans les MOP pour différents types de pollution

Les travaux qui ont mis en évidence ces enrichissements des MOP en métaux montrent toujours que les MOP sont d'autant plus enrichies en métaux qu'elles sont de petites tailles.

D'autre part, dans une gamme de teneur allant de 10 à 5000 mg/kg de métaux dans les sols, Lamy et al. (2002) ont observé que plus la teneur en métaux dans les sols est élevée plus la teneur en métaux dans les MOP est élevée sans montrer de signe de saturation.

Cependant, la nature de l'association métaux-MOP n'est pas encore connue. Ainsi Lamy et al. (2002) émettent l'hypothèse que dans les sols agricoles, l'accumulation des

métaux dans les MOP serait due à des processus intervenants probablement de façon conjointe, soit abiotiques (adsorption, complexation), soit dus à l'activité des micro-organismes vivants.

Dans le cas d'une pelouse métallicole, Balabane et al. (1999) expliquent les teneurs plus élevées en métaux dans les MOP de petites tailles par une décomposition sélective des parties des MOP avec de faibles concentrations en métaux et une résistance à la biodégradation pour les portions riches en métaux. Une étude comparative sur la biodégradation de feuilles de métalophyte riches ou peu riches en Zn et Cd semble confirmer cette hypothèse (Boucher et al., 2005a,b). Boucher et al. (2005a) montrent dans un premier temps que la biodégradation des feuilles contaminées et non contaminées est identique dans les deux cas, ce qui correspondrait à la dégradation de carbone facilement biodégradable. Dans un second temps, ils observent que les feuilles non contaminées en métaux sont plus biodégradées que les feuilles contaminées en métaux.

De plus, dans les sols contaminés, les MOP ($> 50 \mu\text{m}$) peuvent représenter entre 10-30% du métal total du sol (Flores-Vélez et al., 1996 ; Besnard et al., 2001) ce qui est non négligeable. On ne sait pas cependant quel est le devenir de l'association MOP-métaux, ce qui reste une question importante du fait des fortes teneurs en métaux dans les MOP et de leur labilité dans le sol.

Des premiers éléments de réponse ont été apportés sur les mécanismes entre MOP et métaux par une étude récente sur des MOP extraites d'un sol de culture ayant été contaminé en Zn et Pb, suite à des retombées d'une ancienne usine de métallurgie (Labanowski et al., Annexe D). Nous suggérons que la réactivité de surface des MOP serait due à la biodégradation qui induirait la formation de sites réactifs.

Des études en laboratoires portant spécifiquement sur la réactivité des MOP vis-à-vis des métaux doivent être menées pour appuyer les hypothèses émises sur les mécanismes d'enrichissement des métaux dans les MOP.

2.4. Les Matières Organiques Dissoutes (MOD)

Les MOD ont des propriétés acido-basiques et complexantes favorisant potentiellement la désorption des métaux de la phase solide vers la solution mais aussi leur migration vers les horizons plus profonds du sol (Naidu et Harter, 1998 ; Gao et al., 2003 ; Wu et al., 2003).

Dans leur globalité, les MOD ont été souvent étudiées pour leur propriété de transport et de solubilité des polluants métalliques (Zhou et Wong, 2001 ; Weng et al., 2002a ; Han et Thompson, 2003 ; Merritt et Erich, 2003). La réactivité de certaines fractions (colloïde, substances humiques, petits acides organiques...) est bien connue mais il existe relativement peu d'études sur la réactivité "globale" des MOD vis-à-vis des métaux (Luster et al., 1996 ; Evangelou et Marsi, 2001 ; Strobel et al., 2001 ; Nierop et al., 2002), ceci étant probablement dû aux faibles quantités de MOD présentes dans la solution du sol.

Ainsi dans la littérature, pour modéliser la spéciation des métaux dans la solution du sol, la réactivité des MOD est généralement assimilée à celle des SH et en particulier à celles des AF (Dwane et Tipping, 1998 ; Christensen et al., 1999, Tipping et al., 2003 ; Ge et al., 2005).

3. Nature des MOS

3.1 Facteurs influençant la nature et quantité des MOS

Les MOS constituent un réservoir de carbone en constante évolution dont la nature et la quantité sont affectées par différents facteurs (Kononova, 1961 ; Quiquampoix, 2000 ; Balesdent et al., 1998 ; Franzluebbers et al., 2001 ; Chenu, 2001 ; Nardi et al., 2004 ; Rivero et al., 2004 ; Ding et al., 2006). La Figure 1.3 reprend ces différents facteurs, l'encadré le plus proche du centre correspond aux facteurs influençant la nature des MOS, alors que l'encadré le plus loin du centre correspond aux facteurs qui vont plutôt influencer la quantité des MOS.

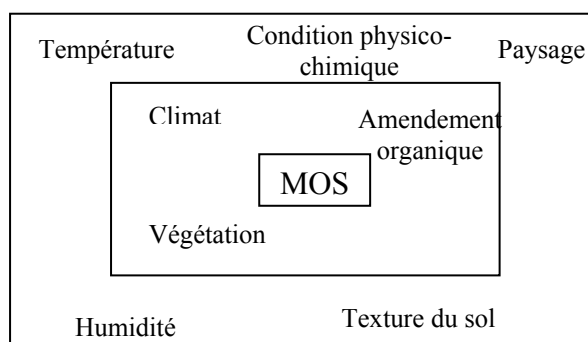


Figure 1.3 Résumé des facteurs influençant la quantité (à l'extérieur) et la qualité (proche du centre) des MOS présentes dans le sol (adapté de Chantigny, 2003 ; Marschner et Kalbitz, 2003)

3.2. Outils de caractérisation de la nature des MOS

La quantification des MOS se fait de façon courante par mesure du carbone du sol. Cependant l'évaluation de la nature des MOS est plus difficile à apprécier, aucun protocole

standardisé à ce jour n'est défini, excepté l'interprétation du rapport C/N (rapport de la teneur du carbone sur sa teneur en azote du sol).

En général, l'évaluation de la nature des MOS passe par l'extraction des substances humiques (Nardi et al., 2004; Rivero et al., 2004 ; Ding et al., 2006). Cette nature est ensuite appréciée :

↳ Soit par une caractérisation structurale ou élémentaire à l'aide de techniques analytiques comme l'Infra-Rouge, RMN du carbone et de l'azote, ESR, pyrolyse...(Kögel-Knabner, 2000). Ces techniques visent à identifier les types de liaisons, les proches voisins du C ou encore des groupes fonctionnels (carboxylique, amine, phénolique...)

↳ Soit à l'aide de mesures visant à quantifier l'acidité totale, le rapport C-AH/C-AF (teneur en C dans les AH par la teneur en C dans les AF) décrivant l'humification, le rapport E_4/E_6 (absorbance à 465nm sur l'absorbance à 665 nm) étant utilisé pour caractériser les AF et AH (MacCarthy and Rice, 1985 ; Stevenson, 1994)

3.3. Nature et réactivité des MOS

La nature des MOS variant en fonction de différents facteurs, elle influence donc directement la réactivité des MOS vis-à-vis des ETM. En effet, la capacité de fixation des ETM par les MOS varie. Les chiffres proposés pour la CEC des MOS varient de 100 à 500 meq/100g (Baize, 2002). D'autre part, l'affinité avec les métaux est différente aussi. Buffle (1988) effectua un récapitulatif de constantes d'affinité pour le Cu obtenues pour diverses matières organiques naturelles (MON) et observa une grande variabilité des constantes d'affinité du Cu pour les MON. A notre connaissance il n'existe aucune étude qui a tenté de relier nature des MOS à sa réactivité. Ainsi, il est peu probable que la MOS d'un podzol - constituée principalement de d'accumulation de débris végétaux peu dégradés- est la même réactivité que les MOS d'un sol de grande culture amendé de boue de station d'épuration. Existerait-il alors une typologie entre nature des MOS et réactivité ?

4. Les MOS dans la prévision de la spéciation des métaux dans les sols

Dans la littérature, la réactivité des MOS est en général assimilée à celle de molécules modèles et plus particulièrement à celles des substances humiques. D'une part, les SH représentent environ 50% du carbone de la Terre (Jones et Bryan, 1998) et d'autre part elles présentent l'avantage d'être facilement isolables et purifiées. Les SH ont donc été largement étudiées ; des modèles thermodynamiques décrivant leurs propriétés acido-basiques et leurs affinités avec les métaux ont été développés principalement durant ces 20 dernières années. A

ce jour, les développements des modèles ont été effectués principalement autour de deux approches conceptuelles:

↳ soit les propriétés physico-chimiques des sites réactifs se distribuent de façon *discrète* : Humic Ion Binding-MODEL VI (Tipping, 1998) ou Stockholm Humic Model (Gustafsson, 2001)

↳ soit les propriétés physico-chimiques des sites réactifs se distribuent de façon *continue* : NICA (Non Ideal Competitive Adsorption Model) (Kinniburgh et al., 1996) couplé avec un modèle électrostatique Donnan (Benedetti et al., 1996a).

Pour ces modèles, des jeux de données ont été publiés (Tipping, 1998 ; Milne et al., 2001 ; Milne et al., 2003) pour les substances humiques. Ces jeux de données ont été établis à partir d'un grand nombre de jeux de données d'acides fulviques et humiques extraits de milieux aquatiques ou de sols. Ces modèles peuvent donc être utilisés tels quels avec leur base de données intégrées. Le résultat d'une modélisation dépend toujours de la qualité des données d'entrée ; ceci présente le risque que les données ne correspondent pas aux propriétés de complexation et de réactivité des substances humiques (i.e. teneur en sites réactifs) à modéliser.

Dans la suite de cette partie, nous présentons les hypothèses de modélisation liées à la prise en compte des MOS dans la phase liquide du sol puis celle dans la phase solide.

4.1. Prise en compte des MOS dans la phase liquide

En général, la réactivité des MOS en phase liquide, ou MOD est assimilée à celles des AF extraits du sol ou à celle d'un mélange AF + AH (Tableau 1.4). Par conséquent, les modèles thermodynamiques et leurs jeux de données pour les substances humiques ont été utilisés pour déterminer la spéciation des métaux dans les solutions du sol ou des eaux de surface (Tipping et al., 2002 ; Weng et al., 2002b,c ; Ge et al., 2005). Ces auteurs montrent que la modélisation permet généralement de bien prévoir leurs données mesurées. Cependant, le manque de connaissance sur la concentration en carbone réactif est limitant. En effet, seule la concentration en carbone organique dissous (COD) est mesurée, mais la proportion de ce carbone -qui est effectivement réactif- n'est pas connue. La proportion de carbone réactif est ensuite assimilée à une concentration en AF ou AH (Tableau 1.4). De ce fait, des optimisations sur la proportion de carbone réactif sont effectuées (Dwane et Tipping., 1998 ; Lofts et al., 2001 ; Tipping et al., 2002) ou bien cette proportion est fixée en faisant référence à des travaux antérieurs (Cancès et al., 2003 ; Ge et al., 2005).

	Hypothèses sur la nature des MOD	Concentration en carbone réactif	Références
Spéciation du Cu et Pb dans des eaux du sous-sol	MOD = AF	[AF] = COD	(Christensen et al., 1999)
Solubilité de l'Al dans des solutions de sol sous forêts en Europe	MOD = AF	$[AF] = 2COD - [MOD]_{\text{inerte}}$ [MOD] _{inerte} ajustée	(Lofts et al., 2001)
Spéciation du Fe et Al dans de l'eau douce	MOD = AF	[AF] = 60-70 % COD	(Tipping et al., 2002)
Spéciation de Al dans des eaux naturelles	MOD = AF + AH	[AH] = 30 % COD × 2 [AF] = 30 % COD × 2	(Weng et al., 2002b)
Spéciation du Cu, Pb, Cd, Zn, Ni solution du sol	MOD = AF + AH	[AH] = 30 % COD × 2 [AF] = 30 % COD × 2	(Weng et al., 2002c)
Spéciation du Cu, Zn, Cd et Pb dans des solutions du sol	MOD = AF	[AF] = 65 % COD	(Tipping et al., 2003)
Adsorption du Pb, Cu et Cd horizon Oe de sol de forêt	MOD = AF	[AF] = 2 COD	(Gustafsson et Schaik, 2003)
Spéciation de Cd, Zn dans une solution du sol	MOD = AF + AH	[AH] = 50 % COD [AF] = 50 % COD	(Cancès et al., 2003)
Spéciation du Cd et du Pb dans la solution du sol	MOD = AF	[AF] = 65 % COD	(Ge et al., 2005)

Le facteur 2 provient de l'hypothèse que les AF sont constitué de 50 % de C en masse
COD Carbone Organique Dissous

Tableau 1.4 Hypothèses de modélisation pour les MOD

4.2. Prise en compte des MOS dans la phase solide

Des hypothèses similaires à celles prises pour les MOS en solution sont effectuées en général pour modéliser la réactivité des MOS de la phase solide. En effet, la réactivité de ces dernières est toujours assimilée à celle des SH et plus majoritairement des AH (Tableau 1.5). Les travaux de la littérature arrivent à prévoir leurs données expérimentales (extraction séquentielle, EXAF, concentration en métaux dissous ou libres) (e.g. Weng et al., 2001 ; Cancès et al, 2003 ; Gustafsson et al., 2003). Cependant, ce type de modélisation repose sur l'approximation que la réactivité des MOS peut être assimilée à celle de molécules modèles comme les AH et les AF. D'autre part, la quantité de AH en AF introduite dans les modèles est : soit ajustée par les modèles, soit extrapolée à partir de la teneur en carbone ou en MO du sol ou soit extrapolée à une quantité de SH extraites.

	Hypothèse sur la nature des MOS	Concentration en carbone réactif	Références
Spéciation du Cu et Cd dans deux sols sableux	MOS = AH	[AH]= teneur en carbone du sol	(Benedetti et al., 1996b)
Solubilité de l'Al dans des solutions de sol sous forêts en Europe	MOS = AF + AH	[AF] et [AH] ajustées	(Lofts et al., 2001)
Spéciation du Cd, Zn, Ni et Pb sols sableux	MOS = AH	[AH]= teneur en MO	(Weng et al., 2001)
Spéciation du Cu et Zn dans un sol contaminé par épandage de lisier porcin	MOS = AH	[AH] = 50 % de la teneur en MO	(Ponthieu, 2003)
Spéciation de Cd, Zn dans un sol proche d'une ancienne industrie métallurgique	MOS = AH	[AH] = 50 % de la teneur en C total du sol	(Cancès et al., 2003)
Adsorption du Zn, Pb, Cu et Cd sur des sols sableux suédois	MOS = AF + AH	[AF] et [AH] ajustées	(Gustafsson et al., 2003)
Adsorption du Pb, Cu et Cd horizon Oe de sol de forêt	MOS = AF + AH	[AF] et [AH] ajustées	(Gustafsson et Schaik, 2003)
Spéciation du Al et Cd dans des sols de forêt	MOS = AH	[AH] = Quantité de SH du sol extraite avec NaOH	(Lumsdon, 2004)
Détermination de Kd Cd, Cu, Pb et Zn d'horizons de sol forêt	MOS = AH + AF	[AH] et [AF] ajustées	(MacDonald et Hendershot, 2006)

Tableau 1.5 Hypothèses de modélisation pour les MOS

4.3. Concentration en sites

La concentration en sites est un facteur important qui va déterminer la quantité de métaux liée par les SH et donc par extrapolation aux MOS sur la phase solide ou aux MOD en solution. Cette concentration dans les modèles résulte d'une multiplication entre la concentration en SH et la teneur en sites. Ainsi, la concentration en sites mise en jeu pour la modélisation peut être ajustée soit par la concentration en SH soit par la teneur en sites.

Dans la plupart des travaux, afin de mieux prévoir les données expérimentales, les concentrations en sites sont contraintes de deux façons :

↳ Par optimisation de la teneur sites ou de la concentration en SH (Benedetti et al., 1996b ; Lofts et al., 2001 ; Gustafsson et al., 2003 ; Gustafsson et Schaik, 2003 ; MacDonald et Hendershot, 2006).

↳ Par utilisation de caractéristiques de l'échantillon (CEC du sol ou quantité de SH extraites à la soude) pour fixer la concentration en SH ou la teneur en sites (Weng et al., 2001 ; Cancès et al., 2003 ; Lumsdon, 2004 ; MacDonald et Hendershot, 2006).

Un grand nombre d'hypothèses voire même d'optimisation est nécessaire pour définir la réactivité des MOS (i.e. concentration en site). La contrainte de la réactivité des MOS (i.e. concentration en site) par des caractéristiques des échantillons semble être une meilleure approche par rapport à l'optimisation de la réactivité des MOS à l'aide des modèles. En effet, cette optimisation donne des caractéristiques à la MOS, qui certes permettent de prévoir les données expérimentales, mais qui n'ont peut-être aucune réalité.

4.4. Les limites de ces approches

Nous avons vu que les MOS contiennent -en plus des substances humiques- d'autres constituants organiques (bactéries, champignons, débris végétaux...) qui interagissent aussi avec les métaux dans les sols. D'après Dudal et Gerard (2004), pour améliorer la prise en compte de la matière organique naturelle dans les programmes thermodynamiques, certaines substances non-humiques doivent être prises en compte, comme par exemple les petits acides organiques. De manière plus générale, l'hétérogénéité des MOS pourrait être intégrée dans ces programmes. En effet, la réactivité de certaines fractions des MOS -comme les MOP et les micro-organismes- semble être importante car le métal mesuré dans ces fractions peut représenter jusqu'à 30 % de la teneur en métal du sol. Cependant la réactivité de ces fractions reste encore à définir et à caractériser, afin de prendre en compte leur réactivité dans la modélisation.

D'autre part, la grande majorité des modélisations effectuées dans la littérature utilise les jeux de données des modèles pour décrire la réactivité des MOS. Or, nous l'avons vu précédemment que la nature des MOS influence sa réactivité. Serait-il nécessaire de prendre en compte aussi la nature des MOS dans les programmes thermodynamiques, afin de mieux représenter la réactivité des MOS ?

5. Objectif et Démarche

5.1 Objectif de la thèse

L'objectif général est d'améliorer la prise en compte des MOS pour la prévision de la spéciation des métaux dans les sols. Pour atteindre cet objectif, il faut i) caractériser et quantifier la réactivité des différentes fractions identifiées lors de ce chapitre ii) comparer la réactivité de ces différentes fractions et hiérarchiser leur importance dans la spéciation des ETM dans les sols iii) intégrer la réactivité des différentes fractions étudiées dans un modèle et le paramétrer iv) tester et comparer différentes stratégies de prise en compte des MOS dans les modèles thermodynamiques pour prévoir la spéciation des métaux dans les sols.

L'utilisation d'un formalisme identique pour décrire la réactivité de ces fractions organiques est nécessaire si on veut comparer et hiérarchiser ces différents matériaux entre eux (vivants, solides, liquides).

5.2. Démarche

La Figure 1.4 présente la démarche générale adoptée pour ce travail. Ce travail concerne deux approches, l'une statique et l'autre dynamique. La partie "statique" a consisté en des extractions physiques ou chimiques, de différentes fractions organiques des MOS puis en une étude de leur réactivité vis-à-vis du cuivre par potentiométrie (partie gauche de la Figure 1.4). Nous avons utilisé le cuivre d'une part comme sonde de réactivité car il a une forte affinité avec la matière organique et d'autre part, il est souvent présent dans les sols pollués par les métaux. Nous avons défini 4 fractions : les MOP, les MOD, la matière organique liée à la surface des minéraux (MO-min) et les bactéries. Les MOP ont été séparées du sol par fractionnement granulo-densimétrique et leur réactivité a été étudiée par détermination de leur capacité d'échange cationique, par batch et par potentiométrie. La réactivité des MOD et de la MO-min a été étudiée à travers celle des AF extraits du sol total et de la fraction granulométrique $< 20\mu\text{m}$. L'étude de la réactivité des bactéries du sol a été effectuée par extraction d'un pool bactérien par méthode densimétrique et par caractérisation de sa réactivité par potentiométrie. Le formalisme discret et le programme FITEQL ont été utilisés pour décrire la réactivité de ces différentes fractions.

La partie "dynamique" s'est intéressée à l'impact d'un ajout de cuivre sur les différentes fractions organiques des MOS et plus particulièrement sur les bactéries en fonction du temps (partie de droite de la Figure 1.4)

Dans la dernière partie, différentes stratégies de prise en compte des MOS dans les modèles thermodynamiques pour la prévision de la spéciation du cuivre dans le sol ont été

étudiées. Les données de réactivité des différentes fractions organiques déterminées dans la partie “statique” ont été utilisées. La validation de ces différentes stratégies a été réalisée à l’aide de données expérimentales obtenues dans de la partie “dynamique” de ce travail. (Double flèche à droite de la Figure 1.4)

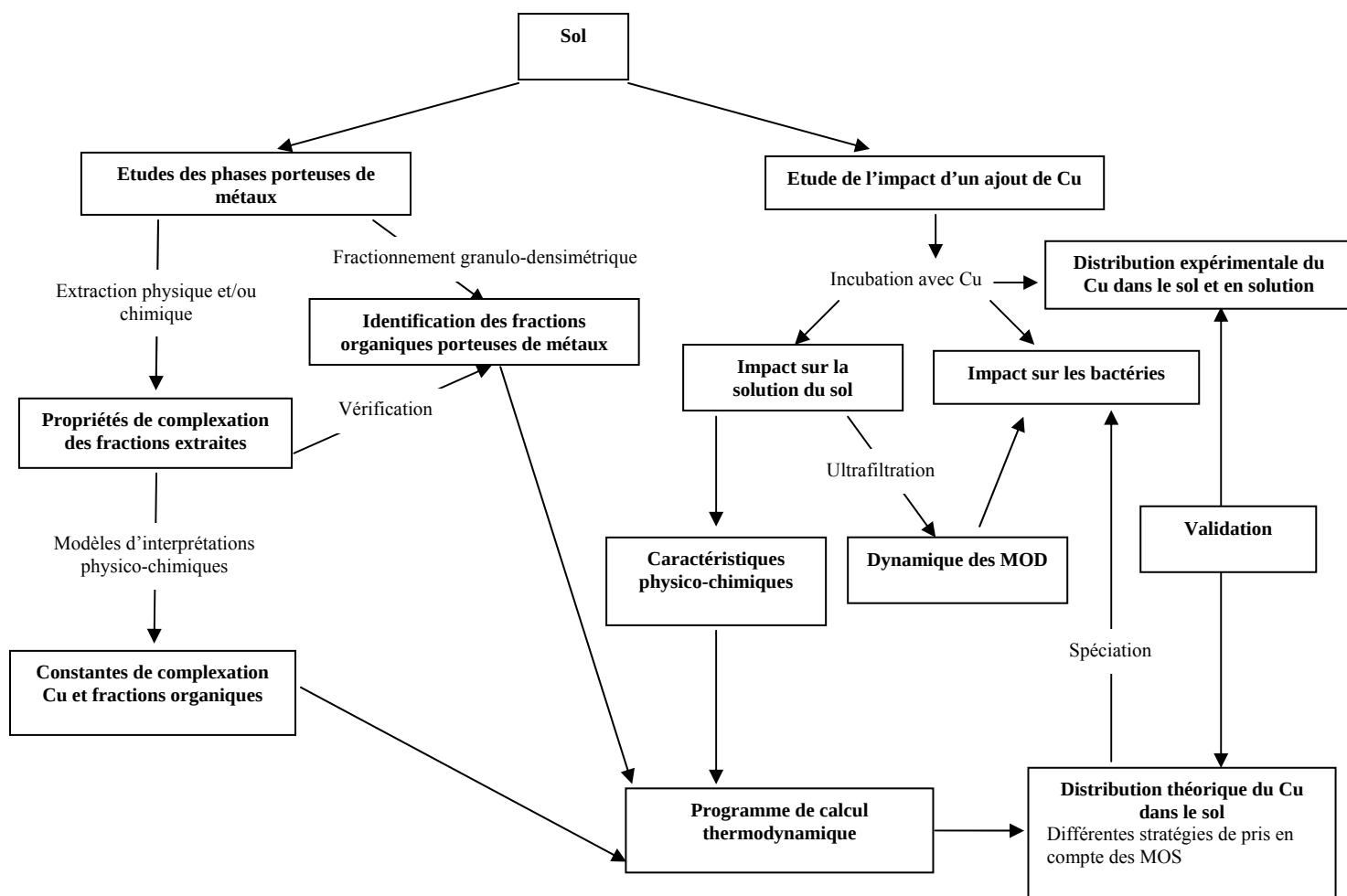


Figure 1.4 Démarche adoptée pour l’amélioration de la prise en compte des MOS pour la prévision de la spéciation des métaux dans les sols

Enfin, pour appréhender la relation nature-réactivité des MOS, nous avons utilisé des échantillons provenant d’un site expérimental pour lesquels la gestion des amendements organiques a été différente pendant ces 15 dernières années.

5.3. Description du site de Macon

5.3.1. Localisation et description de l'essai agronomique de Macon

Le site expérimental se situe dans la région de Bourgogne près de Macon et concerne un essai agronomique débuté en 1991. Il s'agit d'une parcelle de vignes divisée en blocs sur lesquels sept traitements ont été apportés, différant par la quantité et la qualité des amendements organiques. Chaque traitement possède quatre répliquas (blocs) disposés de façon aléatoire (Annexe A).

Ce site expérimental avait été initialement mis en place pour étudier l'influence de la nature d'apports organiques sur l'érosion des sols viticoles. De ce fait, les amendements organiques sont déposés sur la surface du sol sous forme de mulch (Annexe B). Le descriptif de l'entretien des blocs et des quantités d'amendements organiques apportés est détaillé dans l'Annexe A.

5.3.2. Choix des amendements

Sur ce site expérimental, le sol est un sol brun profond, argilo-limoneux fin développé sur la même roche mère. Au cours de ce travail, nous avons étudié la situation témoin du site sans amendement organique (NA) (autre que les résidus de cultures), deux amendements organiques, paille (S) et compost de résineux (CC). Ce choix a été fait suite aux travaux réalisés conjointement avec le laboratoire de Microbiologie et Géochimie des Sols (INRA-Dijon) sur la structure des communautés bactériennes et fongiques (Lejon et al., Annexe C). Dans ce travail, nous avons essayé de relier le statut organique des sols -apprécié à travers l'étude SH- à la structure des communautés bactériennes. Les résultats montrent que la structure des communautés bactériennes entre NA, S et CC a été modifiée due à des statuts organiques différents.

5.4. Caractéristiques des échantillons

Les 5 premiers centimètres de chaque bloc retenu ont été prélevés en mai 2004 après avoir écarté la couche superficielle d'amendement organique. Les échantillons composites ont été ensuite obtenus en mélangeant une même quantité de sol provenant des 4 blocs de répétition ; leurs principales caractéristiques géochimiques sont données dans le Tableau 1.6.

Les trois échantillons présentent des teneurs semblables en cuivre et apparaissent faiblement contaminés, pollution qui serait due à des pratiques culturales antérieures au site expérimental (Meneghetti, 2005). Ce résultat montre que les intrants organiques n'ont pas apporté de cuivre. Les amendements organiques S ou CC ont fait légèrement varier la teneur

en élément majeur. En effet, les teneurs en Al et Fe observées dans le sol amendé par CC sont plus faibles que pour NA et S, et plus fortes pour Ca. Ces différences pourraient s'expliquer par l'apport de matières organiques qui entraîne donc un effet de dilution. A l'opposé pour le Ca, les teneurs sont plus élevées dans CC que pour NA et S, et suggèrent que les amendements organiques ont apporté du Ca, ceci peut-être dû à un traitement préalable des amendements (chaulage des composts) ou bien à la composition intrinsèque de l'amendement. Néanmoins, ce qui est le plus différencié entre les trois sols est la teneur en carbone organique, le C/N et la CEC (CC>>S>NA). En se basant sur le C/N, les amendements organiques semblent avoir modifié la nature des MOS tout en augmentant la CEC.

	NA	S	CC
Sables (50-2000µm) en %	11,0	10,5	12,9
Limons (2-50 µm) en %	57,0	57,9	55,7
Argiles (< 2µm) en %	32,0	31,6	31,4
pH eau	6,8	6,8	6,6
C organique g/kg	12,3	17,6	43,0
C/N	11,7	13,1	17,5
Biomasse (mg C/kg)	218,0	330,0	415,0
CEC cmol ⁺ /kg	16,8	18,6	24,3
Cu mg/kg	62,4	60,2	59,9
Al g/100g	5,1	5,1	4,8
Ca g/100g	0,5	0,6	0,8
Fe g/100g	3,1	3,1	2,8
K g/100g	1,3	1,4	1,3
Mg g/100g	0,4	0,4	0,4
Mn g/kg	0,8	0,8	0,8
Na g/100g	0,5	0,5	0,5

Tableau 1.6 Caractéristiques géochimiques des échantillons composites

5.5. Répartition initiale du cuivre dans les sols

Afin de connaître la répartition initiale du cuivre des sols avant ajout de cuivre, nous avons effectué des extractions séquentielles ainsi que des fractionnements granulo-densimétriques. La distribution granulo-densimétrique du carbone sera présentée au Chapitre II.

5.5.1. Fractionnement granulo-densimétrique

5.5.1.1. Mode opératoire

50 g de sol ont été dispersés mécaniquement par un agitateur rotatif en présence de 125 ml d'eau permutée et de 10 billes dans un flacon en polypropylène. La suspension est

tamisée sous eau à l'aide de tamis de 200, 50 et 20 μm . Les fractions légères 2000-200 et 50-200 μm ont été séparées selon le protocole de Baslesdent et al. (1991). Les MOP correspondant aux fractions légères sont séparées par flottaison de la fraction minérale dense. La pureté des fractions obtenues est contrôlée par observations sous loupe binoculaire. La fraction $< 20\mu\text{m}$ a été séparée de la solution par centrifugation (13261 g pendant 10 min) et lyophilisée. Les autres fractions sont séchées à 55°C. Les teneurs en cuivre sont déterminées pour chaque fraction. La solution restante est concentrée dans un évaporateur rotatif à 35°C sous vide afin de permettre le dosage du cuivre éventuellement mobilisé en solution. Les résultats sont exprimés par rapport à la masse sèche à 105°C.

5.5.1.2. Répartition granulométrique du Cu

La distribution granulométrique du cuivre en 6 fractions est donnée à la Figure 1.5. Pour NA, S et CC, la majeure partie du cuivre ($> 65\%$) se localise dans la fraction fine ($<20\mu\text{m}$) et la contribution de chaque fraction au Cu total du sol diminue lorsque la taille des fractions augmente (Figure 1.5). Partant de la situation NA comme référence, l'apport de compost de résineux (CC) a induit un changement de répartition granulométrique du Cu de la fraction fine vers les fractions grossières (50-200 et 200-2000 μm) et plus particulièrement dans les fractions MOP (Figure 1.5). L'apport de paille (S) n'a pas entraîné de modification majeure de la répartition du Cu, une faible augmentation de la quantité de cuivre est tout de même observée dans les MOP 50-200 μm . Le proportion en Cu dans la fraction 20-50 μm reste inchangée pour NA, S et CC (Figure 1.5). Les résultats obtenus pour le Cu indiquent un changement de localisation granulométrique entre NA, S et CC. Ce changement de localisation peut être assimilé à un changement de spéciation dû aux apports organiques.

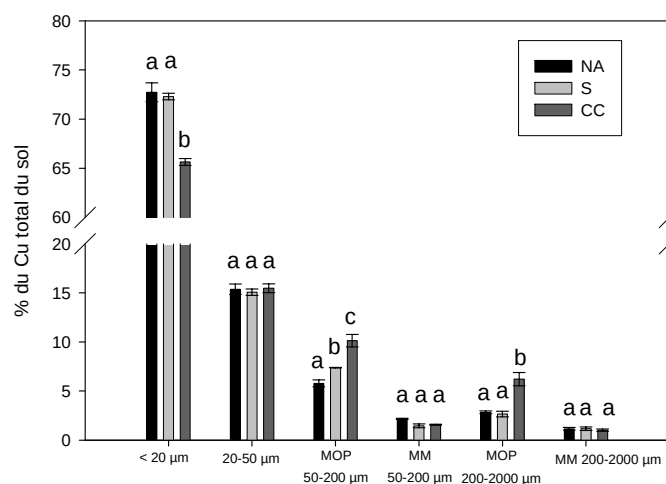


Figure 1.5 Distribution du cuivre dans les différentes fractions ganulo-densimétriques en pourcentage du cuivre initial total du sol.

5.5.2. Extractions séquentielles

Des extractions séquentielles ont été menées sur NA, S et CC en parallèle par l'équipe de Dijon (UMR INRA Microbiologie et Géochimie des Sols - équipe GéoSol) sur les sols avec et sans ajout de Cu afin de déterminer la répartition du cuivre en 5 phases : échangeable, MOS, oxydes de Fer, oxydes de Mn et le Cu associés aux silicates ou autres minéraux appelé fraction résiduelle (Figure 1.6). Les différents réactifs utilisés pour cette extraction sont détaillés à l'Annexe I.

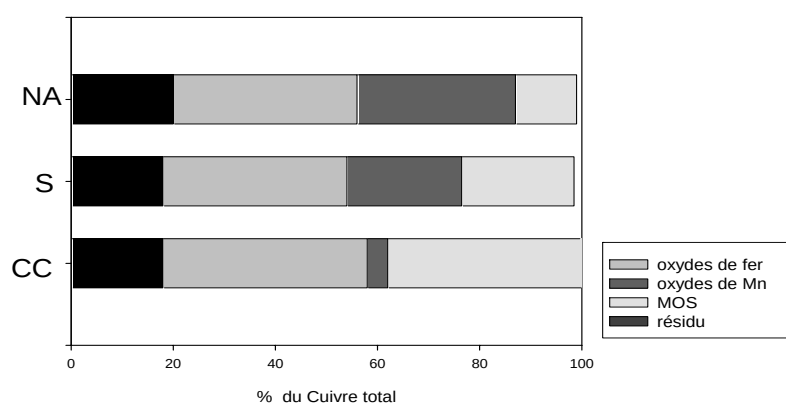


Figure 1.6 Distribution du cuivre initial obtenue par extractions séquentielles

La contribution des oxydes de Fer et la fraction résiduelle restent inchangées entre les trois sols (40 % et 20 % respectivement). La principale différence entre NA, S et CC est l'augmentation de la contribution des MOS au détriment des oxydes de Mn (Figure 1.6), indiquant un changement de spéciation du Cu après l'ajout de matières organiques au profit des MOS. Ces résultats corroborent ceux obtenus avec les fractionnements granulométriques (Figure 1.5).

Il a été souvent montré que dans les horizons de surface des sols, les MOS jouent un rôle prépondérant dans l'adsorption de certains ETM comme le Cu, Pb (Ponthieu, 2003 ; Weng et al., 2001 ; Cancès et al., 2003). Cependant, les extractions séquentielles montrent que les oxydes de Fe et de Mn représentent entre 45 et 67 % du Cu total alors que les MOS en représentent entre 12 et 39 %. Cette forte contribution des oxydes de Fer et Mn peut s'expliquer par des teneurs plus fortes en oxyde de Fer et Mn (Tableau 1.7) par rapport aux sols étudiés par Ponthieu (2003), Weng et al. (2001) et Cancès et al. (2003). En effet, la teneur en oxydes de fer dans nos sols est de 1,4 à 40 fois plus grande et environ 4 fois plus grande pour les oxydes de Mn. Il sera donc important de tenir compte de ces fractions minérales dans la modélisation pour prévoir la spéciation du cuivre dans nos sols.

	Oxydes de Fe g.kg ⁻¹ de sol	Oxydes de Mn mg.kg ⁻¹ de sol
NA	25,89 ± 0,62	1008 ± 163
S	23,08 ± 0,90	900 ± 246
CC	22,17 ± 1,04	947 ± 255

Tableau 1.7 Teneur en oxydes de Fe et Mn dans NA, S et CC

Si l'on recoupe les résultats des fractionnements granulo-densimétriques et ceux des extractions séquentielles, on obtient une répartition du Cu du sol sous forme organique entre les MOP et les autres fractions organiques, donnée dans le Tableau 1.8.

	% de Cuivre total		Répartition du Cu dans les MOS	
	MOS (extraction séquentielle)	MOP (fractionnement granulo-densimétrique)	MOP	Autres fractions des MOS
NA	12,0 %	8,6 %	71,0 %	39,0 %
S	22,0 %	10,0 %	45,6 %	54,4 %
CC	39,0 %	16,3 %	41,9 %	58,2 %

Tableau 1.8 Répartition du cuivre initial entre les MOP et les autres fractions de MOS

Ces résultats confirment que les MOP sont une des fractions des MOS importante dans l'immobilisation des métaux dans les sols car les MOP représentent environ 45 % des métaux liés aux MOS pour S et CC et jusqu'à 71 % pour NA. L'apport de matière organique a eu tendance à diminuer la proportion du Cu lié aux MOP au profit des autres fractions de MOS.

5.6. Répartition du cuivre après ajout

Le protocole utilisé pour apporter l'ajout de Cu est donné au Chapitre V. Les résultats ci-dessous sont donnés tout de suite après l'ajout (i.e. $t=0$ j). L'ajout de cuivre avait pour but d'apporter environ 250mg kg⁻¹, soit une teneur dans la gamme des sols viticoles pollués par le cuivre (100 à 1500 mg kg⁻¹, Besnard et al., 2001)

5.6.1. Fractionnement granulo-densimétrique

La Figure 1.7 représente la distribution en pourcentage du Cu après ajout dans les différentes fractions granulo-densimétriques. L'ajout de cuivre s'est réparti principalement dans la fraction < 20 µm (Figure 1.7). Cependant la répartition granulométrique est différente entre NA, S et CC. En effet, la proportion de l'ajout dans les fractions > 20 µm augmente pour les sols amendés alors qu'elle diminue dans la fraction < 20 µm (Figure 1.7). Ces résultats indiquent que les amendements organiques ont eu un impact sur la répartition du cuivre ajouté.

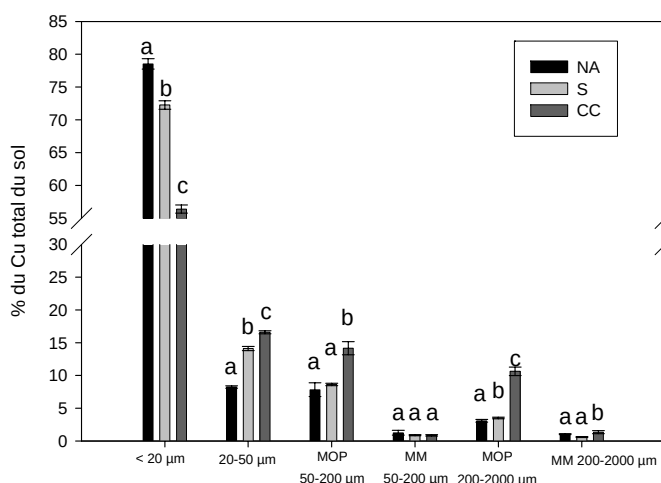


Figure 1.7 Répartition centésimale de l'ajout du cuivre dans les différentes fractions granulométriques

5.6.2. Extractions séquentielles

Les résultats sont donnés à la Figure 1.8. Excepté pour CC, les MOS n'ont pas un rôle prépondérant dans l'adsorption du cuivre. En effet, pour NA, et S les oxydes de fer et Mn adsorbent environ 60 à 70 % du Cu ajouté (Figure 1.8).

La contribution des oxydes de Fer diminue légèrement entre les sols NA, S et CC de 22 à 32 % au profit des MOS. La principale différence entre NA, S et CC est l'augmentation de la contribution des MOS au détriment des oxydes de Mn déjà observée dans le paragraphe précédent (Figure 1.8). Cette augmentation de la contribution des MOS a été aussi observée pour la répartition du cuivre initial (Figure 1.7).

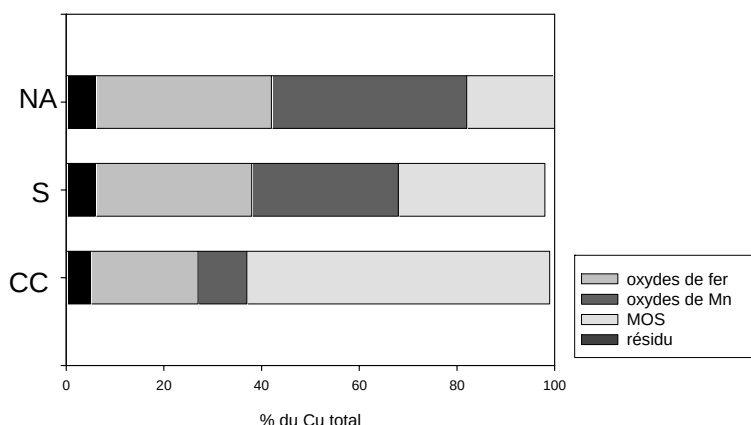


Figure 1.8 Distribution de l'ajout de cuivre (250 ppm) obtenue par extractions séquentielles

Si l'on recoupe les résultats des fractionnements granulo-densimétriques et ceux des extractions séquentielles, la répartition du Cu sous forme organique entre les MOP et les autres fractions organiques est donnée dans le Tableau 1.9. On observe les mêmes tendances que pour la répartition du cuivre initial, les MOP sont l'une des fractions des MOS qui contribuent de façon importante à l'immobilisation du Cu dans NA, S et CC.

	% de Cuivre total		Répartition du Cu dans les MOS	
	MOS (extraction séquentielle)	MOP (fractionnement granulo-densimétrique)	MOP	Autres fractions des MOS
NA	18,0 %	10,9 %	60,6 %	39,4 %
S	30,0 %	12,1 %	40,3 %	59,4 %
CC	62,0 %	24,8 %	40,0%	60,0 %

Tableau 1.9 Répartition de l'ajout de cuivre entre les MOP et les autres fractions de MOS

Les MOS sont constituées de différentes fractions organiques (substances humiques, bactéries, champignons, débris végétaux...) qui interagissent avec les métaux. Il en est de même dans nos sols avec la mise en évidence par exemple des MOP comme phase porteuse des métaux. On montre aussi qu'un ajout de cuivre a un impact sur ces différentes fractions.

Il est certain que l'on ne pourra pas rendre compte de la réactivité des MOP comme phase porteuse de métaux en utilisant les substances humiques comme molécules modèles de la réactivité des MOS. Il apparaît donc nécessaire d'introduire d'autres fractions organiques pour décrire la réactivité des MOS. La suite de ce travail portera sur l'étude, la quantification et la caractérisation de la réactivité de ces différentes fractions de MOS.

Chapitre II.

Statut organique des sols et réactivité des Substances Humiques

Chapitre II. Statut organique des sols et réactivité des Substances Humiques

En premier partie de ce chapitre, l'influence des amendements organiques sur le statut organique des sols a été étudiée

1) en phase solide :

- à travers la localisation du carbone (fractionnements granulo-densimétriques),
- à travers la composition des substances humiques (répartition du carbone et cuivre dans les SH)

2) en phase liquide :

- par l'étude des propriétés spectroscopiques et moléculaires des MOD (ultrafiltration et spectroscopie UV-visible).

Dans une seconde partie, nous nous sommes ensuite intéressés à la réactivité du Cu avec les AF extraits du sol et de la fraction $< 20 \mu\text{m}$. L'effet des amendements organiques sur les propriétés physico-chimiques des AF extraits (déterminées par potentiométrie) en est discuté ci-après pour ces deux types d'AF (Sebastia et al., 2007, accepté)

1. Statut organique des sols et influence des amendements organiques

1.1. Localisation du carbone dans les fractions granulo-densimétriques

La répartition du carbone organique du sol dans 6 fractions granulo-densimétriques est donnée à la Figure 2.1. Pour NA et S, la répartition granulométrique du carbone organique est comparable. La majeure partie du carbone se localise dans la fraction $< 20 \mu\text{m}$ (56 %), le reste étant également réparti entre les autres fractions granulométriques (14 %). Pour CC, la proportion de carbone organique dans la fraction $< 20 \mu\text{m}$ est de 33 %, 15 % pour la fraction 20-50 μm et 55 % dans les MOP (Figure 2.1). Ces résultats montrent que l'apport de compost de résineux (CC) a le plus modifié la répartition granulométrique du carbone organique au profit des fractions grossières par rapport à NA et S ; indiquant une incorporation "granulométrique" différente du compost résineux par rapport à la paille et aux retours de la culture de vigne (feuille, raisin et grappe de raisin, sarment). Ces résultats suggèrent donc une dégradation quasi complète de l'apport de paille en carbone de plus petite taille, alors que le compost de résineux serait plus résistant à la biodégradation. Cette interprétation serait en

accord avec l'hypothèse que les composts ont déjà été biodégradés et seraient donc plus stables et résistants à la biodégradation, une fois incorporés dans le sol.

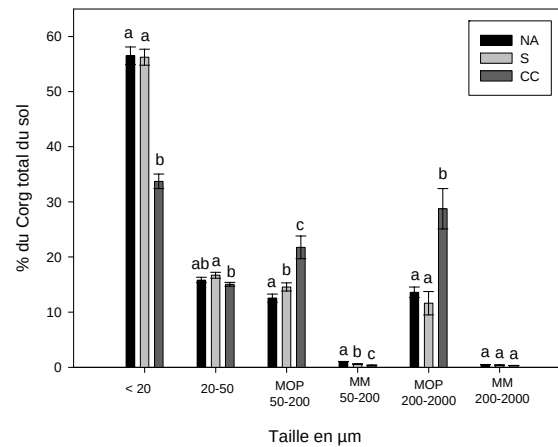


Figure 2.1 Distribution centésimale du carbone dans les différentes fractions granulométriques

1.2. Composition des Substances Humiques

1.2.1. Protocole d'extraction

Les substances humiques ont été extraites du sol suivant le protocole décrit par Holtzclaw et al., (1976). Cette procédure présente l'avantage d'obtenir du matériau organique dont on pourra étudier la réactivité par la suite en potentiométrie. Brièvement, une solution de NaOH 0,5M est appliquée sur le sol sous N_2 pendant 16 heures dans un rapport solide/liquide de 1/4. Les substances humiques solubles sont ensuite séparées du sol par centrifugation. Le pH de la solution de SH extraites est ensuite ajusté à pH 1. Cette solution est laissée au repos pendant trois heures pour permettre la précipitation des AH. Après avoir récupérer les AH par centrifugation, le pH du surnageant est augmenté de pH 1 à 5,5 pour permettre la précipitation des β -humus. Les AF purifiés sont séparés des β -humus par centrifugation. La somme des AF purifiés et des β -humus correspondent dans la littérature à la fraction des AF. Les AF purifiés ont été utilisés dans ce travail pour les dosages potentiométriques.

1.2.2. Proportion de SH dans le sol

La proportion de SH extractible de NA, S et CC a été évaluée par épuisement, suite à des extractions répétées avec NaOH. Le pourcentage de carbone extrait est donné à la Figure 2.2 en fonction du nombre d'extractions effectuées. Le pourcentage de carbone organique extrait est différent entre NA et les sols amendés (S et CC) (Figure 2.2). C'est pour NA que

l'on extrait la plus grande proportion de carbone organique (34 %) comparativement aux sols amendés (24 %). L'introduction d'amendement organique n'a donc pas augmenté la proportion de substances humiques dans les sols.

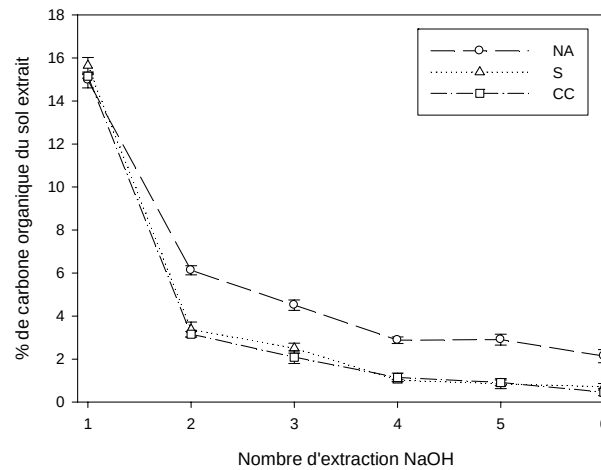


Figure 2.2 Pourcentage de carbone organique du sol extrait par plusieurs extractions répétées de NaOH

1.2.3. Répartition du carbone organique entre les AF et AH

La répartition du carbone organique des SH extraites de NA, S et CC en AH et AF est donnée à la Figure 2.3. Pour NA et S, les AF prédominent, cependant il y a plus d'AH dans NA que dans S (35 % et 28 % respectivement). Au contraire pour CC, ce sont les AH qui sont majoritaires (55 %). Le rapport C-AH/C-AF peut être utilisé comme un indicateur du degré d'humification de la matière organique : plus ce rapport est élevé, plus la matière organique est humifiée (Domeizel et al., 2004). Dans notre étude, ce degré d'humification diffère entre les trois sols : 0,5 pour NA, 0,4 pour S et 1,2 pour CC. Ainsi, partant de la situation NA comme référence, l'apport de compost de résineux a entraîné la présence de matière organique plus humifiée dans CC tandis que l'apport de paille (S) a entraîné la présence dans le sol de matière organique moins humifiée.

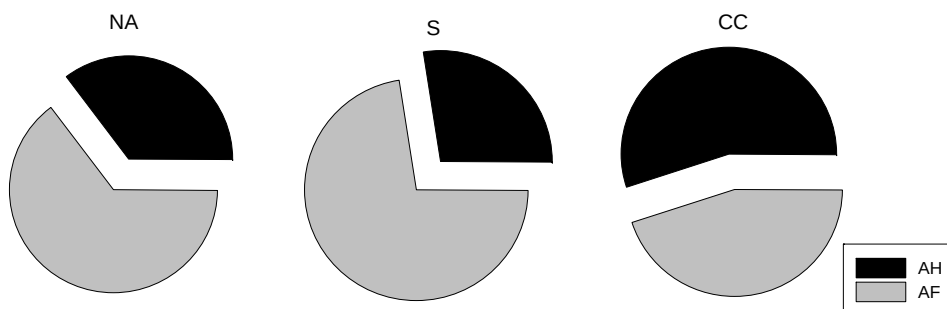


Figure 2.3 Répartition centésimale du carbone organique extrait des SH entre AF et AH

1.2.4. Répartition du cuivre initial extrait avec les SH

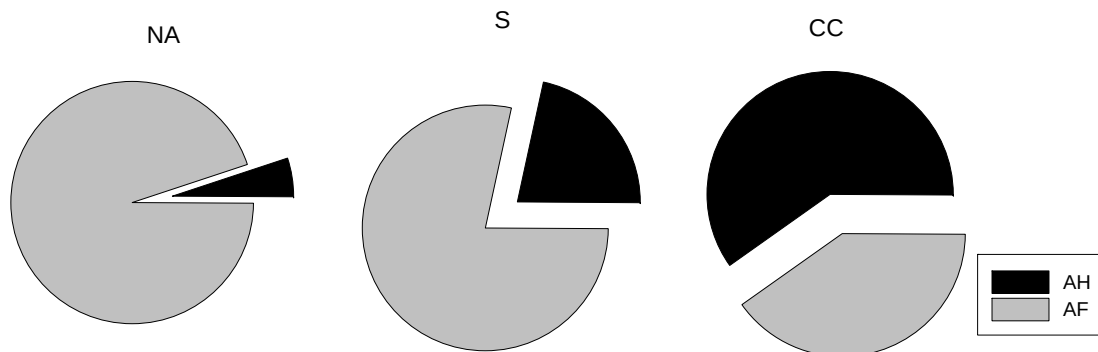


Figure 2.4 Répartition centésimale du Cu dosé dans les AF et AH

La répartition du cuivre extrait entre les AF et les AH est donnée à la Figure 2.4. Le cuivre se distribue différemment pour NA, S et CC. Les différences sont principalement dues aux acides humiques, principal réservoir du Cu pour CC, alors qu'ils sont minoritaires pour NA et S. Cependant les quantités de Corg-AF et Corg-AH sont différentes pour NA, S et CC. Afin de pouvoir comparer NA, S et CC entre-eux, nous avons normalisé le Cu dosé dans les fractions AF et AH par leur teneur en carbone organique (rapport Cu/Corg) (Tableau 2.1). Si on considère ce rapport comme un indice d'affinité entre AF, AH et le Cu, les AF possèdent le plus grand rapport Cu/Corg, indiquant que cette fraction a la plus forte affinité pour le Cu dans NA, S et CC. Quelle que soit la fraction des SH considérée, le rapport Cu/Corg est différent entre NA, S et CC. Il est généralement plus faible dans les sols amendés (S et CC). Ce résultat suggère que les amendements organiques ont modifié l'affinité des SH avec le Cu, en particulier pour les AF. Partant de NA comme référence, l'amendement de compost de résineux (CC) a le plus modifié l'affinité des SH avec le Cu par rapport à l'amendement paille (S).

	AH	AF
NA	1,0	9,9
S	3,0	4,5
CC	0,8	0,8

Tableau 2.1 Rapport Cu/Corg (en $\mu\text{g Cu/ mg Corg}$) pour les AF, AH

1.3. Nature des Matières Organiques Dissoutes

1.3.1. Distribution moléculaire du carbone organique dissous par ultrafiltration

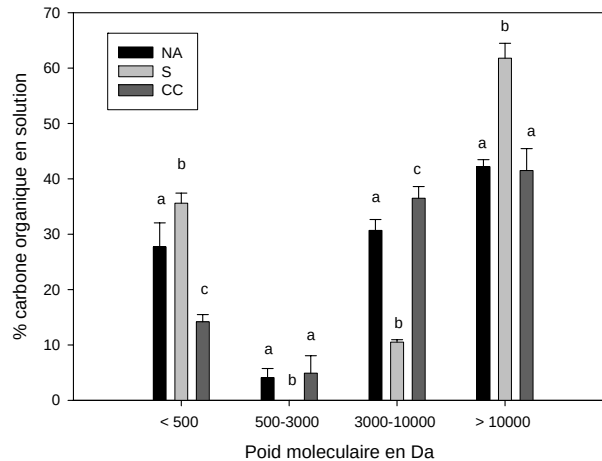


Figure 2.5 Distribution moléculaire du carbone organique dissous par ultrafiltration en taille de poids moléculaire < 500, 500-3000, 3000-10000 et > 10000 Da

Les solutions du sol ont été extraites en agitant par rotation du sol avec de l'eau permutée avec un rapport (1:2 solide : liquide) pendant 20 min pour chaque sol non séché. La solution de sol est extraite par centrifugation à 12 000 *g* puis filtrée à 5 μ m. Cette solution est ensuite ultrafiltrée en cascade, à l'aide de trois membranes de seuil de coupure 10000, 3000 et 500 Daltons. Le dosage du carbone dans chaque fraction ainsi obtenue, permet de dresser la distribution moléculaire du carbone organique dissous (Figure 2.5).

Pour les trois sols, la majeure partie du carbone organique dissous (> 60%) est supérieure à 3000 Da, indiquant que la majorité du carbone est sous forme de macromolécule type SH. On observe des distributions moléculaires du carbone en solution significativement différentes entre NA, S et CC indiquant, que les apports d'amendements organiques ont modifié la composition moléculaire des MOD. En particulier S qui se distingue par le peu de carbone organique dans les fractions intermédiaires par rapport à celles petites (< 500 Da) et des grosses molécules (> 10000 Da).

1.2.2. Propriétés spectroscopiques de la solution du sol

Les solutions extraites à l'eau sur des sols séchés ont été obtenues dans les mêmes conditions que précédemment puis analysées par UV. Les valeurs E_2/E_3 (absorbance 250/365nm) et A_{280} absorbance molaire (absorbance à 280 nm normalisée par la teneur en

carbone organique) sont reportées dans le Tableau 2.2. Le rapport d'absorbance E_2/E_3 est considéré dans la littérature comme indicateur de la taille des molécules organiques et de leur caractère hydrophile. Plus ce rapport est élevé, plus la taille des molécules organiques est grande et plus le caractère hydrophile est faible (Guo et Chorover, 2003). L'absorbance molaire est utilisée dans la littérature pour estimer le caractère aromatique des molécules organiques. Plus l'absorbance molaire est forte, plus le caractère aromatique des molécules organiques en solution est élevé (Peuravuori et Pihlaja, 1997)

Solutions extraites	E_2/E_3	Absorbance molaire $L \text{ mol}^{-1} C \text{ cm}^{-1}$
NA	3,9 (0,1)a	230 (3,1)a
S	4,6 (0,1)b	304 (2,6)b
CC	4,5 (0,1)b	343 (21)c

Tableau 2.2 Propriétés spectroscopiques des solutions extraites

Les rapports E_2/E_3 des solutions extraites sont de l'ordre de 4 pour NA et de 4,5 pour S et CC, suggérant une taille de molécule sensiblement plus élevée, avec un caractère hydrophile plus faible pour S et CC que pour NA (Tableau 2.2). L'absorbance molaire est de NA est plus faible que celle de S et CC, suggérant un plus faible caractère aromatique des MOD extraites de NA que de S et CC.

Ces résultats suggèrent que les amendements organiques ont modifié la composition moléculaire de la solution mais aussi la nature chimique des MOD.

1.4. Conclusions

L'ensemble des résultats sur la caractérisation du carbone organique indique que les apports organiques (répétés depuis ces 15 dernières années) ont modifié le statut organique de nos sols comme le suggérait le rapport C/N et l'étude de la structure des communautés bactériennes de NA, S et CC (Annexe C).

Les résultats obtenus pour le Cu indiquent un changement de localisation du cuivre à l'échelle des substances humiques. Ce changement peut être assimilé à un changement de spéciation qui est à relier à une modification du statut organique de nos sols.

Nous avons observé aussi une localisation du cuivre initial et du carbone organique (Chapitre I et Figure 2.1) principalement dans la fraction fine du sol $< 20\mu\text{m}$, en accord avec les résultats de la littérature (Ducaroir et Lamy, 1995 ; Flores-Vélez et al., 1996 ; Besnard et al., 2001). L'extraction de la matière organique de cette fraction $< 20 \mu\text{m}$ et l'étude de sa réactivité, par comparaison avec la réactivité d'autres fractions organiques, nous permettra

d'apporter des éléments de réponse et de compréhension sur la localisation particulière des ETM dans les fractions fines du sol.

2. Réactivité vis à vis du cuivre des fractions fulviques

La séparation physique de la matière organique dans les fractions fines semble difficile, en raison de la nature de l'association entre la matrice minérale et la matière organique. L'extraction chimique semble être la meilleure approche pour extraire cette matière organique malgré d'éventuels inconvénients (modifications de la fraction extraite, la sélectivité de l'extractant employé...)

Nous avons extrait les substances humiques de la fraction $< 20 \mu\text{m}$ et du sol total. Parmi les substances humiques, la réactivité des AF a été uniquement étudiée par potentiométrie, technique bien adaptée pour l'étude de la réactivité des substances humiques. Les fractions des AF ont été choisies pour trois raisons principales :

↪ La différence de nature des MOS entre NA, S et CC est mieux exprimée pour les AF que pour les AH (Tableau 2.1). Ainsi, on peut supposer que des différences de réactivité des SH extraites entre NA, S et CC seront plus perceptibles pour les AF plutôt que pour les AH.

↪ L'extraction des AF extraits du sol total, nous permettra d'estimer par extrapolation la réactivité des MOD. En effet, l'étude de celle-ci est délicate car les quantités de carbone organique récupérées en solutions sont faibles. D'autre part, nous avons observé lors du paragraphe précédent que les MOD sont constituées de plus de 60 % de macromolécules du type SH. Enfin, d'après la littérature (Chapitre I), la réactivité des MOD est souvent assimilée à celle des AF.

↪ L'extraction et l'étude de la réactivité des AF de la fraction $< 20 \mu\text{m}$, nous permettra d'estimer l'affinité du carbone organique de cette fraction fine avec les métaux, qui est censé être très réactif vis-à-vis des métaux.

2.1. Résultats majeurs (résumé article)

Les travaux relatifs à la réactivité des AF ont fait l'objet d'un article publié dans la revue Chemosphère (voir p 40). Dans cet article, les travaux concernant la réactivité des AF extraits du sol total et de la fraction $< 20 \mu\text{m}$ y sont donnés. L'impact des amendements organiques sur les propriétés physico-chimiques des AF extraits (propriétés acido-basiques et affinité avec le Cu), obtenues par potentiométrie et modélisées par FITEQL y est discuté.

Les pK_a des AF extraits obtenus par FITEQL sont donnés au Tableau 2.3. Pour les AF extraits du sol de NA, le $pK_{H,1}$ est significativement différent de celui des sols amendés (S et CC) tandis que le $pK_{H,2}$ est significativement différent entre NA, S et CC (Tableau 2.3). Ces différences suggèrent que les amendements organiques ont induit une modification de la réactivité du proton avec les AF extraits du sol. Au contraire, pour les AF $< 20 \mu m$, les amendements organiques n'ont que faiblement modifié la réactivité des AF vis-à-vis du proton. En effet, seul le $pK_{H,2}$ des AF $< 20 \mu m$ de CC est significativement différent de celui de NA et S.

AF	$pK_{H,1}$	$pK_{H,2}$
Extraits du sol		
NA	$5.14 \pm 0.04a$	$9.35 \pm 0.14a$
S	$4.92 \pm 0.09b$	$8.34 \pm 0.15b$
CC	$4.88 \pm 0.11b$	$8.67 \pm 0.13c$
Extraits de la fraction $< 20 \mu m$		
NA	$5.07 \pm 0.05a$	$8.92 \pm 0.11a$
S	$5.05 \pm 0.04a$	$9.03 \pm 0.11a$
CC	$5.08 \pm 0.06a$	$8.39 \pm 0.06b$

Pour un type de AF (extraits du sol ou de la fraction $< 20 \mu m$) et un pK ($pK_{H,1}$ ou $pK_{H,2}$), des lettres identiques signifient pas de différence significative ($p < 0,05$)

Tableau 2.3 pK_a des AF extraits du sol et de la fraction $< 20 \mu m$ obtenu par FITEQL

Pour les AF extraits du sol, la proportion de cuivre lié est différente pour NA, S et CC alors qu'elle est plus homogène pour les AF extraits de la fraction $< 20 \mu m$ (Figure 2.6). L'affinité du Cu a été donc la plus modifiée avec les AF extraits du sol global qu'avec les AF extraits de la fraction $< 20 \mu m$.

Dans nos conditions expérimentales, l'ensemble des résultats montre un impact plus faible des amendements organiques sur les propriétés physico-chimiques des AF $< 20 \mu m$, par rapport à celle des AF extraits du sol total. Ces résultats suggèrent que les amendements organiques induisent les impacts les plus importants dans les fractions $> 20 \mu m$. Cette conclusion est en accord avec les travaux de Balesdent (1996) sur le turn-over du carbone, qui serait d'autant plus lent que la fraction est fine.

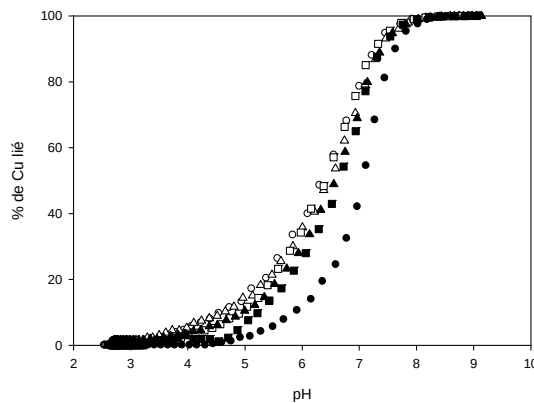


Figure 2.6 Pourcentage de Cu lié en présence d'AF extraits ($R=4$). AF extraits du sol total : ■ CC, ▲ S et ● NA et de la fraction < 20µm : □ CC, △ S et ○ NA

Les amendements organiques ont changé la nature des MOS de la phase liquide et solide du sol. En effet, la quantité et la répartition du carbone organique des substances humiques sont différentes entre NA, S et CC. De même, la composition et la nature moléculaire des MOD sont différentes entre NA, S et CC.

Cette modification a entraîné un changement de localisation du cuivre initial dans les substances humiques, aussi observé lors des extractions séquentielles et des fractionnements granulo-densimétriques. Ces changements de localisation peuvent être assimilés à un changement de spéciation du Cu dans le sol qui est à relier à une modification de la nature des MOS.

L'étude de la réactivité des AF extraits a indiqué que les amendements organiques ont plus modifié la nature physico-chimique (propriété acido-basique et affinité avec le Cu) des AF extraits du sol total, par rapport à celle des AF extraits de la fraction < 20 µm. Ces résultats suggèrent que la réactivité des fractions grossières des MOS a été la plus affectée. Ces fractions grossières seront donc étudiées dans le chapitre suivant.

Les constantes d'affinité avec le Cu obtenues dans ce chapitre seront utilisées dans le dernier chapitre de ce travail pour déterminer la spéciation des métaux dans les sols. Classiquement (Chapitre I), les constantes d'affinité du Cu des AF extraits du sol total seront utilisées pour quantifier la réactivité des MOD. Nous avons utilisé les AF extraits des fractions < 20 µm pour quantifier la réactivité de la matière organique liée à la matière minérale.

Changes in soil organic matter chemical properties after organic amendments

Julien Sebastia, Jérôme Labanowski and Isabelle Lamy *

INRA, UR251 - PESSAC, RD10, 78026 Versailles cedex, France

*Corresponding author: E-mail address: lamy@versailles.inra.fr,

tel + 33 1 30 83 32 66; Fax + 33 1 30 83 32 59

Chemosphere 68 (2007) 1245-1253 : [doi:10.1016/j.chemosphere.2007.01.058](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.058)

Abstract

Organic inputs are used to improve soil physical and chemical properties, but the corresponding changes in soil organic matter (SOM) chemical properties are not well known. In this study, we compared some characteristics of the SOM of a soil receiving either no organic inputs, or two different amendments during 15 years (straw or conifer compost). Quantities of organic carbon and C/N values were determined on particle size fractions after physical soil fractionation to localize changes due to amendments. Contents in reactive functional groups, acid-base properties and copper binding affinities were determined by titration experiments for the soluble fraction of SOM: the fulvic acid fraction (FA). Data of FA extracted from the bulk soil were compared to data of FA extracted from the < 20µm size-fraction with the help of either a discrete or a continuous model (fit of data with FITEQL or NICA respectively). Copper binding characteristics of FA extracted from the < 20µm size-fraction did not change significantly after organic inputs, while those of FA extracted from the bulk organic-amended soils were found different from the ones with no amendment. Minor effects observed in the finer soil fractions were ascribed to their low turn-over of organic carbon and/or to a greater homogeneity in the nature of the organic carbon entering these fractions. Our results show major chemical changes in coarser soil organic fractions after organic amendments.

keywords: organic amendments, soil organic carbon, fulvic acids, acid-base properties, copper binding

1. Introduction

Organic amendments are currently used in agricultural soils to improve their physical and chemical properties. Several studies have shown that supply of exogenous organic matter can modify not only the amount of indigenous organic matter but also the quality of bulk soil (Nardi et al., 2004, Lejon et al., 2006). Soil organic matter (SOM) includes several components and it is not clear which one is modified when organic inputs are used. In order to evaluate the quality of organic matter, the operationally defined fulvic or humic fractions are widely used to define the complexing properties of organic matter in soils. For example, Rivero et al., (2004) used the so-called humic and fulvic acids (respectively HA and FA) to show that compost inputs during 3 years in tropical conditions significantly raised the humic fraction over the fulvic fraction, suggesting an increase in functional groups and aromaticity. Plaza et al. (2003, 2005b) studied the influence of pig slurry amendments on the characteristics of soil humic substances. However, they rather observed a decrease in acidic functional group contents and a modification of the corresponding affinities for proton binding, suggesting that such modifications can have a large impact on transport of micro- and macronutrients as well as toxic metal ions in soils.

Ion complexing properties of SOM are the key mechanisms that insure the role of either sink or source of major and trace elements in soils. Acid-base and complexing properties have thus been the subject of various conceptual approaches for predicting the speciation of major and trace elements using thermodynamic calculations. Two main approaches are classically used in the literature, based on either discrete or continuous distribution of functional reactive groups (Perdue, 2001). They can be used to compare organic chemical properties of the fulvic or humic acids extracted from soils whatever the approaches.

Furthermore, it has been shown by size fractionation that soil organic carbon is mainly located in the finest size fractions $< 20 \mu\text{m}$ (Ducaroir et Lamy, 1995; Florez-Velez et al., 1996; Rumpel et al., 2004). The nature and the turn-over of the organic carbon in the finest fraction were different from the other particle size fractions (Rumpel et al., 2004; Balesdent, 1996), but it is not clearly known if this size fraction is modified in its chemical properties after organic inputs.

The objectives of this work are to assess changes in SOM chemical properties after organic inputs with regard to i) the fulvic acid fraction extracted from the bulk soil and ii) the fulvic acid fraction extracted from the $< 20 \mu\text{m}$ soil size fraction. Contents in reactive functional groups, acid-base properties and complexing characteristics towards copper taken

as a probe of reactivity were compared for soils receiving two different amendments and a situation without organic inputs. Therefore potentiometric titrations and fit of data with FITEQL and NICA model were made. Results are used to discuss the impact of exogenous organic inputs on SOM chemical properties.

2. Materials and methods

2.1. Site description and sampling

We used a fifteen years old field experiment located in the vineyard site of Mâcon Clessé (Burgundy, France) (Lejon et al., 2006). The site is divided in various plots receiving different organic input treatments: (1) straw laid at the soil surface at 10 t ha⁻¹ every 2 years (called S) and (2) conifer compost laid at 100 m³ ha⁻¹ every 3-4 years (called CC). The control is a non-amended (NA) plot with no organic inputs other than restituted vine-shoot fragments and only chemical weeding of soil. All soils were deep Eutric Cambisols (FAO, 1989), fine clay-loamy textured, developed on the same parent material. Sampling was made at 0-5 cm depth of the surface horizon in the various plots. Four replicates of about 2 kg were sampled per plot. Samples were mixed and homogenized, air-dried, sieved to 2.0 mm and stored in plastic bags at room temperature. Soil sample texture was: sand (50-2000 µm): 11.5% ± 1.0; loam (2-50 µm): 56.9% ± 0.9; clay (< 2 µm): 31.7% ± 0.3 (mean and standard deviation for the three homogenized samples). The clay fraction, studied by X-Ray diffraction, included mainly illite, kaolinite, and interstratified 2:1 phyllosilicates, as well as quartz and feldspar. These surface samples displayed a pH of 6.7 ± 0.3, and a cation exchange capacity varying from about 17 to 25 cmol⁺ kg⁻¹ depending on organic amendments. The organic carbon content was 1.23% ± 0.3 for NA; 1.75% ± 0.15 for S and 4.30% ± 0.31 for CC and the ratio C/N was 11.7 ± 0.3 for NA, 13.1 ± 0.2 for S and 17.5 ± 0.5 for CC (means of three determinations after high temperature catalytic combustion followed by CO₂ measurement with a Shimadzu TOC-VCSN analyzer)..

2.2. Physical soil fractionation

Particle size fractionation was carried out in three replicates on soil samples NA, S and CC following Ducaroir and Lamy (1995) modified after Balesdent et al. (1991). Mechanical dispersion of 50 g of soil sample was performed by a rotated shaker during 16 hours in

polypropylene tubes with 125 ml of de-ionized water and 10 glass balls (6 mm) to help dispersion of soil particles. The suspensions were then sieved through a series of screens of decreasing sizes: 200, 50, 20 μm . The $< 20 \mu\text{m}$ fraction was separated from the soluble fraction by centrifugation at 13 261 g for 10 min (Beckman J-25I, rotor JLA-9.1000) and lyophilized (Lyovac GT 2). The other fractions were oven dried at 55 °C. Nitrogen and carbon contents of each size fraction were determined by dry combustion in an autoanalyzer (CE instruments NC 2500).

The remaining soluble fraction was concentrated in a rotary evaporator at 35 °C under vacuum (Heidolph 94200) and acidified (1% HNO_3 v:v). Soluble organic C was then monitored by high temperature catalytic combustion followed by CO_2 measurement (Shimadzu TOC-VCSN). This value was used for the mass balance of organic carbon. All results are expressed on a 105 °C dry mass basis.

2.3. Isolation and purification of FA

Fulvic acids (FA) were extracted from the bulk soil samples and from their $< 20 \mu\text{m}$ fractions using the alkaline extraction procedure described by Holtzclaw et al. (1976). This procedure includes a purification step necessary before potentiometric titrations. Each sample was first extracted with NaOH 0.5 M under N_2 during 16 h using a soil:solution ratio of 1:4 (w:v). The mixture was centrifuged at 9605 g for 15 min (Beckman J-25I) to separate the soluble humic substances (HS) from the solid matrix. The HS were then acidified with HCl 6M to pH 1, left standing 3 hours to allow complete precipitation of humic acids (HA), and centrifuged at 15 000 g for 10 min. After HA removal, pH of the supernatant was increased from 1 to 5.5 with NaOH 5 M, left standing 3 hours, and centrifugation at 15 000 g for 10 min allowed to discard the so-called β -humus fraction (Holtzclaw et al., 1978) from the supernatant. The non-purified fulvic acid solutions were desalted against de-ionised water by dialysis (molecular weight cut-off membrane of 1000 Da, 7 Spectra/Por). Protonation of the reactive groups of FA was then performed using a strong cationic exchanger resin (Amberlit IRN-77 resin) saturated with H^+ . Before use, resin was washed with NaCl 1 M/ NaOH 1 M and rinsed with water, then washed again with HCl 2 M and rinsed in order to have the resin in H^+ form. Then, 100 ml of non-purified FA was eluted at 4.5 ml min^{-1} in a column (15 cm x 3 cm) filled with about 100 ml of resin. The percolate containing soluble purified FA was stored in glass bottle at 4 °C and soluble organic carbon content of this stock solution was determined. Previous study has shown that the nature of SOM is contrasted between NA, S

and CC (Lejon et al., 2007). The percentage of organic carbon of the humic substances in the fulvic fraction (step of purification not included) was 64.7% for NA, 68.5% for S, but only 45.1% for CC. Thus, AF-C corresponded to 11.4% of soil organic C for NA, 11.6% for S and 7.7% for CC.

2.4. Chemical properties of FA

2.4.1. Acid-base titrations

The titrations were conducted using a pH meter (TIM 900, Radiometer) with a burette (ABU901, Radiometer) assembly. A solution containing a known quantity of stock solution of FA, an initial acid content of $2 \cdot 10^{-3}$ M HClO_4 and a constant ionic strength of 0.1 M NaClO_4 was placed in a thermostated cell at 25 °C. A positive external pressure of N_2 was applied above the solution to remove CO_2 during titration. Before each titration of FA, a blank was performed with $2 \cdot 10^{-3}$ M HClO_4 and 0.1 M NaClO_4 .

Aliquots of NaOH as the titrant (0.05 M) were injected through a glass line. The titrant was prepared under controlled atmosphere every 15 days and transferred into a bottle fitted with a tube containing soda lime. The titrant was standardized in triplicate against potassium hydrogen phthalate (KHP) and the mean concentration of the three standards used in the calculations. pH was measured using a couple of electrode: a reference electrode (XR 110, Radiometer) with a salt-bridge junction filled with 0.1 M NaClO_4 (AL 120, Radiometer); and a glass electrode (XG 250, Radiometer). The inner KCl in the reference electrode was replaced by saturated NaCl solution to avoid KClO_4 precipitation in the electrode liquid junction. The electrodes were daily calibrated by fresh solutions of KHP (pH 4.008) and of *di*-Sodium tetraborate decahydrate (pH 9.196). The titrator was programmed in dynamic mode and successive titrant additions were made only when a stability of 0.02 mV s^{-1} had been attained.

2.4.2. Copper complexing properties

Titrations of FA in the presence of copper were performed with the same experimental procedure. A solution containing FA, $2 \cdot 10^{-3}$ M HClO_4 , 0.1 M NaClO_4 and various amounts of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (Strem Chemicals) was placed in the thermostated cell. In order to compare the reactivity of the different FA samples, we worked at the same reactive site concentration in the cell ($1.7 \cdot 10^{-4} \pm 0.2 \text{ eq.l}^{-1}$), and the copper concentrations in the cell were arbitrary fixed to

have a ratio of reactive site content to copper content of four. Free copper was measured with a Cu(II) ion-selective electrode (ISECu25, Radiometer) and a reference electrode (XR 110, Radiometer) fitted with a salt-bridge junction (AL 120, Radiometer). The copper ion selective electrode was calibrated in two different ways: routinely by three standard solutions (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M Cu in 0.1 M NaClO₄) by dilution of a standard solution, and periodically until 10^{-8} M in the presence of nitrilotriacetic acid to verify the Nernstian response of the electrode.

2.5. Theoretical background

2.5.1. Determination of total functional groups concentrations and charge of FA

The titration curves were linearized by the method of Gran (1952) in order to divide acidity of sample into two different chemical acidic groups which dissociate before or after the pH of the equivalence point observed. This method was used for FA solutions (Lamy et al., 1987) as well as for microbial biosorbents (Naja et al., 2005) or raw sewage (Kunz and Jardim, 2000).

The calculations of the Gran function were as follows:

$$G = (V_0 + V)10^{(-pH)} \text{ at } pH < 7, \quad (1)$$

$$G = (V_0 + V)10^{(K_w - pH)} \text{ at } pH > 7, \quad (2)$$

where G is the Gran function, V_0 the initial volume, V the titrant added volume and K_w the acid dissociation constant for water.

From our titration curves, three different acid groups could be defined depending on their apparent ionization constants:

- A strong acidity (As) attributed to a residual acidity due to the preparation of FA or acid groups already dissociated at the beginning of the titration (Lamy et al., 1987)
- A weak acidity (Aw) attributed to the ionization of carboxylic groups at $pH < 7$
- A very weak acidity (Avw) attributed to the ionization of phenolic and amino groups at $pH > 7$. Here, we defined the total acidity (A_{TO}) of a sample as the sum of Aw and Avw.

For each point of the titration curve the charge Q (meq g⁻¹ of organic carbon) was calculated using the following charge balance equation for all ions in solution (disregarding the supporting background electrolyte) :

$$Q = \frac{[C_a]V_0/(V_0 + V) - V[C_b]/(V_0 + V) - [H^+] + [OH^-]}{[FA]} \quad (3)$$

where $[H^+] = 10^{-pH}$, $[OH^-] = 10^{-pH+pK_w}$ and K_w the ionic product of water, $[C_a]$ is the concentration of initial acidity (i.e. protons already dissociated at the beginning of the titration = the known concentration of added $HClO_4$ + the experimentally determined value of As ; eq l⁻¹), V and $[C_b]$ are respectively the volume (l) and the concentration (eq l⁻¹) of the base added; V_0 is the initial volume and $[FA]$ is the concentration of fulvic acid expressed in kg C l⁻¹ initially introduced in the titration cell.

2.5.2. Determination of acid-base properties of FA

FITEQL 4.0 and NICA model were used both as a comparison of respectively a discrete and a continuous approach to analyze the proton binding affinity behavior of FA. FITEQL is a computer program for the determination of chemical equilibrium constants from experimental data (Herbelin and Westall, 1999) based on the chemical equilibrium equations for mass action (Westall et al., 1995):

$$\log C_i = \log K_i + \sum_j a_{ij} \log X_j \quad (4)$$

where C_i is the concentration of species i , K_i is the stability constant of species i , the summation is taken over all components j , a_{ij} is the mass action stoichiometric coefficient of component j in species i , and X_j is the free concentration of component j .

Electrostatic behavior of FA particles can be taken into account when modeling acid-base properties. Here calculations of an electrostatic behavior of FA with FITEQL 4.0 were not performed because of lack of data such as specific surface area, or capacitance of Helmholtz layer.

The NICA model describes the adsorption of a proton following the basic mono-component equation for species binding by i -type sites (Koopal et al., 1994)

$$\theta_{H,i} = \frac{(\tilde{K}_{H,i}[H^+])^{m_i}}{1 + (\tilde{K}_{H,i}[H^+])^{m_i}} \quad (5)$$

where $\theta_{H,i}$ is the proportion of occupied i -type sites by a proton, $\tilde{K}_{H,i}$ is the median affinity distribution for proton binding by the i -type sites and m_i corresponds to the width of the affinity distribution.

Equation (5) can be extended to take into account a given number of continuous distributions of proton binding sites by weighted summation of charge contributions of different site types:

$$Q = \sum_{i=1}^n Q_{\max,i} (1 - \theta_{H,i}) \quad (6)$$

where $Q_{\max,i}$ is the total amount of i-types sites.

Electrostatic behaviour of FA in NICA model is usually described with the Donnan gel approach (Koopal et al., 2005; Plaza et al., 2005a), FA being considered to form an electrically neutral gel like phase. In our work, calculations with Donnan model were not performed because of the use of a single ionic strength (Plaza et al., 2005b). Thus apparent affinity constants were derived from our approach.

The presence of two different types of binding sites ascribed to carboxylic and phenolic sites as already shown in previous studies allowed us to constrain the calculations with FITEQL or NICA with two types of sites (Milne et al., 1995, 2003; Fiol et al., 1999). With FITEQL, we optimized only $K_{H,1}$ and $K_{H,2}$ with the fixed values of $L_1 = A_w$ and $L_2 = A_{vw}$ previously determined by the Gran method. With NICA, we optimized acid base properties of FA (i.e., $\tilde{K}_{H,1}$, $\tilde{K}_{H,2}$, m_1 and m_2) with fixed $Q_{\max,1} = A_w$ and $Q_{\max,2} = A_{vw}$. The fit computer program FIT 2.5 was associated to the NICA model for calculations (Kinniburgh, 1993).

2.5.3. Determination of copper complexing properties of FA

FITEQL was revealed well-adapted to model FA reactivity with copper as it was found easier to use with our data than NICA, and required less adjusted parameters and input data. Moreover modelling with NICA model gives only global constants (e.g. $\log \tilde{K}_{Cu,1}$ and $\log \tilde{K}_{Cu,2}$), while FITEQL deals with constants for each complexes species, more useful to unravel copper reactivity and to highlight differences. For the calculations, we considered free copper and hydrolysis products of copper forming monodentate complexes with FA and we introduced acid base properties previously determined. The apparent stability constants were expressed as follow with S_n^- corresponding to reactive sites of FA:



2.6. Statistical analysis

Significant differences ($p < 0.05$) in organic carbon contents and C/N data between soil treatments data were determined using XLstat (Microsoft) with Student's t -test.

Modelling of chemical properties of FA with NICA model was controlled by the residual mean square errors (RMSE) computed by FIT 2.5 (Kinniburgh, 1993), while calculations with FITEQL 4.0 were tested by the low sums of squares of residuals (W_{sos}/df) given by the software (Herbelin and Westall, 1999).

3. Results and Discussion

3.1. Soil organic carbon contents and location in particle size fractions

Quantities of organic carbon in each size fraction, i.e. carbon content multiplied by the mass of fraction, is given in Figure 1 for the three soil samples. This presentation stresses the contribution of each size fraction to the total soil carbon content. The sum of all quantities is equal to the total carbon content in the sample (Figure 1). The mass balance of C recovered from the different fractions was $98.0 \pm 0.9\%$.

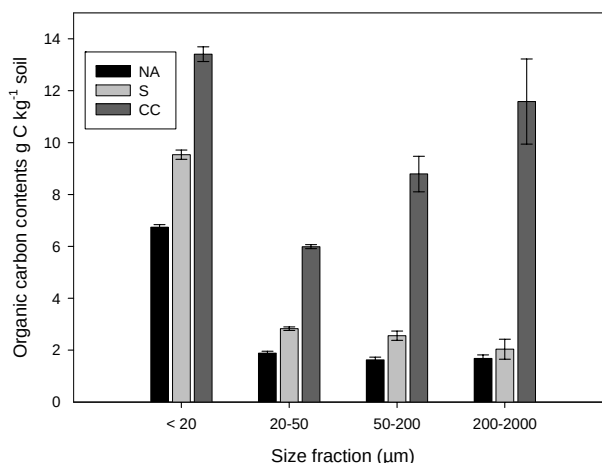


Figure 1 Distribution of organic carbon contents in the different size fractions of the three soil samples

Organic amendments in our field experiment lead to an increase in organic carbon in all size fractions except for the coarser fraction $> 200 \mu\text{m}$ of S. This increase was smaller for S than for CC. Moreover, for S the increase in quantities was low and nearly equal between the

size fractions, while for CC, the increase was larger and raised with increasing size fractions (Figure 1).

For NA and S, organic carbon is mainly located in the $< 20 \mu\text{m}$ fraction (56% of total carbon content) while for CC this last fraction represents only 33% of total carbon content. For CC, 200-2000 μm and 50-200 μm fractions contribute also to a large part to the total carbon content, 29% and 22% respectively.

Values of C/N of each size fraction are given in Figure 2 for the three samples. Whatever the size fractions, C/N was always larger for CC indicating a different nature of organic matter than S and NA. C/N ratios of S and NA were fairly similar, except for the coarser fractions (50-200 and 200-2000 μm). All these results suggest that organic amendments brought a fingerprint in all size fractions of the soils.

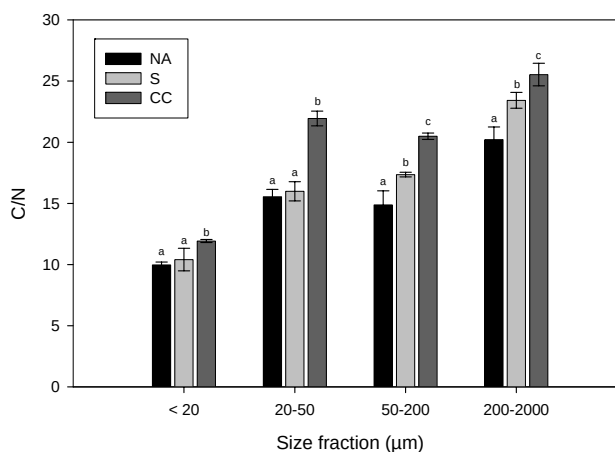


Figure 2 C/N values for the different size fractions of the three soil samples

3.2. Acid-base properties of fulvic acids

3.2.1 Acidic functional group contents of bulk and $< 20 \mu\text{m}$ FA

Total acidity of the various FA samples (A_{TO}) and repartition of reactive sites between carboxylic and phenolic types (respectively A_{W} and A_{VW} determined as described in the materials and methods) are given in Table 1 for the three soil samples. For all samples, total acidity of bulk FA is always larger than for FA extracted from the $< 20 \mu\text{m}$ size-fraction, the greater differences being observed for the NA soil sample. For NA, these results suggest that total acidity of bulk FA is mainly due to an acidity located in fractions larger than 20 μm , where 44% of soil organic carbon is located (Figure 2). These findings for NA concern

especially the phenolic groups: A_{vw} is about 5.5 eq Kg C⁻¹ in bulk soil FA and only 1.3 eq Kg C⁻¹ for FA extracted from the < 20 µm size fraction.

On the contrary for S and CC, A_{TO} of bulk FA and of < 20 µm FA are close. Thus FA contained in fractions > 20 µm seems less important in A_{TO} , despite the fact that these fractions > 20 µm contribute to 66% and 44% of the soil organic carbon for S and CC, respectively. Finally, total acidity of bulk FA follows the order NA>CC>S while for < 20 µm FA the order changed: CC>S>NA. Globally much less variations are observed for carboxylic-type sites than for phenolic ones.

Carboxylic groups are known to constitute the major part of acidity of FA extracted from soils (about 55-59%), as reported for example by Plaza et al. (2005b); Gondar et al. (2005a) and Fiol et al. (1999). But in our study, FA extracted from NA bulk soil shows a larger content of phenolic groups, whereas the repartition between carboxylic and phenolic groups for the < 20 µm FA is more in accordance with literature (Table 1).

FA samples	A_{TO}	A_w	A_{vw}	$\log K_{H,1}$	$\log K_{H,2}$	$Wsos/df$
	eq Kg ⁻¹ C					
Isolated from the bulk soil						
NA	7.22 ± 0.13	1.76 ± 0.07	5.46 ± 0.06	5.14 ± 0.04	9.35 ± 0.14	1.63
S	5.37 ± 0.26	3.18 ± 0.28	2.19 ± 0.10	4.92 ± 0.09	8.34 ± 0.15	2.92
CC	6.72 ± 0.28	3.91 ± 0.10	2.81± 0.19	4.88 ± 0.11	8.67 ± 0.13	4.54
Isolated from the <20µm fraction						
NA	2.97 ± 023	1.59 ± 0.17	1.25 ± 0.06	5.07 ± 0.05	8.92 ± 0.11	3.17
S	4.35 ± 0.18	2.49 ± 0.11	1.86 ± 0.07	5.05 ± 0.04	9.03 ± 0.11	4.85
CC	5.97 ± 0.29	3.09 ± 0.24	2.67 ± 0.05	5.08 ± 0.06	8.39 ± 0.06	4.52

A_{TO} is the total acidity corresponding to the sum of A_w and A_{vw} , A_w is the weak acidity and A_{vw} is the very weak acidity

W_{sos}/df values are sums of squares of residuals computed by FITEQL

Table 1 Acidic functional group contents of FA extracted from the bulk soils and from the < 20µm size-fraction as determined by the Gran method, and fitting parameters $\log K_{H,1}$ and $\log K_{H,2}$ for proton binding characteristics with FITEQL

When normalized to the carbon content of the FA solutions, carboxylic and phenolic groups contents (A_w and A_{vw}) of bulk FA differ between the three soil samples (Table 1). Such results suggest that signature of organic inputs can be seen for the bulk sample when extracting FA and determining their functional groups contents. For < 20 µm fractions, these differences are less marked possibly due to the fact that (i) organic carbon from organic inputs is not yet sufficiently incorporated in this fine fraction due to a turn-over exceeding 15 year existence of the field experiment; or (ii) it is always the same kind of organic matter which is

incorporated in the finest fractions, involving no changes in the global nature of the organic carbon. In this view, we observed that the increases in organic carbon contents were less or equal in the finest fractions than in the others (Figure 1), and values of C/N were close (NA=S>CC) (Figure 2).

3.2.2 Charge vs pH curves

Figure 3 shows the experimental charge curves for the FA extracted from the bulk of the three soil samples and the corresponding curves for FA extracted from the < 20 μm size fractions. For all samples, charges of FA increase with pH. All these curves have a similar shape except for FA extracted from bulk NA, and charges follow the order CC>S>NA in the pH range 3.5-9 (Figure 3). The fact that charges of bulk FA isolated from NA were higher than that of CC or S for pH > 9 can be related to its higher content in phenolic groups (Table 1).

In our work organic inputs induced an increase of the charge of both bulk FA and < 20 μm FA. This result is not in accordance with the study of Plaza et al. (2005b) on the acid-base properties of FA and HA isolated from a soil amended by pig slurry. They observed a decrease in the charge of FA and HA with an increase in pig slurry amendment. The authors suggested that it was only a relative decrease as pig slurry is not a mature organic material (Plaza et al., 2003), and proposed an aerobic treatment before application on soil to enhance its humification degree.

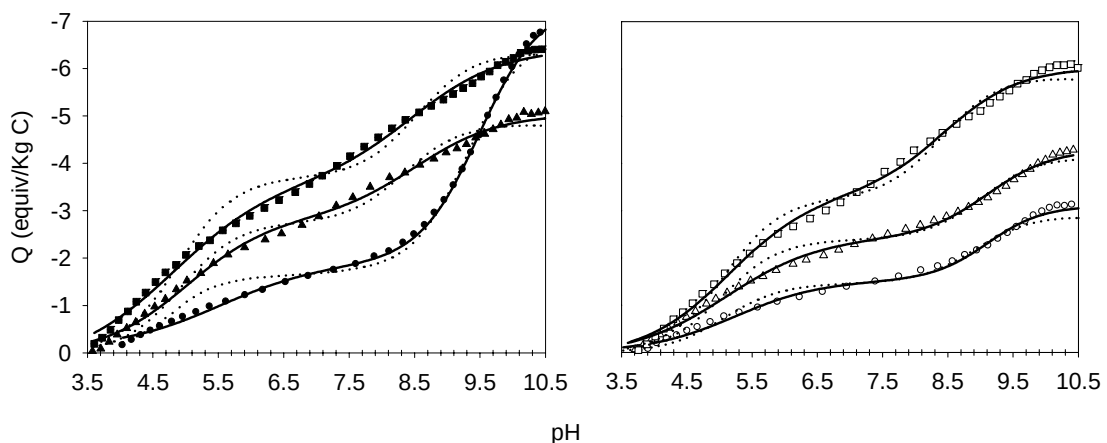


Figure 3 Negative charge Q of FA isolated from bulk soil samples (left, dark symbols) and isolated from the < 20 μm fraction (right, empty symbols) versus pH, ■ □ Conifer compost = CC, ▲ △ Straw = S, and ● ○ Non-amended = NA, solid line is the best fit with NICA and dotted line the best fit with FITEQL

Discrete and continuous distribution of sites were used to model charge curves obtained Figure 3. We constrained these two models with the experimental data (results of Gran linearization), by fixing total acidity (A_{TO}) (i.e. carboxylic and phenolic groups contents). Results of modeling are given for FITEQL in Table 1 and for NICA model in Table 2, and the resulting curves are shown in Fig 3.

3.2.3 Proton binding affinity

The discrete approach by FITEQL and the continuous approach by NICA were found to fit well the experimental datasets for the various FA examined (Figure 3) as shown by the criterion parameters: W_{sols}/df ranging between 0.1 and 10 (Table 1), small RMSE and large values for the coefficient of determination (r^2) (Table 2). Hence, the quantification of carboxylic and phenolic groups contents by the Gran method appears to be consistent in regard of good fitting parameters for FA by FITEQL and NICA model.

FA samples	r^2	RMSE	$\log \tilde{K}_{H,1}$	m_1	$\log \tilde{K}_{H,2}$	m_2
Isolated from the bulk soil						
NA	0.9897	0.0570	5.53 ± 0.07	0.56 ± 0.03	9.49 ± 0.01	0.93 ± 0.01
S	0.9961	0.1122	5.02 ± 0.07	0.68 ± 0.07	8.52 ± 0.09	0.69 ± 0.06
CC	0.9971	0.1124	4.80 ± 0.07	0.56 ± 0.04	8.48 ± 0.09	0.62 ± 0.04
Isolated from <20 μ m fraction						
NA	0.9951	0.0804	5.24 ± 0.09	0.66 ± 0.07	9.11 ± 0.05	0.98 ± 0.07
S	0.9958	0.0905	5.11 ± 0.06	0.61 ± 0.04	9.11 ± 0.06	0.86 ± 0.07
CC	0.9966	0.1267	5.14 ± 0.06	0.66 ± 0.05	8.45 ± 0.07	0.76 ± 0.06

r^2 is the coefficient of determination

RMSE is the residual mean square errors computed by NICA

m_i is the width of the proton affinity distribution

Table 2 Fitting parameters $\log \tilde{K}_{H,1}$ and $\log \tilde{K}_{H,2}$ for proton binding characteristics of fulvic acids with NICA model

As expected, NICA provides better fit than FITEQL due to a continuous distribution of sites which takes into account heterogeneity in the proton binding affinities. However, FITEQL based on discrete distribution of sites shows (i) consistent fits (e.g. Figure 3 and $0.1 < W_{sols}/df < 10$); and (ii) similar tendencies of proton affinity constant between bulk FA and < 20 μ m FA as does NICA (Tables 1 and 2). Due to similar tendencies, we discuss in the following text only results of calculations by FITEQL.

The values found are in accordance with the distribution pKa values for simple organic acids made by Perdue (1985) for humic substances. But the acidity constant for carboxylic groups of bulk FA for NA ($\log K_{H,1} = 5.14$) was found significantly different ($p < 0.05$) from the corresponding one for bulk CC and S for which $\log K_{H,1}$ are close (Table 1). In addition, the acidity constants for the phenolic groups of bulk FA were found significantly different ($p < 0.05$) between the three samples, $\log K_{H,2}$ following the order NA > CC > S (Table 3). Consequently, results of proton binding affinity indicate that organic inputs induced modification of the reactivity towards protons of bulk FA in all samples.

On the contrary, organic inputs appear to induce no modification of the acidity constants of the carboxylic groups of the $< 20 \mu\text{m}$ FA. Indeed these constants are significantly similar between the three samples (i.e. $\log K_{H,1} = 5.1$) whereas the acidity constant of the phenolic groups change significantly, especially between CC ($\log K_{H,2} = 8.4$) and the others (about $\log K_{H,2} = 9.0$) (Table 2). Although an increase of carbon content in the $< 20 \mu\text{m}$ fraction was pointed out for S and CC (Figure 1), this increase seems to poorly modify the proton binding properties.

On the other hand, the $\log K_{H,1}$ for the carboxyl groups show no significant differences between bulk FA and $< 20 \mu\text{m}$ FA except for CC, while the $\log K_{H,2}$ for the phenolic groups of bulk FA are significantly different from those of $< 20 \mu\text{m}$ FA. These results pointed out the probable different nature of organic carbon in the $< 20 \mu\text{m}$ fraction from that of the bulk soil.

These results suggest that (i) for bulk samples, organic inputs changed the nature of the titratable sites of the organic FA fraction, visible by a change in the repartition between carboxyl and phenolic sites and their corresponding dissociation constants; (ii) organic inputs partially change the nature of this extractable organic matter in the $< 20 \mu\text{m}$ fraction (i.e. increase in acidic functional group contents with slight changes in proton binding affinity).

3.3 Copper binding

Experimental quantities of bound copper to the different FA fractions are given in Figure 4. For the three soils and at one given pH value, less copper was bound in the presence of bulk FA, compared to $< 20 \mu\text{m}$ FA. Furthermore, percentage of bound copper for the three bulk FA are rather scattered while those for FA extracted from the $< 20 \mu\text{m}$ size fraction are

rather close (Figure 4). These results are in accordance with the fact that the nature of organic carbon of the $< 20 \mu\text{m}$ FA is more homogenous than that of bulk FA.

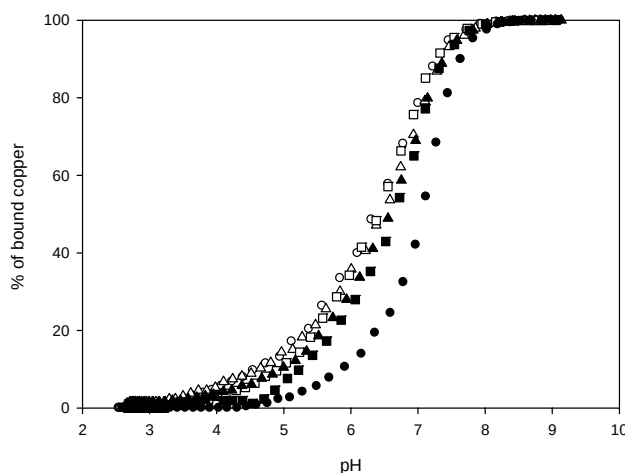


Figure 4 Experimental data expressed as percent of bound copper in the presence of FA extracted from the three soil samples ($R = 4$). Bulk FA: ■ Conifer compost, ▲ Straw and ● Non-amended, and $< 20 \mu\text{m}$ FA: □ Conifer compost, △ Straw, ○ Non-amended

Fitting a two-site binding model to Cu titration data from pH 2.5 to pH 9.5 for each FA sample produced apparent stability constant of Cu-FA complexes. Table 3 gives these apparent stability constants for bulk FA and $< 20 \mu\text{m}$ FA. The low sums of squares of residuals (W_{sos}/df) indicate that experimental datasets are well fitted by FITEQL. This can be seen in Figure 5 where experimental data (Cu^{2+}) are plotted against the theoretical speciation of copper calculated here in the case of $< 20 \mu\text{m}$ FA for S ($R = 4$). For all three soil samples, the same types of copper-FA complexes were found best to fit the experimental data: S_1Cu , S_1CuOH and S_2CuOH , where S_1 denotes carboxylic-type groups and S_2 denotes phenolic-type groups. According to the theoretical speciation, in environmental conditions between pH 6 to 8 complexes involving CuOH species and FA were predominant (Figure 5). Several authors who studied metal reactivity (Al, Fe, Pb, Cu) with organic and biological material have shown that mixed ligand complex formation must be taken into account (Lamy et al., 1985) and in particular those with the hydrolysis product of metals (Folwe and Fein, 1999; Tipping et al., 2002).

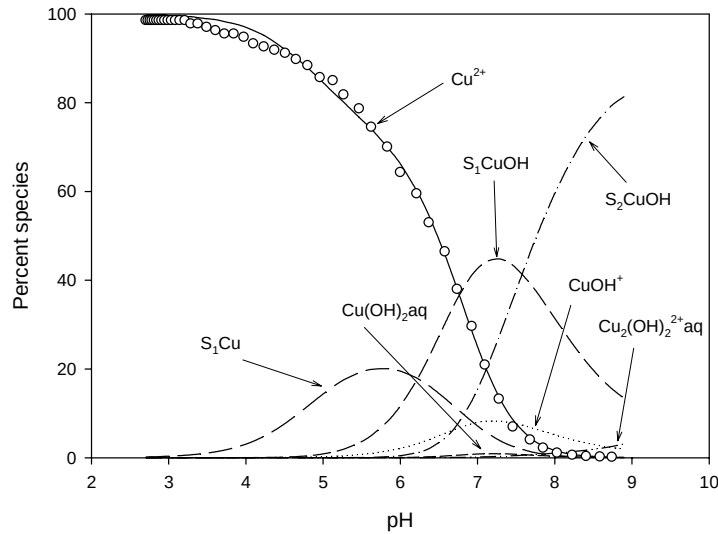


Figure 5 Example of theoretical copper speciation in a solution of FA extracted from the < 20 μm fraction of Straw ($R = 4$, $W_{\text{sos}}/df = 0.44$), circles are experimental data and lines are FITEQL calculations

For the ratio ligand/copper studied $R = 4$, an impact of the organic inputs on the copper stability constants of bulk FA was found (Table 3), but not for < 20 μm FA. Furthermore, for one given soil sample NA, S or CC, copper binding characteristics for bulk FA and < 20 μm FA were similar except for the NA sample where values for $S_1\text{Cu}$ and $S_1\text{CuOH}$ were found significantly different.

FA samples	Log K $S_1\text{Cu}$	log K $S_1\text{CuOH}$	log K $S_2\text{CuOH}$	W_{sos}/df
Isolated from the bulk soil				
NA	3.27 ^a	3.87 ^a	6.23 ^a	0.18
S	3.42 ^a	4.91 ^b	5.81 ^a	0.21
CC	3.12 ^a	4.79 ^b	6.08 ^a	0.29
Isolated from <20 μm fraction				
NA	3.69 ^a	5.01 ^a	6.21 ^a	0.14
S	3.60 ^a	4.87 ^a	6.49 ^a	0.44
CC	3.42 ^a	5.02 ^a	5.91 ^a	0.11

Uncertainties are $\pm 5\%$ for all stability constants.

Values followed by the same letter within each column and for one location of FA (bulk or < 20 μm) are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 3 Apparent stability constants of Cu-FA complexes computed by FITEQL for a FA/metal ratio $R=4$.

When studying dissolved organic carbon originating from four different experimental sites, Strobel et al. (2001) showed no differences of their Cu stability constant although different acidic functional group contents were found. Similar conclusions were reported by

Gondar et al. (2005 a,b), who determined the acid-base properties and copper complexation of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. The humic substances extracted from the deeper horizon exhibited a higher concentration of acid sites but no differences was found for the conditional binding parameters of the HA or FA of the two horizons.

Our experimental and fitted data show that differences in chemical reactivity toward copper after organic inputs are better viewed in FA extracted from the bulk soil than from the $< 20 \mu\text{m}$ fraction. Hence, 15 years of organic inputs have induced more differentiation in chemical characteristics of organic FA carbon in the coarser fractions. This result is in accordance with work of Balesdent (1996) on the turn-over of organic carbon in soil. Indeed, the turn-over of the coarser fractions was found faster than the finest (e.g. 63 years for the 0-50 μm fraction and 3 years for 200-2000 μm fraction). Thus carbon incorporated in the coarser fractions induced changes in chemical properties of FA of these fractions while for the finest fraction ($< 20\mu\text{m}$) the changes were not seen in our case. Nevertheless, our results after organic inputs strongly suggest that the organic carbon located in the finest fraction (Figure 1) is reactive because increases in A_{TO} were highlighted (Table 1) despite no major change in copper reactivity or proton binding affinity. This might be due to the fact that organic carbon entering the finest fractions is always of the same nature.

5. Conclusion

Location of organic carbon contents in the three soil samples indicated that all particle size fractions exhibit an increase in organic carbon after the organic amendments. Moreover, the C/N were significantly different for the three samples only in the coarser fractions 50-200 μm and 200-2000 μm .

We observed that organic amendments disturbed the repartition of functional groups compared to the non-amended soil for FA isolated from the bulk soil but not for FA extracted from the $< 20 \mu\text{m}$ size-fraction. Proton binding constants were found modified after amendments for the FA extracted from the bulk soil but not for the FA extracted from the $< 20 \mu\text{m}$ size-fraction. In the same way the organic amendments did not change the copper binding ability of the FA $< 20\mu\text{m}$ but induced changes for the bulk FA.

Thus in this study combining SOM data and fulvic acid chemistry with the effects of organic matter amendments to soils, all results agree to show a minimal impact of organic amendments on chemical reactivity of FA extracted from the $< 20 \mu\text{m}$ size-fraction. This was

ascribed either to the long-term carbon turn-over of this fraction or to a greater homogeneity in the nature of the organic carbon. But changes were observed for FA extracted from the bulk soil, suggesting that the chemical reactivity of the coarser organic fractions could be a better indicator for impacts of medium-term amendments.

Acknowledgments:

The authors thanks M. G. Keizer for his kind advices when using NICA approach. This work was partly supported by a PN/ACI "ECCO" project in the frame of the Concerted Action ECODYN. Authors acknowledge Jean-Pierre Pétraud and Sébastien Breuil for their technical help, the Région Ile de France and INRA for a grant for J. Sebastia and the program TOXNUC-E for a post doctoral grant for J. Labanowski.

References

- Balesdent, J., 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 485-493.
- Balesdent, J., Pétraud, J.P., Feller, C., 1991. Some effects of ultrasonic vibrations on size-distribution of soil organic matter. *Science du Sol* 29, 95-106.
- Ducaroir, J., Lamy, I., 1995. Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst* 120, 741-745.
- FAO-Unesco-ISRIC, 1989. Revised Legend of the FAO-Unesco Soil Map of the World. World Resources Report n° 60. FAO, Rome.
- Fiol, S., López, R., Ramos, A., Antelo, J.M., Arce, F., 1999. Study of the acid-base properties of three fulvic acids extracted from different horizons of a soil. *Anal. Chim. Acta* 385, 443-449.
- Florez-Vélez, L.M., Ducaroir, J., Jaunet, A.M., Robert, M., 1996. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 523-532.
- Folwe, D.A., Fein, J.B., 1999. Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: Testing the chemical equilibrium model. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 63, 3059-3067.
- Gran, G., 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst* 77, 661-671.

Gondar, D., Lopez, R., Fiol, S., Antelo, J.M., Arce, F., 2005 a. Characterization and acid-base properties of fulvic acids and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma* 126, 367-374.

Gondar, D., Iglesias, A., Lopez, R., Fiol, S., Antelo, J.M., Arce, F., 2005 b. Copper binding by peat fulvic and humic extracted from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Chemosphere* 63, 82-88.

Herbelin, A., Westall, J., 1999. FITEQL a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data version 4.0. User manual.

Holtzclaw, K.M., Sposito, G., Bradford, G.R., 1976. Analytical properties of the soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures: I. extraction and purification of fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40, 254-258.

Holtzclaw, K.M., Keech, D.A., Page, A.L., Sposito, G., Ganje, T.J., Ball N.B., 1978. Trace metal distributions among the humic acid, the fulvic acid, and the precipitable fractions extracted with NaOH from sewage sludges. *J. Environ. Qual.* 7, 124-127.

Kinniburgh, D.G., 1993. User guide. Tech. Rep. WD/93/23. Hydrogeology Series. British Geol. Survey, Keyworth.

Koopal, L.K., van Riemsdijk, W.H., deWit, J.C.M., Benedetti, M.F., 1994. Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces. *J. Colloid Interf. Sci.* 166, 51-60.

Koopal, L.K., Saito, T., Pinheiro, J.P., van Riemsdijk, W.H., 2005. Ion binding to natural organic matter: General considerations and NICA-Donnan model. *Colloid Surface A* 265, 40-54.

Kunz, A., Jardim, W.F., 2000. Complexation and adsorption of copper in raw sewage. *Water. Res.* 34, 2061-2068.

Lamy, I., Seywert, M., Cromer, M., Scharff, J.P., 1985. Simple and mixed ligand complexes of copper(II) with polyfunctional phenolic compounds as model of natural substances. *Anal. Chim. Acta.* 176, 201-212.

Lamy, I., Cromer, M., Scharff, J.P., 1987. Binding strength evaluation of Cu(II) complexation with organic ligands of environmental interest. *Sci. Total Environ.* 62, 271-274.

Lamy, I., M., Cromer, M., Scharff, J.P., 1988. Comparative study of copper(II) interactions with monomeric ligands and synthetic or natural organic materials from potentiometric data. *Anal. Chim. Acta.* 212, 105-122.

Lejon, D.P.H., Sebastia, J., Lamy, I., Chaussod, R., Ranjard, L., 2007. Relationships between soil organic status and microbial communities in agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microb. Ecol. In press*

Milne, C.J., Kinniburgh, D.G., deWitt, J.C.M., van Riemsdijk, W.H., 1995. Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 59, 1101-1112.

Milne, J.M., Kinniburgh, D.G., van Riemsdijk, D.G., Tipping, E., 2003. Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion by humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 37, 958-971.

Naja, G., Mustin, C., Volesky, B., Berthelin, J., 2005. A high-resolution titrator: a new approach to studying binding sites of microbial biosorbents. *Water Res.* 39, 579-588.

Nardi, S., Morari, F., Berti, A., Tosoni, M., Giardini, L., 2004. Soil organic matter properties after 40 years of different use of organic and mineral fertilisers. *Eur. J. Agron.* 21, 357-367.

Perdue, E.M., 2001. Modelings concepts in metal-humic complexation. In: Clapp, C.E., Hayes, M.H.B., Senesi, N., Bloom, P.R., Jardine, P.M. (Eds.). *Humic Substances and Chemical Contaminants*. Soil Science Society of America, Inc., pp. 305-317.

Perdue, E.M., 1985. Acidic functional groups of humic substances. In: Aiken, G.R., MacKnight, D.M., Wershaw, R.L. (Eds.). *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*. John Wiley, New York, pp. 527-561.

Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N., Polo, A., 2005a. Proton binding by humic acids from organic amendements and amended soils by the NICA-Donnan model. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6692-6697.

Plaza, C., García-Gil, J.C., Polo, A., Senesi, N., Brunetti, G., 2005b. Proton binding by humic and fulvic acids from pig slurry and amended soils. *J. Environ. Qual.* 34, 1131-1137.

Plaza, C., Senesi, N., Polo Brunetti, G., A., García-Gil, J.C., D'Orazio, V., 2003. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. *Soil Till. Res.* 74, 179-190.

Rivero, C., Chirenje, T., Ma, L.Q., Martinez, G., 2004. Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. *Geoderma* 123, 355-361.

Rumpel, C., Eusterhues, K., Kögel-Knabner, I., 2004. Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 177-190.

Strobel, B.W., Hansen, H.C.B., Borggaard, O.K., Andersen, M.K., Raulund-Rasmussen, K., 2001. Composition and reactivity of DOC in forest floor soil solutions in relation to tree species and soil type. *Biogeochemistry* 56, 1-26.

Tipping, E., Rey-Castro, C., Bryan, S.E., Hamilton-Taylor, J., 2002. Al(III) and Fe(III) binding by humic substances in freshwaters, and implications for trace metal speciation. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 66, 3211-3224.

Westall, J.C., Jones, J.D., Turner, G.D., Zachara, J.M., 1995. Models for association of metal ions with heterogeneous environmental sorbents. 1. complexation of Co(II) by leonardite humic acid as function of pH and NaClO₄ concentration. *Environ. Sci. Technol.* 29, 951-959.

Chapitre III.

Réactivité des Matières Organiques Particulaires

Chapitre III. Réactivité des Matières Organiques Particulaires

Dans le premier chapitre, nous avons mis en évidence le fait que les MOP sont une fraction importante des MOS, comme phase porteuse de métaux mais pour lesquelles les mécanismes d'interaction avec les métaux restent peu étudiés. D'autre part, les résultats exposés au second chapitre montrent que le changement de statut organique de nos sols a plus affecté la réactivité chimique des fractions grossières que celle des fractions fines du sol.

Afin de mettre en évidence la réactivité des MOP et de la quantifier, nous avons utilisé :

- une méthode indirecte (détermination de la Capacité d'Echange Cationique CEC)
- deux méthodes directes (batch d'adsorption et titrages potentiométriques).

Deux fractions de MOP 50-200 et 200-2000 μm ont été extraites par fractionnement granulo-densimétrique. Ces deux fractions ont été choisies car elles présentent, d'après la littérature, des turn-over du carbone différents, représentant ainsi des compartiments fonctionnels du sol (Balesdent, 1996). Elles permettent aussi de réduire l'hétérogénéité des matériaux étudiés au sein d'une fraction.

L'ensemble des analyses n'a pu être effectué sur toutes les MOP, ceci dû au nombre élevé de fractionnements granulo-densimétriques nécessaires pour obtenir une quantité suffisante de matériau.

1. Capacité d'Echange Cationique des MOP

La CEC est une analyse couramment effectuée en science du sol, permettant de déterminer la capacité d'échange maximale de cations qu'un sol peut échanger. Cette analyse est utilisée comme un outil de gestion des sols (Tessier et al., 1999). Ce type de détermination a été aussi appliqué aux racines de végétaux (e.g. Ram, 1980 ; Dufey et Braun, 1986 ; Rengel et Robinson, 1989). Cronan (1991) montre que les racines des végétaux possèdent une CEC qui augmente avec le pH. Ces résultats sont dûs à la présence de groupements à charge variable, comme des groupements carboxyliques (Rengel et Robinson, 1989). D'après nos résultats (Chapitre I), les MOP semblent être réactives vis-à-vis du cuivre et donc on devrait pouvoir déterminer une CEC. Nous avons ainsi essayé de déterminer celle des MOP, à l'aide

d'un protocole adapté pour ce type de matériau. De plus, nous avons déterminé la CEC des MOP pour deux pH (4,5 et 6), dans le but de mettre en évidence ou pas une charge variable des MOP que l'on pourrait peut-être attribuer à des groupements fonctionnels.

1.1 Mode opératoire

Les MOP étant un matériau assez fragile, des agitations longues et fortes (agitateur) pour mesurer la CEC du sol selon les méthodes AFNOR pourraient conduire à la détérioration des MOP. Nous avons donc utilisé un protocole différent plus adapté aux matériaux biologiques pour estimer la CEC des MOP, et mis au point un système d'agitation qui ne conduit pas à leur détérioration. Les MOP ont été placées dans un flacon permettant de les faire tremper dans des bains successifs et de les récupérer sans en perdre. Ce système présente l'avantage d'une agitation douce par déplacement du liquide de l'intérieur du flacon, par un mouvement de piston. Ce système a été baptisé la "mopette" (Figure 3.1).

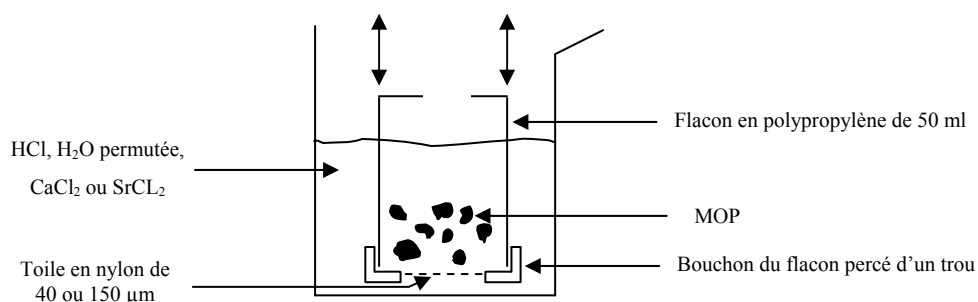


Figure 3.1 Système pour déterminer la CEC des MOP "La mopette"

Nous avons choisi le protocole utilisé par Cronan (1991) ensuite repris par Godbold et Jentschke (1998). Il a été mis au point pour mesurer la CEC de racines de végétaux. Ce protocole consiste en un premier temps à décationiser les MOP et à les ajuster au pH désiré pour la mesure de la CEC. Les MOP sont ensuite saturées au Ca puis désaturées au Sr. Le calcium échangé est dosé et la CEC quantifiée (Annexe E ; Condaminet, 2006). La CEC de nos MOP a été déterminée à pH 4,5 et 6. Comme ce protocole est non optimisé pour les MOP, deux types de CEC ont été effectués :

↳ CEC Cronan : pour toutes les MOP, le protocole de Cronan (1991) a été utilisé tel quel.

↳ CEC optimisée : pour les MOP extraites de CC (MOP que l'on avait en plus grande quantité), nous avons suivi et maintenu le pH durant l'étape de saturation au calcium, étape déterminante car elle conditionne la valeur de la CEC.

1.2 Résultats

1.2.1. CEC Cronan

Les CEC mesurées pour toutes les MOP sont rapportées dans la Figure 3.2. Les MOP possèdent une CEC qui oscille entre 17 et 27 meq/100g de MOP. La CEC des MOP mesurée à pH 6 est différente de celle mesurée à pH 4,5 sauf pour S.

Ainsi deux hypothèses peuvent être avancées :

↳ Soit la CEC ne varie pas, cela indique donc la présence de charges permanentes, indépendantes du pH. Ce type de propriété est souvent rencontré pour de la matière minérale, comme des argiles.

↳ Soit la CEC augmente avec le pH, indiquant la présence de charges variables. Or cette deuxième hypothèse semble plus probable car il s'agit de matière organique et non de matière minérale.

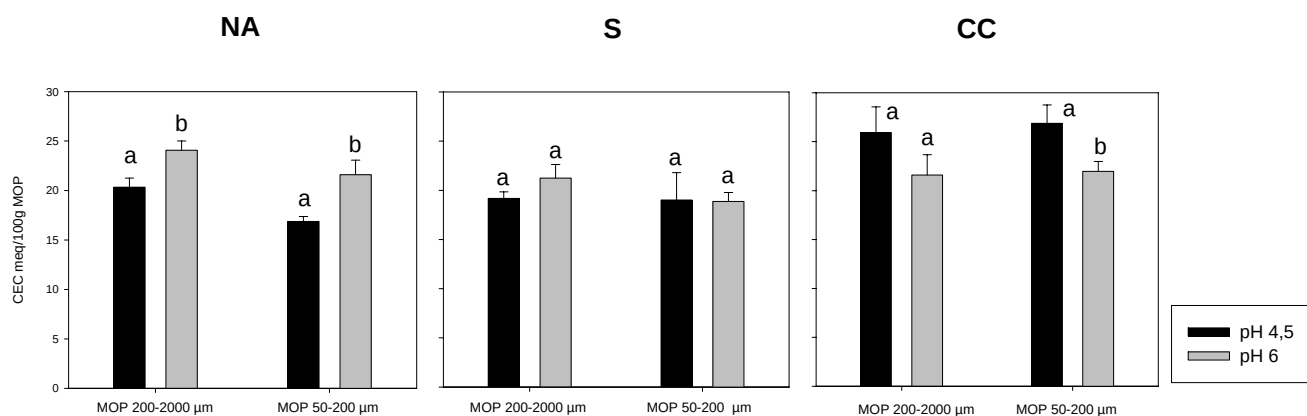


Figure 3.2 CEC mesurées pour les MOP à pH 4,5 et 6

1.2.2. CEC optimisée

Les résultats de la CEC pour les MOP extraites de CC sont donnés dans le Tableau 3.1. La CEC est plus importante quand le pH augmente. Ce résultat coïncide avec les propriétés de la matière organique. D'autre part, la CEC est plus grande quand la taille des MOP diminue. Si l'on considère que plus les MOP sont petites plus elles sont biodégradées, alors cette observation concorde avec celle de Stevenson (1982). Il montre que la dégradation de la lignine par les bactéries -par déméthylation et oxydation- conduit à la formation de groupements à charge variables du type carboxylique et phénolique.

Le fait que l'on n'observe pas systématiquement une CEC Cronan pH 4,5 inférieure ou égale à la CEC Cronan pH 6, provient peut-être de l'échange de protons fixés sur les MOP

par du calcium, provoquant une baisse de pH en solution. Pour des pH trop faibles, le proton devenant plus compétitif que le calcium, l'échange ne peut alors plus se faire, la mesure de la CEC étant donc erronée.

	MOP CC 200-2000 μm		MOP CC 50-200 μm	
pH	4,5	6,0	4,5	6,0
CEC (meq/100g)	25,93	69,32	26,87	93,8

Tableau 3.1 CEC des MOP après suivi du pH pendant l'étape de saturation au calcium

1.3 Conclusions et perspectives

Nous avons pu montrer au cours de ces essais que les MOP possèdent une CEC variant avec le pH, ce qui suggère la présence de groupements à charge variable sur les MOP. Cette CEC augmente lorsque la taille des MOP diminue, ce qui semble aussi indiquer un effet de la biodégradation sur la CEC des MOP.

Il resterait encore quelques optimisations du mode opératoire à effectuer, dont principalement, le temps de saturation avec le Ca dont il conviendrait de déterminer le temps d'équilibre. De même, lors de l'étape de désaturation au Sr, il conviendrait aussi de faire une étude cinétique pour déterminer le temps d'équilibre.

2. Mise en évidence d'une capacité d'adsorption du Cuivre par les MOP

Pour mettre en évidence une capacité d'adsorption du cuivre par les MOP, nous avons effectué une étude en batch. Nous avons déterminé une capacité d'adsorption maximale en cuivre des MOP. Nous avons ensuite caractérisé l'affinité du cuivre avec les MOP en faisant l'hypothèse de l'existence de deux sites de capacité complexante différente.

La capacité d'adsorption de Cu a été mesurée à pH 6 en réacteur discontinu pour les MOP 200-2000 μm pour NA, S et CC.

2.1. Mode opératoire

Une quantité précise d'environ 0,1 g de MOP sèches est ajoutée dans 40 mL de NaClO_4 0,1 M. La solution est mise en agitation par bullage d'azote, pour éviter l'utilisation d'un barreau aimanté. Au bout de 30 min, des ajouts connus en cuivre sont effectués toutes les 5 minutes, à l'aide de deux solutions mères de cuivre suivant l'importance de l'ajout (0,1M et 0,001M). Les solutions mères ont été préalablement dosées par la méthode de Flaschka (1964). Le pH est maintenu à 6 par ajout soit à l'aide d'une solution de NaOH 0,1M ou de HClO_4 0,1M. Le cuivre libre est déterminé à l'aide d'une électrode spécifique, couplée avec une électrode de référence plongeant dans une allonge remplie de NaClO_4 0,1 M. Le couple

d'électrodes est préalablement calibré avec trois solutions de cuivre à 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M en milieu 0,1 M NaClO_4 .

La quantité de cuivre adsorbée par les MOP est obtenue par différence entre le cuivre total et la concentration en cuivre libre. Pour une concentration en cuivre de libre en solution de $6 \cdot 10^{-4}$ M à pH 6, 97,5% de cuivre total est sous forme libre (calculs effectués avec le logiciel ECOSAT). Nous avons donc arrêté cette expérience pour une concentration en cuivre libre mesurée à $6 \cdot 10^{-4}$ M pour éviter un biais par l'hydrolyse sur la quantité de cuivre adsorbée par les MOP.

2.2. Résultats

La Figure 3.3 représente la quantité de Cu adsorbée par les MOP en fonction du cuivre libre mesurée en solution. Les trois types de MOP NA, S et CC 200-2000 μm adsorbent la même quantité de cuivre rapportée en kg de MOP. La saturation des MOP par le Cu n'est pas observée, bien que la quantité adsorbée sur les MOP soit supérieure à 10000 mg de Cu fixé par kg de MOP.

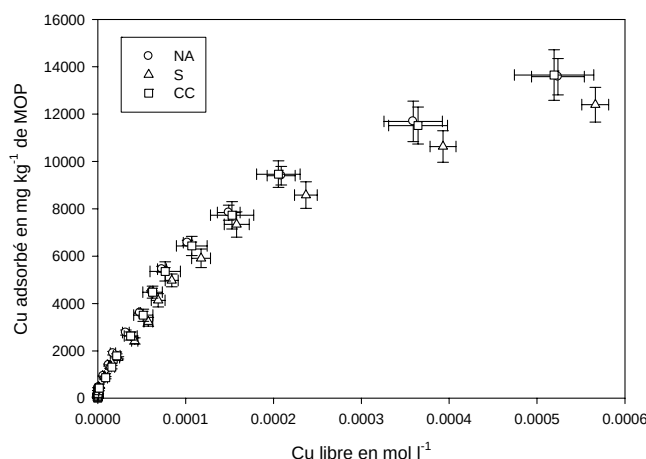


Figure 3.3 Quantité de cuivre adsorbée par les MOP 200-2000 μm de NA, S et CC à pH 6

Pour caractériser l'affinité du cuivre avec les MOP, nous avons utilisé l'équation double surface de Langmuir (Fitch et Stevenson, 1984) faisant l'hypothèse de l'existence de deux sites de capacité complexante différente :

$$(C_M - m) = \left(CC_1 - \frac{(C_M - m)}{K'_1 \times m} \right) + \left(CC_2 - \frac{(C_M - m)}{K'_2 \times m} \right)$$

C_M = Concentration totale en cuivre introduite
 m = concentration en Cu libre à l'équilibre
 CC_1 et CC_2 = concentrations en sites
 K'_1 et K'_2 = les constantes de stabilité conditionnelles relatives à ces sites

Un exemple est donné à la Figure 3.4. La partie de gauche permet d'estimer, à partir de l'équation de la droite, la concentration totale en sites ($CC_1 + CC_2$) et la constante conditionnelle K'_1 des sites d'affinité faible. La partie droite du graphe permet de la même manière d'estimer la concentration en sites qui complexent fortement les métaux, et la constante conditionnelle associée, K'_2 .

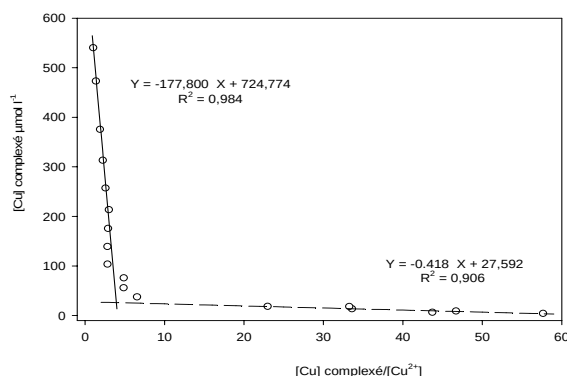


Figure 3.4 Isotherme double surface de Langmuir appliquée aux données d'adsorption du Cu par les MOP 200-2000 μm extraites de S à pH 6.

Le Tableau 3.2 rassemble les capacités de complexation et les constantes conditionnelles, déterminées par la méthode double surface de Langmuir pour les MOP 200-2000 μm à pH 6. Les MOP des 3 sols possèdent des capacités de complexation et des constantes conditionnelles similaires. L'apport d'amendements organiques n'a pas eu d'influence significative sur l'affinité avec le Cu et sur les capacités de complexation des MOP. Les valeurs obtenues pour les constantes d'affinité sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Fitch and Stevenson (1984) pour un acide humique, ou celles déterminées par Citeau (2004) pour des colloïdes, ou encore celles des acides fulviques extraits de nos sols (cf. Tableau 2.8 ; Chapitre II). Ce résultat suggère une forte affinité du cuivre pour les MOP. Cependant, la capacité de complexation totale ($CC_1 + CC_2$) des MOP, assimilée à une concentration en sites, est inférieure à celle d'AF extraits de sol (Esteves da Silva et Oliveira, 2002) et aussi à celle des acides fulviques extraits des sols NA, S et CC (cf. Tableau 2.5, Chapitre II).

MOP 200-2000 μm	CC_1 (meq g^{-1} MOP)	K'_1	CC_2 (meq g^{-1} MOP)	K'_2
NA	$0,25 \pm 0,02^a$	$3,76 \pm 0,01^a$	$1,26.10^{-2} \pm 0,13^a$	$6,23 \pm 0,14^a$
S	$0,23 \pm 0,02^a$	$3,65 \pm 0,10^a$	$1,15.10^{-2} \pm 0,21^a$	$6,13 \pm 0,16^a$
CC	$0,26 \pm 0,02^a$	$3,73 \pm 0,13^a$	$0,97.10^{-2} \pm 0,20^a$	$6,08 \pm 0,18^a$

^a différentes lettres indiquent dans une colonne une différence significative ($P > 0,05$)

Tableau 3.2 Valeurs des constantes conditionnelles et capacités complexantes associées déterminées à pH 6.

3. Quantification de la réactivité des MOP

Dans l'article présenté par la suite, la réactivité des MOP -déjà mise en évidence par la CEC ou par batch à pH constant- a été quantifiée par titrages potentiométriques et modélisée par FITEQL pour chaque taille de MOP et chaque sol à pH variable.

3.1. Résultats majeurs (résumé article)

Les travaux relatifs à la réactivité des MOP ont fait l'objet d'un article soumis à European journal of Soil Science (voir p 69).

Les titrages potentiométriques en absence de cuivre indiquent la présence de deux sites titrables dont les pKa sont similaires aux pKa de groupements carboxyliques et aux pKa de groupements phosphates. La présence de ce type de groupements à la surface des MOP serait attribuée à la biodégradation des résidus végétaux et à la présence microbienne sur les MOP. Par ajustement des courbes de titrage (Figure 3.5) avec les données calculées par FITEQL, en faisant l'hypothèse d'un modèle à 2 pKa, on a pu montrer que le pouvoir tampon des MOP augmente lorsque leur taille diminue. Ceci est donc en accord avec l'idée que la dégradation induirait la création de nouveaux sites de surface car plus les MOP sont de petite taille, plus elles sont biodégradées. Le pouvoir tampon a été trouvé identique pour les MOP 200-2000 μm quel que soit le sol, alors qu'il est différent pour les MOP de plus petite taille de 50-200 μm . Ce pouvoir tampon varie dans le sens : CC>S>NA.

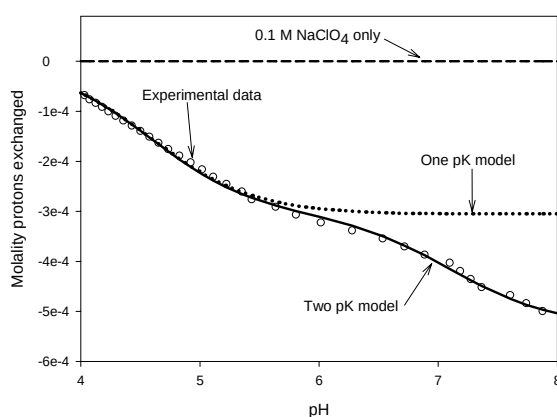


Figure 3.5 Titrage potentiométrique des MOP 50-200 μm CC en absence de Cu (symboles vides). Les résultats de la modélisation par FITEQL sont donnés en considérant 1 ou 2 sites

Le titrage des MOP 200-2000 et 50-200 μm en présence et en absence de cuivre est donné à la Figure 3.6. Dans nos conditions expérimentales, la capacité des MOP à complexer le Cu commence dès pH 4. L'interaction entre le Cu et les MOP durant les titrages correspond à la compétition entre le proton et le Cu pour un site complexant. Les constantes de

complexation pour Cu obtenues par FITEQL sont identiques pour les MOP 50-200 et 200-2000 μm (Table 3). Il a été souvent observé dans la littérature que les MOP de petite taille avaient les teneurs en métaux les plus élevées. Cette observation serait due à une concentration en sites plus élevée pour les MOP de petite taille et non à une affinité plus forte avec les métaux. Ces résultats indiquent que les MOP peuvent avoir un rôle de puits de métaux dans les sols.

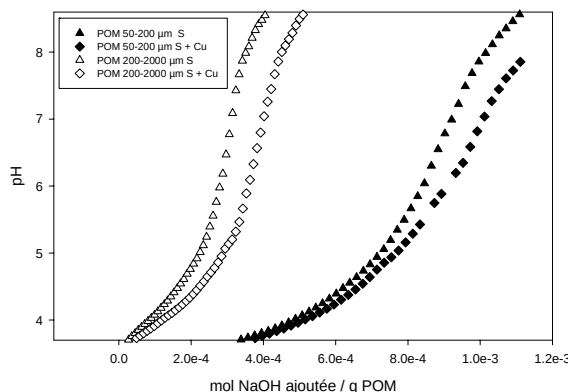


Figure 3.6 Titrages potentiométriques en absence ou en présence de cuivre (Rapport: ligand/Cu=8) avec les MOP 50-200 μm (symboles pleins) ou 200-2000 μm (symboles vides) extraites de S

Dans ce chapitre, la réactivité des MOP a été caractérisée à l'aide de méthode indirecte (CEC) et directe (étude en batch et potentiométrie).

Les valeurs obtenues par potentiométrie et batch sont comparables pour les teneurs en sites et les constantes d'affinité avec le cuivre. Cependant, la CEC donne des valeurs supérieures de 40 à 60 % par rapport aux valeurs mesurées par potentiométrie et batch d'adsorption. Néanmoins, les tendances observées entre les échantillons par ces différentes techniques sont similaires. Ces différences s'expliquent par les différentes techniques et mode opératoire utilisés.

L'ensemble de ces résultats montre que les MOP possèdent des groupements fonctionnels réactifs (carboxyliques et phosphates) qui seraient dus à la biodégradation et à la présence microbienne dans les MOP. La différence de nature des MOS observée entre NA, S et CC ne se traduit qu'à travers la teneur en sites des MOP 50-200 μm . L'affinité des MOP 200-200 et 50-200 μm pour le Cu reste identique entre les trois sols.

Par conséquent, les MOP peuvent jouer le rôle de puits de métaux dans les sols et confirment les résultats acquis au chapitre I. A ce titre, les données obtenues sur la réactivité des MOP seront utilisées dans le dernier chapitre, pour déterminer la spéciation des métaux dans les sols.

“Buffer capacity and Cu affinity of soil POM size fractions”

J. SEBASTIA, F. VAN OORT & I. LAMY

INRA, UR251 - PESSAC, RD 10, 78026 Versailles cedex, France

Article soumis à *European Journal of Soil Science*

Summary

Particulate organic matter (POM), defined as sand-sized organic separates in soils, is known as a labile organic component with a rapid turnover. Recently, POM was identified as a metal-enriched organic fraction in both metal-contaminated and uncontaminated soils. However, mechanisms for such metal-enrichment are poorly understood, because of lacking information on chemical properties of POM. The aim of this study was to show the reactivity of POM towards Cu and a POM-size effect on this reactivity. POM was isolated from soils with different organic amendment managements: straw (S), conifer compost (CC), and non-amended (NA). Two POM size fractions were isolated by density-fractionation in water: 50-200 μm and 200-2000 μm . These fractions were studied for their metal contents, acid-base properties and affinity toward Cu. The buffer capacity and Cu affinity were modeled by FITEQL 4.0 software and compared between the two POM size fractions. Each POM size fraction provided a buffer capacity due to the presence of reactive sites, the highest being for the 50-200 μm POM fractions. Signature of organic inputs as seen by the buffer capacities was observed for the 50-200 μm but not for the 200-2000 μm POM fractions. But Cu affinity was comparable between the coarse and fine POM fractions and no significant differences were found between NA, S, and CC samples. We checked the hypothesis that decreasing POM size due to degradation processes generates more reactive surface sites. Results confirmed that soil POM plays a key role of metal sink, due to its chemical properties.

Introduction

Particulate Organic Matter (POM), as defined in our work is the part of soil organic matter (SOM) that can be isolated in $> 50\text{-}\mu\text{m}$ sand-sized fractions according to physical separation approaches in water (Balesdent *et al.*, 1991; Gregorich *et al.*, 2006). The material thus isolated is heterogeneous regarding its turnover, and includes animal and plant residues but also root fragments or fungal hyphae (Gregorich & Janzen, 1996; Chenu & Stotzky, 2000). In addition, Christensen (2001) defined POM as “uncomplexed” organic matter in soil, neither present as readily recognizable litter components (i.e. $> 2\text{ mm}$) nor incorporated into primary organomineral complexes. POM or “uncomplexed organic matter” was widely studied in order to establish relationships between POM characteristics and SOM dynamics and soil properties (Besnard *et al.*, 1996; Balesdent *et al.*, 1998; Whalen *et al.*, 2000). Quantity and quality of POM fractions were shown to be strongly influenced by soil management, but the use of POM as an index is matter of discussion: there is no prove that POM fractions have a functional meaning (Wander, 2004).

A main POM characteristic related to SOM dynamics is the rapid turnover of C and N in POM fractions. This turnover generally decreased with decreasing POM size indicating that smaller POM size fractions had a higher residence time in soil (Balesdent, 1996). In addition, several studies have shown that POM extracted from soils of uncontaminated, moderately and strong metal-contaminated soils was metal-enriched (Ducaroir & Lamy, 1995; Florez-Vélez *et al.*, 1996; Balabane *et al.*, 1999, Besnard *et al.*, 2001; Balabane & van Oort, 2002). Enrichment factors between 1.5 and 3 were found for Pb and Zn, between 4 and 5 for Cd, but as high as 7 for Cu when comparing the metal contents of POM with those determined on bulk samples of surface horizons of agricultural soils from an area around a former zinc smelter (Lamy *et al.*, 2002). To explain metals-enrichment in POM two main hypotheses were formulated (Labanowski *et al.*, 2007): (i) absorption of low rates of metals by plants *via* roots and accumulation in shoots may lead to coarse plant debris locally enriched in metals before re-entering the soils; (ii) POM display reactive surface sites involved in metal sorption. The first hypothesis however seems unable to explain the *in situ* measured enrichment factors since metal contents determined on aerial parts of plants (except for metallophyte species) are generally small with respect to metal contents determined on coarse POM fragments. A recent work on characterization of heavy metal adsorption on soil particulate organic matter (Guo *et al.*, 2006) seems to confirm the second hypothesis for Pb, Cu, and Cd. After FTIR analysis of POM in the absence or presence of heavy metals, Guo *et al.* (2006) suggested that adsorption

on POM was mainly due to complexes with carboxyl and hydroxyl groups. Moreover several studies on samples collected from moderate and strong metal polluted soils showed that metal contents of POM fractions increased with decreasing POM size (Balabane *et al.*, 1999; Lamy *et al.*, 2002; Balabane & van Oort, 2002). These authors suggested both an effect of abiotic processes (e.g. increasing reactivity for particles with decreasing sizes) as well as an influence of biodegradation leading to a relative enrichment of the most metal contaminated POM parts. From laboratory incubations, Boucher *et al.*, (2005 a,b) showed that biodegradation of metal contaminated leaves in an uncontaminated soil lead to an increase in metal content of soil POM in the fraction 200-2000 μm . Hence, POM appears as a metal sink in soils, but its role is poorly understood and the number of studies dealing with chemical properties of POM is small. In particular, metal reactivity towards POM is still poorly documented contrasting with numerous studies on the reactivity of other fractions of soil organic matter towards metals, such as humic substances or bacteria (Milne *et al.*, 2003; Guiné *et al.*, 2006).

The objectives of the present paper were (i) to show the chemical reactivity of POM, and (ii) to assess a size effect on this reactivity. For this, we used an original approach combining the extraction of two POM fractions, 200-2000 and 50-200 μm , by physical fractionation in water and the potentiometric titrations of these POM fractions in the absence or presence of Cu. The POM fractions were extracted from soils amended either with straw or conifer compost and a non-amended soil. Data from potentiometric titrations were fitted with FITEQL 4.0 software in order to show and compare the various POM reactivities in function of the POM-sizes and to discuss the role of POM towards sorption of heavy metals in soils.

Materials and methods

Site description and sampling

We used a 15-year old field experiment located in the vineyard site of Mâcon Clessé (Burgundy, France). All soils were deep Eutric Cambisols (FAO, 1989), fine clay-loamy textured, developed on the same parent material. The soil surface horizons displayed a pH between 6.5 and 7, and cation exchange capacity varying from about 17 to 25 $\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$ depending on organic amendments. The clay fraction, studied by X-Ray diffraction, included mainly illite, kaolinite, and interstratified 2:1 phyllosilicates, as well as quartz and feldspar. Two plots receiving different organic amendments at the soil surface were selected: (1) straw amendment (S) at a rate of 10 t ha^{-1} every 2 years, and (2) conifer compost amendment (CC) at a rate of 100 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ every 3-4 years. For control was also sampled a non-amended (NA)

plot with no organic inputs other than restituted vine-shoot fragments and only chemical weeding of soil. Sampling was made at 0-5 cm depth of the surface horizon in the various plots. Four replicates of about 2 kg were sampled per plot. Samples were mixed and homogenized, air-dried, sieved to 2.0 mm and stored in plastic bags at room temperature.

Physical fractionation of the soil samples and POM analysis

Mechanical dispersion of ca 50 g of soil samples (< 2 mm) was performed on a rotated shaker during 16 hours in polypropylene tubes with 125 ml of de-ionized water in the presence of 10 glass beads (6 mm). The suspension was then wet-sieved to 200 and 50 μm , respectively. We separated the light fractions 200-2000 and 50-200 μm by flotation in water according to Balesdent et al. (1991). Thus POM corresponding to a light fraction mainly composed of floating organic debris was isolated from the dense mineral fractions. The two isolated POM fractions were oven-dried at 55°C. For the bulk soil samples and each size fraction, total N and C were determined by dry combustion in an autoanalyzer (CE instruments NC 2500) and total Cu content by flame atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 220) after HNO_3 digestion for POM and HF/HNO_3 digestion for bulk soil samples under microwave (CEM, MarsX). Purity of each isolated POM fraction was checked under a binocular microscope, and a petrographic polarized microscope was used to study general aspects of POM fractions.

Potentiometric titrations of POM

We first studied the removal of indigenous POM Cu by shaking ca 0.3 g of POM in 50 ml of water at different pH (2, 3, 4, 5, 6) during 24 hours. At pH 2, total organic carbon (TOC) and Fe were more desorbed than at pH 3.5 while desorption of Cu was weak (16 % of the indigenous Cu content of POM). At pH 3.5 however, Cu removal was negligible suggesting no POM modification. We thus decided not to acid-wash POM before experiments, and to begin titrations around pH 3.5. At the end of titration, TOC content in solution was monitored by high temperature catalytic combustion followed by CO_2 measurement (Shimadzu TOC-VCSN). We found that around pH 8-9 less than 6% of total organic carbon initially introduced as solid matter in the titration cell were solubilized indicating that our experimental conditions minimized modifications of POM during titration.

All titrations were thus conducted in a pH range between 3.5 and a maximum of 9 in order to minimize side-effects like POM modifications (mineralization of POM at low pH or solubilization of carbon at high pH). Copper was used here both for its relevance as a major

environmental pollutant, especially in vineyard soils (Besnard *et al.*, 2001) but also as a probe of metal reactivity related to its well-known high affinity with soil organic constituents.

Acid-base properties of POM

The titrations were conducted using a pH meter (TIM 900, Radiometer) with a burette assembly (ABU901, Radiometer). A solution containing a known quantity of POM (1.6 g l⁻¹ for POM 200-2000 or 0.8 g l⁻¹ for POM 50-200µm) and with an initial HClO₄ content of 10^{-3.5} M and a constant ionic strength of 10⁻¹ M NaClO₄ was titrated in a thermostated cell at 25°C. Titrations were conducted in the presence of a positive external pressure of N₂ applied above the solution to avoid solubilization of CO₂ during the experiments. Aliquots of NaOH used as titrant (5.10⁻² M) previously standardized against potassium hydrogen phthalate were injected through a glass line. The pH was measured using a couple of electrodes: a reference electrode (XR 110, Radiometer) fitted with a salt-bridge junction filled with 10⁻¹ M NaClO₄ (AL 120, Radiometer) and a glass electrode (XG 250, Radiometer). The titrator was programmed in a dynamic mode and successive fixed titrant additions of 10 µl were made each 5 minutes, a time laps checked to be satisfactory for achieving stability of the measure.

For each point of the titration curve the charge Q (eq g⁻¹ of POM) was calculated using the following charge balance equation for all ions in solution (disregarding the supporting background electrolyte) :

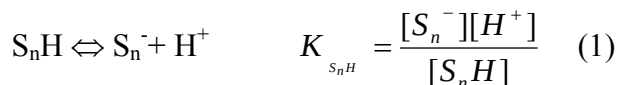
$$Q = \frac{[Ca]Vo/(Vo+V) - V[Cb]/(Vo+V) - [H^+] + [OH^-]}{[POM]} \quad (3)$$

where $[H^+] = 10^{pH}$, $[OH^-] = 10^{pH-pK_w}$ and K_w = the ionic product of water, $[Ca]$ is the concentration of initial acidity (i.e. protons already dissociated at the beginning of the titration and the known initial concentration of added HClO₄), V and $[Cb]$ are respectively the volume (l) and the concentration (eq l⁻¹) of the base added; Vo is the initial volume and $[POM]$ is the concentration of POM expressed in g l⁻¹ introduced in the titration cell.

The potentiometric titrations experiments were modelled using FITEQL 4.0 optimization routine (Herbelin & Westall, 1999) to determine the intrinsic deprotonation constants, surface site densities and Cu binding affinities. Possible electrostatic behaviour of POM particles was not taken into account as an option in the model because of lack of data such as specific surface area or capacitance of Helmholtz layer.

Fitting of experimental titration curves of POM was tested with the hypothesis of either one or two acid-base exchange sites, based on the presence of carboxyl and/or phenol groups on particulate organic matter in soil (Guo *et al.*, 2006). Optimization of several

parameters was made during the fitting procedure: sites concentration and apparent conditional constants. The apparent conditional dissociation constants were expressed as:



Where S_n is a surface reactive functional group and $n=1$ or 2 .

Titration of POM in the presence of Cu

A solution containing a known quantity of POM and various amounts of a stock solution of $Cu(ClO_4)_2$ (Strem Chemicals) was titrated with $NaOH$ $5 \cdot 10^{-2}$ M at constant ionic strength of 10^{-1} M $NaClO_4$. The Cu concentrations in the cell were fixed in order to have a ratio: ligand content/Cu content = 8, where the ligand content was expressed as the total amount of reactive titratable functional group for a POM fraction (thus $Cu = 7.4 \cdot 10^{-5} \pm 0.7$ M for POM 200-2000 μm or $5.8 \cdot 10^{-5} \pm 1.2$ M Cu for POM 50-200 μm). The free Cu concentration was measured during the titration with a Cu(II) ion-selective electrode (ISECu25, Radiometer) coupled to a reference electrode fitted with a salt-bridge junction (XR 110 and AL 120, Radiometer). Before experiment, these electrodes were calibrated with stock solution of Cu (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M) in 0.1 M $NaClO_4$.

To determine the Cu binding affinity constants from the experimental curves in the presence of Cu, we considered free Cu and hydrolysis products of Cu forming monodentate complexes with POM and we introduced acid base properties previously determined (i.e. sites concentration and apparent conditional constant). The apparent stability constants of complexe formation between POM and Cu were expressed as follow:



POM saturation with Cu

About ca 0.1g of dry POM was mixed with 40 ml of $NaClO_4$ 10^{-1} M. Copper additions were made each 5 minutes using stock solution (10^{-1} M or 10^{-3} M Cu). pH of the solution was maintained constant at 6 with small additions of $NaOH$ (10^{-1} M) or $HClO_4$ (10^{-1} M). The free Cu concentration was measured during the titration with a Cu(II) ion-selective electrode (ISECu25, Radiometer) coupled to a reference electrode fitted with a salt-bridge junction (XR 110 and AL 120, Radiometer) calibrated as before.

The quantity of sorbed Cu was determined by difference between total Cu in solution and free Cu. In order to neglect Cu hydrolysis in the Cu adsorption POM experiments, we stopped for a free Cu concentration in solution of $6 \cdot 10^{-4}$ M. For such a free Cu concentration of $6 \cdot 10^{-4}$ M Cu and pH 6, thermodynamic calculations indicated that 97.5 % of Cu in solution is in the free form. The Cu saturation experiments were made in triplicates for POM size fractions 200-2000 μ m of the three samples NA, S and CC.

Statistical

Significant differences ($P < 0.05$) between data were determined using XLstat (Microsoft) with Student's *t*-test on the means of two or three replicates.

Results and Discussion

POM characteristics

General aspects of the POM fractions extracted from the three soil samples and observed by optical microscopy are presented in Figure 1. For both POM size fractions, continuous size heterogeneity was observed due to biodegradation processes in soils. The 200-2000- μ m size fractions still showed recognizable plant structures ascribed to fragments of vine-shoot (Figure 1a), straw (Figure 1c), and very dark colored conifer compost residues (Figure 1e). But in the 50-200- μ m size fractions, general aspect of POM fragments were more alike when comparing the three soils (Figure 1b,d,f). Plant cell structures were still visible but the affiliation with their organic input was difficult to establish at this scale of study.

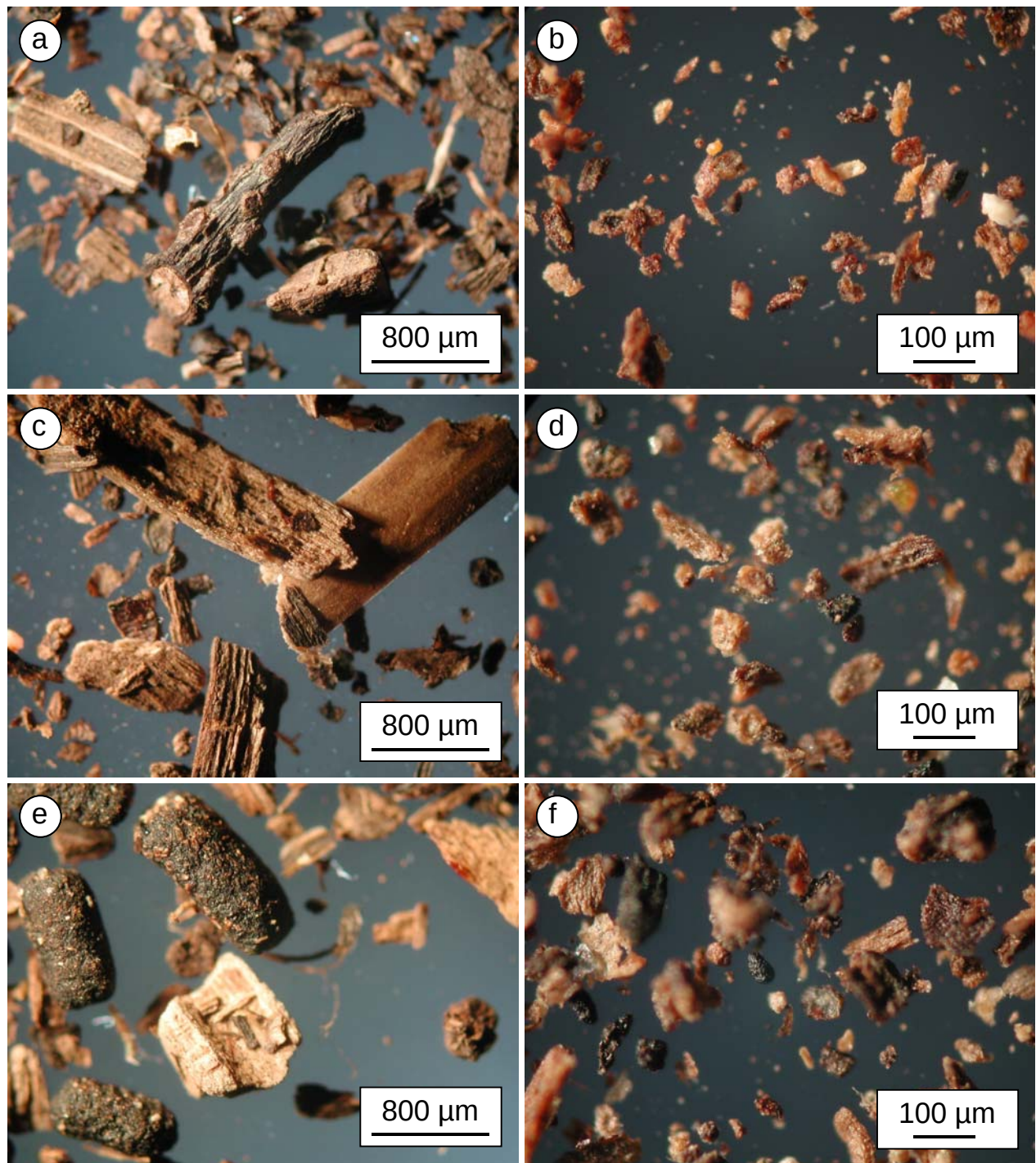


Figure 1 Microscopic observations of extracted POM: 200-2000- μm POM size fractions (left) extracted from NA (a), S (c), CC (e) and 50-200- μm POM size fractions (right) extracted from NA (b), S (d), CC(f) samples. (NA = non-amended soil, S = soil amended with straw and CC = soil amended with conifer compost).

POM characteristics are presented in Table 1. Total POM fractions 50-2000 μm represented a small part of the mass of soil, 1.3 % of the mass of the NA soil, 1.8 % for S, but reached 6.1 % for CC. However total POM fractions represent a large reservoir of organic carbon in soil: about 25 % for NA and S and 47 % for CC. Similar findings were noted by Besnard et al. (2001) in calcareous vineyard soils amended with various organic amendments. These authors observed that total POM accounted for 20-55% of organic carbon. Furthermore, Christensen (2001) reported that uncomplexed organic matter in soil can account for 10-40 % of organic carbon in surface horizons depending on several factors such as land use, vegetation type, climate, soil type or faunal activity.

	Mass (g kg ⁻¹ soil)	Organic C		C/N	Cu	
		(g kg ⁻¹ POM)	(g kg ⁻¹ soil)		(mg kg ⁻¹ POM)	(mg kg ⁻¹ soil)
NA						
POM 200-2000 μm	4.5 $\pm$ 0.3	358.0 $\pm$ 7.7	1.6 $\pm$ 0.1	24.0 $\pm$ 0.8	395.1 $\pm$ 13.5	1.8 $\pm$ 0.1
POM 50-200 μm	7.5 $\pm$ 0.3	189.9 $\pm$ 8.2	1.5 $\pm$ 0.1	17.7 $\pm$ 0.5	486.7 $\pm$ 9.6	3.7 $\pm$ 0.2
<i>Bulk soil</i>			12.3 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.3		62.4 $\pm$ 0.4
S						
POM 200-2000 μm	5.8 $\pm$ 1.1	341.0 $\pm$ 12.5	2.0 $\pm$ 0.4	24.4 $\pm$ 2.1	281.3 $\pm$ 26.3	1.6 $\pm$ 0.2
POM 50-200 μm	12.6 $\pm$ 0.7	204.0 $\pm$ 3.9	2.5 $\pm$ 0.2	17.5 $\pm$ 0.2	369.0 $\pm$ 10.7	4.5 $\pm$ 0.1
<i>Bulk soil</i>			17.5 $\pm$ 1.50	13.1 $\pm$ 0.2		61.1 $\pm$ 0.6
CC						
POM 200-2000 μm	31.8 $\pm$ 6.1	360.3 $\pm$ 5.7	11.5 $\pm$ 1.6	25.5 $\pm$ 0.6	114.8 $\pm$ 7.3	3.6 $\pm$ 0.4
POM 50-200 μm	29.1 $\pm$ 2.0	296.7 $\pm$ 8.5	8.7 $\pm$ 0.7	20.4 $\pm$ 0.3	203.4 $\pm$ 4.4	5.9 $\pm$ 0.4
<i>Bulk soil</i>			43.0 $\pm$ 3.1	17.5 $\pm$ 0.5		58.8 $\pm$ 0.1

Table 1 Chemical characteristics of POM extracted from the three soil samples (NA = non-amended soil, S = soil amended with straw and CC= soil amended with conifer compost) (mean $\pm$ standard error)

Organic carbon contents of POM and C/N values decreased with the decreasing POM size in agreement with findings of Balabane and van Oort (2002) and Besnard et al. (2001) indicating that the finest POM were more biodegraded. The 200-2000- μm POM size fractions of the three samples showed comparable organic carbon contents and C/N values ($p > 0.05$). Thus, although the morphology of 200-2000- μm POM fractions was found different (Figure 4.6), no biogeochemical signature of the exogenous organic inputs was observed for these fractions. For the 50-200- μm POM size fraction, the organic carbon contents and C/N values measured for CC differed significantly from those of NA and S, but little difference was observed for the morphological aspects of these fine POM particles (Figure 1). Fortuna et al. (2003) found that addition of compost to a sandy loam cultivated soil significantly increased POM-C contents.

All three soil samples showed comparable Cu contents of about 60 mg kg⁻¹ of soil (Table 1), but Cu contents in the extracted POM fractions were found 2-8 higher than for the bulk samples. For all three soils, a higher Cu content was observed in the finest POM fraction (table 1). Accumulation and increasing metal enrichment with decreasing POM size was also observed for other metals and for different types of pollution (Florez-Vélez et al., 1996; Lamy et al., 2002; Balabane et al., 1999; Besnard et al., 2001; Balabane and van Oort, 2002). In our samples, lowest Cu contents in POM were observed for the S and CC soils. However, in these soils the contribution of total POM pool to the total Cu content of bulk soil was 9.9% for S and 16.1% for CC, higher than for the NA soil (8.8%) (Table 1). Thus, introduction of exogenous organic matter in these soils induced a change in the initial copper distribution towards the new introduced organic debris. This change was larger for compost than straw amendment, and clearly visible in the finest POM fractions. These results suggest that incorporation of exogenous organic material into various particle-size fractions modifies copper speciation. In the amended soils, the lower Cu content measured in POM may be due to a dilution effect. Besnard et al. (2001) also observed low Cu content in POM extracted from a soil amended with oak bark. They concluded either to a low reactivity of the oak-bark towards Cu or to a dilution effect due to high mass percentage of the POM fraction in this soil.

Buffer capacity of POM

Example of typical titration curves for the 200-2000 and the 50-200- μ m -POM size fractions are given in Figure 2a, showing the reproducibility of titrations. An example of derived calculated charge curves (Q) is given Figure 2b. The charge before pH 4 should be tend to 0 but in Figure 2b, Q increases before pH 4. Such a behaviour could be due to uncertainties of the pH electrodes classically observed at low pH (Guiné *et al.*, 2007). At pH>8, Q decreases rapidly (Figure 2b) and appears unusual. This may be due to a proton release related to solubilisation of organic carbon of POM. Therefore, modelling of titration curves were restricted between pH 4 and 8.

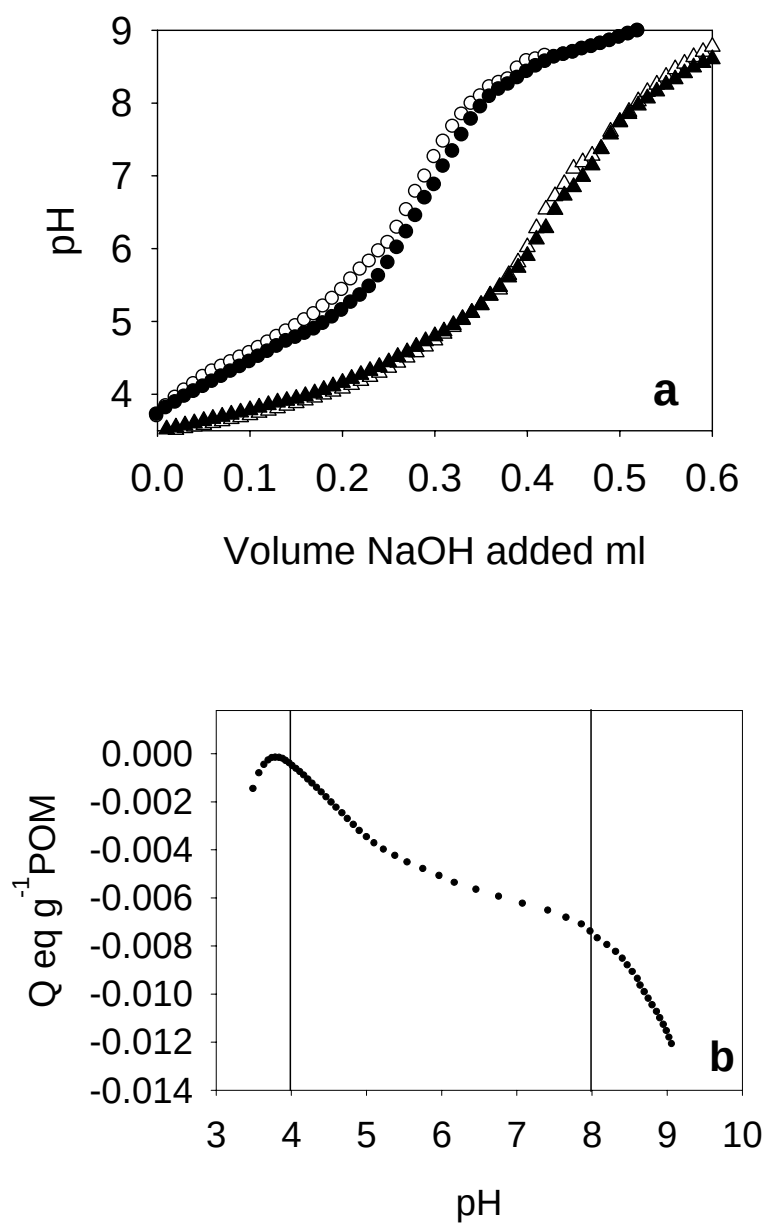


Figure 2 (a) Potentiometric pH vs V titration curves of 200-2000 μm ($\circ$ repetition 1, $\bullet$ repetition 2) and 50-200 μm ($\triangle$ repetition 1, $\blacktriangle$ repetition 2) sized-POM extracted from soil CC, amended with conifer compost. (b) Example of calculated Q charge curves from potentiometric data of POM 200-2000 μm extracted from soil S, amended with straw.

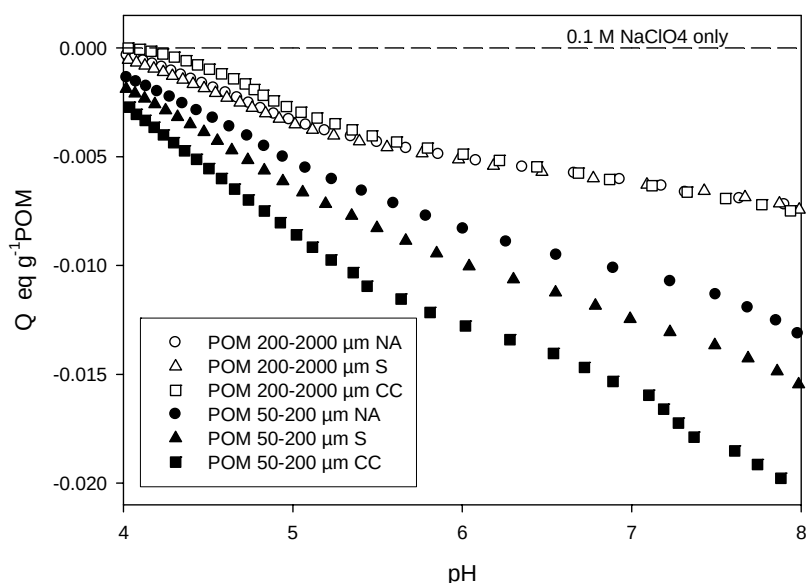


Figure 3 Calculated Q charge curves from potentiometric titration of 200-2000 μm ($\circ$, $\square$, $\triangle$) and 50-200 μm ($\bullet$, $\blacksquare$, $\blacktriangle$) sized-POM extracted from the three soil samples. NA: non-amended, S: amended with straw and CC: amended with conifer compost.

Figure 3 gives Q charge curves vs pH calculated from potentiometric data of each POM sample, and shows that each POM fraction provided a buffer capacity to the solution between pH 4 and 8 compared to a solution without POM. Titration curves were rather similar in shape between size-fractions but buffer capacities were found higher for the finest POM fractions. Furthermore, when normalized to the grams of titrated POM, the coarser POM fractions from the three soils showed comparable buffer capacities. On the contrary, the finest POM fractions exhibited significantly different buffer capacities, the highest observed for the fine POM fraction from CC (Figure 3). Within our experimental conditions we fitted the potentiometric data using either a one-site or a two-site model. An example of such calculations is given in Figure 4. Whatever the POM fraction, the one-site model did not account for the entire buffer capacity titrated between pH 4 and 8: for $\text{pH} > 5.8$, nearly all sites were deprotonated and no further buffer was possible. The two-site model, however, provided a good fit to the experimental data, indicating that at least two types of reactive functional groups were present and active on POM surfaces between pH 4 and 8.

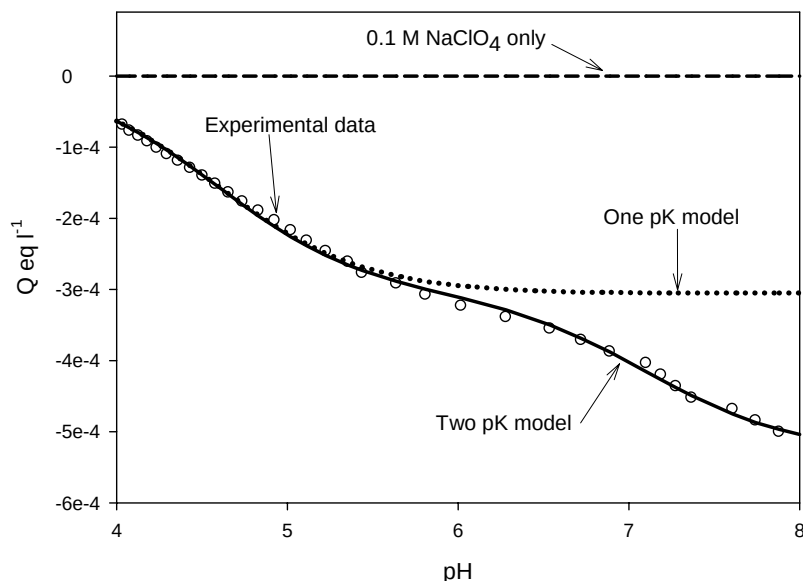


Figure 4 Results from FITEQL 4.0 modelling of potentiometric titration data for one titration performed using POM 50-200 μm extracted from soil amended with conifer compost. Also shown is the titration curve for the electrolyte in the absence of POM. Results of modelling are depicted for the best-fitting with the hypothesis of the presence of one or two-sites.

	$\text{pK}_{\text{S1,H}}$	$\text{pK}_{\text{S2,H}}$	$\frac{[\text{S}_1]}{[\text{S}_2]}$ $10^{-4} \text{ eq g}^{-1} \text{ POM}$	
POM-NA				
200-2000 μm	$4.86 \pm 0.18\text{a}^1$	$7.28 \pm 0.18\text{a}$	$1.37 \pm 0.28\text{a}$	$0.69 \pm 0.14\text{a}$
50-200 μm	$4.68 \pm 0.23\text{a}$	$6.90 \pm 0.25\text{a}$	$2.48 \pm 0.18\text{b}$	$1.56 \pm 0.13\text{b}$
POM-S				
200-2000 μm	$4.81 \pm 0.13\text{a}$	$7.46 \pm 0.24\text{a}$	$1.69 \pm 0.28\text{a}$	$0.76 \pm 0.13\text{a}$
50-200 μm	$4.71 \pm 0.12\text{a}$	$6.99 \pm 0.18\text{b}$	$2.85 \pm 0.12\text{b}$	$1.95 \pm 0.15\text{b}$
POM-CC				
200-2000 μm	$5.00 \pm 0.14\text{a}$	$7.38 \pm 0.15\text{a}$	$1.43 \pm 0.25\text{a}$	$0.76 \pm 0.12\text{a}$
50-200 μm	$4.57 \pm 0.16\text{b}$	$7.02 \pm 0.08\text{b}$	$3.83 \pm 0.31\text{b}$	$2.44 \pm 0.32\text{b}$

¹Different letters within columns and for one POM sample indicate significance at $P < 0.05$

Table 2 Deprotonation constants and site densities as calculated by FITEQL. (mean $\pm$ standard error)

The deprotonation constants and surface-site densities calculated after fitting titration data between pH 4 and 8 are compiled in Table 2. The buffer capacity can be linked to the presence of carboxyl and phenolic groups as highlighted by Guo *et al.* (2006) by Infra Red spectrometry of POM, such sites being created after degradation of soil organic residues (Stevenson, 1982 ; Kelleher *et al.*, 2006). But our $\text{pK}_{\text{Sn,H}}$ values are also compatible with the

presence of microbial adhesion on POM surface (i.e. bacteria and fungi) shown by Chenu & Stotzky, 2000, such micro organisms exhibiting acid-base properties with carboxyl, phosphate and phenolic groups (Fein *et al.*, 1997 ; Guiné *et al.*, 2006).

For a given POM size fraction, $pK_{S1,H}$, or $pK_{S2,H}$ values did not differ significantly between NA, S, and CC (Table 2). These results indicate that organic inputs had only little influence on deprotonation constants for a given POM size fraction. But when comparing POM size fractions within a soil sample, values of deprotonation constant ($pK_{S1,H}$, and/or $pK_{S2,H}$) were found significantly different between the 50-200- μm and 200-2000- μm POM size fractions for the two amended soils, whereas no significant difference was observed for the NA soil. This absence of size effect on the buffer capacity for NA soil suggested that similar kinds of functional reactive groups were present both in the 50-200 and 200-2000 μm POM fractions. However, consecutive to the introduction of new organic residues, such a size effect on the buffer capacity becomes visible. Considering the high turnover rates mentioned for coarser organic residues (Balesdent, 1996), the chemical signature (e.g. $pK_{Sn,H}$) related to different organic amendments will mark more time lastingly the finer POM fractions. In accordance with this, no significant differences were observed between NA, S, and CC for the surface site densities of coarser POM (Table 2). But within each soil, the site density was always higher for the 50-200- μm than for the 200-2000- μm POM size fraction. This last result corroborates the idea that decreasing POM size generates functional reactive sites.

POM-Cu interaction

Cu saturation curves at constant pH of 6 for POM 200-2000 μm are given in Figure 5a. Even for adsorbed Cu larger than 10 000 mg kg^{-1} of POM, saturation was not attained. This Cu content was 25-90 times higher than the initial Cu content of POM and showed that POM can adsorb high quantity of Cu. Quantity of Cu adsorbed was not significantly different between NA, S and CC, suggesting that the type of organic inputs have no influence on Cu sorption of coarse POM. From these data, an example of calculated curve using the Langmuir double surface equation (Fitch & Stevenson, 1984) is given in Figure 5b and shows the presence of two copper-reactive sites, depending on the Cu concentration in solution i.e. strong and weak binding sites.

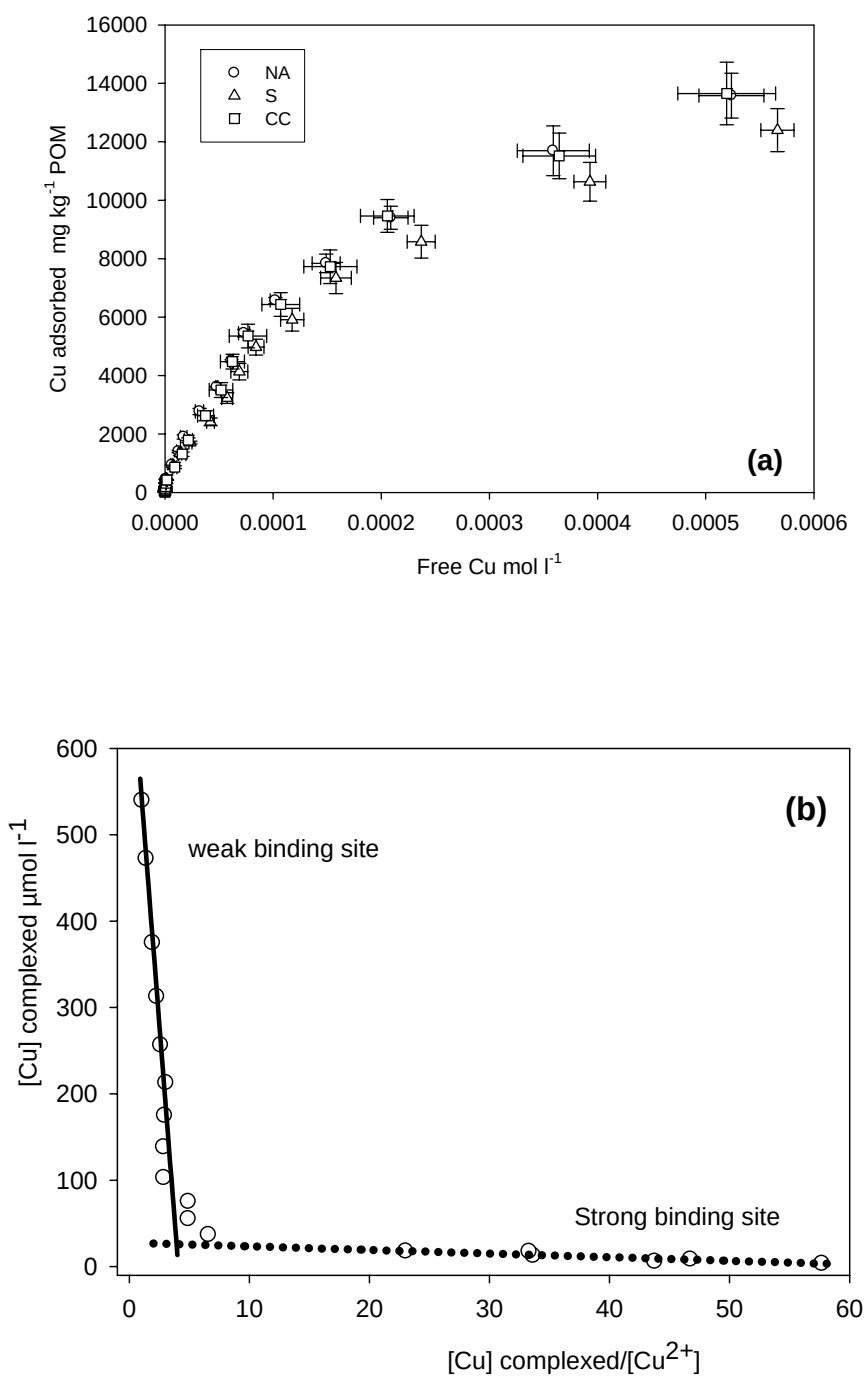


Figure 5 (a) Cu saturation curves of POM 200-200 μm extracted from NA, S et CC (NA = non-amended soil, S = soil amended with straw and CC = soil amended with conifer compost) (b) Example of calculated curve using the Langmuir double surface equation from Cu saturation data for POM 200-2000 μm extracted from S

Titration curves of 200-2000- μm or 50-200- μm POM size fractions in the absence and presence of Cu are shown Figure 6 for the S soil. The other POM samples showed a similar behaviour. The ability of the POM size fractions to complex Cu is expressed as soon as pH 4 by the proton release due to Cu-complexation. The interactions of Cu with POM during the alkali titration correspond to a competition between the metal ion and protons for complexing sites on the ligand.

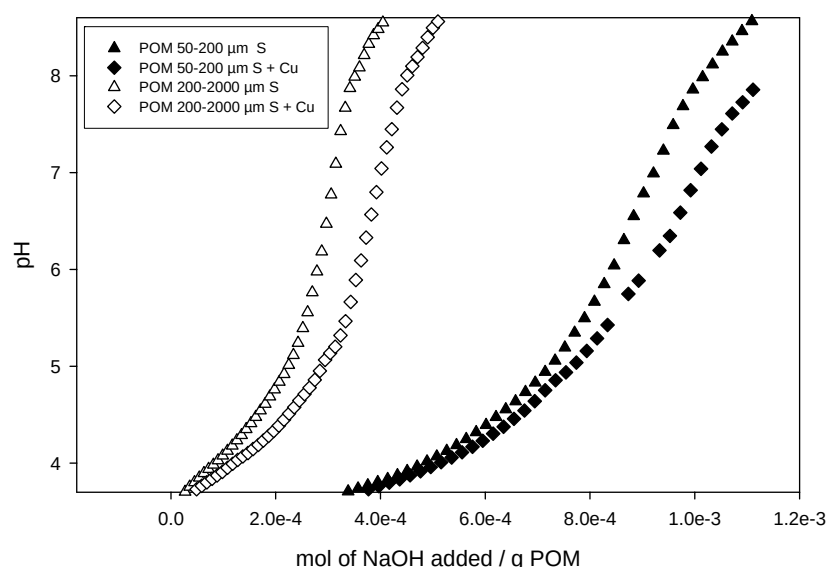


Figure 6 Potentiometric titration data in the absence and presence of Cu (Ratio R: ligand/Cu = 8) of 50-200 μm ($\triangle$, $\diamond$) and 200-2000 μm ($\blacktriangle$, $\blacklozenge$) sized-POM extracted from soil S amended with straw.

Analysis of the metal distribution on POM fragments have been also performed using μSXRF on impregnated undisturbed soil thin sections, in different metal contaminated arable soils (Lamy *et al.*, 2005; Labanowski *et al.*, 2007) or vineyard soils (Hinsinger *et al.*, 2005). These chemical mappings of heavy metal distribution on organic debris revealed rather heterogeneous distribution patterns for Zn and Cu on POM. These results point to a surface fixation of metals and were in accordance with the findings of our work.

Results from FITEQL calculations from potentiometric data with different hypothesis of complexes formation are presented in Figure 7 for NA. Fits for CC and S were similar. The observed decrease of free Cu contents between pH 4 and 8 was enforced by the presence of POM, indicating an increased adsorption of Cu on POM surfaces with an increasing pH. For all titrations between pH 4 and 8 with POM in presence of Cu, the best fit was obtained with the hypothesis of the formation of two complexes involving the first type of site: $\text{S}_1\text{-Cu}^+$ and

S_1 -CuOH. In our experimental conditions, the hypothesis of Cu complexes with the other type of site S_2 did not produce the best fit (Figure 7). Nevertheless, Cu-complexes with S_2 cannot be excluded under different experimental conditions. Indeed in our study, only a low amount of Cu was added favouring complexation by S_1 type sites, the stronger ones as suggested Figure 5b, while other ligand/Cu ratios could lead to formation of other type of complexes.

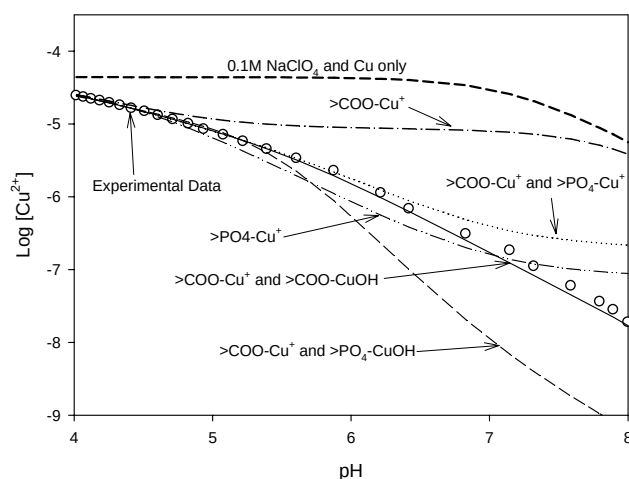


Figure 7 Results from FITEQL 4.0 modelling of potentiometric titration data in the presence of copper ($R=8$) for one titration performed using POM 50-200 μm extracted from NA, the non-amended soil. Results of modelling are depicted for different complexes hypothesis.

Table 3 shows the apparent stability constants for Cu- complexes with the two POM size fractions computed by FITEQL. Whatever the size of POM or organic amendments, no significant differences were observed between the stability constants. Hence, reactivity of soil POM towards Cu seemed to be unaffected by the nature of the organic inputs and no size effect could be assessed. This result suggested that whatever the size of the POM fraction, the same kind of functional groups were metal-reactive. Consequently, the recurrently observed larger Cu content of the 50-200- μm POM size fractions with respect to the 200-2000 μm fraction (Table 1) is explained by the larger surface site content of the 50-200 μm fraction (Table 2) rather than by a different Cu affinity (Table 3). To our knowledge, these results on the quantification of complexing capacities of soil POM fractions are new in literature. When comparing the obtained values with literature data available for other reactive organic fractions with well-known high Cu-affinities (e.g. for humic substances), they were found in the same range (Lamy *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1999). POM can thus be considered as playing an important role of metal sink in soils, mainly due to their chemical acido-basic and complexing properties. One of the remaining questions, item for forthcoming work, is the role of POM as a source for metals in soils.

	POM 50-200 μm		POM 200-2000 μm	
	Log K			
	$>\text{COO}-\text{Cu}^+$	$>\text{COO}-\text{CuOH}$	$>\text{COO}-\text{Cu}^+$	$>\text{COO}-\text{CuOH}$
NA	$4.45 \pm 0.22\text{a}^1$	$6.63 \pm 0.33\text{a}$	$4.61 \pm 0.18\text{a}$	$6.71 \pm 0.28\text{a}$
S	$4.35 \pm 0.19\text{a}$	$6.79 \pm 0.23\text{a}$	$4.49 \pm 0.19\text{a}$	$6.42 \pm 0.30\text{a}$
CC	$4.29 \pm 0.21\text{a}$	$6.51 \pm 0.29\text{a}$	$4.61 \pm 0.15\text{a}$	$6.34 \pm 0.25\text{a}$

¹Different letters within columns indicate significance at $P < 0.05$

Table 3 Apparent stability constants of Cu-POM complexes computed by FITEQL. (mean $\pm$ standard error)

Conclusions

Potentiometric titrations highlighted the buffer capacity and Cu affinity of soil extracted POM fractions. Within our experimental conditions of titrations, between pH 4 and 8, this buffer capacity may be linked to the presence of at least two reactive sites whose characteristics were compared between POM size fractions extracted from soils amended with various organic inputs. Surface site density (expressed per gram of POM) increased with decreasing POM size, corroborating the fact that biodegradation of POM leads to creation of new reactive surface sites.

Laboratory titrations of POM in the presence of Cu indicated a surface reactivity of POM towards Cu. This reactivity was found independent of the size of the POM fraction. The in situ higher Cu contents of the finer POM fractions were ascribed to a higher surface site density of these fractions in relation with the biodegradation of POM.

Organic amendments during 15 years modified the chemical acido-basic characteristics of POM, visible only for the finer POM fractions, and especially in the case of conifer compost amendments. In both amended and non-amended soils, the affinity of Cu for POM fractions was found comparable in our experimental conditions and rather high when comparing data with those obtained on other organic fractions. This result underlines the role of metal sink of POM in soils.

Acknowledgments

This work was partly supported by a PN/ACI “ECCO” project in the frame of the Concerted Action ECODYN. We acknowledge S. Breuil for technical help, the Région Ile de France and INRA for a grant for J. Sebastia.

References

- Balabane, M., Faivre, D., van Oort, F. & Dahmani-Muller, H. 1999. Mutual effects of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metallophyte grassland. *Environmental Pollution*, **105**, 45-54.
- Balabane, M. & van Oort, F. 2002. Metal enrichment of particulate organic matter in arable soils with low metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 1513-1516.
- Balesdent, J. 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *European Journal of Soil Science*, **47**, 485-493.
- Balesdent, J., Pétraud, J.P. & Feller, C. 1991. Some effects of ultrasonic vibrations on size-distribution of soil organic matter. *Science du Sol*, **29**, 95-106.
- Balesdent, J., Besnard, E., Arrouays, D & Chenu, C. 1998. The dynamics of carbon in particle-size fractions of soil in a forest-cultivation sequence. *Plant and Soil*, **201**, 49-57.
- Besnard, E., Chenu, C. Balesdent, J., Puget, P. & Arrouays, D. 1996. Fate of particulate organic matter in soil aggregates during cultivation. *European Journal of Soil Science*, **47**, 495-503.
- Besnard, E., Chenu, C. & Robert, M. 2001. Influence of organic amendments on Cu distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution*, **112**, 329-337.
- Boucher, U., Balabane, M., Lamy, I. & Cambier, P. 2005a. Decomposition in soil microcosms of leaves of the metallophyte *Arabidopsis Halleri*: effect of leaf-associated heavy metals on biodegradation. *Environmental Pollution*, **135**, 187-194.
- Boucher, U., Lamy, I., Cambier, P. & Balabane, M., 2005b. Decomposition of leaves of the metallophyte *Arabidopsis halleri* in soil microcosms: Fate of Zn and Cd from plant residues. *Environmental Pollution*, **135**: 323-332.
- Brown, G.K., MacCarthy, P. & Leenheer J.A. 1999. Simultaneous determination of Ca, Cu, Ni, Zn and Cd binding strengths with fulvic acid fractions by Schubert's method. *Analytica Chimica Acta*, **402**, 169-181.
- Chenu, C. & Stotzky, G. 2000. Interactions between microorganisms and soil particles: an overview. In: *Interactions between Soil Particles and Microorganisms and Their Impact on the Terrestrial Environment* (eds P.M. Huang, J.-M. Bollag & N. Senesi), pp. 3-40. Wiley and Sons, New York.

- Christensen, B.T. 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science*, **52**, 345-353.
- Ducaroir, J. & Lamy, I. 1995. Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *The Analyst*, **120**, 741-745.
- FAO-Unesco-ISRIC. 1989. *Revised legend of the FAO-Unesco soil map of the world*. World Resources Report n° 60. FAO, Rome.
- Fein, J.B., Daughney, C.J., Yee, N. & Davis, T.A. 1997. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 3319-3328.
- Fitch, A. & Steveson, F.J. 1984. Comparison of models for determining stability constants of metal complexes with humic substances. *Soil Science Society of America Journal*, **48**, 1044-1050.
- Florez-Vélez, L.M., Ducaroir, J., Jaunet, A.M. & Robert, M. 1996. Study of the distribution of Cu in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science*, **47**, 523-532.
- Fortuna, A., Harwood, R.R. & Paul, A. 2003. The effects of compost and crop rotations on carbon turnover and the particulate organic matter fraction. *Soil Science*, **168**, 434-444.
- Gregorich, E.G. & Janzen, H.H. 1996. Storage of soil carbon in the light fraction and macroorganic matter. In: *Structure and organic matter storage in soils* (eds M.R Carter & B.A. Stewart), pp. 167–190. Lewis Publ., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gregorich, E.G., Beare, M.H., McKim, U.F. & Skjemstad, J.O. 2006. Chemical and biological characteristics of physically uncomplexed organic matter. *Soil Science Society of American Journal*, **70**, 975-985.
- Guiné, V., Spadini, L., Sarret, G., Muris, M., Delolme, C., Gaudet, J.P. & Martins, J.M.F. 2006. Zinc sorption to three gram-negative bacteria: combined titration, modelling, and EXAFS study. *Environmental Science & Technology*, **40**, 1806-1813.
- Guiné, V., Martins, J.M.F., Causse, B., Durand, A., Gaudet, J.P. & Spadini, L. 2007. Effect of cultivation and experimental conditions on the surface reactivity of the metal-resistant bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 to protons, cadmium and zinc. *Chemical Geology*, **236**, 266-280.

- Guo, X., Zhang, S., Shan, X.-Q., Luo, L., Zhu, Y.-G., Liu, T., Xie, Y.-N. & Gault, A. 2006. Characterization of Pb, Cu and Cd adsorption on particulate organic matter in soil. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **25**, 2366-2373.
- Herbelin, A. & Westall, J. 1999. FITEQL a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data version 4.0.
- Hinsinger, P., Ambrosi, J.P., Andrieux, P., Casellas, C., Chaignon, V., Elsass, F., Gilbin, R., Lamy, I., Mousain, D., van Oort, F. & Voltz, M. 2005. Spéciation, biodisponibilité et toxicité du cuivre dans les sols et les sédiments d'un bassin versant viticole en Languedoc-Rousillon. In: *Programme national d'écotoxicologie : avancées récentes de la recherche*. pp. 11-47. La Documentation française, Paris.
- Kelleher, B.P., Simpson, M.J. & Simpson, A.J. 2006. Assessing the fate and transformation of plant residues in the terrestrial environment using HR-MAS NMR spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**, 4080-4094.
- Labanowski, J., Sebastia, J., Foy, E., Jongmans, T., Lamy, I. & van Oort, F. 2007. Fate of metal-associated POM in a soil under arable land use contaminated by metallurgical fallout (northern France). *Environmental pollution*, in press, doi:10.1016/j.envpol.2006.12.019.
- Lamy, I., Cromer, M. & Scharff, J.P. 1988. Comparative study of copper(II) interactions with monomeric ligands and synthetic or natural organic materials from potentiometric data. *Analytica Chimica Acta*, **212**, 105-122.
- Lamy, I., Ducaroir, J., Sterckeman, T. & Douay, F. 2002. Réactivité des matières organiques. In: *Un point sur...Les Eléments métalliques dans les sols - Approches fonctionnelles et spatiales*, (eds. D. Baize & M. Tercé). pp. 269-282. INRA-Éditions, Versailles, France.
- Lamy, I., Sterckeman, T., Cambier, P., Jaffrezic, A., van Oort, F., Baize, D., Chaussod, R., Denaix, L. & Cornu, S. 2005. Présence et impacts des éléments en trace dans les sols. In: *Sols et Environnement* (eds M.C. Girard, C. Walter, J.C. Rémy, J. Berthelin & J.L. Morel) pp. 469-490, Dunod, Paris.
- Milne, J.M., Kinniburgh, D.G., van Riemsdijk, D.G. & Tipping, E. 2003. Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion by humic substances. *Environmental Science and Technology*, **37**, 958-971.
- Stevenson, F.G. 1982. Reactive functional groups of humic substances. In: *Humus chemistry genesis, composition, reactions* (ed F.G. Stevenson), pp. 221-243, Wiley, New York.

- Wander, M. 2004. Soil organic matter fractions and their relevance to soil function. In: *Soil organic matter in sustainable agriculture* (eds F.Magdoff & R.W. Ray), pp. 67-102. CRC Press Inc., Boca Raton, USA.
- Whalen, J.K., Bottomley, P.J., Myrold, D.D. 2000. Carbon and nitrogen mineralization from light- and heavy- fraction additions to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 1345-1352.

Chapitre IV.

Réactivité des bactéries du sol

Chapitre IV. Réactivité des bactéries du sol

Parmi la fraction vivante des MOS, les micro-organismes sont les plus nombreux. Ces micro-organismes semblent être une fraction clé dans le devenir des métaux dans les sols. D'une part, ils affectent la mobilité des métaux car ils participent à la dégradation des MOS, à la production et au relargage de substances organiques. Ils affectent leur mobilité indirectement car ils influencent aussi le pH et le potentiel redox (Ledin, 2000). D'autre part, bien que les micro-organismes d'un sol excèdent rarement quelque pourcent de la masse et du carbone total du sol, ils peuvent aussi contribuer à une accumulation significativement des métaux dans les sols, comme l'ont reporté Ledin (2000) et Ledin et al. (1996).

Dans ce travail, la réactivité des micro-organismes a été étudiée à travers celle des bactéries. La réactivité de la fraction bactérienne du sol, fraction organique composite -constituée d'une large variété de souches bactériennes à différentes phases de croissance à un temps donné- a été étudiée dans sa globalité et non à l'aide d'une souche cultivée en laboratoire.

De ce fait, il fallait utiliser un moyen d'extraire un matériau organique correspondant à cette fraction. Ce matériau extrait devait pouvoir être ensuite étudié de façon similaire aux fractions organiques étudiées lors de ce travail. Nous avons donc choisi un protocole original qui consiste en une extraction densimétrique d'un pool bactérien vivant à partir du sol. Nous avons ensuite étudié la réactivité des bactéries extraites de S et CC qui a été quantifiée par titrages potentiométriques modélisés par FITEQL. Des extractions ont été aussi effectuées pour NA mais les quantités trop faibles de bactéries récupérées lors de ces extractions n'ont pas permis d'obtenir une quantité suffisante de matériau pour étudier leur réactivité.

1. Extraction des bactéries

L'extraction d'un pool bactérien du sol est difficile due à la présence de particules minérales. Les différentes approches d'extraction cellulaire développées consistent dans un premier temps à une étape de dispersion (mixage, agitation ou ultrasons) puis d'une étape de centrifugation (Lindahl, 1996; Lindahl et Bakken, 1995). L'étape de centrifugation, en présence d'un gradient de densité (solution de Nycodenz), permet la séparation des cellules bactériennes du reste du sol (Lindahl et Bakken, 1995). Nous avons choisi ce type d'approche qui a l'avantage d'être rapide et d'obtenir un pool bactérien sans modification de l'intégrité cellulaire, ni de leur activité (Priemé et al., 1996; Mayr et al., 1999; Lindhal et Olsen, 1996; Courtois et al., 2001).

Dix jours avant l'extraction du pool bactérien, les sols S et CC ont été incubés dans des bocaux fermés, à l'obscurité et à 20°C. L'humidité des sols incubés a été ajustée et maintenue à 80 % de la capacité au champ. Pour extraire les bactéries des sols S et CC, nous avons suivi le protocole optimisé et décrit par Maron et al. (2005) et Courtois et al. (2004). Brièvement, 10 g de sol équivalent sec ont été dispersés dans 50 ml d'une solution saline (NaCl 0.8% (poids/volume)) avec un Waring Blender. Avant centrifugation, 25 ml de la solution obtenue est déposé au dessus d'une solution de Nicodenz (0.8 g ml⁻¹). Le Nicodenz est un composé soluble dans l'eau, non toxique, non ionique et très résistant à la biodégradation. Après centrifugation, on récupère à la pipette un anneau bactérien visible entre le Nicodenz et la solution du sol qui est ensuite rincé et récupéré dans NaClO₄ 0,1M.

Nous avons ainsi obtenu, deux solutions mères de bactéries contenant 135.8 ± 7.3 et 74.7 ± 4.7 mg de bactéries par litre (définie par rapport à la masse après séchage à 105°C) pour le sol amendé par CC et S respectivement.

2. Titrage potentiométrique et modélisation

2.1 Titrages potentiométriques

Les propriétés acido-basiques du pool bactérien extrait du sol ont été déterminées à l'aide de titrages potentiométrique, avec le même mode opératoire décrit pour les MOP ou les AF. Les solutions titrées contenaient 30 ml de solution mère de bactérie et 1 ml d'une solution contenant des quantités connues d'HClO₄ et NaClO₄ de façon à obtenir une concentration avant titrage de 0.1M NaClO₄ et 10^{-3.5} M HClO₄.

La réactivité du pool bactérien extrait du sol vis-à-vis du cuivre a été déterminée à l'aide de titrages potentiométriques des solutions mères de bactéries en présence de cuivre.

Les titrages des solutions mères de bactéries en présence de cuivre ont été effectués en utilisant toujours le même protocole. Une solution de 31 ml composée de 30 ml d'une solution mère de bactéries, de $10^{-3.5}$ M HClO_4 , 0.1 M NaClO_4 et des quantités variables d'une solution mère de cuivre ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (Strem Chemicals)) est titrée. La concentration en cuivre avant le titrage est fixée de façon à avoir un rapport ligand (concentration en sites réactifs) sur concentration en cuivre de 4.

L'intégrité cellulaire des bactéries durant le titrage a été appréciée par la mesure du carbone organique en solution. Nous n'avons observé pas de lyse cellulaire durant les titrages (i.e. le carbone organique en solution variant de moins de 4 % entre le début et la fin des titrages).

2.1 Modélisation

Pour déterminer les propriétés acido-basiques et la réactivité vis-à-vis du cuivre des pools bactériens extraits, les titrages potentiométriques ont été ajustés à l'aide de FITEQL 4.0 (Herbelin et Westall, 1999). Les effets électrostatiques n'ont pas été considérés. FITEQL 4.0 a déjà été utilisé dans la littérature pour modéliser des titrages acido-basiques de bactéries (e.g. Hass et al., 2001; Daughney et al., 2001; Fein et al., 2005). D'après les travaux de Fien et al. (1997) sur des bactéries, 3 sites acido-basiques peuvent être discriminés :



R représente une bactérie sur laquelle est attachée des groupements fonctionnels. Les sites acides sont représentatifs des groupements fonctionnels carboxyle et phosphodiester, les sites neutres sont des groupements phosphomonoester et les sites basiques représentent des groupements hydroxyle et amine (Guiné et al. 2006). Les équations de masse correspondant aux réactions de déprotonation ci-dessus sont

$$K_{a1} = \frac{[\text{R-COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{R-COOH}]} \quad (4)$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{R-PO}_4^-][\text{H}^+]}{[\text{R-PO}_4\text{H}]} \quad (5)$$

$$K_{a3} = \frac{[\text{R-O}^-][\text{H}^+]}{[\text{R-OH}]} \quad (6)$$

Où K_a représente les constantes d'équilibre et les crochets représentent la concentration en sites de surface et en proton en mol par litre. Les données expérimentales sont ajustées en faisant varier et en optimisant simultanément les densités en sites de surfaces et les constantes d'équilibre.

D'autre part, pour modéliser les complexes entre le cuivre (Cu^{2+}) et les sites de surfaces déprotonés des bactéries, les complexes suivants ont été examinés,



En considérant la gamme de pH balayés lors des titrages, les sites de surface R-OH n'ont pas été considérés comme interagissant avec le cuivre. En plus, le cuivre peut s'hydrolyser, formant ainsi un produit d'hydrolyse chargé positivement (CuOH^+) pouvant former aussi des complexes avec les sites de surface des bactéries. :



Les équations de masse correspondant à ces équilibres sont les suivantes :

$$K_1 = \frac{[\text{R-COO-Cu}^+]}{[\text{R-COO}^-][\text{Cu}^{2+}]} \quad (9)$$

$$K_2 = \frac{[\text{R-PO}_4\text{-Cu}^+]}{[\text{R-PO}_4^-][\text{Cu}^{2+}]} \quad (10)$$

$$K_3 = \frac{[\text{R-COO-CuOH}]}{[\text{R-COO}^-][\text{CuOH}^+]} \quad (11)$$

$$K_4 = \frac{[\text{R-PO}_4\text{-CuOH}]}{[\text{R-PO}_4^-][\text{CuOH}^+]} \quad (12)$$

Dans la gamme de pH des titrages en présence de cuivre (entre pH 4 et 8,5), 3 espèces hydrolysées du cuivre sont concernées. Par conséquent, les données pour l'hydrolyse du cuivre ont été directement introduites dans FITEQL 4.0 en rentrant les constantes des équilibres suivants (Mineql data; Baes et Mesmer, 1986) :



3. Résultats

3.1. Propriétés acido-basiques des pools bactériens extraits

Le meilleur ajustement des données expérimentales a été obtenu en considérant trois types de sites de surface (Figure 4.1), ce qui est en accord avec les travaux de Fein et al. (1997) et Markai et al. (2003). Dans notre étude, les effets électrostatiques n'ont pas été considérés, ce qui est en fait une simplification des processus réels. Cependant, Fein et al. (2005) ont montré que les titrages acido-basiques de *Bacillus Subtilis* ne permettent pas de mettre en évidence les effets électrostatiques. De nombreux auteurs ont obtenus de très bons ajustements en négligeant les effets électrostatiques (e.g. Dittrich et Sibling, 2005; Markai et al., 2003; Fein et al., 1997; Guiné et al., 2006).

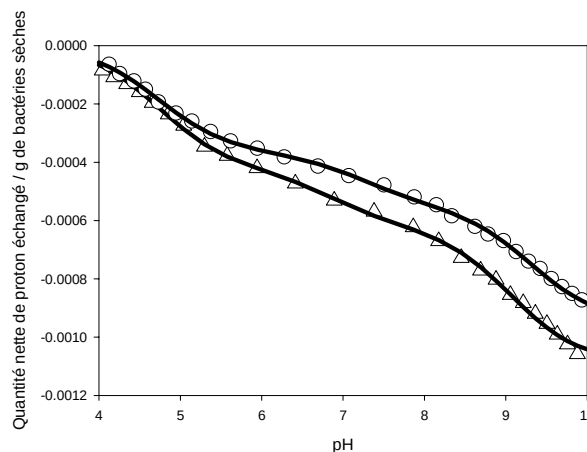


Figure 4.1 Données des titrages acido-basiques pour les bactéries extraites de S (cercles) et CC (triangles). Les lignes sont le résultat de l'ajustement effectué par FITEQL en considérant 3 sites de surface.

La forme des courbes pour S et CC est comparable mais la quantité de protons échangée est supérieure pour S que pour CC (Figure 4.1). Les pKa et la concentration des trois types de groupements fonctionnels pour les pools bactériens extraits de S et CC sont résumés dans le Tableau 4.1. Les concentrations des trois types de groupements fonctionnels sont toujours supérieures pour S que pour CC alors que leurs pKa respectifs ne sont pas significativement différents. Cette observation pour les concentrations en sites de surface pourrait être liée à l'observation de différentes structures de communautés bactériennes entre S et CC dues à des natures différentes de matière organique apportée (Lejon et al., 2006). La présence de différentes variétés de bactéries dans ces sols avec des structures de surface cellulaire différentes pourrait induire donc des concentrations en sites de surface différenciées. Cette hypothèse est en accord avec la littérature qui montre que pour

différentes espèces de bactérie, les concentrations en sites de surface sont variées alors que les pKa sont du même ordre de grandeur (Tableau 4.1).

Les valeurs de pKa et les concentrations en sites de surface obtenues pour S et CC sont dans la gamme de valeurs trouvées dans la littérature (Tableau 4.1). De plus, les pKa déterminés pour S et CC sont très proches de la moyenne des pKa de 11 espèces de bactéries trouvées dans la littérature (Tableau 4.1). Au contraire, les concentrations en sites de surface pour ces 11 espèces sont toujours plus faibles que celles déterminées pour S et CC. Parmi les hypothèses explicatives, on pourrait évoquer la présence importante de bactéries gram négative dans S et CC, bactéries connues pour avoir les concentrations en sites de surface les plus élevées (Tableau 4.1).

Espèce de bactérie	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	S ₁ *	S ₂ *	S ₃ *	Références
S	4,68±0,08a ¹	6,99±0,14a	9,26±0,13a	4,38±0,16a	2,21±0,27a	5,20±0,61a	Notre étude
CC	4,61±0,11a	6,98±0,25a	9,29±0,04a	3,60±0,30b	1,83±0,11b	4,39±0,24b	Notre étude
<i>Bactérie gram positive</i>							
<i>Bacillus subtilis</i>	4,82±0,12	6,90±0,50	9,40±0,60	1,20±0,20	0,44±0,03	0,62±0,04	Fein et al., 1997
<i>Bacillus licheniformis</i>	5,20±0,30	7,50±0,40	10,20±0,50	0,88±0,38	0,82±0,45	1,23±0,69	Daughney et al., 1998
<i>Bacillus megaterium</i>	5,18±0,16	7,63±0,23	10,23±0,40	1,87±0,32	0,81±0,21	2,91±1,63	Yee et Fein, 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,83±0,08	6,99±0,35	9,02±0,10	1,13±0,58	1,35±0,30	2,51±0,30	Yee et Fein, 2001
<i>Streptococcus faecalis</i>	4,78±0,02	7,16±0,20	9,57±0,08	2,54±0,19	0,50±0,03	0,78±0,22	Yee et Fein, 2001
<i>Bacillus subtilis</i>	4,40±0,30	6,90±0,60	11,20±0,20	0,94±0,16	0,51±0,02	1,80±0,40	Markai et al, 2003
<i>Bactérie gram Négative</i>							
<i>Synechococcus green</i>	4,85±0,31	6,56±0,2	8,76±0,06	2,60±0,40	1,90±0,50	2,50±0,40	Dittrich et Sibling, 2005
<i>Synechococcus red</i>	4,98±0,16	6,69±0,39	8,66±0,21	7,40±1,60	4,40±0,80	4,80±0,80	Dittrich et Sibling, 2005
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	3,80±0,80	6,70±0,20	9,40±0,94	4,20±0,42	1,20±0,36	4,50±1,35	Guiné et al., 2006
<i>Escherichia Coli</i>	4,60±0,80	6,80±0,20	9,20±0,92	2,50±0,25	0,71±0,21	2,50±0,75	Guiné et al., 2006
<i>Pseudomonas putida</i>	4,40±0,80	6,50±0,20	9,70±0,97	5,30±0,53	3,20±0,96	7,30±2,19	Guiné et al., 2006
Average	4,71	6,94	9,58	2,78	1,44	2,86	
max	5,20	7,63	11,20	7,40	4,40	7,30	
min	3,80	6,50	8,66	0,88	0,44	0,62	

* concentrations en groupe fonctionnel en 10⁻⁴ eq/g de bactéries séchées

¹Differentes lettres dans une colonne indiquent une différence significative entre S et CC $P < 0.05$

Tableau 4.1 pKa et concentration en sites de surface trouvés dans la littérature

3.2. Interaction cuivre-bactérie

Les données expérimentales sont bien ajustées par FITEQL comme on peut le voir à la Figure 4.2. La Figure 4.2 représente les données expérimentales en (Cu²⁺) ainsi que la

spéciation théorique obtenue par FITEQL. Pour S et CC, la prise en compte uniquement des sites carboxyliques dans la complexation du cuivre (R-COO-Cu^+ and R-COO-CuOH) donne les meilleurs ajustements. Des résultats similaires ont été trouvés par Fowle et Fein (1999) qui ont étudié l'interaction du cuivre avec *Bacillus subtilis* entre pH 2.5 et 6.5. Mais ces résultats sont contradictoires avec ceux de Ngwenya et al. (2003) qui ont trouvé que l'implication des sites carboxyliques et phosphates (R-COO-Cu^+ et $\text{R-PO}_4\text{-Cu}^+$) est nécessaire pour bien décrire l'adsorption du cuivre entre pH 2.5 et 6.5.

Dans notre étude, l'ajustement en utilisant uniquement les groupements carboxyliques génère un meilleur ajustement que la prise en compte des groupements carboxyliques et phosphates surtout pour des $\text{pH} > 6,5$ (Figure 4.2). Cependant, les complexes cuivre et groupement phosphate ne peuvent pas être exclus dans d'autres conditions expérimentales. Dans nos conditions, ces complexes semblent ne pas être favorisés alors que les complexes avec les carboxyles sont prédominants. Ce résultat pourrait s'expliquer par trois raisons (i) le faible rapport (concentration en site / concentration en cuivre) (ii) une plus forte concentration en sites carboxyliques qu'en sites phosphates (Tableau 4.1) et (iii) une affinité du cuivre (Cu^{2+} et CuOH^+) plus grande pour les sites carboxyliques que pour les sites phosphates.

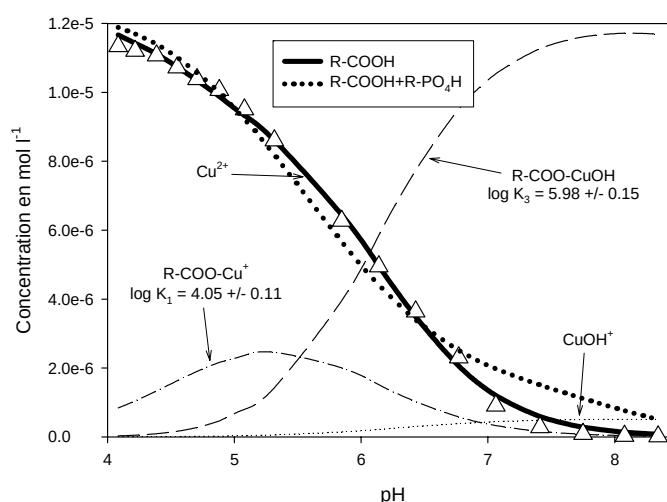


Figure 4.2 Exemple de spéciation théorique du cuivre en présence de bactéries extraites de S. Les triangles représentent les données expérimentales et les lignes les calculs effectués par FITEQL.

L'utilisation des groupements carboxyles pour ajuster les données de titrage en présence de cuivre (entre pH 4 et 8,5) donne des constantes apparentes de stabilité pour les complexes bactérie-Cu reportées dans le Tableau 4.2. Pour le rapport ligand /cuivre étudié $R=4$, les constantes de stabilité des complexes ne sont pas significativement différentes entre

S et CC. Le Tableau 2 présente aussi les valeurs de constantes d'affinité de complexes bactérie-Cu trouvées dans la littérature. Les valeurs des constantes pour le complexe R-COO-Cu⁺ trouvées dans notre étude sont significativement plus faibles que les valeurs de la littérature. Par contre, les valeurs des constantes du complexe R-COO-CuOH sont comparables à celle obtenue avec *Bacillus licheniformis* et significativement différentes de celle obtenue avec *Bacillus subtilis* (Tableau 4.2). Ces différences pourraient s'expliquer par (i) des modes opératoires (étude en batch) différents de celui utilisé dans notre étude (titrage en présence de Cu) (i.e. rapport bactérie/Cu, gamme de pH étudiés) (ii) l'interdépendance des constantes ajustées (i.e. prise en compte des groupements carboxyles ou carboxyles+phosphates dans l'ajustement). Nous avons donc ajusté nos données entre pH 2 et 6,5 en considérant seulement le complexe R-COO-Cu⁺ comme ont fait Fein et al. (1997), Daughney et al. (1998) et Ngwenya et al. (2003). Les valeurs de constantes obtenues pour le complexe R-COO-Cu⁺ (Log K = 4,1 ± 0,2 pour CC et 4,4 ± 0,1 pour S) ne sont plus significativement différentes de celles trouvées dans la littérature ($P > 0.05$) sauf entre CC et *Bacillus licheniformis*.

Ces résultats montrent que les valeurs des constantes Cu-bactéries sont comparables quelles que soient les espèces de bactéries ou pour un pool bactérien extrait du sol. La réactivité d'un pool de bactéries non connues vis-à-vis du cuivre peut être alors modélisée soit par la réactivité d'une bactérie ou par un modèle générique. Cette conclusion est en accord avec les travaux de Yee et Fein (2001) pour le Cd.

Espèce de bactérie	log K _{R-COO-Cu}	log K _{R-COO-CuOH}	Références
S	4,1±0,1	6,0±0,2	Notre étude
CC	3,8±0,2	5,7±0,2	Notre étude
<i>Bacillus subtilis</i>	4.3	nd	Fein et al., 1997
<i>Bacillus subtilis</i>	nd	6,4±0,1	Fowle and Fein, 1999
<i>Bacillus licheniformis</i>	4,9±0,4	nd	Daughney et al., 1998
<i>Bacillus licheniformis</i>	nd	6,1±0,9	Fowle and Fein, 1999
Unknown species	4,4±0,2	nd	Ngwenya et al., 2003
nd non déterminé			

Tableau 4.2 Constantes de stabilité Cu-bactérie trouvées dans la littérature comparées à celles obtenues dans ce travail

3.3. Conclusion

La combinaison d'extraction par centrifugation dans un gradient de densité et de titrages potentiométriques en présence ou en absence de cuivre, nous a permis de déterminer des paramètres thermodynamiques pour modéliser la sorption du cuivre par une fraction

biologique constituée de bactéries du sol. La modélisation des données de titrages (sur une gamme de pH 4 à 10) en absence de cuivre par FITEQI 4.0 révèle la présence de trois sites de surface sur les bactéries que l'on peut attribuer à des groupements du type carboxylique, phosphate et hydroxyle. L'affinité du proton et les concentrations en sites obtenus pour nos pools bactériens sont dans la gamme de valeurs données dans la littérature pour une large variété d'espèces bactériennes. Les tritages en présence de cuivre montrent que dans nos conditions expérimentales seuls les groupements carboxyliques sont responsables de l'adsorption du cuivre (R-COO-Cu^+ et R-COO-CuOH). La comparaison entre l'affinité du cuivre de nos pools bactériens et celle de travaux sur des souches pures de bactéries révèle des similarités. Notre étude suggère que l'adsorption du Cu par les bactéries du sol pourrait être estimée par l'extraction d'un pool bactérien du sol plutôt que l'utilisation une souche de bactérie comme modèle.

La quantité maximale de cuivre fixée par la biomasse a été estimée pour S et CC en faisant les approximations suivantes :

- ↪ *La biomasse est constituée uniquement de bactéries*
- ↪ *Tous les sites de surface sont saturés en métaux*

Avec ces hypothèses, la quantité maximale de cuivre fixée par la biomasse est d'environ 20 mg de Cu / kg de sol pour S et CC. D'après ce calcul, la biomasse du sol peut effectivement immobiliser une quantité non négligeable de métaux en considérant uniquement leur propriété de surface. D'autres mécanismes -comme le transport actif par exemple- peuvent faire augmenter la capacité d'adsorption des métaux par les microorganismes. Mécanismes qui sont délicats à prendre en compte dans la modélisation. Il semble donc nécessaire d'intégrer la réactivité de cette fraction pour la prévision de la spéciation des métaux dans les sols.

Ainsi, les données obtenues sur la réactivité des pools bactériens seront utilisées dans le dernier chapitre, pour déterminer la spéciation des métaux dans les sols.

Chapitre V.

Relation entre devenir et impact du cuivre sur les bactéries après ajout de cuivre

Chapitre V. Relation entre devenir et impact du cuivre sur les bactéries après ajout de cuivre

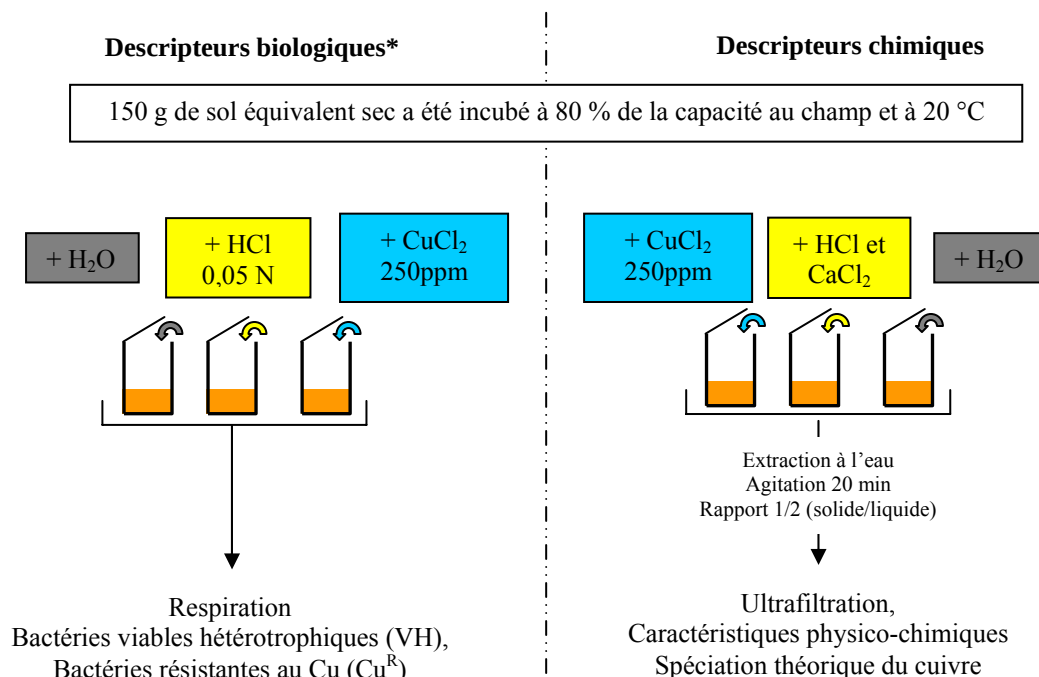
Afin de relier devenir et impact du cuivre, une étude en dynamique a été menée pendant 35 jours. Les sols non séchés ont été mis à incuber -sous forme de microcosme- sans ou avec ajout de cuivre (250 mg/kg) pendant un temps donné ($t=0$, 15 et 35 jours).

Nous avons mis en évidence dans le chapitre II des statuts organiques différenciés entre NA, S et CC. Or, ceux-ci ont influencé la réactivité des MOP et des AF extraits du sol total. De ce fait, cette étude en dynamique a été réalisée pour NA, S et CC afin de déterminer l'influence du statut organique sur le devenir du cuivre et sur l'impact de celui-ci sur les bactéries. La Figure 5.1 présente un schéma descriptif de l'étude en dynamique réalisée.

L'impact d'un ajout de cuivre sur les bactéries a été apprécié à l'aide de descripteurs biologiques et chimiques. Le devenir du cuivre dans le sol a été suivi à l'aide de descripteurs chimiques. Les descripteurs biologiques concernent le suivi du CO_2 dégagé (respiration), l'énumération des bactéries viables hétérotrophiques (VH) et l'énumération des bactéries résistantes au Cu (Cu^R). Les descripteurs chimiques concernent les caractéristiques physico-chimiques des solutions du sol extraites, l'ultrafiltration du Carbone Organique Dissous (COD) et la spéciation théorique du cuivre en solution.

Dans un premier temps, nous avons effectué la spéciation théorique du cuivre en solution avec ECOSAT en utilisant sa base de données. Dans un second temps, afin de relier l'intensité de l'impact du cuivre et sa concentration sous forme libre en solution, nous avons affiné les calculs avec nos propres valeurs, en introduisant dans ECOSAT des données acquises au cours des chapitres précédents.

Les données obtenues sur les caractéristiques physico-chimiques de la solution du sol ont été utilisées comme données d'entrée ou de validation de la modélisation de la spéciation du cuivre dans nos sols (Chapitre VI)



* L'étude des descripteurs biologiques a été réalisée par l'UMR Géochimie et Microbiologie des sols (INRA, Dijon). Chaque type d'ajout a été répété trois fois dans des microcosmes indépendants. Des microcosmes indépendants ont été mis en place pour $t=0$, 15 et 35 j. L'ensemble a été réalisé pour NA, S et CC, soit au total 81 microcosmes pour les descripteurs biologiques et 81 pour les descripteurs chimiques.

Figure 5.1 Schéma descriptif de l'étude en microcosme

1. Cas du sol non-amendé (NA)

1.1 Résultats majeurs (résumé article)

Les résultats obtenus dans cette partie ont été rédigés sous forme d'un article soumis et donné en fin de ce chapitre. Les résultats majeurs sont résumés ci-dessous.

Les réponses des différents descripteurs sont reprises dans le Tableau 5.1. Les descripteurs biologiques décrivent l'impact du cuivre sur les bactéries (VH et Cu^R) et une partie de l'activité des bactéries à travers la respiration. Les descripteurs chimiques décrivent des caractéristiques de la solution du sol, celles-ci étant le résultat à la fois de processus biotiques et abiotiques. Ces descripteurs ne vont donc pas forcément montrer les mêmes tendances.

Cependant, il semble exister un lien subtil entre les descripteurs biologiques et chimiques, relié à l'impact du cuivre sur le sol (Tableau 5.1). En effet, les descripteurs biologiques indiquent un impact dès 15 jours d'incubation, visible par une augmentation des

bactéries Cu^R et par une diminution des bactéries VH. Cet impact est aussi mis en évidence par les descripteurs chimiques (l'évolution de la spéciation du cuivre et la dynamique des petites (< 500 Da) et grosses molécules (> 500 Da) en solution).

Les descripteurs biologiques et chimiques apparaissent donc complémentaires pour comprendre et mettre en évidence l'impact du cuivre sur le sol.

Temps d'incubation	t = 15 jours	t = 35 jours
Descripteurs Biologiques		
- Respiration	–	–
- Enumération VH	+	–
- Enumération Cu ^R	+	+
Descripteurs chimiques		
- pH	+	–
- COD	–	+
- % Cu récupéré en solution	+	–
- Devenir des petites et grosses molécules	+	+
- Evolution de la spéciation théorique	+	–

+ différences significatives observées entre les microcosmes Cu et les microcosmes contrôles

– pas de différences significatives observées entre les microcosmes Cu et les microcosmes contrôles

Tableau 5.1 Récapitulatif des réponses observées pour les différents descripteurs utilisés pour NA

2. Cas du sol amendé avec de la paille (S)

Comme nous avons pu le voir avec NA, les microcosmes H₂O ne suffisent pas pour interpréter les descripteurs chimiques en présence de Cu en raison des effets abiotiques dus à l'ajout (perturbation du pH, de la force ionique, des équilibres d'adsorption et de désorption des MOD, ...). De ce fait, pour S et CC (parties suivantes), seuls les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂ ont été exploités.

2.1. Réponse des descripteurs biologiques

La quantité de CO₂ dégagée au cours de l'incubation est donnée à la Figure 5.2 pour les microcosmes contrôles (H₂O ou HCl) et pour les microcosmes avec Cu. Comme pour NA, après 35 jours d'incubation, on observe une diminution significative de la quantité de CO₂ dégagée d'environ 20% dans les microcosmes HCl et Cu. Ces résultats montrent qu'une acidification a autant d'effet sur la respiration qu'un ajout de Cu. Les effets résultant de l'ajout de Cu ou de l'acidification ne peuvent pas être discriminés par ce descripteur.

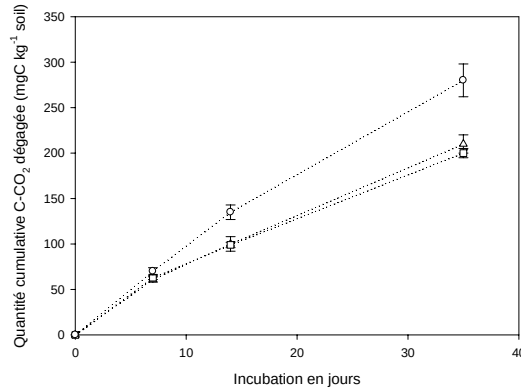


Figure 5.2 Quantité de CO₂ dégagée par les sols S incubés pour trois types de microcosmes : H₂O (O), HCl (Δ) et Cu (□).

L'énumération des bactéries viables hétérotrophiques (VH) est donnée dans le Tableau 5.2. A t=15 et 35 jours, la même quantité de VH est énumérée entre les microcosmes H₂O et Cu. Cependant, un enrichissement significatif en Cu^R est observé à t=35 jours pour les microcosmes Cu (Tableau 5.2).

		microcosmes	
		+H ₂ O	+ Cu
Bactéries Viables Hétérotrophiques (CFU.g ⁻¹ of sol)	t= 15	2,82×10 ⁷ (0,37) _a	2,27×10 ⁷ (0,33) ^a
	t= 35	2,09×10 ⁷ (0,76) _a	2,57×10 ⁷ (0,33) ^a
Bactéries résistantes au cuivre (CFU.g ⁻¹ of soil)	t= 15	3,07×10 ³ (0,77) _a	5,19×10 ³ (1,10) ^a
	t= 35	2,58×10 ³ (0,37) _a	7,29×10 ³ (0,30) ^b

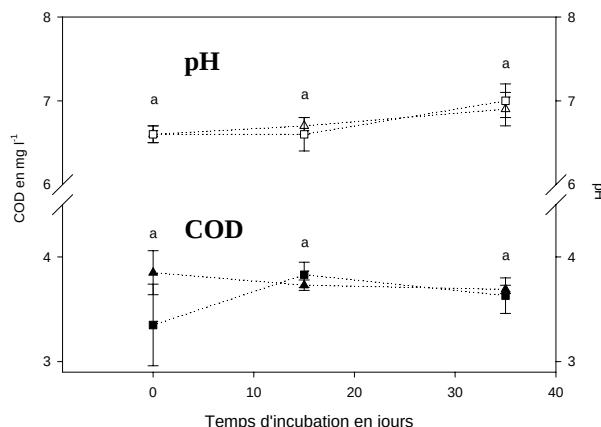
Les valeurs entre les parenthèses sont les écarts types

Pour un temps donné et un type de bactéries énumérées, différentes lettres indiquent une différence significative ($p < 0.05$)

Tableau 5.2 Enumérations des bactéries viables hétérotrophiques (VH) et résistantes au cuivre (Cu^R) pour les microcosmes H₂O et Cu aux 15^{ème} et 35^{ème} jours d'incubation (S)

2.2. Evolution des caractéristiques de la solution du sol

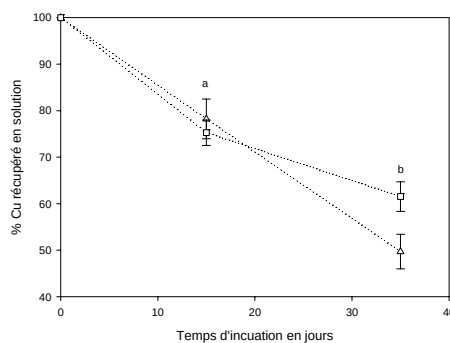
Pour un temps donné, les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂ ont des valeurs de pH et COD qui ne sont pas significativement différentes (Figure 5.3). L'évolution du pH et du COD est identique pour ces deux microcosmes. Le COD reste stable ($p < 0,05$) alors que le pH augmente significativement après 35 jours d'incubation.



Pour un temps d'incubation donné, différentes lettres indiquent une différence significative entre les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂.

Figure 5.3 Evolution du pH et du COD des solutions du sol au cours de l'incubation pour S extraites des microcosmes Cu (pH □, COD ■) et HCl/CaCl₂ (pH △, COD ▲).

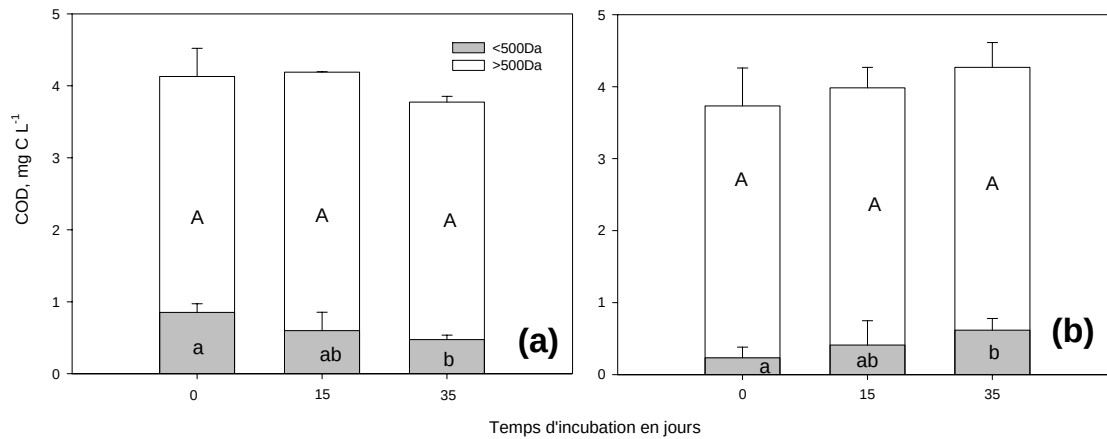
Les valeurs de cuivre mesurées en solution pour les microcosmes Cu au cours de l'incubation (45 à 70 $\mu\text{g l}^{-1}$) sont largement supérieures à celles mesurées pour les microcosmes HCl/CaCl₂ (8 à 16 $\mu\text{g l}^{-1}$). Ces concentrations diminuent au cours du temps d'incubation. Cependant l'amplitude de diminution du Cu en solution est similaire pour ces deux microcosmes à t=15 jours mais significativement différente à t=35 jours comme l'illustre la Figure 5.4.



Pour un temps d'incubation donné, différentes lettres indiquent une différence significative entre les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂.

Figure 5.4 Pourcentage de Cu récupéré en solution durant l'incubation (t 0 = 100%) pour les sols S incubés avec HCl/CaCl₂ (△) et Cu (□)

Le suivi des petites (<500 Da) et grosses molécules (> 500 Da) dans les solution du sol extraites des microcosmes HCl/CaCl₂ et Cu au cours de l'incubation est donné à la Figure 5.5. Pour les microcosmes HCl/CaCl₂, les petites molécules diminuent significativement au cours du temps, alors que les grosses restent stables (Figure 5.5, a). A l'opposé pour les microcosmes avec Cu, les petites molécules augmentent significativement, alors que les grosses restent stables (Figure 5.5, b).



A: Différences significatives ($p < 0,05$) entre COD > 500 Da
a: Différences significatives ($p < 0,05$) entre COD < 500 Da

Figure 5.5 Distribution du COD en petites (< 500 Da) et grosses molécules (> 500 Da) pour les microcosmes HCl/CaCl₂ (a) et Cu (b) pour les solutions du sol extraites de S.

2.3. Spéciation théorique du cuivre

La spéciation théorique du cuivre en solution -calculée par ECOSAT avec les mêmes hypothèses faites pour NA- est reportée dans le Tableau 5.3. Pour les microcosmes HCl/CaCl₂, les pourcentages de cuivre libre et inorganique diminuent au cours du temps d'incubation au profit du Cu organique. Pour les microcosmes Cu, les formes de cuivre libre et inorganiques diminuent pendant les 15 premiers jours d'incubation au bénéfice des formes du Cu organiques, puis cette spéciation reste inchangée à t=35 jours.

	Microcosmes HCl/CaCl ₂	Microcosmes CuCl ₂
% de Cu libre		
t = 0 jours	13,2 (0,1) ^a	45,3 (5,5) ^a
t = 15 jours	8,8 (1,3) ^b	25,1 (3,2) ^b
t = 35 jours	1,9 (0,8) ^c	14,6 (8,2) ^b
% de Cu organique		
t = 0 jours	85,7 (0,2) ^a	51,1 (5,3) ^a
t = 15 jours	90,4 (1,3) ^b	71,7 (3,1) ^b
t = 35 jours	97,5 (0,6) ^c	82,3 (8,1) ^b
% de Cu inorganique		
t = 0 jours	1,1 (0,1) ^a	3,7 (1,0) ^a
t = 15 jours	0,8 (0,1) ^b	3,2 (0,3) ^a
t = 35 jours	0,4 (0,1) ^c	3,1 (0,5) ^a

Pour un microcosme et une espèce de cuivre donnée, différentes lettres indiquent une différence significative ($p < 0,05$)

Tableau 5.3 Spéciation théorique du cuivre calculée par ECOSAT dans les solutions du sol extraites des microcosmes HCl/CaCl₂ et CuCl₂ durant l'incubation (S).

2.4. Conclusions

	NA		S	
	t = 15 jours	t= 35 jours	t = 15 jours	t= 35 jours
Descripteurs biologiques				
- Respiration	–	–	–	–
- Enumération VH	+	–	–	–
- Enumération Cu ^R	+	+	–	+
Descripteurs chimiques				
- pH	+	–	–	–
- COD	–	+	–	–
- % Cu récupéré en solution	+	–	–	+
- Devenir des petites et grosses molécules	+	+	–	+
- Evolution de la spéciation théorique	+	–	–	+

+ différences observées entre les microcosmes Cu et contrôles

– pas de différences observées entre les microcosmes Cu et contrôles

Tableau 5.4 Récapitulatif des réponses observées pour les différents descripteurs utilisés pour NA et S.

Pour S, d'après les descripteurs utilisés (Tableau 5.4), l'impact du cuivre a été observé à t=35 jours. Cet impact est retardé par rapport à NA, pour lequel l'impact du cuivre a été observé à t=15 jours. D'autre part, l'impact du cuivre observé semble plus faible par rapport à NA. En effet, moins de descripteurs ont mis en évidence un impact du Cu dans S par rapport à NA (Tableau 5.4).

3. Cas du sol amendé avec du compost de résineux (CC)

3.1. Réponse des descripteurs biologiques

La quantité de CO₂ dégagée au cours de l'incubation est donnée à la Figure 5.6 pour les microcosmes contrôles (H₂O ou HCl) et pour les microcosmes avec Cu. Comme pour NA et S, après 35 jours d'incubation, on observe une diminution significative de la quantité de CO₂ dégagée d'environ 40% dans les microcosmes HCl et Cu.

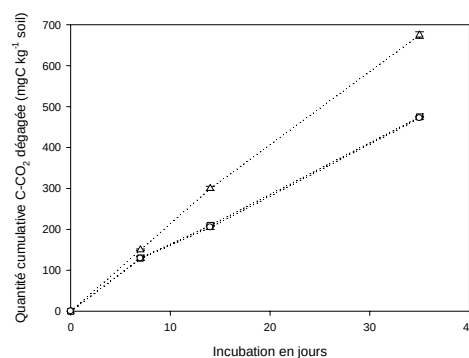


Figure 5.6 Quantité de CO₂ dégagée par les sols CC incubés pour trois types de microcosmes : H₂O (O), HCl (Δ) et Cu (□).

		microcosmes	
		+H ₂ O	+ Cu
Bactéries Viables Hétérotrophiques (CFU.g ⁻¹ of sol)	t= 15	5,22×10 ⁷ (0,68) ^a	6,19×10 ⁷ (1,83) ^a
	t= 35	3,84×10 ⁷ (0,21) ^a	4,16×10 ⁷ (0,50) ^a
Bactéries résistantes au cuivre (CFU.g ⁻¹ of soil)	t= 15	2,61×10 ³ (0,48) ^a	7,17×10 ³ (2,05) ^b
	t= 35	3,83×10 ³ (0,23) ^a	2,39×10 ³ (0,91) ^b

Les valeurs entre les parenthèses sont les écartypes

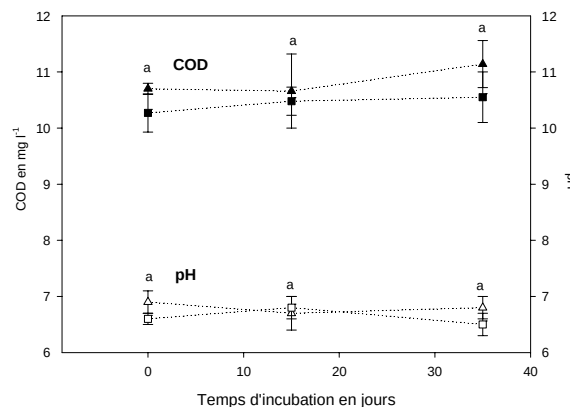
Pour un temps donné et un type de bactéries énumérées, différentes lettres indiquent une différence significative ($p < 0.05$)

Tableau 5.5 Enumérations des bactéries viables hétérotrophiques (VH) et résistantes au cuivre (Cu^R) pour les microcosmes H₂O et Cu aux 15^{ème} et 35^{ème} jours d'incubation (CC).

L'énumération des bactéries viables hétérotrophiques (VH) est donnée dans le Tableau 5.5. A t=15 et 35 jours, la même quantité de VH est énumérée entre les microcosmes H₂O et Cu . Cependant, un enrichissement significatif en Cu^R est observé à t=15 jours pour le microcosme Cu, par contre celui-ci n'est plus observable à t=35 jours (Tableau 5.5).

3.2. Evolution des caractéristiques de la solution du sol

Pour un temps donné, les valeurs de pH et de COD sont similaires entre les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂. Le COD et le pH restent stables tout au long de l'incubation (Figure 5.7).



Pour un temps d'incubation donné, différentes lettres indiquent une différence significative entre les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂.

Figure 5.7 Evolution du pH et du COD des solutions du sol au cours de l'incubation pour CC extraites des microcosmes Cu (pH □, COD ■) et HCl/CaCl₂ (pH △, COD ▲).

Bien que la concentration en Cu en solution au cours de l'incubation soit très différente entre les microcosmes Cu (67 à 115 µg l⁻¹) et HCl/CaCl₂ (9 à 14 µg l⁻¹), l'amplitude de diminution du Cu en solution n'est pas significativement différente à 15 et 35 jours entre les microcosmes Cu et HCl/CaCl₂ (Figure 5.8).

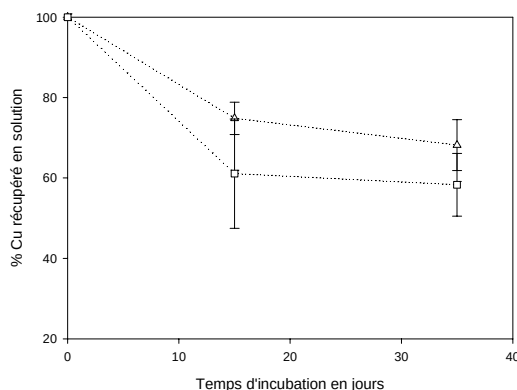
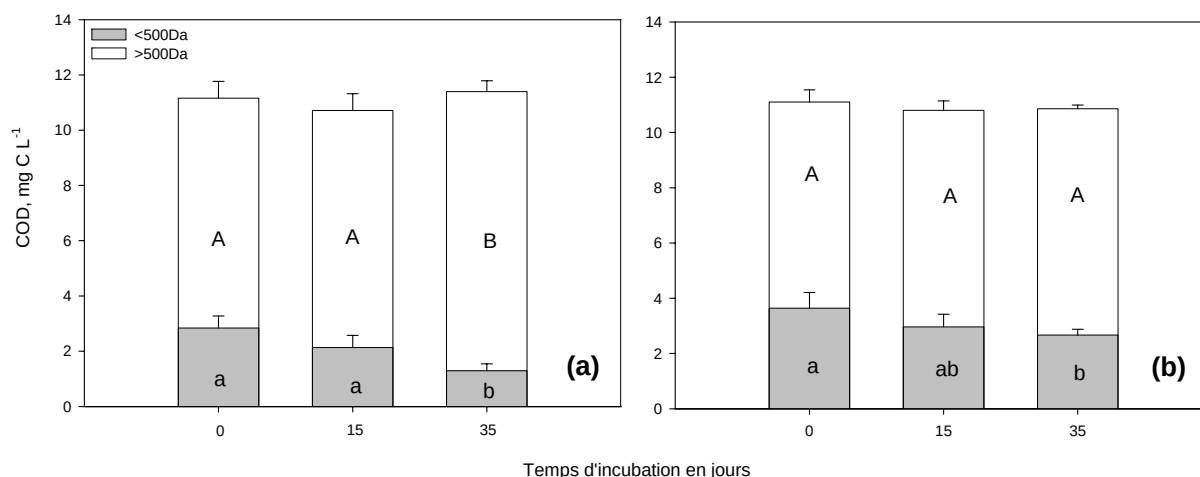


Figure 5.8 Pourcentage de Cu récupéré en solution durant l'incubation ($t_0 = 100\%$) pour les sols CC incubés avec HCl/CaCl₂ ($\triangle$) et Cu ($\square$)

Le devenir des petites (<500 Da) et grosses molécules (> 500 Da) dans les solutions du sol extraites des microcosmes HCl/CaCl₂ et Cu au cours de l'incubation est donné à la Figure 5.9. Pour les microcosmes HCl/CaCl₂ et Cu, les petites molécules diminuent significativement au cours du temps alors que les grosses molécules restent stables, sauf pour le microcosme HCl/CaCl₂ à $t=35$ jours où les grosses molécules augmentent significativement (Figure 5.9, a). De plus on observe une diminution plus importante des petites molécules dans les microcosmes HCl/CaCl₂ que dans les microcosmes Cu (Figure 5.9, b)



A: Différences significatives ($p < 0,05$) entre COD > 500 Da

a: Différences significatives ($p < 0,05$) entre COD < 500 Da

Figure 5.9 Distribution du COD en petite (< 500 Da) et grosses molécules (> 500 Da) pour les microcosmes HCl/CaCl₂ (a) et Cu (b) pour les solutions extraites de CC.

3.3. Spéciation théorique du cuivre

La spéciation théorique du cuivre calculée par ECOSAT est reportée dans le Tableau 5.6. Pour les microcosmes HCl/CaCl₂ et Cu, la spéciation du cuivre reste inchangée pendant l'incubation. Néanmoins, un changement de spéciation observé à t=15 jours pour les microcosmes avec Cu est observé par une diminution significative du cuivre libre au bénéfice de Cu organique

	Microcosmes HCl/CaCl ₂	Microcosmes CuCl ₂
% de Cu libre		
t = 0 jours	0,5 (0,3) ^a	16,4 (5,4) ^a
t = 15 jours	0,7 (0,5) ^a	7,6 (2,6) ^b
t = 35 jours	0,3 (0,2) ^a	9,9 (1,9) ^{ab}
% de Cu organique		
t = 0 jours	99,4 (0,3) ^a	82,1 (5,6) ^a
t = 15 jours	99,2 (0,5) ^a	91,6 (2,6) ^b
t = 35 jours	99,6 (0,2) ^a	89,3 (8,1) ^{ab}
% de Cu inorganique		
t = 0 jours	0,1 (0,1) ^a	1,5 (0,2) ^a
t = 15 jours	0,1 (0,1) ^a	0,9 (0,1) ^b
t = 35 jours	0,1 (0,1) ^a	0,9 (0,1) ^b

Pour un microcosme et espèce de cuivre donnée, différentes lettres indiquent une différence significative ($p < 0.05$)

Tableau 5.6 Spéciation théorique du cuivre calculée par ECOSAT dans les solutions du sol extraites durant l'incubation des microcosmes HCl/CaCl₂ et CuCl₂ durant l'incubation (CC)

3.4. Conclusions

Pour CC, seulement deux descripteurs indiquent un impact du cuivre à t=15 jours (Tableau 5.7). L'impact du cuivre sur CC est plus faible par rapport à S et NA car moins de descripteurs ont relaté cet impact (Tableau 5.7).

	NA		S		CC	
	t = 15 jours	t = 35 jours	t = 15 jours	t = 35 jours	t = 15 jours	t = 35 jours
Descripteurs biologiques						
Respiration	–	–	–	–	–	–
Enumération VH	+	–	–	–	–	–
Enumération Cu ^R	+	+	–	+	+	–
Descripteurs chimiques						
pH	+	–	–	–	–	–
TOC	–	+	–	–	–	–
% Cu récupéré en solution	+	–	–	+	–	–
Devenir des petites et grosses molécules	+	+	–	+	–	–
Evolution de la spéciation théorique	+	–	–	+	+	–

Tableau 5.7 Récapitulatif des réponses observées pour les différents descripteurs utilisés pour NA, S et CC.

4. Relation entre le cuivre libre et l'intensité des impacts observés

Au cours des parties précédentes, nous avons observé une intensité de l'impact du cuivre différente sur les sols, suivant l'ordre du plus fort au plus faible impact : $NA > S > CC$. Cette intensité est à relier à une différence de biodisponibilité du cuivre entre NA, S et CC. En se basant sur le FIAM (Free Ion Activity Model) qui considère que la toxicité d'un métal peut être prédite grâce à la concentration en ion libre (Brown et Markich, 2000), nous avons alors relié l'intensité de l'impact observé avec la concentration en cuivre libre en solution à $t=0j$.

Nous avons déterminé les concentrations en cuivre libre par ECOSAT en utilisant les hypothèses suivantes :

- ↳ [Fe] total en solution = [Fe(III)]
- ↳ La réactivité des MOD a été assimilée à celle des AF
- ↳ 65 % COD est du carbone réactif (Tipping et al., 2002 ; Ge et al., 2005)
- ↳ Les AF sont composés pour moitié de carbone

En plus de ces hypothèses, nous avons comparé trois scénarios entre-eux :

Scénario 1- Nous avons considéré que les MOD NA, S et CC ont la même réactivité. Les jeux de données déterminés par Milne et al. (2001,2003) pour la réactivité des AF ont été utilisés.

Scénario 2- Nous avons considéré que les MOD NA, S et CC n'ont pas la même réactivité. En effet, la réactivité des AF extraits du sol total (Chapitre II) a été influencée par le changement de statut organique des sols. Nous avons aussi utilisé les données de réactivité de Milne et al. (2001,2003). Cependant, nous avons introduit les teneurs en sites déterminées au chapitre II pour les AF extraits du sol total dans ECOSAT (Table 1, article Chapitre II).

Scénario 3- En plus du changement de réactivité des MOD, nous avons pris en compte la quantité de biomasse présente dans nos sols (Tableau 1.6, Chapitre I). En effet, pour une même quantité d'ion libre mais une quantité de biomasse différente, rien n'indique que l'on aura les mêmes impacts. De ce fait, nous avons divisé les concentrations en cuivre libre calculées pour le scénario 2 par la quantité de biomasse. On obtient ainsi une quantité de cuivre "toxique" par quantité de biomasse

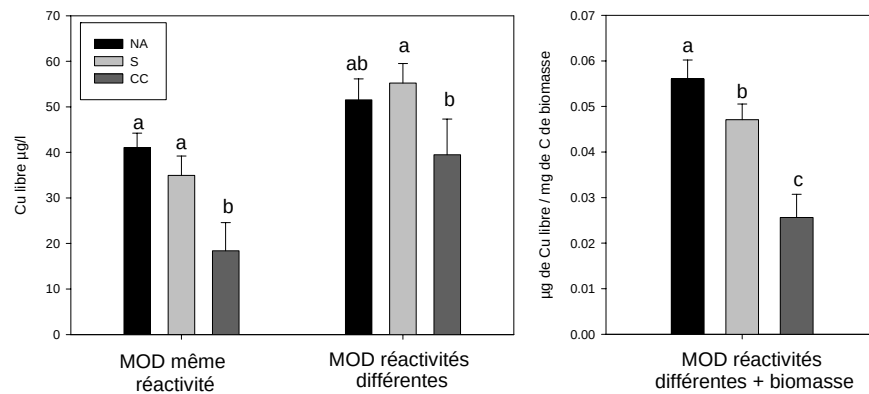


Figure 5.10 Comparaison de la concentration en cuivre libre et de la quantité de cuivre "toxique" par quantité de biomasse pour les trois scénarios

Pour le scénario 1 et 2 (Figure 5.10, partie gauche), il est délicat de relier l'intensité de l'impact du cuivre sur le sol au cuivre libre en solution. En effet, pour le scénario 1, on devrait observer une intensité d'impact similaire pour NA et S, car nous avons les mêmes concentrations calculées en cuivre libre. Ce résultat est contradictoire car on observe un impact plus faible pour S que pour NA. Néanmoins, pour CC, la concentration en cuivre libre en solution est toujours la plus faible, correspondant bien à un impact observé plus faible par rapport à NA et S.

Pour le scénario 2, on obtient des résultats contradictoires avec les intensités des impacts observées. En effet c'est pour NA et CC que l'on a les plus faibles concentrations en cuivre libre en solution alors que le plus fort impact est observé pour NA et le plus faible pour CC.

Par contre, le scénario 3 concorde avec l'intensité de l'impact observé (Figure 5.10, partie gauche). En effet la quantité de cuivre "toxique" ramenée au carbone de biomasse suit l'ordre suivant NA>S>CC ce qui est en accord avec l'intensité des impacts observés. On obtient le même résultat si on considère une même réactivité des MOD ainsi que la quantité de biomasse (i.e. scénario 1 couplé avec le scénario 3). Ce résultat suggère que la cible et sa quantité (i.e biomasse dans notre cas) sont un facteur important à prendre en compte pour décrire l'intensité de l'impact dans nos sols.

Au cours de ce chapitre, pour NA, S et CC, l'intensité de l'impact du cuivre observé a été différent. Ce résultat suggère que les statuts organiques de nos sols ont une influence sur le devenir et l'impact du cuivre.

Relier la concentration cuivre libre en solution et l'intensité des impacts observés, en prenant en compte une même ou différente réactivité des MOD est délicat. Néanmoins, si on tient compte de la quantité de biomasse présente dans nos sols, les résultats obtenus coïncident avec les impacts observés, indiquant bien que d'autres paramètres autres que la concentration en ion libre en solution influencent l'intensité de l'impact du métal dans les sols. Cette étude a permis d'acquérir des données sur la solution du sol pour les microcosmes H₂O et Cu pour NA, S et CC (Annexe G). Elle a permis aussi de déterminer la répartition du cuivre dans la phase solide, à l'aide de fractionnements granulodensimétriques et d'extractions séquentielles sur les sols (après incubation uniquement à t=0j pour les microcosmes H₂O et Cu) (exposé au chapitre I).

Au cours de cette étude, les données acquises sur la phase solide et sur la solution du sol serviront de données d'entrée dans ECOSAT et de données de validation lors de ce dernier chapitre. Différents scénarios de prise en compte des MOS dans les modèles y seront étudiées pour déterminer la spéciation du cuivre dans nos sols.

“Impact of added copper on soil bacteria and copper modeling in soil: a dynamic study”

Julien Sebastia ^a, David P.H. Lejon ^b, Rémi Chaussod ^b, Lionel Ranjard ^b, Isabelle Lamy ^a

^a INRA, PESSAC, *Physicochemistry and Ecotoxicology of Contaminated Agricultural Soils, RD10, 78026 Versailles cedex, France*

^b UMR Soil Microbiology and Geochemistry, INRA/University of Burgundy, BP 86510, 21065 Dijon, France

Article soumis à Soil Biology and Biochemistry

1.1. Abstract

To understand the copper behaviour in soil and its impact on soil microorganisms, we studied the effect of a single dose of copper addition with time using both biological and chemical data to assess respectively an impact on bacteria and to determine copper speciation. Biological data were obtained after incubation of soil samples until 35 days in microcosms spiked with CuCl₂ and compared to a control H₂O. They concerned the number of viable heterotrophic as well as copper-resistant bacteria (Cu^R). Evolved CO₂-C during incubation was also followed in HCl spiked microcosms to identify an acidification effect linked to the copper salt addition. Chemical data concerned pH and contents in major and trace elements of soil-water extracts. A special focus was made on the dissolved organic carbon (DOC) as the major ligand of copper in solution, and because its dynamic is controlled by both biotic and abiotic processes. We thus used ultrafiltration to divide DOC into high or low molecular weight organic fractions to distinguish their evolution with time of incubation. Theoretical speciation of copper in solution was calculated with the ECOSAT model. The impact of copper salt addition on the solution chemistry, i.e. changes in pH and ionic strength, and introduction of a divalent cation was mimicked with an HCl/CaCl₂ control microcosm.

CO₂-C measurements showed that the spike of copper salt has as much effect on soil respiration as does the corresponding soil acidification with HCl. Enumeration of copper

resistant bacteria appeared to be a good descriptor of the copper impact. For the copper supplemented microcosms, significant increase in Cu^{R} at $t=15$ days of incubation strongly suggested that some copper species were bioavailable, but an attenuation of the effect was observed at the end of the incubation. Significant changes in copper speciation in solution were found in parallel only in the copper spiked microcosms, where free copper species decreased at the benefit of organic forms in solution during incubation. A copper impact on the dynamics of low and high molecular weight organic matter in solution was clearly differentiated from the one induced by chemical changes after copper addition. Biological and chemical descriptors selected both agreed to show an effect of the Cu dose tested when compared to the same H_2O control, but the HCl/CaCl_2 control provided useful chemical information to explain the data after addition of CuCl_2 .

keywords: copper speciation; dissolved organic matter; viable heterotrophic bacteria; copper-resistant bacteria; soil copper impact

1.2. Introduction

Soil microorganisms can be affected by heavy metal contents in soils. The impact of heavy metals in soils as studied by microbial approaches showed that within sufficient high total metal contents, a decrease in the amount of microbial biomass and cultivable bacteria and an increase in metal tolerant bacteria can be observed. Some functions in soils assumed by microorganisms were also shown to be altered (Aoyama and Itaya, 1995; Chander and Brookes, 1993; Duxbury and Bicknell, 1983; Giller et al., 1998; Huysman et al., 1994; Knight et al., 1997; Ranjard et al., 1997). All these alterations may induce changes in surrounding soil physicochemical conditions, but this aspect of heavy metal impact in soils is not sufficiently documented. In laboratory experiments however, mechanisms such as acidification due to the addition of heavy metal were shown likewise to alter biochemical responses (Lombi et al., 2005; Speir et al., 1999). Heavy metal impacts in soils were frequently related to biological parameters but rarely linked to a chemical speciation of the metal, despite the fact that only metal speciation can be related to its bioavailability (Kunito et al., 2001b; Ranjard et al., 1997). Nevertheless speciation of metal in soils is difficult to obtain, especially in the goal of relating metal species to bioavailability (Thornton, 1999).

Heavy metals can bind to several reactive organic or mineral soil constituents, as much as in the solid or the liquid phase. Many processes like sorption/desorption, precipitation/dissolution or complexation are responsible for the heavy metal distribution

among soil constituents and soil phases. One soil constituent in particular is related both to the dynamic of heavy metals and to the activity of microorganisms in soils: the dissolved organic matter (DOM). DOM is one of the main reactive fractions of the soil organic matter both from the point of view of its rapid turn-over and its reactivity towards heavy metals. Furthermore its dynamic is controlled by numerous biotic and abiotic processes. The fate of soil DOM (mineralization or production) is due to microorganisms activities but also to the presence of soil reactive constituents driving the sorption/desorption mechanisms, in relation with the soil solution characteristics (Kalbitz et al., 2000; Marschner and Kalbitz, 2003; Reemtsma et al., 1999; Smolander and Kitunen, 2002). DOM is also involved in several processes concerning the fate of heavy metals in soils (Fotovat and Naidu, 1998; Merritt and Erich, 2003; Zhou and Wong, 2001). DOM can change the speciation of heavy metals by the formation of metallic complexes in solution thus modifying their potential toxic effects (Dumestre et al., 1999). But soil microorganisms can also change the metal speciation in order to reduce toxicity by several mechanisms including binding to cell-surface components, extracellular complexation with biomolecules or precipitation by metabolites (Cervantes and Gutierrez-Corona, 1994; Gadd, 2004; Gordon et al., 1994; Trevors, 1987).

Dynamic of heavy metals, microbial activities and dynamic of organic carbon (especially DOM) are obviously linked, but it is still difficult to accurately describe the connections between these processes. It is thus interesting to mix biological and chemical points of view when dealing with heavy metals impacts on soil microorganisms. One of the main challenges to connect biological and chemical descriptors is to relate the metal speciation to the effect on soil microorganisms. In this way, Dumestre et al. (1999) showed that the measure of free copper activity in solution can be a good descriptor of copper toxicity in soil. But such data are not easy to obtain, especially in complex systems like soil solutions in the presence of many ligands.

In this work, our aim was to relate microbiological to chemical data of soil copper impact in order to better describe the soil response and select relevant descriptors. Copper was used for its environmental significance, especially in vineyard soils (Besnard et al., 2001), and its known reactivity towards organic ligands which complicates its biodynamic in soils. Thus, DOM was chosen as a key parameter to follow, as its production and consumption in solution is attributed both to microbial processes and abiotic processes. We used microcosms incubated during 35 days with a vineyard soil in the absence or presence of added copper, and followed both i) biological descriptors expressed as CO₂-C evolved and number of cultivable as well as copper-resistant bacteria, and ii) chemical descriptors based

on soil solution characteristics (pH, total copper and total organic carbon contents (TOC) and contents in major cations and anions). The direct determination of free copper species using a copper ion selective electrode was not possible in our case, because of the presence of interfering ions in solution. We thus calculated a theoretical Cu speciation using the program ECOSAT with the determined soil solution characteristics in order to take into account soluble organic matter as copper ligand (Keizer and van Riemsdijk, 2005). Furthermore, we followed the evolution of TOC in solution after ultrafiltration, in order to distinguish larger organic molecules > 500 Da from the smaller ones which were supposed to have the more rapid turn-over (van Hees et al., 2005). These results were put together and compared between a control “H₂O” without copper and a control “HCl/CaCl₂” mimicking the copper input (i.e. raising of the ionic strength, introduction of a divalent cation together with a pH modification), to explain the differences observed and to discuss the reliability of chemical descriptors to biological ones.

1.3. Materials and methods

1.3.1. Site description and sampling

We used a long-term field experiment started in 1991 and located in the vineyard site of Mâcon Clessé (Burgundy, France). The silty clay loam soil was used as an agricultural soil before the vine installation fifteen years ago. Since this date, the parcels we used in this study received no sulfate copper nor organic inputs except returned vine-shoot fragments (“Bouillie Bordelaise”) and were only chemical weeded between vine-plants. Thus, the weak copper contamination exhibited by the surface soil samples (about 60 mg Cu kg⁻¹, Table 1, compared to the Cu value of about 20 mg Cu kg⁻¹ at 60 cm depth) probably comes from the past before the field experiment installation. Sampling was made at 0-5 cm depth and samples were mixed and homogenized, wet sieved at 2.0 mm and stored at 4°C. Selected characteristics of the soil are given Table 1.

Soil	
pH (water)	6.78
Sand (50-2000 μm) (%)	11.0
Loam (2-50 μm) (%)	57.0
Clay (< 2 μm) (%)	33.0
CaCO ₃ (%)	0.24
C (%)	1.29
C/N	11.7
CEC cmol ⁺ kg ⁻¹	16.8
Cu (mg kg ⁻¹)	62.4

Table 1 Selected characteristics of the soil sample

1.3.2. Experimental procedure

150 g soil equivalent dry weight were incubated in darkness at 20°C in closed jars during 35 days in the absence and presence of CuCl₂ added so as to have finally 250 mg Cu kg⁻¹ soil. This total soil Cu concentration is in the range of copper contaminated vineyards soils in France (100 to 1500 mg Cu kg⁻¹ Besnard et al., 2001). The soil moisture content of each microcosm was adjusted to 80% of the water holding capacity (WHC). Classically, a blank control with only water addition was made. But we also used a blank in the presence of added HCl in order to mimic the impact of acidification with chloride content on the microorganisms, and a blank with both HCl and CaCl₂ addition in order to mimic the introduction of a divalent cation and evaluate the impact on the changes in the nature and in the solubility of dissolved organic matter as already observed, specially for the chemical descriptors (Fotovat and Naidu, 1998; Reemtsma et al., 1999)

During incubation, the microcosms were regularly opened and condensation dried, then weight adjustment was made with deionised water to maintain soil moisture at 80% WHC. Soil samples were removed from triplicates microcosms for biological and chemical measurements at two times: t = 15 or 35 days, while t = 0 corresponds to the introduction of copper and then immediately remove of soil for either the biological or chemical analysis.

1.3.3. Enumeration of bacterial populations

At t=15 days and t=35 days, microorganisms from control (H₂O) and copper contaminated soil microcosms were extracted by blending 10 g of dry soil sample with 50 ml of a saline solution (NaCl 0.8%) for 90 s in a Waring-Blender (Eberbach Corporation). Homogeneous soil suspensions were serially diluted in sterile saline solution and 100 μl of appropriate dilutions were spread on the agar plates. Three plates were inoculated for each dilution. Enumeration of colony forming units (CFU) corresponding to viable heterotrophic

(VH) bacteria were performed on YG agar (Kunito et al., 2001b). Copper resistant bacteria (Cu^R bacteria) were selected on CuCl_2 supplemented YG (2mM Cu(II)) to allow distinction between copper resistant and sensitive bacteria (Kunito et al., 2001a). Filter-sterilized copper stock solution (10 g l^{-1}) was added to sterilize PCA prior to dispensing. Cycloheximide was used as an antifungal agent (100 mg l^{-1} final concentration). Enumerations were performed after 7 days of incubation at 28°C . Plates with between 10 and 100 colonies per plate were counted. The data were expressed as the means of triplicate determinations and standard error of the means.

1.3.5. Soil solution extraction and ultrafiltration

The soil solution was extracted from the various microcosms at the different sampling times with deionised water, using a soil:water ratio of 1:2. After a 20 min shaking, the soil-solution mixture was centrifuged for 20 min at $12\,000 \text{ g}$ and the supernatant was filtered through $5.0 \mu\text{m}$ cellulose nitrate Millipore filters and divided in two aliquots. One was used to determine soil solution characteristics: pH, total organic carbon (TOC) and copper contents and major anions and cations. The other part was ultrafiltered using a succession of three molecular weight cut off (MWCO) membranes of 10 000, 3 000 and 500 Da to avoid clogging (Amicon's diaflow membranes YM10, YM3 and YCO5 respectively, Millipore, in Amicon 8050 and 8040 stirred cell systems). Molecular size fractionation was deemed operationally complete when 50% of the initial volume in the ultrafiltration cell had passed through a membrane in order to avoid polarization or coagulation of organic matter on the membrane surface (Burba et al., 1998). TOC contents were determined in each ultrafiltered fractions. The percentages of TOC recovered after ultrafiltration varied between 95 and 110% which were satisfactory considering the low values involved. Cu contents were also determined in all fractions, but values were too low to be discussed. Addition of all the carbon contents higher than 500 Da allowed to divide TOC in solution in two parts: the small molecules $<500 \text{ Da}$ and the large molecules $>500 \text{ Da}$. Before each ultrafiltration, all membranes were washed with NaOH (0.1 M) and rinsed with water, then washed again with HCl (0.1 M) and rinsed in order to avoid contaminations.

1.3.6. Chemical analysis

Cu in solution was determined by furnace atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 220). Total organic C in solution was monitored by high temperature catalytic combustion followed by CO_2 measurement (Shimadzu TOC-VCSN). pH was measured with

a combined Ag/AgCl electrode (Radiometer analytical, XC 250). Major anions in solution (SO_4^{2-} , NO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^-) were determined by capillary electrophoresis (Millipore) and major cations in solution (Ca, Mg, K, Na, Fe) by flame atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 220).

1.3.7. Theoretical speciation of copper in solution

Theoretical copper speciation in soil extracts was determined by thermodynamic calculations using ECOSAT (Keizer and van Riemsdijk, 2005). We assumed that 65 % of the total organic carbon determined in soil solution extracts was reactive (Tipping et al., 2002 ; Ge et al., 2005). The default set of parameters previously determined by Milne et al. (2001, 2003) was used i.e.: density of carboxylic groups, $Q_{1\text{max}} = 5.88 \text{ mol kg}^{-1}$; width of the distribution (heterogeneity), $m_{\text{H1}} = 0.59$; density of phenolic sites, $Q_{2\text{max}} = 1.86 \text{ mol kg}^{-1}$; $m_{\text{H2}} = 0.70$; median intrinsic proton / Cu binding constants: $\log K_{\text{H1}} = 2.34$; $\log K_{\text{H2}} = 8.6$; $\log K_{\text{1Cu}} = -0.26$ and $\log K_{2\text{Cu}} = 8.26$, and the parameter b , related to the Donnan volume = -0.57 .

1.3.8. Carbon Mineralization during incubation

Forty grams of soil samples were incubated in a 575 ml glass jar hermetically sealed and containing a vial of 10 ml of $25 \times 10^{-3} \text{ M NaOH}$ to trap released CO_2 . Soil respiration was measured on soil microcosms supplemented with H_2O , HCl or CuCl_2 . The CO_2 accumulated in NaOH traps was measured after 7, 15, and 35 days of incubation by non-dispersive infrared spectroscopy with a Dohman DC 80 carbon analyzer (Parat et al., 2005). Data were expressed as the cumulative amount of CO_2 released along the incubation period.

1.3.9. Statistical analysis

Data are expressed as mean and standard deviation from microcosms made in triplicate. Significant differences between data were tested with a Student test (XLstat, Microsoft). The significance level used was $p < 0.05$.

1.4. Results

1.4.1. Microbial data

Figure 1 gives the amounts of CO_2 released during the incubation for the H_2O and HCl control microcosms and the copper supplemented microcosms. After 35 days, $172 \text{ mg of CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ soil}$ were released for the H_2O microcosm, while a significant decrease of 25% was observed both for the copper and HCl supplemented microcosms.

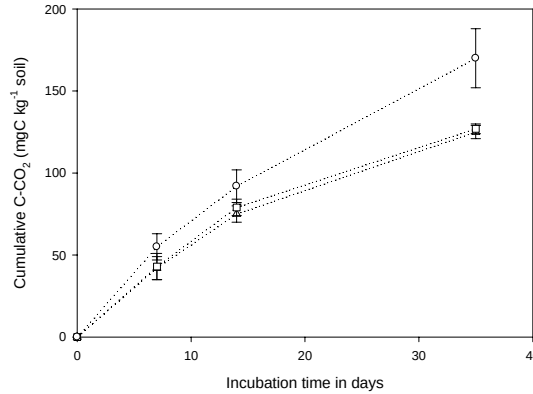


Figure 1 Amounts of CO₂ released by the soil samples incubated in the various microcosms: H₂O (O), HCl (Δ) and copper (□). Values are means of triplicate ± standard deviation.

Enumeration of total viable heterotrophic bacteria (VH) and copper resistant bacteria (Cu^R) performed at t=15 and t=35 days for the H₂O and copper spiked microcosms are given Table 2. At t=15, number of cultivable heterotrophic bacteria was 2.79×10^7 CFU g⁻¹ soil without copper contamination while in the copper microcosms a significant decrease on VH bacteria to 4.00×10^6 CFU g⁻¹ soil was observed. However, such differences did not persist at t=35, with similar densities recovered between the copper and H₂O control microcosms.

In parallel, at t=15 days, density of Cu^R bacteria in the control H₂O microcosms was 2.96×10^3 CFU g⁻¹ soil representing about 0.01% of VH bacteria (Table 2). A significant increase in Cu^R bacteria occurred at t=15 days in the microcosms supplemented with copper, corresponding to an enrichment factor of 3.4. But at t=35 days, this increase in Cu^R bacteria observed at t=15 remained nearly constant (enrichment factor of 2.9).

		microcosms	
		+H ₂ O	+ Cu
Viable Heterotrophic bacteria (CFU.g ⁻¹ of soil)	t= 15	2.79×10^7 (0.21) ^a	4.00×10^6 (0.47) ^b
	t= 35	1.50×10^7 (0.01) ^a	1.84×10^7 (0.45) ^a
Copper Resistant bacteria (CFU.g ⁻¹ of soil)	t= 15	2.96×10^3 (0.50) ^a	1.01×10^4 (0.39) ^b
	t= 35	3.14×10^3 (0.33) ^a	9.02×10^3 (0.68) ^b

Values in brackets are standard deviation

Superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in bacterial enumerations between control and copper spiked soils for a given microcosm

Table 2 Enumerations of viable heterotrophic (VH) and copper resistant (Cu^R) bacteria in the H₂O control microcosms and copper contaminated microcosms at t=15 and t=35 days of incubation.

1.4.2. Chemical data

Soil solutions characteristic are given Table 3. For all the microcosms in the absence or presence of added copper, TOC and total copper contents determined in water extracts were always less than 0.1% of the total respective soil contents (Table 3).

Type of microcosms	Incubation time in days	Soil solutions characteristics		
		pH	TOC mg.l ⁻¹	Cu μg.l ⁻¹
Control (H ₂ O)	0	7.3 (0.3) ^a	5.70 (0.13) ^a	23.48 (7.79) ^a
	15	7.3 (0.1) ^a	3.84 (0.32) ^b	14.54 (1.50) ^b
	35	7.1 (0.2) ^a	3.26 (0.19) ^c	9.85 (0.66) ^c
Control (HCl/CaCl ₂)	0	6.6 (0.1) ^a	2.90 (0.20) ^a	7.44 (0.77) ^a
	15	6.6 (0.1) ^a	2.57 (0.10) ^b	5.84 (0.71) ^b
	35	6.6 (0.2) ^a	2.16 (0.10) ^c	5.14 (0.15) ^b
CuCl ₂	0	6.5 (0.1) ^a	2.37 (0.26) ^a	74.00 (5.72) ^a
	15	6.8 (0.1) ^b	1.85 (0.13) ^b	30.20 (4.08) ^b
	35	6.6 (0.2) ^{ab}	1.66 (0.23) ^b	28.20 (2.72) ^b

Superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) for each soil solution characteristics and one type of microcosm between different time of incubation

Values in brackets are standard deviation

Table 3 Soil solution characteristics during incubation: pH, total organic carbon (TOC) and total copper determined in the water extracts at $t = 0, 15$ or 35 days

At $t=0$, values of pH and TOC of the water extracts were higher for the H₂O control microcosms than for the HCl/CaCl₂ and copper microcosms (Table 3). In addition, we extracted more copper from the H₂O control microcosms than from the HCl/CaCl₂ control ones even if the solution pH was lower in these last extracts. Furthermore, significantly less organic carbon in solution ($p < 0.05$) was extracted in the copper microcosms (2.4 mg l^{-1}) than in the control HCl/CaCl₂ microcosms (2.9 mg l^{-1}). Finally, calculated ionic strength of the extracted solutions gave as expected a much lower value for the H₂O microcosms ($1.73 \cdot 10^{-3} \pm 0.17$) than for the other microcosms: HCl/CaCl₂ ($6.57 \cdot 10^{-3} \pm 0.24$) and copper ($6.62 \cdot 10^{-3} \pm 0.17$).

During incubation, pH values and TOC contents of the H₂O control microcosms stayed always higher than the corresponding values of the HCl/CaCl₂ and copper microcosms (Table 3). For both controls and for the copper microcosms, TOC values decreased with time. pH values of the H₂O and HCl/CaCl₂ control stand steady at 7.1 and 6.6 respectively during incubation while pH increased between 0 and 15 days for the copper microcosms. Between $t = 0$ and 35 days, total copper contents in all extracted solutions declined but the amplitude of the decrease differed between the samples. The highest decrease (around 60% of decrease) was observed in the copper microcosms between $t = 0$ and 15 days (Figure 2), while the decrease was much lower for the HCl/CaCl₂ microcosms.

Contrary to the evolution of copper contents, TOC showed a larger decrease (32%) in the H₂O microcosms between 0 and 15 days compared to the copper (22% of decrease) and HCl/CaCl₂ microcosms (11%). Between 15 and 35 days however, for all microcosms, the amplitude of the decrease was much lower for both copper and TOC values (Table 3).

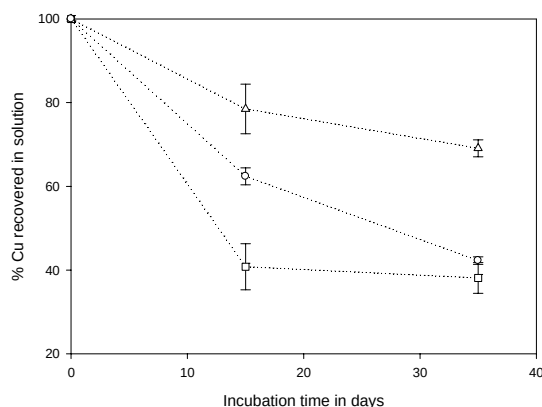
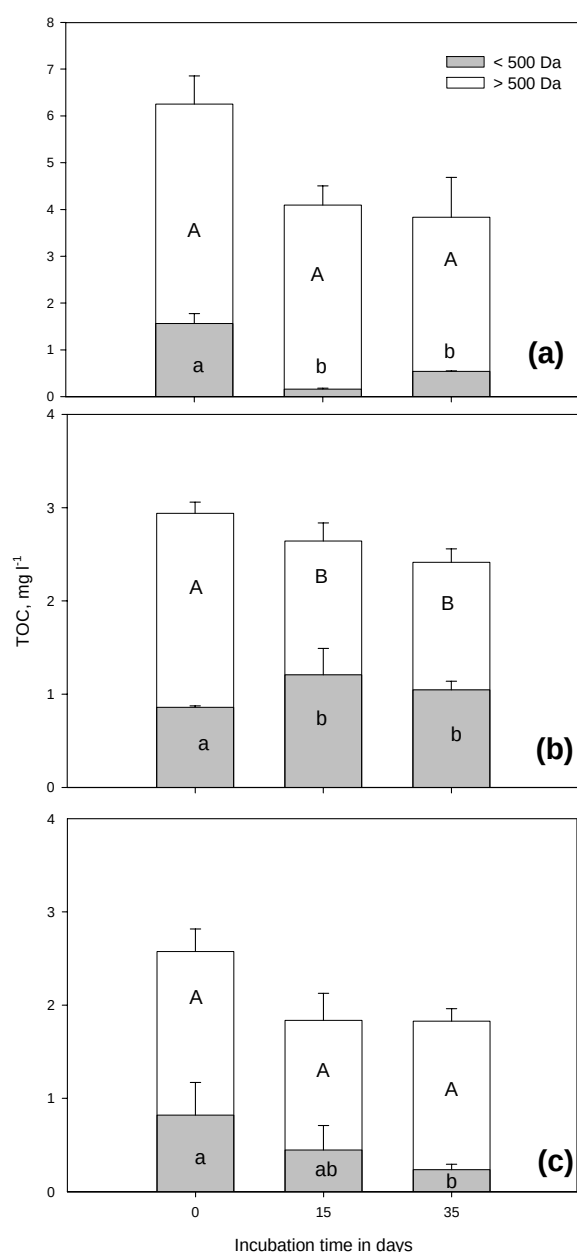


Figure 2 Percent of copper recovered in solution during the time of incubation ($t_0 = 100\%$) for the soil samples incubated with H₂O (O), HCl/CaCl₂ (Δ) and copper (□). Values are means of triplicate $\pm$ standard deviation.

The behaviour of the small (<500 Da) and large organic molecules (>500 Da) in the water extracts of the controls and copper microcosms during incubation is shown Figure 3. Copper, H₂O and HCl/CaCl₂ microcosms showed different trends. In the H₂O microcosms, the decrease in TOC observed during incubation (Table 3) was attributed to the significant decrease in small organic molecules <500 Da as soon as $t = 15$ (Figure 3,a). On the contrary, in the HCl/CaCl₂ control microcosms the decrease in TOC in solution was attributed to the decrease in larger organic molecules >500 Da (Figure 3,b). This decrease was associated however with an increase in small organic molecules <500 Da. Behaviour of organic carbon in the copper microcosms was different from the two controls: small molecules were shown to decrease only after 35 days while large molecules remained stable during the time of incubation (Figure 3,c).



A: significant differences ($p < 0.05$) between TOC > 500 Da
a: significant differences ($p < 0.05$) between TOC < 500 Da

Figure 3 Distribution of the total organic carbon in solution between small (lower than 500 Da) and large organic molecules (higher than 500 Da) as determined by ultrafiltration, for the three types of microcosms during the time of incubation (a) microcosm H₂O, (b) microcosm HCl/CaCl₂ and (c) microcosm CuCl₂.

1.4.3. Theoretical copper speciation in solution

At $t=0$, theoretical calculations with the ECOSAT model indicated that for H₂O microcosm 99% of total copper concentration was in the form of organic complexes, the remaining being in the free Cu²⁺ form and complexed with inorganic ligands (Table 4). For the HCl/CaCl₂ microcosms, where both organic carbon and pH values were lower, theoretical calculations gave rather comparable speciation: 90% of total copper was in the

organic form and 8% in the free form. But for the copper microcosms where the total copper contents in solution were higher (Table 3), we calculated that only 40% of total copper was in the organic form and as much as 56% was in the free form, the remaining being in the inorganic forms (Table 4).

During incubation, speciation of copper in solution did not change significantly for the two H₂O and HCl/CaCl₂ control microcosms, but significant changes were observed for the copper microcosms: free copper species decreased at the benefit of copper organic forms in solution.

	Microcosms H ₂ O	Microcosms HCl/CaCl ₂	Microcosms CuCl ₂
% of free Cu			
t = 0 days	0.9 (0.6) ^a	9.4 (1.4) ^a	55.5 (4.3) ^a
t = 15 days	1.3 (0.4) ^a	9.1 (2.1) ^a	35.3 (3.8) ^b
t = 35 days	1.8 (0.7) ^a	8.8 (5.3) ^a	46.2 (12.7) ^{ab}
% organic Cu			
t = 0 days	98.7 (0.7) ^a	89.7 (1.5) ^a	40.2 (4.5) ^a
t = 15 days	98.2 (0.5) ^a	90.2 (2.2) ^a	60.0 (3.9) ^b
t = 35 days	97.7 (0.8) ^a	90.2 (5.5) ^a	49.9 (12.1) ^{ab}
% inorganic Cu			
t = 0 days	0.4 (0.2) ^a	0.8 (0.2) ^a	4.1 (0.5) ^a
t = 15 days	0.6 (0.1) ^a	0.7 (0.1) ^a	4.6 (0.5) ^a
t = 35 days	0.5 (0.1) ^a	1.0 (0.4) ^a	3.9 (0.6) ^a

Different letters within columns and for one copper species indicate significance at $p < 0.05$

Table 4 Theoretical calculations of Cu speciation in the soil water extracts of the three microcosms: H₂O, HCl/CaCl₂ and copper at three times of incubation, determined by the model ECOSAT using the experimental values of total contents of major and trace elements

1.5. Discussion

1.5.1. Relevant biological descriptors of soil copper impact

Results of amounts of CO₂ released during incubation suggested that the spike of copper had as much effect on soil respiration as did the soil acidification with HCl. We confirm in our study that carbon mineralization is not a good descriptor of soil copper impact, such measurements being too global to point out specific effects. For example, Giller et al. (1998) reported that respiration can be unaffected, slightly reduced or increased in metal contaminated soils.

When copper impact was expressed with the number of viable heterotrophic bacteria, an effect was observed in the first days of the incubation but not thereafter. The use of only an H₂O control can not allowed to conclude on the pertinence of VH data as descriptor of soil

copper impact. However, results suggested an attenuation of copper addition impacts, not pointed out with CO₂ released measurements.

Enumeration of copper resistant bacteria gave another insight of the copper addition impact but Cu^R results were found in accordance with the results of VH counting i.e. with the fact that much impact of copper addition is observed at t= 15 days, while less impact is seen until 35 days. But enrichment of copper resistant bacteria is more powerful descriptor, as it can be directly linked to the presence of copper. The evolution of this biological descriptor during incubation strongly suggests that some added copper species were readily bioavailable at least during the first days of incubation. Indeed, several authors proposed that the degree of enrichment in metal resistant bacteria can be used as a sensitive measure of metal bioavailability in soil (Duxbury and Bicknell, 1983; Huysman et al., 1994; Olson and Thornton, 1982).

1.5.2. Copper addition at t=0: abiotic processes

Taking into account that at t=0 only the abiotic processes due to copper addition can be assessed, our results on soil solution characteristics showed an impact of the soil copper addition both on solution pH and ionic strength, and suggested an impact on the adsorption/desorption equilibrium of soil organic carbon. Indeed, the lower organic carbon content in solution in the copper microcosms can be attributed to the adsorption of organo-metallic complexes on the soil matrix via cation bridging or by the decrease of organic solubility due to copper complexation (Evanko and Dzombak, 1998; Tipping and Woof, 1990; Tipping and Woof, 1991). Such a decrease in organic solubility was also observed in the HCl/CaCl₂ microcosms, where the introduction of Ca²⁺ as a divalent cation mimicked the ability of Cu²⁺ to disturb the adsorption/desorption equilibrium of soil organic carbon. Consequently, the presence of organic matter in higher contents in the soil extracts of the H₂O microcosms together with higher pH values (above 7) induced a particular copper speciation in solution. This speciation was not in favour of the presence of free copper species as stated by theoretical calculations. Free ionic forms of metals in solution are expected to be more impacting on microorganisms according to the free ion activity model (Brown and Markich, 2000). The results of theoretical calculation by ECOSAT showed therefore the extend of possible impact in copper microcosms with more than 50 % of free copper forms in solution compared to less than 10 % in the H₂O and HCl/CaCl₂ microcosms.

1.5.3. Evolution of the chemical soil water extracts characteristics during incubation

The striking fact during incubation was the great decrease of total copper contents in solution in copper microcosms which suggests important changes in speciation for Cu. Similar observations have been made by Wang and Staunton, (2006) who studied the time-course of copper water-extractable, either native or added to a soil sample, after introduction of leaf compost or lucerne straw. However they found that the extractability of added copper increased with dissolved organic carbon, a result we did not observe. Our results rather suggest that organic carbon and copper in solution may have different pathways whose links are not easy to establish, taking into account both microbial processes and abiotic processes. However, chemical data and theoretical calculations showed an increase in copper organic forms between 0 and 15 days. This evolution of copper speciation was consistent with an attenuation of copper impact as seen by the biological data.

The different behaviour of large and small molecules indicated that the impact of added copper can be differentiated from the one of the acidification and the presence of a divalent cation (Figure 3). Such data concerning the dynamic of organic carbon in solution however were too much integrative to be ascribed to a particular mechanism, but they were obviously related to a chemical descriptor of the copper impact in soil.

The decrease in organic molecules <500 Da during incubation observed for the H₂O and the copper microcosms was consistent with the results of Ström et al. (2001) and van Hees et al. (2005) who showed that small organic molecules were rapidly and preferentially degraded in soil by microorganisms. But for the HCl/CaCl₂ control microcosms, small molecules increased during incubation while large molecules decreased, suggesting that either an accumulation or a desorption of small molecules and/or a degradation of higher molecules were favoured. Accumulation of microbial metabolites during incubation of DOM have already been observed in the work of Kalbitz et al. (2003b) who suggested that for low contents of carbohydrates in solution, microorganisms were able to use other compounds as energy sources such as lignin-derived molecules or lipids thus inducing a production of microbial metabolites in DOM.

Differences in the behaviour of organic molecules in the two H₂O or HCl/CaCl₂ control microcosms may thus be the expression of different natures of TOC in solution, depending on the organic carbon retained in the soil matrix. Consequently, organic molecules in solution in the copper spiked microcosms were more likely to resemble to that of the

HCl/CaCl₂ ones, and their different dynamics in the absence or presence of copper strongly supported that copper disturbed the dynamic of organic matter in solution. Marschner and Kalbitz (2003) and Kalbitz et al. (2003a) showed that primary factor controlling DOM biodegradability were structural characteristics and properties, more than molecular size. The fact that the decrease in small organic molecules with time was slower in the copper microcosms compared to the H₂O controls may be the result of i) different natures of organic carbon in solution, or ii) to a more difficult degradation of molecules of the same nature than those which accumulate in the HCl/CaCl₂ microcosms. Theoretical speciation of copper in copper microcosms indicated around half of total copper in complexed forms with organic matter and such interactions may diminish their biodegradation. Indeed, in a laboratory experiment Renella et al. (2004) monitored the degradation of citrate and oxalate complexed with Cd, Cu, Mg, Pb and Zn in clay alkaline soil. Their results showed that biodegradation of citrate or oxalate linked to Cu, Cd and Pb was lower than that of oxalate and citrate complexed with Mg.

1.5.4. Relationship between biological and chemical data

With the variations of TOC and Cu contents during incubation, the chemical descriptors chosen in this study aimed at giving the characteristics of the soil solution as the result of abiotic and biotic processes. The biological descriptors aimed at describing the impact of copper on the number of specific soil bacteria and on a part of their activity as seen by the mineralization of organic carbon. These descriptors are thus not expected to show the same trends: the first ones integrate many processes while the last ones (except mineralization) are more closely related to the impact of copper on soil bacteria. But a subtle link can be made between the chemical and the biological approaches, related to the bioavailability of copper as a “stressing agent”.

Combining our results from both the biological and chemical data during incubation suggested a more important change in Cu speciation towards less bioavailability in the copper microcosms than in the control one including the mimicked microcosms. Changes in metal speciation towards less toxic species in solution during incubation of leaves of metallophyte in soil microcosms were already observed by Boucher et al. (2005a).

For our soil sample, the biological descriptors indicated a copper impact as soon as 15 days of incubation after copper addition, resulting in an increase in copper resistant bacteria and a decrease in viable heterotrophic bacteria. The corresponding changes in chemical descriptors were the evolution of the copper speciation, not observed in the control

microcosms, and an impact of copper added on the TOC dynamic in solution clearly differentiated from a pH or an ionic strength effect. The attenuation of the impact noted from the biological VH or Cu^R descriptors was also seen through the chemical descriptors chosen.

Thus biological descriptors together with chemical descriptors were found complementarily to approach the mechanisms involved in the copper impact, provided that chemical considerations are taken into account.

1.6. Acknowledgments

This work was partly supported by a PN/ACI “ECCO” project in the frame of the Concerted Action ECODYN. We thank Anne Jaulin for its advises in atomic absorption analysis, Fanny Perreau and Sébastien Breuil for their technical help, The Région Ile de France and INRA for a grant for J. Sebastia., and the Région Bourgogne and The Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne for a grant for D.P.H. Lejon.

1.7. References

Aoyama, M., Itaya, S., 1995. Effects of copper on the metabolism of ¹⁴C-labeled glucose in soil in relation to amendment with organic materials. *Soil Science and Plant Nutrition* 41, 245-252.

Besnard, E., Chenu, C., Robert, M., 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution* 112, 329-337.

Boucher, U., Lamy, I., Cambier, P., Balabane, M., 2005a. Decomposition of leaves of the metallophyte *Arabidopsis halleri* in soil microcosms: Fate of Zn and Cd from plant residues. *Environmental Pollution* 135, 323-332.

Brown, P.L., Markich, S.J., 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquatic toxicology* 51, 177-194.

Burba, P., Aster, B., Nifant'eva, T., Shkinev, V., Spivakov, B.Ya., 1998. Membrane filtrations studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview Part1. Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration. *Talanta* 45, 977-988.

Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F., 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Review* 14, 121-137.

Chander, K., Brookes, P.C., 1993. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 1231-1239.

Dumestre, A., Sauvé, S., McBride, M., Baveye, P., Berthelin, J., 1999. Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 124–131.

Duxbury, T., Bicknell, B., 1983. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology & Biochemistry* 15, 243-250.

Evanko, C.R., Dzombak, D.A., 1998. Influence of structural features on sorption of NOM-analogue organic acids to goethite. *Environmental Science and Technology* 32, 2846–2855.

Fotovat, A., Naidu, R., 1998. Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma* 84, 213-234.

Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109-119.

Ge, Y., MacDonald, D., Sauve, S., Hendershot, W., 2005. Modeling of Cd and Pb speciation in soil solutions by WinHumicV and NICA-Donnan model. *Environmental Modelling and Software* 20, 353-359.

Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1389-1414.

Gordon, A.S., Howell, L.D., Harwood, V., 1994. Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 408-411.

Huysman, F., Verstraete, W., Brookes, P.C., 1994. Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biology & Biochemistry* 26, 103-110.

Kalbitz, K., Schwesig, D., Schmerwitz, J., Kaiser, K., Haumaier, L., Glaser, B., Ellerbrock, R., Leinweber, P., 2003b. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 1129-1142.

Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D., Matzner, E., 2003a. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113, 273-291.

Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.-H., Michalzik, B., Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165, 277–304.

Keizer, M.G., van Riemsdijk, W.H., 2005. A computer program for the calculation of speciation and transport in soil-water system Version 4.8. User manual, Department of Soil Quality, Wageningen University, The Netherlands.

Knight, B., McGrath, S.P. and Chaudri, A.M., 1997. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper or zinc. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 39-43.

Kunito, T., Saeki, K., Goto, S., Hayashi, H., Oyaizu, H., Matsumoto, S., 2001a. Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresource Technology* 79, 135-146.

Kunito, T., Saeki, K., Nagaoka, K., Oyaizu, H., Matsumoto, S., 2001b. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *European Journal of Soil Biology* 37, 95-102.

Lombi, E., McLaughlin, M.J., Hamon, R.E., 2005. Chemical considerations in the interpretation of toxicity of metals in soils. In *Final Proceeding of the 8th International Conference of Biogeochemistry of Trace Elements*. CSIRO, Adelaide, Australia, pp 384-385.

Marschner, B., Kalbitz, K., 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113, 211-235.

Merritt, K.A., Erich, M.S., 2003. Influence of organic matter decomposition on soluble carbon and its copper-binding capacity. *Journal Environmental Quality* 32, 2122-2131.

Milne, J., Kinniburgh, D.G., Tipping, E., 2001. Generic NICA-Donnan model parameters for proton binding by humic substances. *Environmental Science and Technology* 35, 2049-2059.

Milne, J., Kinniburgh, D.G., Riemsdijk, W.H.V., Tipping, E., 2003. Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances. *Environmental Science Technology* 37, 958-971.

Olson, B.H., Thornton, I., 1982. The resistance patterns to metals populations in contaminated land. *Journal of Soil Science* 33, 271-277.

Parat, C., Chaussod, R., Lévêque, J., Andreux, F., 2005. Long-term effects of metal-containing farmyard manure and sewage sludge on soil organic matter in a fluvisol. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 673-679.

Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-monrozier, L., Nazaret, S., 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology* 24, 321-331.

Reemtsma, T., Bredow, A., Gehring, M., 1999. The nature and kinetics of organic matter release from soil by salt solutions. *European Journal Soil Science* 50, 53-64.

Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P., 2004. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma* 122, 311–315.

Smolander, A., Kitunen, V., 2002. Soil microbial activities and characteristics of dissolved organic C and N in relation to tree species. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 651-660.

Speir, T.W., Kettles, H.A., Percival, H.J., Parshotam, A., 1999. Is soil acidification the cause of biochemical responses when soils are amended with heavy metal salts? *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1953-1961.

Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., Jones, D.L., 2001. Organic acid behavior in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 2125–2133.

Thornton, I., 1999. Bioavailability of trace metals in the foodchain. In *Final Proceeding of the 5th International Conference of Biogeochemistry of Trace Elements*. Vienna, Austria, 1999; pp 11-14.

Tipping, E., Woof, C., 1990. Humic substances in acid organic soils: Modelling their release to soil solution in terms of humic charge. *Journal of Soil Science* 41, 573-586.

Tipping, E., Woof, C., 1991. The distribution of humic substance between the solid and aqueous phases of acid organic soils: A description based on heterogeneity and charge-dependent sorption equilibria. *Journal of Soil Science* 42, 437-448.

Tipping, E., Rey-Castro, C., Bryan, S.E., Hamilton-Taylor, J. 2002. Al(III) and Fe(III) binding by humic substances in freshwaters, and implications for trace metal speciation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 3211-3224

Trevor, J.T., 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiology Science* 4, 29-31.

van Hees, P.A.W., Jones, D.L., Finlay, R., Godbold, D.L., Lundström, U.S., 2005. The carbon we do not see—the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1–13.

Wang, G., Staunton, S., 2006. Evolution of water-extractable copper in soil with time as a function of organic matter amendments and aeration. *European Journal of Soil Science* 57, 372-380.

Zhou, L.X., Wong, J.W.C., 2001. Effect of dissolved organic matter from sludge and sludge compost on soil copper sorption. *Journal of Environmental Quality*, 30: 878-883.

Chapitre VI.

Prévision de la spéciation du cuivre dans les sols : prise en compte des MOS

Chapitre VI. Prévision de la spéciation du cuivre dans les sols : prise en compte des MOS

Dans ce chapitre, nous avons regroupé nos différents résultats exposés dans les chapitres précédents pour :

- ✧ Hiérarchiser la réactivité des fractions organiques vis-à-vis du Cu
- ✧ Paramétrer le modèle et intégrer nos données de réactivité
- ✧ Tester différents scénarios de prise en compte des MOS dans la prévision de la spéciation du cuivre dans les sols. La validation de ces différents scénarios a été effectuée grâce aux données expérimentales : d'extractions séquentielles, de fractionnements granulodensim triques et de concentrations en cuivre en solution.

La prévision de la spéciation du cuivre dans le sol a été réalisée :

- ✧ Pour NA, S et CC, sols ayant des statuts organiques différents,
- ✧ Et pour ces mêmes échantillons à leur teneur initiale en Cu (60 mg/kg) et contaminés artificiellement après ajout de cuivre (250 mg /kg).

1. Réactivité des différentes fractions des MOS

Au cours des chapitres précédents, nous avons étudié la réactivité avec le cuivre de cinq fractions des MOS : MOP grossières, MOP fines, AF sol total, AF < 20 μ m et pool bactérien du sol. L'utilisation du même outil analytique (potentiométrie), d'un même programme pour l'exploitation de ces données (FITEQL) et de conditions expérimentales équivalentes, rend possible la comparaison et la hiérarchisation de la réactivité de ces différentes fractions organiques.

Pour comparer cette réactivité, deux paramètres sont à prendre en compte :

- i) L'affinité de la fraction organique avec le cuivre qui s'exprime à travers la constante de complexation.
- ii) La capacité de fixation de la fraction organique des MOS qui se traduit par la quantité de sites titrables.

1.1. Affinité avec le cuivre

Les constantes de complexation du cuivre pour les cinq fractions de MOS sont reprises dans le Tableau 6.1. Les MOP et les bactéries sont les fractions des MOS qui ont la plus grande affinité avec le Cu. Les AF extraits du sol total ou de la fraction < 20  m possèdent des affinités avec le cuivre plus faibles que les bactéries ou les MOP.

Fractions organiques des MOS	Log K					
	COO-Cu			COO-CuOH		
	NA	S	CC	NA	S	CC
MOP 200-2000 �m‡	4,61	4,49	4,61	6,71	6,42	6,34
MOP 50-200 �m‡	4,45	4,35	4,29	6,63	6,79	6,51
Bactéries*	nd	4,05	3,75	nd	5,98	5,69
AF < 20�m *	3,69	3,60	3,42	5,01	4,87	5,02
AF sol total*	3,27	3,43	3,12	3,87	4,91	4,79

‡ rapport ligand sur métal égal à 8

* rapport ligand sur métal égal à 4

Tableau 6.1 Récapitulatif des constantes de complexation du cuivre avec les groupements carboxyliques pour les différentes fractions organiques étudiées

1.2. Quantité de sites titrables

La capacité de fixation de chaque fraction des MOS a été exprimée soit par g de matériau, soit par g de carbone de la fraction ou bien par g de carbone du sol (Tableau 6.2). Les calculs suivants ont permis de prendre en compte une représentativité de chaque fraction dans le sol :

  Pour les MOP : Masse de MOP extraite (Table 1, article Chapitre III) multipliée par la teneur en sites des MOP (Table 2, article Chapitre III).

  Pour les bactéries : 50 % de la biomasse (mg C/ Kg de sol) (Tableau 1.6, Chapitre I) multiplié par 2 (approximation bactérie = 50 % de C) et multiplié par la teneur en sites du pool bactérien (Table 1, article Chapitre IV).

  AF < 20  m : Nous avons considéré que 50% du C localisé dans la fraction fine du sol (0-20 m) (Figure 1, article Chemosphere Chapitre II)  taient sous la forme de substances humiques assimilées à des AF. Nous avons multiplié cette quantité de carbone par la teneur en sites des AF extraits de la fraction < 20  m (Table 1, article Chemosphere Chapitre II)

  AF sol total : Nous avons considéré la quantité de SH solubilisée après épuisement à la soude (Figure 1, article Chemosphere Chapitre II) et avons affecté le pourcentage d'AF

dans les SH (Figure 2.3, Chapitre II). Nous avons ensuite multiplié cette quantité par la teneur en sites des AF extraits du sol total (Table 1, article Chemosphere Chapitre II)

Fractions organiques des MOS	10 ⁻⁴ eq/g de matériau			10 ⁻⁴ eq/g C de la fraction			10 ⁻⁴ eq/g C du sol		
	NA	S	CC	NA	S	CC	NA	S	CC
MOP 200-2000 �m	2,06	2,45	2,19	5,75	7,18	5,83	0,78	0,83	1,67
MOP 50-200 �m	4,04	4,80	6,27	21,27	23,52	21,18	2,66	3,41	4,60
Bactéries	nd	11,79	9,82	nd	23,58	19,64	nd	0,21	0,12
AF < 20�m	14,85	21,75	29,85	29,7	43,5	59,7	8,3	12,18	9,85
AF sol total	36,1	26,85	33,60	72,2	53,7	67,2	14,1	9,66	7,28

Tableau 6.2 Capacité de fixation du cuivre des fractions organiques extraites exprimée en g de matériau, en g de C de la fraction ou en g de C du sol.

Les capacités de fixation des différentes fractions organiques sont dans la gamme de celles proposées pour les MOS dans la littérature (17 à 86 10⁻⁴ eq/g C ; Baize, 2002) excepté pour les MOP grossières (Tableau 6.2).

Que l'on considère la capacité de fixation par gramme de matériau ou par gramme de carbone, les AF (< 20  m et sol total) sont les fractions qui ont la plus grande capacité à complexer les métaux pour NA, S et CC. Ce résultat est concordant avec la littérature, les AF possédant toujours les plus grandes capacités à fixer les métaux par rapport à des bactéries ou à des collo ides (e.g. Fein et al., 1997 ; C teau, 2004 ; Plaza et al., 2005a). A l'opposé, les MOP 200-2000  m possèdent les plus faibles capacités à complexer les métaux pour nos trois sols. Ce résultat semble logique car il s'agit de débris de plantes peu décomposés. La capacité de fixation des bactéries est soit supérieure, soit inférieure à celle des MOP 50-200 m, dépendant de la façon dont elle est exprimée (g de matériau ou g de C) et du sol considéré (S ou CC).

Pour considérer la représentativité de chaque fraction dans le sol, nous avons ramené la capacité de fixation par gramme du carbone du sol. On peut considérer que la fraction des AF extraits du sol total est la résultante d'une extraction plus ou moins complète des autres fractions. On observe pour NA que la capacité de fixation des AF sol total est supérieure à la somme de la capacité de fixation des autres fractions, alors qu'elle est inférieure pour S et CC. Ce résultat suggère pour NA qu'une partie non négligeable des fractions des MOS (MOP, bactérie, AF<20  m) peut contribuer à la capacité de fixation des AF sol total, ce qui est probablement moins le cas pour S et CC.

Dans nos sols (NA, S et CC), les MOP fines et les AF < 20 μm sont les deux principales fractions qui vont contribuer à la complexation des métaux. Les bactéries et les MOP grossières auront une contribution moins importante en terme de sites complexants. Autrement dit, la représentativité des MOP fines et des AF < 20 μm dans le sol est grande comparativement aux bactéries et aux MOP grossières.

Les MOP fines possédant la plus forte affinité avec le cuivre et une grande représentativité dans le sol pour leur capacité de fixation, seront donc une des fractions des MOS qui aura potentiellement une grande capacité à fixer les métaux dans les sols.

2. Modèle, scénarios et données d'entrée

2.1 Le modèle multi-surfaces utilisé

Pour prévoir la spéciation du Cu dans NA, S et CC, nous avons pris en considération les MOS mais aussi les autres phases réactives du sol, en particulier les oxydes de manganèse, les oxydes de fer et les argiles. Nous avons ainsi utilisé un modèle multi-surfaces permettant de décrire plusieurs surfaces réactives (Figure 6.1). Pour réaliser les prévisions de la spéciation du Cu, le code de calcul d'ECOSAT a été choisi car :

- Il contient une base de données conséquente sur les fractions minérales et surtout sur les substances humiques
- Il a déjà été utilisé pour déterminer la spéciation des métaux dans les sols sableux et dans leur solution, avec succès (e.g. Weng et al, 2001,2002 ; Cancès et al., 2003 ; Ponthieu, 2003). Nous avons cherché à l'appliquer ici sur des sols argilo-limoneux.

Le schéma conceptuel des réactions pour décrire l'interaction du cuivre avec les différentes phases réactives du sol est donné ci-après.

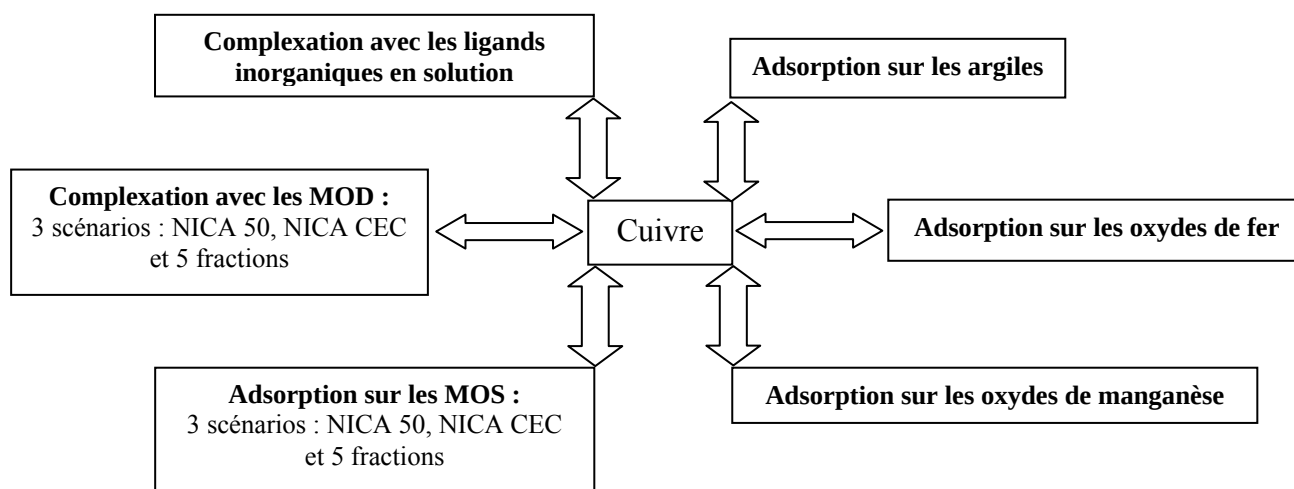


Figure 6.1 Schéma conceptuel du modèle multi-surfaces utilisé (inspiré de Weng et al., 2001)

2.2 Données générales d'entrée

Pour réaliser la spéciation du cuivre, des données sur la solution et sur la phase solide du sol sont nécessaires. Les données d'entrée pour la phase solide seront explicitées au fur et à mesure de la description des différentes phases réactives, au cours des paragraphes suivants.

↳ Le fond géochimique en cuivre, apprécié à la fois par les extractions séquentielles (fraction résiduelle) et par les travaux de Meneghetti (2005), est d'environ 16 mg/kg de sol. Celui-ci a été retranché de la teneur en cuivre total du sol qui a été insérée dans le programme car nous le considérons non réactif.

↳ Les concentrations des différents cations et anions, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de la solution du sol sont celles déterminées après extraction sol-eau à $t=0j$ et sont données à l'Annexe G.

2.3 Phases minérales réactives

2.3.1. Les oxydes de fer

La quantité d'oxydes de fer introduite dans ECOSAT correspond à la teneur en fer extrait du sol par le protocole de Mehra et Jackson (1959) (Annexe I). Pour décrire la réactivité des oxydes de fer, nous avons utilisé le modèle développé par Dzombak et Morel (1990) (2 sites DDL model) proposé par ECOSAT (Annexe H).

Nous avons cependant adapté la valeur de la surface spécifique du modèle ($600\text{m}^2/\text{g}$) à nos échantillons. En effet, les surfaces spécifiques sont très différentes entre les oxydes de fer amorphes (de 160 à $700\text{ m}^2/\text{g}$) et cristallisés (de 30 à $71\text{ m}^2/\text{g}$) (Buffle, 1988). Or, la surface spécifique est utilisée par ECOSAT pour transformer une quantité d'oxydes en une concentration en sites (valeur importante car elle détermine une capacité à fixer le cuivre, cf. ci-après). Garder une surface spécifique de $600\text{ m}^2/\text{g}$ conduit donc à attribuer aux oxydes de fer une très grande capacité à fixer le Cu. Nous avons choisi d'établir cette surface spécifique à $100\text{ m}^2/\text{g}$ pour NA, S et CC, valeur plus réaliste pour nos sols. Cette surface spécifique correspondrait à un mélange constitué de 50% d'oxydes de fer amorphes à $160\text{ m}^2/\text{g}$ et 50 % d'oxydes de fer cristallisés à $32\text{m}^2/\text{g}$. La présence d'oxydes de fer cristallisés dans nos échantillons a été mise en évidence dans les fractions fines du sol par analyse aux rayons X (Annexe J).

ECOSAT transforme la quantité d'oxydes de Fer en une concentration en sites de la manière suivante :

Cs = concentration en sites

Q = quantité d'oxydes de Fer (kg/l)

Ds = densité de sites (sites/nm², pré-programm e)

S = surface spécifique (m²/kg)

Na = nombre d'Avogadro (6,022 10²³ mol⁻¹)

$$C_s = \frac{Q \times D_s \times S \times 10^{18}}{N_A}$$

2.3.2. Les oxydes de Mn

La quantité d'oxydes de Mn introduite dans le programme est égale à la teneur en manganèse extrait par le protocole de Chao (1972) (Annexe I). Pour la réactivité des oxydes de Mn, nous avons utilisé les données de réactivité déterminées par Ponthieu (2003) avec NICA-Donnan pour la birnessite (Annexe H). La quantité d'oxydes de Mn est ensuite transformée par ECOSAT en une concentration en sites de la manière suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Quantité d'oxydes de Mn (kg/l)} \times \text{Teneur en sites (préprogrammée, mol/kg)} \\ & = \text{Concentration en sites (mol/l)} \end{aligned}$$

2.3.3. Les argiles

Pour les argiles, nous avons utilisé le modèle de Gaines-Thomas et considéré que les argiles sont saturées en Ca. La constante d'échange du Ca par le Cu (K Ca→Cu) sur les argiles a été fixée à 4,58. Cette valeur provient du K Ca→Ni pour une kaolinite (Bansal, 1982) car nous n'avons pas trouvé de valeur K Ca→Cu dans la littérature.

La CEC des argiles de nos sols introduite dans ECOSAT a été approximée par la formule reportée dans le Tableau 6.3 (Baize, 2002). La CEC des argiles de NA, S et CC est d'environ 36 meq/100g.

$CEC_{arg} = \frac{T - (MO \times 2) \times 100}{A}$ CEC arg : CEC des argiles en meq/100g T : CEC du sol en meq/100g A : taux d'argile en % MO : taux de MO en % 2 : la CEC de la MO exprimée en meq pour 1% de MO	Valeurs calculées : NA = 38 meq/100g S = 40 meq/100g CC = 30 meq/100g Valeur moyenne : 36 ± 5 meq/100g
--	---

Tableau 6.3 Calcul de la CEC du cortège des argiles pour NA, S et CC

Ces résultats sont cohérents avec les analyses aux rayons X effectuées sur la fraction < 20  m de nos sols. Ces analyses révèlent la présence d'illite, kaolinite et d'argiles gonflantes du type dont la CEC varie entre 3 et 150 meq/100g d'après la littérature.

La CEC des argiles introduite dans ECOSAT a donc été de 0,36 mol/kg, valeur moyenne des CEC des argiles calculées pour NA, S et CC. ECOSAT transforme ensuite la quantité d'argiles introduite en une concentration en sites de la manière suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Quantité d'argiles (kg/l)} \times \text{CEC des argiles (déterminée par le calcul, mol/kg)} \\ & = \text{Concentration en sites (mol/l)} \end{aligned}$$

2.4. Les 3 scénarios de prise en compte des MOS

2.4.1. Scénario NICA 50

Pour ce scénario, nous avons utilisé la base de données d'ECOSAT. La réactivité des MOD et MOS a été décrite par le modèle NICA-Donnan. Seules les quantités de MOS et de MOD (en kg/l, nécessaires pour le calcul car non préprogrammées) ont été introduites, reposant sur différentes approximations :

↳ La réactivité des MOS est assimilée à celle des AH (e.g. Weng et al., 2001 ; Cancès et al., 2003 ; Lumsdon, 2004). 50 % de la teneur en matière organique du sol (= teneur en carbone du sol $\times 1,72$) est considérée réactive (Ponthieu, 2003). La base de données d'ECOSAT (données décrites par Milne et al., 2001,2003) est utilisée. ECOSAT affecte pour une quantité d'AH (en kg/l), une concentration en sites (mol/l) qui se répartit en deux types de sites (COOH et OH) par le cheminement suivant :

$$\begin{aligned} & \text{Quantité d'AH (kg/l)} \times \text{Teneur en sites préprogrammée (OH ou COOH, mol/kg)} \\ & = \text{Concentration en sites (OH ou COOH mol/l)} \end{aligned}$$

↳ La réactivité des MOD est assimilée à celle des AF (Gustafsson et Schaik, 2003 ; Ge et al., 2005). La quantité de MOD introduite dans le programme correspond à 65 % du COD (Ge et al., 2005) multiplié par 2 (sur la base de l'hypothèse: AF = 50 % de C). La base de données d'ECOSAT est utilisée. ECOSAT effectue le même cheminement que pour les AH pour déterminer les concentrations en sites, avec une teneurs en sites COOH et OH préprogrammées.

2.4.2. Scénario NICA CEC

Ce scénario diffère du précédent par le fait que nous avons contraint la concentration en sites des MOS et MOD calculée par ECOSAT. Pour les MOS, cette concentration a été contrainte par la CEC du sol (cf. 2.5. Validité des données d'entrée par la CEC du sol). Cette approche a déjà été utilisée par Weng et al. (2001) et MacDonald et Hendershot (2006) pour

déterminer la spéciation de métaux dans les sols. Pour les MOD, cette concentration a été contrainte à l'aide de données expérimentales obtenues pour les AF extraits du sol total.

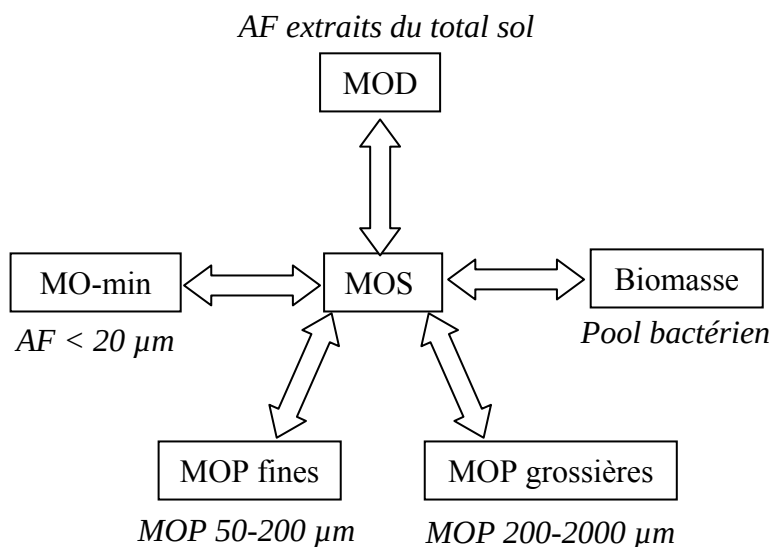
↪ La réactivité des MOS est toujours assimilée à celle des AH. La base de données d'ECOSAT est toujours utilisée. La quantité de AH introduite dans ECOSAT a été calculée de manière à produire une concentration en sites égale à la CEC de la somme des 5 fractions organiques (cf. ci-après 2.4.3. Scénario 5 fractions).

↪ La réactivité des MOD est toujours assimilée à celle des AF. Nous avons considéré que 65 % du COD sont sous la forme d'AF. La base de donnée d'ECOSAT est toujours utilisée, cependant les teneurs en sites préprogrammées (OH et COOH) dans ECOSAT ont été modifiées par celles des AF du sol total (Tableau 1, article Chapitre II).

2.4.3. Scénario 5 fractions

Pour ce scénario, la réactivité des MOS a été assimilée à la somme des réactivités des 5 fractions organiques : MOP fines, MOP grossières, biomasse, MOD et matière organique liée à la surface des minéraux (MO-min) (Figure 6.2). Nous avons considéré pour ces différentes fractions organiques que :

- ↪ la réactivité des AF extraits de la fraction $< 20 \mu\text{m}$ peut être assimilée à celle de la MO-min
- ↪ la réactivité des MOD peut être assimilée à la réactivité des AF extraits du sol total
- ↪ la réactivité de la biomasse peut être décrite par celle d'un pool bactérien extrait du sol total.



Les écritures en italique correspondent aux matériaux utilisés pour décrire la réactivité des 5 fractions. La somme de la réactivité des MOS est assimilée à la somme des réactivités de ces 5 fractions

Figure 6.2 Schéma conceptuel du scénario 5 fractions

Les concentrations en sites pour chacune de ces fractions ont été calculées de la manière suivante :

↳ Pour les MOP : Masse de MOP extraite (Table 1, article Chapitre III) multipliée par la teneur en sites des MOP (Table 2, article Chapitre III).

↳ Pour la biomasse : quantité de biomasse (Tableau 1.6, Chapitre I) multipliée par 2 (approximation bactérie = 50 % de C) et multipliée par la teneur en sites du pool bactérien (Table 1, article Chapitre IV).

↳ Pour la MO-min : 50% du C localisé dans les fractions fines (0-20 μm et 20-50 μm) (Figure 2.1, Chapitre II) ont été multipliés par la teneur en sites des AF < 20 μm (Table 1, article Chapitre II).

↳ Pour les MOD : 65 % du COD ont été multipliés par la teneur en sites des AF extraits du sol total (Table 1, article Chapitre II).

Les constantes d'affinité avec le cuivre pour ces différentes fractions sont reprises au Tableau 6.2. Les constantes d'affinité des MOD avec le Ca, Fe, Mg ont été calculées à partir des données génériques de WHAM (Tipping, 1998 ; Tipping et al., 2003) (Annexe F). Toutes les constantes intégrées dans ECOSAT ont été corrigées pour une force ionique nulle ($I=0$) à l'aide de l'équation de Davies (Annexe F).

2.5. Validité des données d'entrée par la CEC du sol

Pour valider les hypothèses effectuées sur les concentrations en sites des différentes phases minérales réactives et sur les MOS (scénario 5 fractions), nous avons comparé la CEC de nos argiles déterminée :

↳ Par le calcul, "CEC directe" (Tableau 6.3)

↳ Avec la "CEC déduite" de la CEC globale du sol moins la CEC de toutes les autres phases réactives du sol (Tableau 6.4, Sol- Σ MOS-Oxydes).

La CEC des argiles déduite est de 44 meq/100 g (Tableau 6.4), valeur proche de celle obtenue par le calcul (36 meq/100 g). Ces résultats indiquent que les approximations effectuées pour déterminer la concentration en sites pour les différentes phases réactives du sol sont cohérentes. De plus, les valeurs de la "CEC déduite" pour NA, S et CC sont comparables (Tableau 6.4). Ce résultat est cohérent car il s'agit de la même matrice sol dont la seule variable est l'apport de matière organique. Pour effectuer la prévision de la

spéciation du cuivre dans nos sols, nous avons introduit les valeurs de "CEC déduite" (Tableau 6.4) dans le programme plutôt que la "CEC directe".

	CEC en cmol ⁺ /kg de sol		
	NA	S	CC
Sol	16,80	18,60	24,30
MOP	0,39	0,75	2,51
Biomasse	0,05	0,08	0,08
MO-min	1,28	2,68	6,26
MOD	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Oxydes de Fe	0,99	0,89	0,85
Oxydes de Mn	0,26	0,23	0,24
� MOS+Oxydes	2,95	4,02	9,95
Argiles	13,83	13,97	14,35
= (Sol-� MOS-Oxydes)			
"CEC déduite" (meq/100g)	42	44	46

Tableau 6.4 CEC des différentes phases réactives de Na, S et CC

La majorité de la CEC est due aux argiles pour NA, S et CC représentant entre 60 et 80% de la CEC du sol. L'apport de matière organique a eu pour conséquence d'augmenter la contribution des MOS à la CEC (Tableau 6.4 et Figure 6.3).

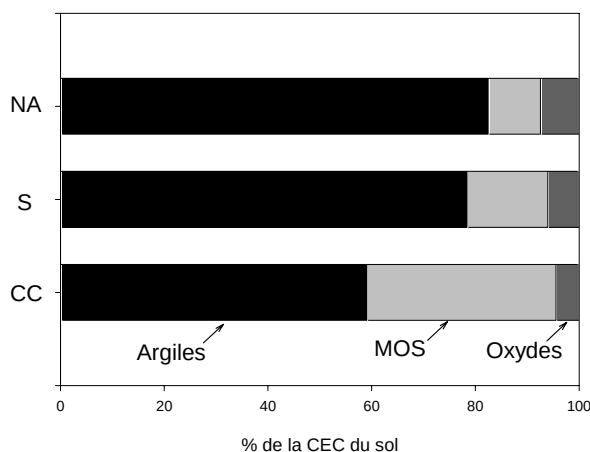


Figure 6.3 Répartition de la CEC entre les argiles, MOS et oxydes (Fer et Mn)

Si l'on additionne l'ensemble de la CEC des fractions des MOS, on obtient une CEC globale des MOS -exprimée en milliéquivalent pour 100 g de Corg des MOS- de 138 pour NA, 199 pour S et 206 pour CC. L'apport de matière organique a augmenté la CEC des MOS, ce qui est peut-être à associer à un changement de statut organique des MOS (observé lors des chapitres précédents). Les valeurs de la CEC des MOS, ainsi calculées, sont plutôt

dans les limites basses des chiffres proposés dans la littérature qui varient entre 170 et 860 meq/100 g de C (Baize, 2002).

2.6. Données de validation

Les données expérimentales sur la distribution du cuivre dans le sol (obtenues par les extractions séquentielles) et sur la concentration en cuivre dissous (Chapitre I ; Annexes G et I) ont été comparées aux données calculées pour les différents scénarios de prise en compte des MOS, afin de les valider.

De plus, les quantités de cuivre liées aux MOP (obtenues par fractionnements granulo-densimétriques) ont servi de données de validation pour le scénario 5 fractions, (Annexe G).

3. Résultats

Nous avons voulu vérifier dans cette partie quel scénario s'approchait au mieux des différents paramètres de validation décrivant notre système (Cu dissous, extractions séquentielles, quantité de cuivre liée au MOP). Le cas échéant, les données d'entrée ont été ajustées dans des limites plausibles pour que les différents scénarios s'approchent au mieux de ces paramètres.

Dans la suite de ce chapitre, la dénomination "sols 60" sera utilisée pour les sols faiblement contaminés (c'est-à-dire à leur teneur initiale) et la dénomination "sols 250" sera attribuée pour les même sols après un ajout de cuivre à 250 mg/kg.

3.1 Cuivre en solution

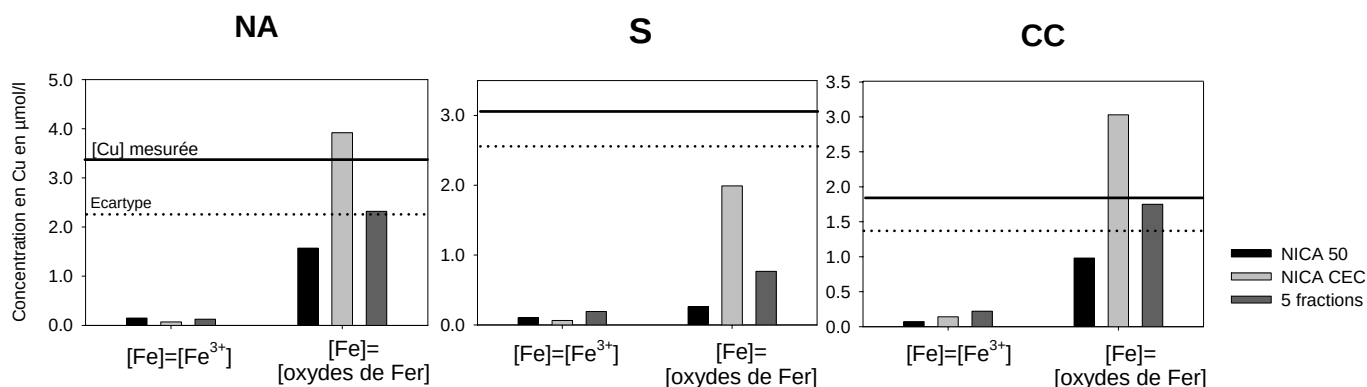
Nous avons rassemblé à la Figure 6.4 pour les trois scénarios, les résultats des calculs du cuivre dissous (Somme du cuivre libre + cuivre lié aux ligands inorganiques + Cu complexé par les MOD) et nous les avons comparés au cuivre total mesuré dans les extraits à l'eau. Dans notre cas, la forme chimique du fer va fortement influencer la concentration du cuivre en solution. En effet, sous forme Fe^{3+} , le fer est compétiteur gagnant par rapport au cuivre pour les sites complexants des MOD, ce qui va faire diminuer potentiellement la concentration en cuivre dissous. Sous forme d'oxyde de fer, il devient un ligand inorganique en solution pour le cuivre et donc va faire augmenter potentiellement la concentration en cuivre dissous. Ainsi deux hypothèses sur la forme chimique du fer en solution ont été faites :

- soit le fer est sous forme Fe^{3+}
- soit il est sous forme d'oxydes de fer

Nous avons considéré ici que les oxydes de fer en solution et en phase solide ont les mêmes réactivités.

3.1.1 Sols 60

Pour les sols 60 et le scénario NICA 50, la concentration en cuivre dissous est toujours sous-estimée quelle que soit la forme chimique du fer en solution (Figure 6.4). Pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions, par optimisation de la quantité d'oxydes de fer, la concentration en cuivre en solution peut être prévue pour NA et CC mais pas pour S (Figure 6.4). La non prise en compte de certaines phases réactives comme les oxydes de Mn (Mn en solution non dosé) permettrait peut-être de mieux prévoir la concentration du cuivre en solution pour S.



La ligne pleine représente la concentration totale en cuivre mesurée dans les extraits à l'eau
La ligne en pointillés représente la concentration totale en cuivre mesurée moins l'écartype.

Figure 6.4 Concentration en Cu en solution mesurée et calculée pour les sols 60 avec les deux hypothèses de la forme chimique du fer en solution.

3.1.2 Sols 250

Pour les sols 250, le scénario NICA 50 sous-estime la concentration en Cu dissous quelle que soit la forme chimique du fer en solution (Figure 6.5). Pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions, par optimisation de la quantité d'oxydes de fer, la concentration en cuivre en solution peut être retrouvée pour les trois sols (Figure 6.5)

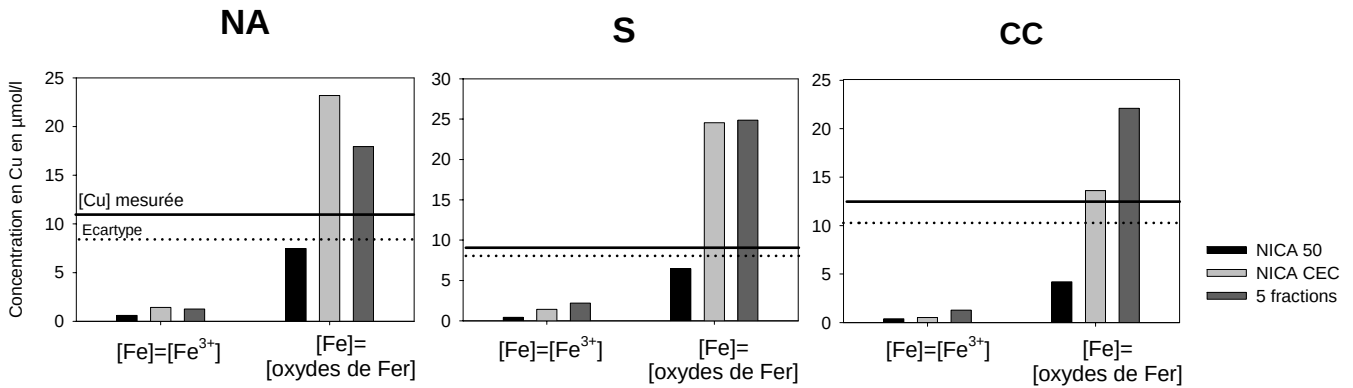


Figure 6.5 Concentration en Cu en solution mesurée et calculée pour les sols 250 avec les deux hypothèses de la forme chimique du fer en solution.

3.1.3. Comparaison des trois scénarios

Ces résultats indiquent que pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions, l'ajustement de la quantité d'oxydes de fer permettrait de retrouver la concentration du cuivre en solution, excepté pour le sol 60 S. Au contraire, pour les sols 60 et 250, le scénario NICA 50 sous-estime systématiquement les concentrations de cuivre en solution, sans qu'il soit possible de retrouver la concentration en cuivre dissous même en ajustant les quantités d'oxydes de fer. Autrement dit, sur la base d'hypothèses présentées précédemment, il est possible de retrouver la concentration en cuivre dissous, au moins pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions.

Il est évident que la détermination de la quantité de Fe et de Mn sous forme d'oxydes en solution permettrait de mieux contraindre le système, notamment pour les sols argilo-limoneux comme les nôtres.

Par la suite, les résultats ont été présentés sans optimisation de la quantité en oxydes de fer en solution car quelles que soient les hypothèses faites, la spéciation du cuivre sur la phase solide reste inchangée.

3.2. Spéciation du cuivre sur la phase solide

3.2.1. Sols 60

La Figure 6.6 représente pour les 3 scénarios la distribution du cuivre dans les principales phases réactives du sol et celle obtenue par les extractions séquentielles. On peut noter que dans nos conditions, la contribution des argiles est toujours inférieure à 0,5%.

↳ Le scénario NICA 50 : surestime la contribution des MOS comparativement aux extractions séquentielles

↳ Le scénario NICA CEC s'approche au mieux de la contribution des MOS déterminée par les extractions séquentielles (environ 30 %)

↳ Sans ajustement, le scénario 5 fractions sous-estime largement la contribution des MOS.

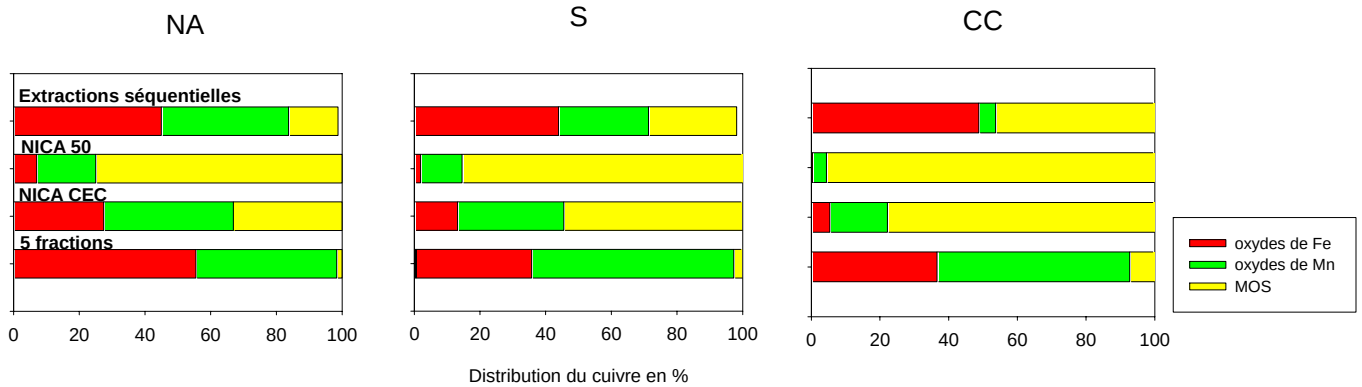


Figure 6.6 Distribution du cuivre dans les sols 60 entre les MOS, oxydes de Fe et Mn, obtenue par extractions séquentielles et par le calcul avec les trois scénarios de prise en compte des MOS

3.2.2. Sols 250

La Figure 6.7 représente la distribution du cuivre dans les principales phases réactives du sol après un ajout de cuivre de 250 mg/kg.

↳ Le scénario NICA 50 surestime largement la contribution des MOS

↳ Le scénario NICA CEC s'approche à 10 % près de la contribution des MOS obtenue par extractions séquentielles.

↳ Le scénario 5 fractions arrive bien à prévoir la contribution des MOS obtenue par extractions séquentielles pour NA et S mais sous-estime celle pour CC.

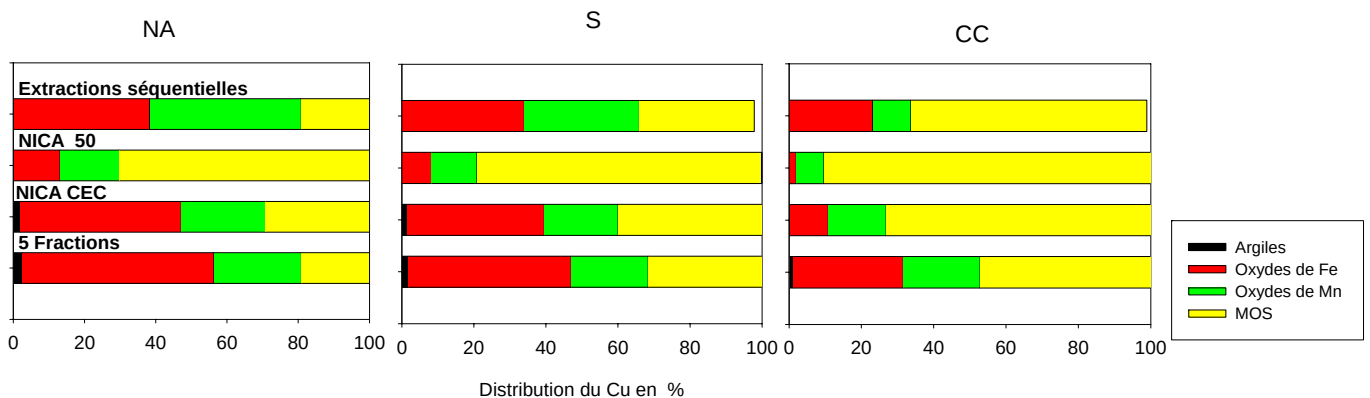


Figure 6.7 Distribution du cuivre dans les sols 250 entre les MOS, oxydes de Fe et Mn, obtenue par extractions séquentielles et par le calcul avec les trois scénarios de prise en compte des MOS

3.2.3. Comparaison des trois scénarios

Quels que soient les sols 60 ou 250, la surestimation systématique de la contribution des MOS pour le scénario NICA 50 provient d'une surestimation de la CEC des MOS. En effet, celle-ci représente plus de 35 % de la CEC totale soit 2 à 4 fois plus que la CEC de la somme des fractions organiques déterminées au cours de ce travail (Tableau 6.5). Or, dans un sol argilo-limoneux, la contribution à la CEC des MOS est minoritaire par rapport à la contribution des argiles. D'autre part, certaines fractions des MOS -comme les débris végétaux ou la biomasse- ont des concentrations en sites différentes des substances humiques (Tableau 6.2). De plus l'interaction MOS-phases minérales du sol change probablement la concentration en sites comparée aux substances humiques dissoutes et purifiées (Weng et al, 2001). En plus, Cooke et al (2007) suggère que l'utilisation des propriétés acido-basiques d'acides humiques dissoutes pour prévoir celles des acides humiques des sols peut conduire à une surestimation de la concentration en sites. Ce scénario ne décrit pas de façon satisfaisante la réactivité des MOS (i.e. concentration en sites).

	CEC en cmol/kg		
	MOS NICA 50*	Sol total‡	MOS 5 fractions [⊙]
NA	6,3	16,8	1,7
S	8,6	18,6	3,5
CC	21,1	24,3	8,8

* CEC déterminée à partir de la base de donnée d'ECOSAT pour GHA

‡ Détermination analytique

[⊙] Somme de la concentration en sites des 5 fractions (cf. Tableau 6.4)

Tableau 6.5 CEC du sol et celle des MOS pour les scénarios NICA 50 et 5 fractions

Contrairement au scénario NICA 50, le scénario NICA CEC contraint la concentration en sites des MOS par la CEC du sol (cf. 2.4.2. Scénario NICA CEC). Ce scénario est le meilleur des trois. En effet, il s'approche des contributions des MOS déterminées par extractions séquentielles et montre les mêmes tendances.

Considérant le scénario NICA CEC comme référence, le scénario 5 fractions arrive bien à représenter la réactivité des MOS pour NA et S pour les sol 250, néanmoins celui-ci sous-estime la contribution des MOS pour CC sol 250 et sol 60 NA, S et CC.

Nous avons essayé d'ajuster pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions, différents paramètres -tels que la teneur en carbone réactif dans la MO-min, la quantité d'oxydes de fer et de manganèse introduite dans ECOSAT- de façon à obtenir des contributions comparables des MOS pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions, mais sans effets : les différences entre ces deux scénarios sont restées les mêmes.

Les seuls paramètres ajustables indépendants pour ces deux scénarios sont les constantes d'affinité entre le cuivre et les MOS que nous avons introduites et qui peuvent être remises en cause. En effet, contrairement aux constantes de NICA-Donnan qui sont indépendantes du pH, de la concentration en ion métallique et donc du rapport ligand sur métal (Kinniburgh et al., 1999), nos constantes ne sont pas applicables directement à toutes les conditions physico-chimiques. Les constantes déterminées pour les différentes fractions de MOS ont été déterminées pour des rapports ligand sur métal de 4 ou 8. Il s'agit de constantes conditionnelles qui peuvent varier avec le rapport ligand/métal.

Or, si l'on compare ces rapports à ceux que l'on a dans notre système (CEC MOS sur cuivre total), les constantes utilisées pour NA et S sol 250 sont applicables, d'où les contributions comparables observées entre les scénarios NICA CEC et 5 fractions (Tableau 6.6 et Figure 6.7). Par contre, pour les sols 60 et le sol 250 CC qui s'éloignent le plus de ces rapports (Tableau 6.6), les contributions des MOS obtenue pour les scénarios 5 fractions et NICA CEC sont différentes (Tableau 6.6 et Figure 6.6).

	Rapport CEC MOS/cuivre total	
	Sols 60	Sols 250
NA	25	4
S	51	7
CC	128	19

Tableau 6.6 Rapport CEC MOS sur cuivre pour les sols 60 et 250

Nous avons donc effectué pour le scénario 5 fractions un ajustement raisonnable et identique des constantes de complexation, de façon à obtenir des contributions des MOS entre NICA CEC et 5 fractions comparables ($\pm 10\%$) pour le sol 250 CC (+ 0,5) et pour les sols 60 NA, S et CC (+ 1,50, 1,85 et 1,0 respectivement) (Figure 6.8). Lamy et al. (1988) ont montré pour des acides fulviques et un acide mimant les AH (acide polycatécholtriglycine) que plus le rapport ligand/métal augmente, plus la constante conditionnelle augmente. Ils ont observé à pH 6 et 7 pour des rapports variant de 4 à 20 une augmentation d'une unité log de

la constante conditionnelle. Les ajustements effectués sur nos constantes de complexation ne paraissent pas aberrants au vu des données.

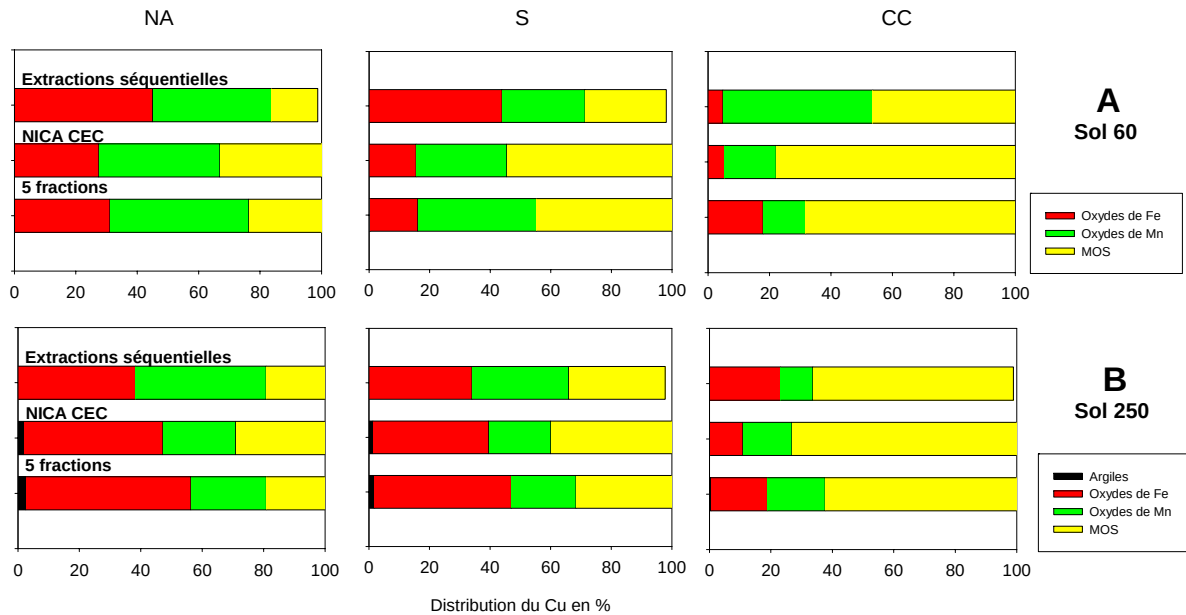


Figure 6.8 Distribution du cuivre entre les MOS, oxydes de Fe et Mn, obtenue par extractions séquentielles et par le calcul pour les scénarios NICA CEC et 5 fractions après ajustement des constantes de complexation pour les sols 60 (A) et les sols 250 (B)

3.3. Quantité de cuivre dans les MOP

Pour le scénario 5 fractions et en utilisant les constantes optimisées précédemment, la quantité de Cu liée aux MOP a été utilisée comme donnée de validation. Dans cette partie, nous présenterons les sols 250 avant les sols 60 pour deux raisons principales :

↳ Un ajustement uniquement des constantes de complexation des MOS avec le Cu pour le sol 250 CC a été nécessaire, alors que les sols 60 ont tous nécessité un ajustement.

↳ L'âge de la contamination est différent pour les sols 250 et les sols 60. Pour les sols 250 la pollution est récente, on s'affranchit par conséquent du fonctionnement du sol et de tous les phénomènes d'atténuation naturelle. Processus qui a pu avoir lieu dans les sols 60 dont la pollution est ancienne.

3.1.3. Sols 250

La Figure 6.9 compare les quantités de cuivre liées aux MOP fines et grossières obtenues par le calcul et par les fractionnements granulo-densimétriques. Pour NA, S et CC la quantité de cuivre liée aux MOP est surestimée (MOP fines NA $\times 1,5$; S $\times 2,2$; CC $\times 2,4$ et MOP grossières NA $\times 2,0$; S $\times 2,5$ et CC $\times 2,6$), néanmoins les mêmes tendances sont

observées entre les valeurs calculées et mesurées, à savoir $CC > S \approx NA$ quelle que soit la taille des MOP.

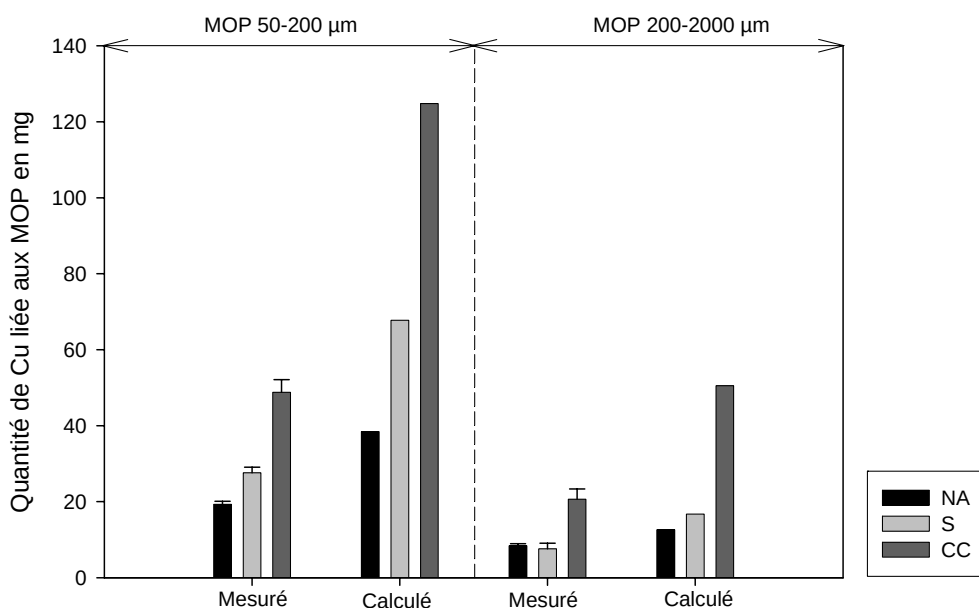


Figure 6.9 Quantités de cuivre liées aux MOP mesurées et calculées pour les sols 250

Cette surestimation correspond au fait que nous avons attribué trop de poids à la complexation du cuivre par les MOP. Dans nos calculs, nous avons considéré pour ce scénario que 100% des MOP sont réactives, sans tenir compte de leur localisation dans le sol ce qui pourrait alors diminuer le pourcentage de MOP réactives. En effet, les MOP se trouvent soit à l'intérieur, soit à l'extérieur des agrégats du sol (Besnard et al., 1996 ; Puget, 1997 ; Six et al., 2002). Il est probable que les MOP piégées dans les agrégats du sol ne pourront pas interagir efficacement avec les métaux.

Nous avons alors optimisé la quantité de MOP réactives de nos sols, de façon à obtenir les valeurs mesurées en cuivre lié aux MOP. Pour cela, nous avons fait varier le pourcentage de MOP réactives pour chaque sol et chaque taille de MOP, autrement dit nous avons fait varier la concentration en sites réactifs des MOP (donnée d'entrée dans ECOSAT). Pour effectuer ce calcul sans changer la spéciation du cuivre dans la phase solide (Figure 6.8), la quantité de sites retranchée aux MOP a été affectée à un autre compartiment constitutif de la MO-min, dont la réactivité est la même que celle des MOP. Le pourcentage de MOP réactives ainsi déterminé pour chaque sol et chaque taille de MOP, est reporté dans le Tableau 6.7.

	NA	S	CC
MOP 200-2000 μm	66%	42%	42%
MOP 50-200 μm	51%	41%	39 %

Tableau 6.7 Proportion de MOP 50-200 et 200-2000 μm réactives pour NA, S et CC.

Aucune étude dans la littérature ne s'est attachée à déterminer un pourcentage de MOP réactives. Cependant, des travaux ont déterminé la répartition massique des MOP entre l'intérieur et l'extérieur des agrégats pour différents types de travail du sol. Puget (1997) a mesuré un pourcentage de MOP extérieur aux agrégats de 44 % pour un sol (non labouré) sous monoculture céréalière, alors que Besnard et al. (1996) a mesuré 73 % des MOP extérieures aux agrégats pour un sol limoneux sous forêt. Si on assimile les MOP réactives à des MOP libres et en considérant les sols non labourés comme étant plus représentatifs de nos sols, alors nos valeurs calculées coïncident avec les valeurs de la littérature. Cela indique que ces valeurs d'ajustement sont tout à fait plausibles. Celles-ci pourraient être vérifiées par la méthode mise au point et décrite par Puget (1997). Cette méthode sépare les MOP en deux pools, soit à l'intérieur, soit à l'extérieur des agrégats. Dans notre étude sur la réactivité des MOP, nous n'avons pas fait la distinction entre ces deux pools

3.1.3. Sols 60

Les pourcentages de MOP réactives déterminés pour les sols 250 ont été affectés pour les sols 60. Nous avons alors comparé les quantités de cuivre liées aux MOP mesurées et calculées entre-elles (Figure 6.10). Celles-ci montrent des tendances identiques. Les quantités de cuivre liées aux MOP calculées sont comparables à celles mesurées pour les MOP 200-2000 μm . Ce résultat montre une certaine robustesse des approximations effectuées sur le pourcentage de MOP 200-2000 μm réactives. La localisation de celles-ci dans la matrice du sol est donc nécessaire à prendre en compte si l'on veut bien décrire la réactivité de ces MOP.

Par contre, pour les MOP 50-200 μm , les quantités de cuivre mesurées et calculées sont comparables pour NA, mais surestimées pour les sols amendés (S de 34 % et CC 39 %). Ces résultats suggèrent que tenir uniquement compte de la localisation de ces MOP ne suffit pas pour expliquer les quantités de cuivre liées à celles-ci. Il semble aussi nécessaire de prendre d'autres facteurs en compte pour prévoir les quantités de cuivre liées aux MOP 50-200 μm , comme l'historique du sol dans les cas de pollution ancienne.

↳ L'apport de matière organique -tous les 3-4 ans pour CC et tous les 2 ans pour S- provoque un non-équilibre du fonctionnement du sol comparativement à NA (pas d'apport). Ainsi, il serait possible que l'apport de matière organique ait stimulé la formation d'agrégats. Cette formation d'agrégats aurait alors favorisé un piégeage plus important de MOP qui auraient été alors moins exposées au cuivre. Mais avec cette hypothèse, toutes les quantités de métaux liées aux MOP auraient dû être surestimées pour les sols amendés, ce qui n'est pas le cas pour les MOP 200-2000 μm .

↳ Si l'on y rajoutait la dynamique de formation des agrégats, ce facteur permettrait peut-être de mieux expliquer les bonnes prévisions pour les MOP 200-2000 μm comparativement aux MOP 50-200 μm .

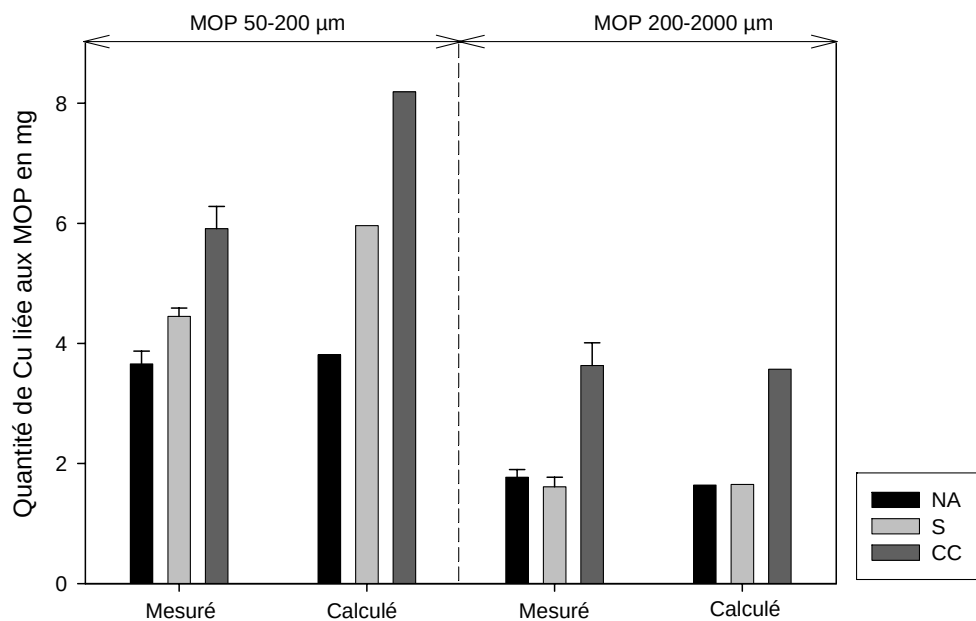


Figure 6.10 Quantités de cuivre liées aux MOP mesurées et calculées pour les sols 60

Au cours de ce chapitre, nous avons tout d'abord comparé et hiérarchisé la réactivité des différentes fractions organiques étudiées au cours de ce travail. Les MOP fines (50-200 μm) apparaissent comme l'une des fractions des MOS ayant la plus grande capacité à fixer les métaux dans nos sols.

Nous avons ensuite testé différents scénarios de prise en compte des MOS pour la prévision des métaux dans les sols. Le scénario NICA 50 considère que 50 % des MOS sont réactives et que leur réactivité est assimilée à celle des substances humiques. Ce scénario tend à surestimer la contribution des MOS par rapport à celle obtenue par les extractions séquentielles et à sous-estimer la concentration de cuivre en solution. Ce scénario semble par conséquent peu valide pour bien décrire la réactivité des MOS.

Le scénario NICA CEC reprend les mêmes approximations que le scénario NICA 50 sauf que la capacité d'échange des MOS (autrement dit la teneur en sites réactifs) a été contrainte. Ce scénario arrive bien à prévoir la contribution des MOS dans la sorption des métaux dans nos sols ainsi que les concentrations de cuivre en solution par rapport aux paramètres de validation.

Les scénarios NICA 50 et NICA CEC montrent que les substances humiques sont de bonnes molécules modèles pour décrire la réactivité des MOS, à condition de contraindre leur réactivité (i.e. concentration en sites). La mesure de la CEC du sol ainsi que celle du cortège d'argiles des sols sont des moyens rapides d'estimer la CEC des MOS et ainsi de contraindre la concentration en sites des MOS.

Bien que les substances humiques soient de bonnes molécules modèles pour décrire la réactivité des MOS, elles ne sont pas représentatives des différentes fractions organiques réactives qui composent les MOS. Le scénario 5 fractions assimile la réactivité des MOS à la somme des réactivités de fractions organiques et permet donc de tenir compte de leur réactivité. Ce scénario a nécessité quelques ajustements pour prévoir les contributions des MOS et les quantités de cuivre liées aux MOP. Ces ajustements sont justifiés par les caractéristiques des constantes utilisées et par le fait que 100 % des matériaux étudiés (les MOP) ne sont pas forcément réactifs. Il convient de tenir compte de la localisation de ces fractions dans le sol voire même d'autres facteurs comme le fonctionnement du sol (e.g. dynamique des agrégats, dynamique d'incorporation des amendements).

En considérant la contribution des MOS obtenue par le scénario NICA CEC comme

référence et les quantités de métaux dans les MOP mesurées comme données de validation, on peut mettre en évidence l'importance des MOP dans la sorption des métaux par les MOS. Les MOP contribuent en moyenne à 30 % du cuivre lié aux MOS pour NA, S et CC.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

L'objectif de ce travail était d'améliorer la prise en compte des MOS dans les modèles pour la prévision de la spéciation des métaux dans les sols. Pour atteindre cet objectif, nous avons extrait différentes fractions organiques des MOS de trois sols ayant une gestion différente des apports de matière organique. Nous avons étudié et quantifié les propriétés acido-basiques de ces fractions et leur affinité avec le cuivre. Comme la nature des MOS est influencée par les apports de matière organique, l'utilisation de ces trois sols nous a permis de prendre en compte l'influence de la nature des MOS sur les propriétés de complexation avec le cuivre. Nous avons ensuite testé différents scénarios de pris en compte des MOS pour la prévision de la spéciation des métaux, puis nous avons comparé les résultats des calculs avec des données expérimentales acquises indépendamment.

Notre travail a permis d'améliorer la connaissance de l'interaction de différentes fractions organiques des MOS avec le cuivre autre que les substances humiques. Ainsi, la réactivité de différents pools globaux organiques a été caractérisée et quantifiée. Les MOP semblent posséder une réactivité de surface liée à la présence de groupements fonctionnels. Ceux-ci seraient dûs à la présence microbienne et à la biodégradation des MOP. Les résultats obtenus pour nos pools bactériens extraits coïncident avec les valeurs obtenues pour des espèces cultivées en laboratoire. Il apparaît donc possible de pouvoir assimiler la réactivité de pools de bactéries indifférenciées extraits du sol à la réactivité d'espèces connues de bactéries cultivées en laboratoire.

Nous avons pu avancer dans la relation nature-réactivité des MOS grâce à notre schéma expérimentale. Pour les différentes fractions organiques étudiées au cours de ce travail, le changement de nature des MOS est plus perceptible pour les propriétés acido-basiques et pour les teneurs en sites de ces différentes fractions que pour les propriétés de complexation avec le cuivre. Les faibles différences observées pour les propriétés de complexation -alors que le statut organique est différent entre nos échantillons- proviendraient peut-être de la forte affinité du cuivre avec la matière organique. L'utilisation

d'autres cations comme le Zn, Cd qui ont des réactivités plus faibles pour la matière organique permettrait peut être d'exprimer des propriétés complexantes différentes.

L'utilisation des mêmes outils expérimentaux et de modélisation pour caractériser et quantifier la réactivité de ces différentes fractions des MOS, nous a permis de hiérarchiser leur importance à complexer le cuivre. Parmi les fractions étudiées, les MOP fines (50-200 μm) apparaissent comme une des fractions importantes des MOS pour complexer le cuivre. Ce résultat a été aussi confirmé par modélisation et par des données expérimentales au cours de ce travail.

De plus, la production de données de réactivité pour les différentes fractions organiques nous a permis de les intégrer dans un modèle thermodynamique. Trois scénarios de prise en compte des MOS ont été testés pour la prévision de la spéciation du cuivre sur deux types d'échantillons sans ajout (teneur initiale du sol, 60 mg/kg) et avec ajout de cuivre (ajout de 250 mg/kg). Une validation à deux étapes de la modélisation de la spéciation du cuivre dans nos sols a été effectuée :

- validité des données d'entrée (validation par la CEC)
- cohérence des données de sortie (validation avec des données expérimentales)

Les résultats de la modélisation montrent que les substances humiques sont un bon modèle pour décrire la réactivité globale des MOS, à condition de contraindre leur concentration en sites. Cependant, pour différencier la réactivité des MOS, on peut utiliser une somme de réactivités de différentes fractions. Cependant il est nécessaire de prendre en compte pour les MOP leur localisation dans le sol, autrement dit d'affecter un pourcentage de MOP non réactives. Pour les MOP les plus fines, d'autres facteurs seraient peut-être nécessaires à intégrer, comme la dynamique de formation des agrégats ou la dynamique d'incorporation des amendements organiques.

Pour améliorer la prise en compte des MOS dans la prévision de la spéciation du cuivre dans les sols, il reste encore à déterminer certains paramètres et à vérifier certaines hypothèses :

↳ Les différentes fractions des MOS prises en compte dans la modélisation interviennent de manière additive. Afin d'améliorer cette approche, il faudrait tenir compte des interactions entre ces différentes fractions mais aussi avec les autres phases réactives du sol.

✎ Il serait nécessaire d'effectuer d'autres expériences et d'utiliser des modèles pour les différentes fractions de MOS étudiées qui produiraient des données de réactivité utilisables dans toutes les conditions physico-chimiques.

✎ Dans ce travail, nous avons fait l'approximation que la matière organique $< 50 \mu\text{m}$ est liée à la surface des minéraux. Cependant les travaux de la littérature ont montré l'existence de particules organiques libres au niveau de toute l'échelle granulométrique du sol. La séparation de ces fractions par des techniques densimétriques permettrait de caractériser la réactivité de ces fractions et de mieux prendre en compte l'hétérogénéité des MOS dans les fractions fines du sol.

✎ Lors de la prévision de la spéciation du cuivre dans nos sols, nous avons effectué des approximations sur la quantité de MOP réactives. Ces approximations pourraient être vérifiées de deux manières :

- Par dosage de la teneur en cuivre des MOP libres et des MOP occlues dans les agrégats à l'aide du protocole développé par Puget (1997) pour nos sols après un ajout de cuivre. Les teneurs en cuivre des MOP libres mesurées devraient être plus élevées que la teneur en cuivre des MOP occlues dans les agrégats.

- Soit en optant pour la même démarche de ce travail, c'est à dire caractériser la réactivité de ces différentes fractions des MOS pour un sol sableux et utiliser ces données pour déterminer la spéciation des métaux dans ce sol. On devrait montrer par le calcul que la quantité de MOP réactives à introduire dans le programme devrait être proche de 100 % car il y a peu d'agrégation dans ce type de sol.

De façon plus générale, mieux appréhender et mesurer les quantités non réactives des différentes phases réactives du sol (minérales ou organiques) permettrait de mieux contraindre les modèles et d'améliorer les prévisions de la spéciation des métaux dans les sols, ceci dans un objectif d'abord physico-chimique puis biologique pour continuer à progresser dans la relation devenir-impact du cuivre.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. & MacCarthy, P.** 1985. An introduction to humic substances in Soil, Sediment, and Water. Dans : Humic substances in soil, sediment, and water : geochemistry, isolation and characterization. Editeurs (Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P.). *John Wiley and Sons*, 1-9.
- Alexander, M.** 1978. Organic matter decomposition. Dans : Introduction to soil microbiology. *Wiley, New York*, 128-147.
- Almas, A. R., McBride, M. B. & Singh, B. R.** 2000. Solubility and lability of cadmium and zinc in two soils treated with organic matter. *Soil Science*, **165**.
- Andreux, F.** 1997. La matière organique des sols. Interactions avec les polluants. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, **83**, 111-122.
- Aoyama, M. & Itaya, S.** 1995. Effects of copper on the metabolism of ^{14}C -labeled glucose in soil in relation to amendment with organic materials. *Soil Science and Plant Nutrition*, **41**, 245-2525.

B

- Baes, C. F. & Mesmer, R. E.** 1986. Copper, Silver, and Gold. Dans : The hydrolysis of cations. *Wiley, New York*, p267-286.
- Baize, D.** 2002. Guide des analyses en pédologie. *INRA EDITIONS*, p257.
- Balabane, M., Faivre, D., van Oort, F. & Dahmani-Muller, H.** 1999. Mutual effects of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metallophyte grassland. *Environmental Pollution*, **105**, 45-54.
- Balabane, M. & van Oort, F.** 2002. Metal enrichment of particulate organic matter in arable soils with low metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 1513-1516.
- Balesdent, J.** 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *European Journal of Soil Science*, **47**, 485-493.
- Balesdent, J.** 1998. Les biotransformations du carbone et de l'azote. Dans : Sol interface fragile. Editeurs (Stengel, P. et Gelin, S.). *INRA EDITIONS*, 67-82.
- Balesdent, J., Besnard, E., Arrouays, D. & Chenu, C.** 1998. The dynamics of carbon in particle-size fractions of soil in a forest-cultivation sequence. *Plant and Soil*, **201**, 49-57.
- Balesdent, J., Pétraud, J. P. & Feller, C.** 1991. Some effects of ultrasonic vibrations on size-distribution of soil organic matter. *Science du Sol*, **29**, 95-106.
- Bansal, O. P.** 1982. Thermodynamics of K-Ni and Ca-Ni exchange reactions on kaolinite clay. *Journal of Soil Science*, **33**, 63-71.
- Benedetti, M. F., Van Riemsdijk, W. H. & Koopal, L. K.** 1996a. Humic Substances Considered as a Heterogeneous Donnan Gel Phase. *Environmental Science and Technology*, **30**, 1805-1813.

- Benedetti, M. F., Van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K., Kinniburgh, D. G., Gooddy, D. C. & Milne, C. J.** 1996b. Metal ion binding by natural organic matter: From the model to the field. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **60**, 2503-2513.
- Besnard, E., Chenu, C., Balesdent, J., Puget, P. & Arrouays, D.** 1996. Fate of particulate organic matter in soil aggregates during cultivation. *European Journal of Soil Science*, **47**, 495-503.
- Besnard, E., Chenu, C. & Robert, M.** 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution*, **112**, 329-337.
- Boucher, U., Balabane, M., Lamy, I. & Cambier, P.** 2005a. Decomposition in soil microcosms of leaves of the metallophyte *Arabidopsis halleri*: effect of leaf-associated heavy metals on biodegradation. *Environmental Pollution*, **135**, 187-194.
- Boucher, U., Lamy, I., Cambier, P. & Balabane, M.** 2005b. Decomposition of leaves of the metallophyte *Arabidopsis halleri* in soil microcosms: fate of Zn and Cd from plant residues. *Environmental Pollution*, **135**, 323-332.
- Brown, G. K., MacCarthy, P. & Leenheer, J. A.** 1999. Simultaneous determination of Ca, Cu, Ni, Zn and Cd binding strengths with fulvic acid fractions by Schubert method. *Analytica Chimica Acta*, **402**, 169-181.
- Brown, P. L. & Markich, S. J.** 2000. Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model. *Aquatic Toxicology*, **51**, 177-194.
- Buffle, J.** 1988. Complexation reactions in aquatic systems an analytical approach. *John Wiley and Sons*, 692.
- Burba, P., Aster, B., Nifant'eva, T., Shkinev, V. & Spivakov, B. Y.** 1998. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview: Part 1. Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration. *Talanta*, **45**, 977-988.

C

- Calvet, R.** 2003. Constituants Organiques. Dans : Le Sol propriétés et fonctions Tome 1 : constitution et structure, phénomènes aux interfaces. *Dunod*, 159-218.
- Cancès, B., Ponthieu, M., Castrec-Rouelle, Aubry, E. & Benedetti, M. F.** 2003. Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma*, **113**, 341-355.
- Cervantes, C. & Gutierrez-Corona, F.** 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **14**, 121-137.
- Chander, K. & Brookes, P. C.** 1993. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry*, **25**, 1231-1239.
- Chantigny, M. H.** 2003. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma*, **113**, 357-380.
- Chao, T. T.** 1972. Selective dissolution of manganese oxides from soils and sediments with acidified hydroxylamine hydrochloride. *Soil Science Society of America Proceeding*, **36**, 764-768.
- Chenu, C.** 2001. Le complexe argilo-humique des sols : état des connaissances actuelles. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, **87**, 3-12.
- Chenu, C. & Bruand, A.** 1998. Constituants et organisation du sol. Dans : Sol interface fragile. Editeurs (Stengel, P. et Gelin, S.). *INRA EDITIONS*, 3-17.

- Chenu, C. & Plante, A. F.** 2006. Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the "primary organo-mineral complex". *European Journal of Soil Science*, **57**, 596-607.
- Chenu, C. & Stotzky, G.** 2000. Interactions between microorganisms and soil particles: an overview. Dans : Interactions between soil particles and microorganisms and their impact on the terrestrial environment. Editeurs (Huang, P.M., Bollagand, J.M., Senesi, N.), Wiley, New York, p582.
- Christensen, B. J., Botma, J. J. & Christensen, T. H.** 1999. Complexation of Cu and Pb by DOC in polluted groundwater: a comparison of experimental data and predictions by computer speciation models (WHAM and MINTEQA2). *Water Research*, **33**, 3231-3238.
- Christensen, B. T.** 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science*, **52**, 345-353.
- Citeau, L.** 2004. Etude des colloïdes naturels présents dans les eaux gravitaires de sols contaminés : relation entre nature des colloïdes et réactivité vis-à-vis des métaux (Zn, Cd, Pb, Cu). Thèse, Institut National d'Agronomie, Paris-Grignon, France. p247.
- Condaminet, V.** 2006. Etude de différentes matières organiques particulières de sol et de leur CEC. Rapport de Stage, IUT d'Orsay, p26.
- Cooke, J. D., Hamilton-Taylor, J. & Tipping, E.** 2007. On the acid-base properties of humic acid in soil. *Environmental Science and Technology*, **41**, 465-470.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P. & Simonet, P.** 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*, **3**, 431-439.
- Cox, J. S., Smith, D. S., Warren, L. A. & Ferris, F. G.** 1999. Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environmental Science and Technology*, **33**, 4514-4521.
- Cronan, C. S.** 1991. Differential adsorption of Al, Ca, and Mg by roots of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Tree Physiology*, **8**, 227-237.

D

- D'Amore, J. J., Al-Abed, S. R., Sheckel, K. G. & Ryan, J. A.** 2005. Methods for speciation of metals in soils: a review. *Journal of Environmental Quality*, **34**, 1707-1745.
- Daughney, C. J., Fein, J. B. & Yee, N.** 1998. A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria. *Chemical Geology*, **144**, 161-176.
- Daughney, C. J., Fowle, D. A. & Fortin, D.** 2001. The effect of growth phase on proton and metal adsorption by *Bacillus subtilis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 1025-1035.
- Ding, G., Liu, X., Herbert, S., Novak, J. T., Amarasiriwardena, D. & Xing, B.** 2006. Effect of cover crop management on soil organic matter. *Geoderma*, **130**, 229-239.
- Dittrich, M. & Sibling, S.** 2005. Cell surface groups of two picocyanobacteria strains studied by zeta potential investigations, potentiometric titration, and infrared spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, **286**, 487-495.
- Domeizel, M., Khalil, A. & Prudent, P.** 2004. UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and for proposing an index of the maturity of compost. *Bioresource Technology*, **94**, 177-184.

- Doyle, R. J.** 1986. How cell walls of gram-positive bacteria interact with metal ions. Dans : Metal ions and bacteria. Editeurs (Beveridge, T.J. et Doyle, R.J.). Wiley, New York, p 275-294.
- Ducaroir, J. & Lamy, I.** 1995. Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst*, **120**, 741-745.
- Dudal, Y. & Gerard, F.** 2004. Accounting for natural organic matter in aqueous chemical equilibrium models: a review of the theories and applications. *Earth-Science Reviews*, **66**, 199-216.
- Dufey, J. E. & Braun, R.** 1986. Cation exchange capacity of roots : titration, sum of exchangeable cations, copper adsorption. *Journal of Plant Nutrition*, **9**, 1147-1155.
- Dumestre, A., Sauve, S., McBride, M. B., Baveye, P. & Berthelin, J.** 1999. Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36**, 124-31.
- Duxbury, T. & Bicknell, B.** 1983. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **15**, 243-250.
- Dwane, G. C. & Tipping, E.** 1998. Testing a humic speciation model by titration of copper-amended natural waters. *Environment International*, **24**, 609-616.
- Dzombak, D. A. & Morel, F. M. M.** 1990. Surface complexation modeling: hydrous ferric oxides. John Wiley and Sons, p416.

E, F

- Esteves da Silva, J. G. G. & Oliveira, C. J. S.** 2002. Metal ion complexation properties of fulvic acids extracted from composted sewage sludge as compared to a soil fulvic acid. *Water Research*, **36**, 3404-3409.
- Evangelou, V. P. & Marsi, M.** 2001. Composition and metal complexation behaviour of humic fractions derived from corn tissue. *Plant and Soil*, **229**, 13-24.
- Evanko, C. R. & Dzombak, D. A.** 1998. Influence of Structural Features on Sorption of NOM-Analogue Organic Acids to Goethite. *Environmental Science and Technology*, **32**, 2846-2855.
- FAO-Unesco-ISRIC.** 1989. Revised legend of the FAO-Unesco soil map of the world. *World Resources Report n° 60*. FAO, Rome.
- Fein, J. B., Boily, J.-F., Yee, N., Gorman-Lewis, D. & Turner, B. F.** 2005. Potentiometric titrations of *Bacillus subtilis* cells to low pH and a comparison of modelling approaches. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **69**, 1123-1132.
- Fein, J. B., Daughney, C. J., Yee, N. & Davis, T. A.** 1997. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 3319-3328.
- Fein, J. B., Martin, A. M. & Wightman, P. G.** 2001. Metal adsorption onto bacterial surfaces: development of a predictive approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 4267-4273.
- Feller, C.** 1997. La matière organique des sols. Questions, concepts et méthodologies. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, **83**, 83-84.
- Fernandez-Cornudet, C., Labanowski, J., Cambier, P., Jongmans, A. G. & Van Oort, F.** 2006. Fate of airborne metal pollution in soils as related to agricultural management: Zn and Pb distributions in soil profiles. *European Journal of Soil Science*, en ligne.
- Ferris, G. F.** 1986. Metallic ion interactions with the outer membrane of gram-negative bacteria. Dans : Metal ions and bacteria. Editeurs (Beveridge, T.J. et Doyle, R.J.). Wiley, New York, 295-324.

- Filley, T. R., Hatcher, P. G., Shortle, W. C. & Praseuth, R. T.** 2000. The application of ^{13}C -labeled tetramethylammonium hydroxide (^{13}C -TMAH) thermochemolysis to the study of fungal degradation of wood. *Organic Geochemistry*, **31**, 181-198.
- Fiol, S., Lopez, R., Ramos, A., Antelo, J. M. & Arce, F.** 1999. Study of acid-base properties of three fulvic acids extracted from different horizons of a soil. *Analytica Chimica Acta*, **385**, 443-449.
- Fitch, A. & Stevenson, F. J.** 1984. Comparison of models for determining stability constants of metal complexes with humic substances. *Soil Science Society of America Journal*, **48**, 1044-1050.
- Flaschka, H. A.** 1964. EDTA titrations: an introduction to theory and practice. *Pergamon Press*, p143.
- Flores-Vélez, L. M., Ducaroir, J., Jaunet, A. M. & Robert, M.** 1996. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science*, **47**, 523-532.
- Fortuna, A., Harwood, R. R. & Paul, A.** 2003. The effects of compost and crop rotations on carbon turnover and the particulate organic matter fraction. *Soil Science*, **168**.
- Fotovat, A. & Naidu, R.** 1998. Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma*, **84**, 213-234.
- Fowle, D. A. & Fein, J. B.** 1999. Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: testing the chemical equilibrium model. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**, 3059-3067.
- Franzluebbers, A. J., Haney, R. L., Honeycutt, C. W., Arshad, M. A., Schomberg, H. H. & Hons, F. M.** 2001. Climatic influences on active fractions of soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1103-1111.

G

- Gadd, G. M.** 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, **122**, 109-119.
- Gao, Y., He, J., Ling, W., Hu, H. & Liu, F.** 2003. Effects of organic acids on copper and cadmium desorption from contaminated soils. *Environment International*, **29**, 613-618.
- Ge, Y., MacDonald, D., Sauve, S. & Hendershot, W.** 2005. Modeling of Cd and Pb speciation in soil solutions by WinHumicV and NICA-Donnan model. *Environmental Modelling and Software*, **20**, 353-359.
- Giller, K. E., Witter, E. & McGrath, S. P.** 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1389-1414.
- Godbold, D. L. & Jentschke, G.** 1998. Aluminium accumulation in root cell walls coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. *Physiologia Plantarum*, **102**, 553-560.
- Gondar, D., Iglesias, A., Lopez, R., Fiol, S., Antelo, J. M. & Arce, F.** 2006. Copper binding by peat fulvic and humic acids extracted from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Chemosphere*, **63**, 82-88.
- Gondar, D., Lopez, R., Fiol, S., Antelo, J. M. & Arce, F.** 2005. Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma*, **126**, 367-374.
- Gordon, A. S., Howell, L. D. & Harwood, V.** 1994. Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, **40**, 408-411.

- Gran, G.** 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst*, **77**, 661-671.
- Gregorich, E. G., Beare, M. H., McKim, U. F. & Skjemstad, J. O.** 2006. Chemical and biological characteristics of physically uncomplexed organic matter. *Soil Science Society of America Journal*, **70**, 975-985.
- Gregorich, E. G. & Ellert, B. H.** 1995. Light fraction and macroorganic matter in mineral soils. Dans : Soil Sampling and Methods of Analysis. Editeur (Carter, M. R.). *Lewis Publisher, Boca Raton*, 397-408.
- Gregorich, E. G., Monreal, C. M., Schnitzer, M. & Schulten, H. R.** 1996. Transformation of plant residues into soil organic matter: chemical characterization of plant tissue, isolated soil fractions, and whole soils. *Soil Science*, **161**, 680-693.
- Guiné, V., Martins, J. & Gaudet, J. P.** 2003. Facilitated transport of heavy metals by bacterial colloids in sand columns. *Journal de Physique IV*, **170**, 593-596.
- Guiné, V., Spadini, L., Sarret, G., Muris, M., Delolme, C., Gaudet, J.-P. & Martins, J. M. F.** 2006. Zinc Sorption to Three Gram-Negative Bacteria: Combined Titration, Modeling, and EXAFS Study. *Environmental Science and Technology*, **40**, 1806-1813.
- Guo, M. & Chorover, J.** 2003. Transport and fractionation of dissolved organic matter in columns. *Soil Science*, **168**, 108-118.
- Gustafsson, J. P.** 2001. Modeling the acid-base properties and metal complexation of humic substances with the Stockholm Humic Model. *Journal of Colloid and Interface Science*, **244**, 102-112.
- Gustafsson, J. P. & van Schaik, J. W. J.** 2003. Cation binding in a mor layer: batch experiments and modelling. *European Journal of Soil Science*, **54**, 295-310.

H

- Haas, J. R., Dichristina, T. J. & Wade, J. R.** 2001. Thermodynamics of U(VI) sorption onto *Shewanella putrefaciens*. *Chemical Geology*, **180**, 33-54.
- Han, N. & Thompson, M. L.** 2003. Impact of Dissolved Organic Matter on Copper Mobility in Aquifer Material. *Journal of Environmental Quality*, **32**, 1829-1836.
- Harter, R. D. & Naidu, R.** 1995. Role of Metal-Organic Complexation in Metal Sorption by Soils. *Advances in Agronomy*, **55**, 219-263.
- Hatira, A., Gallali, T., Rouiller, J. & Guillet, B.** 1990. Stabilité et solubilité des complexes formés entre le cuivre, le plomb, le zinc et les acides fulviques. *Science du Sol*, **28**, 123-135.
- Haynes, R. J.** 2000. Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 211-219.
- Herbelin, A. & Westall, J. C.** 1999. FITEQL a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data version 4.0.
- Hinsinger, P., Ambrosi, J. P., Andrieux, P., Casellas, C., Chaignon, V., Elsass, F., Gilbin, R., Lamy, I., Mousain, D., van Oort, F. & Voltz, M.** 2005. Spéciation, biodisponibilité et toxicité du cuivre dans les sols et les sédiments d'un bassin versant viticole en Languedoc-Rousillon. Dans : Programme national d'écotoxicologie : avancées récentes de la recherche. *La Documentation française*, 11-47.
- Holtzclaw, K. M. & Sposito, G.** 1978. Analytical properties of the soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures: III. Unaltered anionic surfactants in fulvic acid. *Soil Science Society of America Journal*, **42**, 607-611.
- Holtzclaw, K. M., Sposito, G. & Bradford, G. R.** 1976. Analytical properties of the soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures : I. Extraction and purification of fulvic acid. *Soil Science Society of America Journal*, **40**, 254-258.

Holtzclaw, K. M., Keech, D. A., Page, A. L., Sposito, G., Ganje, T. J. & N.B., Ball. 1978. Trace metal distributions among the humic acid, the fulvic acid, and the precipitable fractions extracted with NaOH from sewage sludges. *Journal of Environmental Quality*, **7**, 124-127.

Huysman, F., Verstraete, W. & Brookes, P. C. 1994. Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 103-110.

J, K

Jansen, E., Michels, M., Til, M. & Doelman, P. 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, **17**, 177-184.

Jones, M. N. & Bryan, N. D. 1998. Colloidal properties of humic substances. *Advances in Colloid and Interface Science*, **78**, 1-48.

Kaiser, K., Haumaier, L. & Zech, W. 2000. The sorption of organic matter in soils as affected by the nature of soil carbon. *Soil Science*, **165**, 305-313.

Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D. & Matzner, E. 2003a. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma*, **113**, 273-291.

Kalbitz, K., Schwesig, D., Schmerwitz, J., Kaiser, K., Haumaier, L., Glaser, B., Ellerbrock, R. & Leinweber, P. 2003b. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 1129-1142.

Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J. H., Michalzik, B. & Matzner, E. 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils : a review. *Soil Science*, **165**, 277-304.

Kandeler, E., Kampichler, C. & Horak, O. 1996. Influence of heavy metal on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, **23**, 299-306.

Karlsson. 2005. Complexation of cadmium, copper and methyl mercury to functional groups in natural organic matter. Thèse, Faculty of Forest Sciences, Umea, Suède. p37.

Keizer, M. G. & van Riemsdijk, W. H. 2005. A computer program for the calculation of speciation and transport in soil-water system Version 4.8. User manual. *Department of Soil Quality, Wageningen University, The Netherlands*.

Kelleher, B. P., Simpson, M. & Simpson, A. 2006. Assessing the fate and transformation of plant residues in the terrestrial environment using HR-MAS NMR spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**, 4080-4094.

Kinniburgh, D. G. 1993. User guide. Tech. Rep. WD/93/23. Hydrogeology Series. British Geol. Survey, Keyworth.

Kinniburgh, D. G., Milne, C. J., Benedetti, M. F., Pinheiro, J. P., Filius, J., Koopal, L. K. & Van Riemsdijk, W. H. 1996. Metal Ion Binding by Humic Acid: Application of the NICA-Donnan Model. *Environmental Science and Technology*, **30**, 1687-1698.

Kinniburgh, D. G., van Riemsdijk, W. H., Koopal, L. K., Borkovec, M., Benedetti, M. F. & Avena, M. J. 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces A*, **151**, 147-166.

Knight, B. P., McGrath, S. P. & Chaudri, A. M. 1997. Biomass carbon Measurements and Substrate Utilization Patterns of Microbial Populations from Soils Amended with Cadmium, Copper, or Zinc. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 39-43.

Kogel-Knabner, I. 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 139-162.

- Kononova, M. M.** 1961. Soil Organic Matter: its nature, its roles in soil formation and in soil fertility. *Pergamon Press*, p450.
- Koopal, L. K., Saito, T., Pinheiro, J. P. & van Riemsdijk, W. H.** 2005. Ion binding to natural organic matter: general considerations and the NICA-Donnan model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **265**, 40-54.
- Koopal, L. K., van Riemsdijk, W. H., de Wit, J. C. M. & Benedetti, M. F.** 1994. Analytical Isotherm Equations for Multicomponent Adsorption to Heterogeneous Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, **166**, 51-60.
- Kunito, T., Saeki, K., Goto, S., Hayashi, H., Oyaizu, H. & Matsumoto, S.** 2001a. Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresource Technology*, **79**, 135-146.
- Kunito, T., Saeki, K., Nagaoka, K., Oyaizu, H. & Matsumoto, S.** 2001b. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *European Journal of Soil Biology*, **37**, 95-102.
- Kunz, A. & Jardim, W. F.** 2000. Complexation and adsorption of copper in raw sewage. *Water Research*, **34**, 2061-2068.

L

- Labanowski, J., Sebastia, J., Foy, E., Jongmans, T., Lamy, I. & van Oort, F.** Annexe D. Fate of metal-associated POM in a soil under arable land use contaminated by metallurgical fallout (northern France). *Environmental Pollution*, *Accepté*.
- Lamy, I., Cromer, M. & Scharff, J. P.** 1987. Binding strength evaluation of Cu(II) complexation with organic ligands of environmental interest. *The Science of The Total Environment*, **62**, 271-274.
- Lamy, I., Cromer, M. & Scharff, J. P.** 1988. Comparative study of copper (II) interactions with monomeric ligands and synthetic or natural organic materials from potentiometric data. *Analytica Chimica Acta*, **212**, 105-122.
- Lamy, I., Ducaroir, J., Sterckeman, T. & Douay, F.** 2002. Réactivité des matières organiques. Dans : Les éléments traces métalliques dans les sols : approches fonctionnelles et spatiales. Editeurs (Baize, D. et Tercé, M.). *INRA EDITIONS*, 269-282.
- Lamy, I., Seywert, M., Cromer, M. & Scharff, J. P.** 1985. Simple and mixed ligand complexes of copper(II) with polyfunctional phenolic compounds as model of natural substances. *Analytica Chimica Acta*, **176**, 201-212.
- Lamy, I., Sterckeman, T., Cambier, P., Jaffrezic, A., van Oort, F., Baize, D. & Chaussod, R.** 2005. Présences et impacts des éléments en trace dans les sols. Dans : Sols et Environnement. Editeurs (Girard, M.C., Walter C., Rémy, J.C., Berthelin, J., Morel, J.L.) *Dunod*, 469-490.
- Lamy, I., van Oort, F., Dère, C. & Baize, D.** 2006. Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *European Journal of Soil Science*, **57**, 731-740.
- Lapaire, J.** 2007. Base de données minéralogiques. Site web, <http://www.miner.ch/>
- Ledin, M.** 2000. Accumulation of metals by microorganisms -- processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, **51**, 1-31.
- Ledin, M., Krantz-Rulcker, C. & Allard, B.** 1996. Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**, 791-799.
- Lejon, D. P. H., Sebastia, J., Lamy, I., Chaussod, R. & Ranjard, L.** 2006. Relationships between soil organic matter status and microbial communities in agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microbial Ecology*, *Accepté*

- Lindahl, V.** 1996. Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *Journal of Microbiological Methods*, **25**, 279-286.
- Lindahl, V., Aa, K. & Olsen, R. A.** 1996. Effects on microbial activity by extraction of indigenous cells from soil slurries. *FEMS Microbiology Ecology*, **21**, 221-230.
- Lindahl, V. & Bakken, L. R.** 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 135-142.
- Lofts, S., Woof, C., Tipping, E., Clarke, N. & Mulder, J.** 2001. Modelling pH buffering and aluminium solubility in European forest soils. *European Journal of Soil Science*, **52**, 189-204.
- Lombi, S. P., McLaughlin, M. J. & Hamon, R. E.** 2005. Chemical considerations in the interpretation of toxicity of metals in soils. *Proceeding of the 8th International Conference of Biogeochemistry of Trace Elements*, Adelaide, Australie, 3-7.
- Lumsdon, D. G.** 2004. Partitioning of organic carbon, aluminium and cadmium between solid and solutions in soils: application of a mineral-humic particle additivity model. *European Journal of Soil Science*, **55**, 271-285.
- Lundquist, E. J., Jackson, L. E., Scow, K. M. & Hsu, C.** 1999a. Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 221-236.
- Luster, J., Lloyd, T., Sposito, G. & Fry, I. V.** 1996. Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of Copper (II) and Aluminum (III) complexation by dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, **30**, 1565-1574.

M

- MacCarthy, P. & Rice, J. A.** 1985. Spectroscopic methods (other than MNR) for determining functionality in humic substances. Dans : Humic substances in soil, sediment, and water : geochemistry, isolation and characterization. Editeurs (Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L., MacCarthy, P.A). *John Wiley and Sons*, 527-559.
- MacDonald, J. D. & Hendershot, W. H.** 2006. Modelling trace metal partitioning in forest floors of northern soils near metal smelters. *Environmental Pollution* **143**, 228-240.
- Markai, S., Andres, Y., Montavon, G. & Grambow, B.** 2003. Study of the interaction between europium (III) and *Bacillus subtilis*: fixation sites, biosorption modeling and reversibility. *Journal of Colloid and Interface Science*, **262**, 351-361.
- Maron, P.-A., Schimann, H., Ranjard, L., Brothier, E., Domenach, A.-M., Lensi, R. & Nazaret, S.** 2005. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology*, **42**, 65-73.
- Marschner, B. & Kalbitz, K.** 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma*, **113**, 211-235.
- Mayr, C., Winding, A. & Hendriksen, N. B.** 1999. Community level physiological profile of soil bacteria unaffected by extraction method. *Journal of Microbiological Methods*, **36**, 29-33.
- McBride, M. B., Sauvé, S. & Hendershot, W.** 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*, **48**, 337-346.
- McCarthy, J. F. & Zachara, J. M.** 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environmental Science and Technology*, **23**, 496-502.

- Meneghetti, M.** 2005. relations matières organiques solubles - cuivre dans le sol : effets d'apports organiques exogènes. DEA Science et Techniques de l'Environnement, Université Paris XII, p70.
- Mehra, O. P. & Jackson, M. J.** 1959. Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and clay minerals*, **5**, 317-327.
- Merritt, K. A. & Erich, M. S.** 2003. Influence of organic matter decomposition on soluble carbon and its copper-binding capacity. *Journal of Environmental Quality*, **32**, 2122-2131.
- Milne, C. J., Kinniburgh, D. G., de Wit, J. C. M., van Riemsdijk, W. H. & Koopal, L. K.** 1995. Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 1101-1112.
- Milne, C. J., Kinniburgh, D. G. & Tipping, E.** 2001. Generic NICA-Donnan Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances. *Environmental Science and Technology*, **35**, 2049-2059.
- Milne, C. J., Kinniburgh, D. G., van Riemsdijk, W. H. & Tipping, E.** 2003. Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances. *Environmental Science and Technology*, **37**, 958-971.
- Moller, J., Miller, M. & Kjoller, A.** 1999. Fungal-bacterial interaction on beech leaves: influence on decomposition and dissolved organic carbon quality. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 367-374.
- Molloy, L. F. & Speir, T.** 1977. Studies on a climosequence of soils in tussock grasslands 12. Constituents of the soil light fraction. *New Zealand journal of Science*, **20**, 167-177.
- Muris, M., Delome, C., Gaudet, J. P. & Spadini, L.** 2005. Assessment of biofilm destabilization and consequent facilitated zinc transport. *Water Science and Technology*, **51**, 21-28.
- Murray, K. & Linder, P. W.** 1983. Fulvic acids: structure and metal binding. I. A random molecular model. *Journal of Soil Science*, **34**, 511-523.

N, O

- Naidu, R. & Harter, R. D.** 1998. Effect of different organic ligands on cadmium sorption by and extractability from soils. *Soil Science Society of America Journal*, **62**, 644-650.
- Naja, G., Mustin, C., Volesky, B. & Berthelin, J.** 2005. A high-resolution titrator: a new approach to studying binding sites of microbial biosorbents. *Water Research*, **39**, 579-588.
- Nardi, S., Morari, F., Berti, A., Tosoni, M. & Giardini, L.** 2004. Soil organic matter properties after 40 years of different use of organic and mineral fertilisers. *European Journal of Agronomy*, **21**, 357-367.
- Ngwenya, B. T., Sutherland, I. W. & Kennedy, L.** 2003. Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Applied Geochemistry*, **18**, 527-538.
- Nierop, K. G. J., Jansen, B., Vrugt, J. A. & Verstraten, J. M.** 2002. Copper complexation by dissolved organic matter and uncertainty assessment of their stability constants. *Chemosphere*, **49**, 1191-1200.
- Olah, G. M., Reisinger, O. & Kilbertus, G.** 1978. Biodégradation et humification. *Paris Librairie Vuibert*, p331.
- Olson, B. H. & Thornton, I.** 1982. The resistance patterns to metals populations in contaminated land. *Journal of Soil Science*, **33**, 271-277.

P

- Parat, C., Chaussod, R., Leveque, J. & Andreux, F.** 2005. Long-term effects of metal-containing farmyard manure and sewage sludge on soil organic matter in a fluvisol. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 673-679.
- Perdue, E. M.** 1985. Acidic functional groups of humic substances. Dans : Humic substances in soil, sediment, and water : geochemistry, isolation and characterization. Editeurs (Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P.). *John Wiley and Sons*, 493-526.
- Perdue, E. M.** 2001. Modelings concepts in metal-humic complexation. Dans : Humic substances and chemical contaminants. Editeurs (Clapp, C.E., Hayes, M.H.B., Senesi, N., Bloom, P.R., Jardine, P.M). *Soil Science Society of America, Inc.*, 305-317.
- Peuravuori, J. & Pihlaja, K. I.** 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*, **337**, 133-149.
- Piccolo, A. & Stevenson, F. J.** 1982. Infrared spectra of Cu^{2+} Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances. *Geoderma*, **27**, 195-208.
- Plaza, C., Brunetti, G., Senesi, N. & Polo, A.** 2005a. Proton binding to humic acids from organic amendments and amended soil by NICA-Donnan model. *Environmental Science and Technology*, **39**, 6692-6697.
- Plaza, C., Garcia-Gil, J. C., Polo, A., Senesi, N. & Brunetti, G.** 2005b. Proton binding by humic and fulvic acids from pig slurry and amended soils. *Journal Environmental of Quality*, **34**, 1131-1137.
- Plaza, C., Senesi, N., Garcia-Gil, J. C. & Polo, A.** 2005c. Copper (II) complexation by humic and fulvic acids from pig slurry and amended and non-amended soils. *Chemosphere*, **61**, 711-716.
- Plaza, C., Senesi, N., Polo, A., Brunetti, G., Garcia-Gil, J. C. & D'Orazio, V.** 2003. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendement. *Soil and Tillage Research*, **74**, 179-190.
- Plette, A. C. C.** 1996. Cadmiun and zinc interactions with a soil bacterium, from variable charging behavior of the cell wall to bioavailability in soils. Thèse, Wagening Agricultural University, Pays-Bas. p159.
- Plette, A. C. C., van Riemsdijk, W. H., Benedetti, M. F. & van der Wal, A.** 1995. pH Dependent Charging Behavior of Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium. *Journal of Colloid and Interface Science*, **173**, 354-363.
- Plette, A. C. C., Benedetti, M. F. & van Riemsdijk, W. H.** 1996. pH Competitive binding of protons, calcium, cadmium, and zinc to isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *Environmental Science and Technology*, **30**, 1902-1911.
- Ponthieu, M.** 2003. Spéciation des éléments traces métalliques dans les sols et les solutions des sols : du modèle au terrain. Thèse, Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille, France. p251.
- Priemé, A., Bonilla Sitaula, J. I., Klemmedtsson, A. K. & Bakken, L. R.** 1996. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. *FEMS Microbiology Ecology*, **21**, 59-68.
- Puget, P.** 1997. Distribution des matières organiques dans des agrégats des sols limoneux cultivés. Conséquences sur la stabilité structurale des agrégats et sur la biodégradation des matières organiques. Thèse Université Paris XII, Val de Marne, France. p164.

Q, R

- Quiquampoix, H.** 2000. Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil. Dans : Soil Biochemistry. Editeurs (Bollag, J. M. et Stotzky, G.). *Marek Dekker*, 171-206.
- Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L. & Nazaret, S.** 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology*, **24**, 321-331.
- Reemtsma, T., Bredow, A. & Gehring, M.** 1999. The nature and kinetics of organic matter release from soil by salt solutions. *European Journal of Soil Science*, **50**, 53-64.
- Renella, G., Landi, L. & Nannipieri, P.** 2004. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, **122**, 311-315.
- Rengel, Z. & Robinson, D. L.** 1989. Determination of cation exchange capacity of ryegrass roots by summing exchangeable cations. *Plant and Soil*, **116**, 217-222.
- Rivero, C., Chirenje, T., Ma, L. Q. & Martinez, G.** 2004. Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. *Geoderma*, **123**, 355-361.
- Ross, S. M.** 1994. Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. Dans: Toxic metals in soil-plant systems. Editeur (Ross, S.M.). *John Wiley and Sons*, 63-153.
- Rumpel, C., Eusterhues, K. & Kogel-Knabner, I.** 2004. Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **36**, 177-190.

S

- Sauvé, S., Hendershot, W. & Allen, H. E.** 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, Total metal burden, and organic matter. *Environmental Science and Technology*, **34**, 1125-1130.
- Schnitzer, M.** 1991. Soil organic matter-The next 75 years. *Soil Science*, **151**, 41-58.
- Schnitzer, M. & Hansen, E. H.** 1970. Organo-metallic interactions in soils: 8. An evaluation of methods for the determination of stability constants of metals of metal-fulvic acid complexes. *Soil Science*, **109**, 333-340.
- Schnitzer, M. & Skinner, S. I. M.** 1965. Organo-metallic interactions in soils: 4. Carboxyl and hydroxyl groups in organic matter and metal retention. *Soil Science*, **99**, 278-284.
- Schuman, L. M.** 1985. Fractionation Method for Soil Micro-. elements. *Soil Science*, **140** 11-22.
- Six, J., Callewaert, P., Lenders, S., De Gryze, S., Morris, S. J., Gregorich, E. G., Paul, E. A. & Paustian, K.** 2002. Measuring and understanding carbon storage in afforested soils by physical fractionation. *Soil Science Society of America Journal*, **66**, 1981-1987.
- Smolander, A. & Kitunen, V.** 2002. Soil microbial activities and characteristics of dissolved organic C and N in relation to tree species. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 651-660.
- Speir, T. W., Kettles, H. A., Percival, H. J. & Parshotam, A.** 1999. Is soil acidification the cause of biochemical responses when soils are amended with heavy metal salts? *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1953-1961.
- Sposito, G., Holtzclaw, K. M. & LeVesque-Madore, C. S.** 1981. Trace metal complexation by fulvic acid extracted from sewage sludge: I. Determination of stability constants and linear correlation analysis. *Soil Science Society of American Journal*, **45**, 465-468.
- Spycher, G., Sollins, P. & Rose, S.** 1983. Carbon and nitrogen in the light fraction of forest soil: vertical distribution and seasonal patterns. *Soil Science*, **135**, 79-87.
- Stevenson, F. J.** 1982. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. A Wiley-Interscience Publication, 443.

- Stevenson, F. J.** 1994. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions 2nd Ed. A Wiley-Interscience Publication.
- Strobel, B. W.** 2001. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution: a review. *Geoderma*, **99**, 169-198.
- Strobel, B. W., Hansen, H. C. B., Borggaard, O. K., Andersen, M. K. & Raulund-Rasmussen, K.** 2001. Composition and reactivity of DOC in forest floor soil solutions in relation to tree species and soil types. *Biogeochemistry*, **56**, 1-26.
- Ström, L., Owen, A. G., Godbold, D. L. & Jones, D. L.** 2001. Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 2125-2133.

T

- Tessier, D., Charlet, L., Schlegel, M. L., Julien, J.-L., Turpin, A., Bigorre, F. & Bruand, A.** 1999. La capacité d'échange et son importance pour la gestion actuelle des sols. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, **85**, p165.
- Thornton, I.** 1999. Bioavailability of trace metals in the foodchain. *Proceeding of the 5th International Conference of Biogeochemistry of Trace Elements*, Vienne, Autriche, 11-15.
- Tipping, E.** 1998. Humic Ion-Binding Model VI: An Improved Description of the Interactions of Protons and Metal Ions with Humic Substances. *Aquatic Geochemistry*, **4**, 3-48.
- Tipping, E., Rey-Castro, C., Bryan, S. E. & Hamilton-Taylor, J.** 2002. Al(III) and Fe(III) binding by humic substances in freshwaters, and implications for trace metal speciation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **66**, 3211-3224.
- Tipping, E., Rieuwerts, J., Pan, G., Ashmore, M. R., Lofts, S., Hill, M. T. R., Farago, M. E. & Thornton, I.** 2003. The solid-solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environmental Pollution*, **125**, 213-225.
- Tipping, E. & Woof, C.** 1990. Humic substances in acid organic soils: Modelling their release to soil solution in terms of humic charge. *Journal of Soil Science*, **41**.
- Tipping, E. & Woof, C.** 1991. The distribution of humic substance between the solid and aqueous phases of acid organic soils: A description based on heterogeneity and charge-dependent sorption equilibria. *Journal of Soil Science*, **437-448**.
- Trevors, J. T.** 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiology Science*, **4**, 29-31.

V

- van Hees, P. A. W., Jones, D. L., Finlay, R., Godbold, D. L. & Lundstrom, U. S.** 2005. The carbon we do not see-the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 1-13.
- Vane, C. H.** 2003. The molecular composition of lignin in spruce decayed by white-rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*) using pyrolysis-GC-MS and thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **51**, 67-75.
- Vane, C. H., Abbott, G. D. & Head, I. M.** 2001. The effect of fungal decay (*Agaricus bisporus*) on wheat straw lignin using pyrolysis-GC-MS in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **60**, 69-78.

W, Y, Z

- Wander, M.** 2004. Soil Organic matter fractions and their relevance to soil function. Dans : *Advances in Agroecology*. Editeurs (Magdoff, F. et Weil, R.), **CRC 3**, 67-102.
- Wang, G. & Staunton, S.** 2006. Evolution of water-extractable copper in soil with time as a function of organic matter amendments and aeration. *European Journal of Soil Science*, **57**, 372-380.
- Weng, L., Fest, E. P. M. J., Fillius, J., Temminghoff, E. J. M. & Van Riemsdijk, W. H.** 2002a. Transport of Humic and Fulvic Acids in Relation to Metal Mobility in a Copper-Contaminated Acid Sandy Soil. *Environmental Science and Technology*, **36**, 1699-1704.
- Weng, L., Temminghoff, E. J. M., Lofts, S., Tipping, E. & Van Riemsdijk, W. H.** 2002c. Complexation with dissolved matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environmental Science and Technology*, **36**, 4804-4810.
- Weng, L., Temminghoff, E. J. M. & van Riemsdijk, W. H.** 2001. Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil. *Environmental Science and Technology*, **35**, 4436-4443.
- Weng, L., Temminghoff, E. J. M. & Van Riemsdijk, W. H.** 2002b. Aluminum speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modeling using NICA-Donnan. *Water Research*, **36**, 4215-4226.
- Wershaw, R. L., Leenheer, J. A., Kennedy, K. R. & Noyes, T. I.** 1996. Use of ^{13}C NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during natural litter decomposition and composting I. Early stage leaf degradation. *Soil Science*, **161**, 667-679.
- Westall, J. C., Jones, D. L., Turner, G. D. & Zachara, J. M.** 1995. Models for association of metal ions with heterogeneous environmental. 1. Complexation of Co(II) by leonardite humic acid as a function of pH and NaClO_4 concentration. *Environmental Science and Technology*, **29**, 951-959.
- Whalen, J. K., Bottomley, P. J. & Myrold, D. D.** 2000. Carbon and nitrogen mineralization from light- and heavy-fraction additions to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 1345-1352.
- Wu, L. H., Luo, Y. M., Christie, P. & Wong, M. H.** 2003a. Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil. *Chemosphere*, **50**, 819-822.
- Wu, S. C., Luo, Y. M., Cheung, K. C. & Wong, M. H.** 2006. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: a laboratory study. *Environmental Pollution*, **144**, 765-773.
- Yariv, S. & Cross, H.** 2002. Organo-clay complexes and interactions. *Marcel Dekker*, p688.
- Yee, N. & Fein, J. B.** 2001. Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 2037-2042.
- Zhou, L. X. & Wong, J. W. C.** 2001. Effect of Dissolved Organic Matter from Sludge and Sludge Compost on Soil Copper Sorption. *Journal of Environmental Quality*, **30**, 878-883.

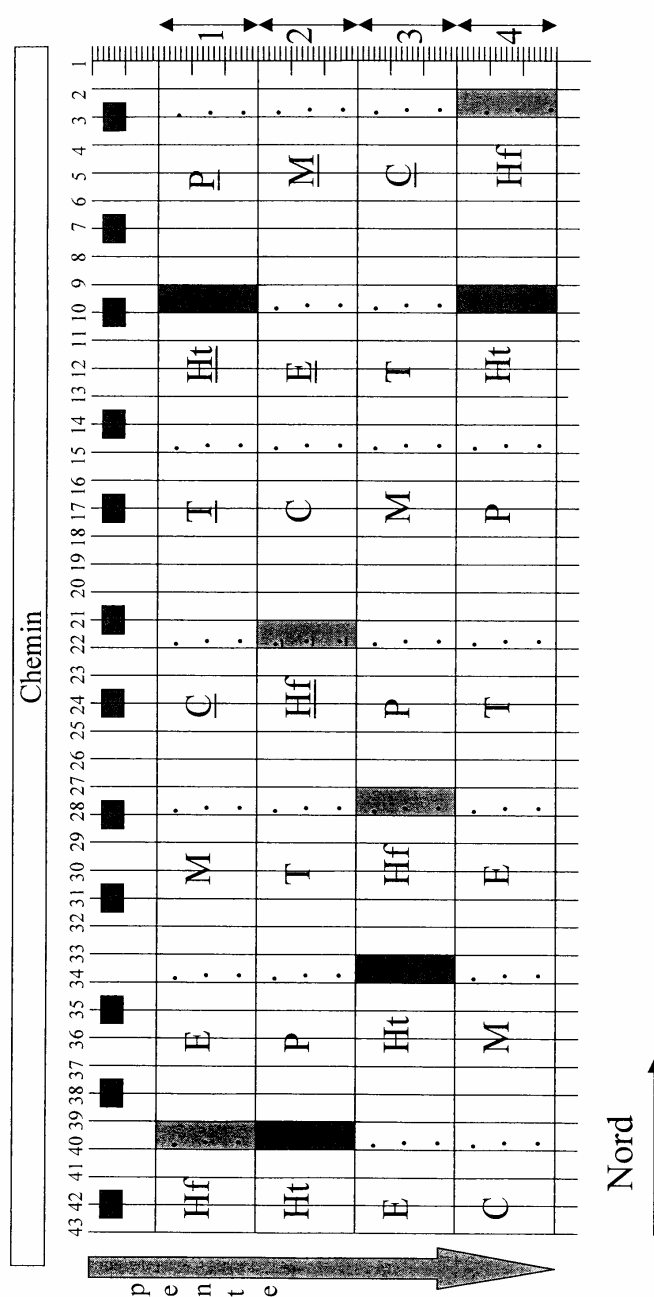
Annexes

Annexe A : Essai agronomique de Macon

Plan de l'essai agronomique de Macon :

T : Témoin
 Ht : Enherbement trèfle
 Hf : Enherbement fétuque
 P : Paille

C : Compost d'écorces de résineux
 E : Ecorces fraîches de résineux
 M : Enherbement naturel maîtrisé



Entretien du parcellaire de Macon :

Modalité organique	Description
Témoin	Entretien chimique du sol (sol nu)
Enherbement trèfle	Enherbement maîtrisé Entretien du sol sous le rang avec des herbicides de post-levée
Enherbement fétuque	Enherbement maîtrisé Entretien du sol sous le rang avec des herbicides de post-levée
Paille	10 t/ha, épandage tous les 2 ans Entretien du sol avec les mêmes herbicides que le Témoin
Compost d'écorces résineux	100 m ³ /ha, épandage tous les 3-4 ans Entretien du sol avec les mêmes herbicides que le Témoin
Ecorces fraîches de résineux	300 m ³ /ha, épandage tous les 3-4 ans Entretien du sol avec les mêmes herbicides que le Témoin
Enherbement naturel maîtrisé	Débutage en sortie d'hiver et griffage quand nécessaire puis enherbement

Annexe B : Photos de l'essai agronomique de Macon

L'essai agronomique est à gauche du chemin



Photo d'un bloc amendé avec de la paille



En premier plan un bloc amendé avec de la paille et au second plan un bloc enherbé avec du trèfle



Annexe C :
**“Relationships between soil organic status and microbial
community density and genetic structure in two
agricultural soils submitted to various types of organic
management”**

David P.H. LEJON¹, Julien SEBASTIA², Isabelle LAMY², Rémi CHAUSSOD¹ and
Lionel RANJARD¹ #

¹*UMR Microbiologie et Géochimie des sols, INRA/Université de Bourgogne, CMSE,
17 rue de Sully, BP 86510, 21065 DIJON Cedex, France*

²*UR Science du Sol, INRA, RD 10, route de Saint-Cyr, 78026 VERSAILLES Cedex,
France*

DOI10.1007/s00248-006-9145-6

(<http://www.springerlink.com/content/n6606820wg60374r/?p=607c31bb315c40059a8b1de3a7a1bf2d&pi=2>)

Article accepté dans Microbial Ecology

Dans ce travail, les modifications qualitatives des communautés microbiennes ont été évaluées par une caractérisation génétique de l'ADN extrait directement du sol en utilisant un B- et un F-ARISA (Bacterial- and Fungal- Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). Ces travaux ont montré que les amendements organiques ont induit des changements de structures des communautés bactériennes pour les échantillons de sol 0-5cm entre NA, S et CC alors que la structure des communautés fongiques ne révèlent pas de différence significative. Une analyse en co-inertie a été réalisée pour spécifier le rôle du statut organique du sol sur la structure génétique des communautés microbiennes. Pour NA, S et CC, les résultats indiquent une co-structuration significative entre les structures génétiques des bactéries et la nature des MOS (exprimée par la répartition des SH en AH, AF et β -humus).

Annexe D :
**"Fate of metal-associated POM in a soil under arable
land use contaminated by metallurgical fallout in northern
France"**

Jérôme Labanowski^a, Julien Sebastia^a, Eddy Foy^b, Toine Jongmans^c, Isabelle Lamy^a,

Folkert van Oort^{a,*}

^aINRA, UR 251 Unité PESSAC, RD 10, F-78026 Versailles cedex, France

^bCEA-CNRS, UMR 9956, Laboratoire Pierre Süe, CEA-Saclay, 91191, Gif-sur-Yvette Cedex, France

^cWUR, Laboratory of Soil Science and Geology, PO Box 37, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

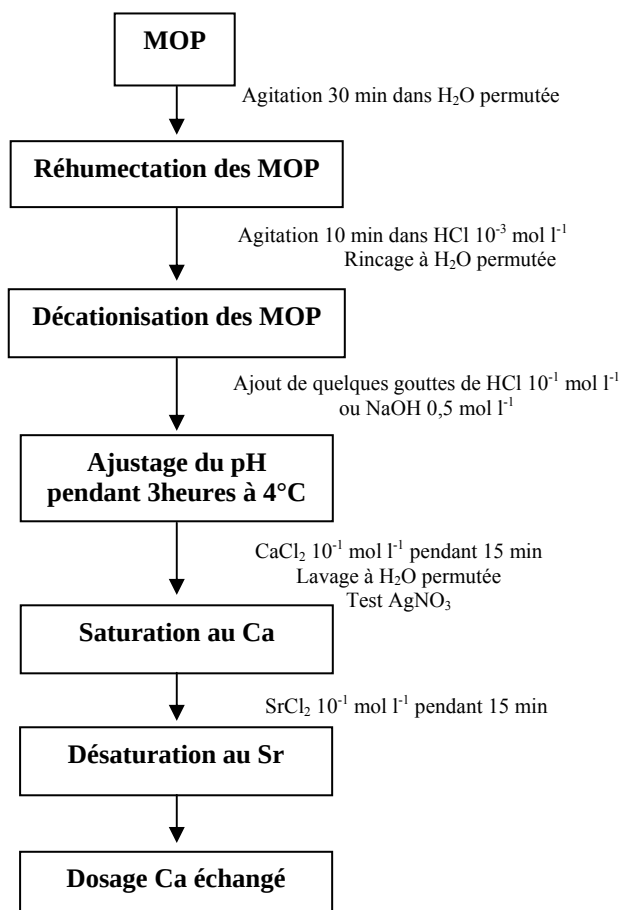
[doi:10.1016/j.envpol.2006.12.019](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.12.019)

Article accepté dans Environmental Pollution

Les MOS sont des constituants majeurs qui participent à l'immobilisation des métaux dans les sols. Parmi les MOS, les Matières Organiques Particulaires (MOP) accumulent de large quantité de métaux, mais le devenir de l'association MOP-métaux est méconnu. Dans ce travail, nous avons étudié l'horizon de surface d'un sol agricole qui a été affecté par des retombées métallurgiques. Nous avons extraits différentes tailles de MOP et de fractions minérales. Des extractions EDTA ont été effectuées sur toutes les fractions isolées. Les résultats montrent que plus les MOP sont petites, plus les teneurs en métaux sont élevées mais moins les métaux sont extractibles à l'EDTA. L'étude micro-morphologique révèle la présence de parties opaques sur les MOP ainsi que la présence de fragments opaques individualisés dans la matrice du sol. Ce travail suggère une séquestration mutuelle des métaux et du carbone organique en particules organique enrichies en métaux de taille micrométrique dérivées des MOP. Cette séquestration mutuelle représenterait un mécanisme d'atténuation naturelle de la pollution des sols par les métaux.

Annexe E :

Protocole pour la détermination de la Capacité d'Echange Cationique des MOP



Annexe F : Constantes de complexation pour les MOD

A partir des données génériques de WHAM (model VI) (Tipping, 1998) pour les AF (Tableau 1), nous avons recalculé les constantes de complexation pour le Ca, Fe et Mg avec nos AF extraits du sol total.

<i>Proton</i>	Métaux
	$\log K_{MA}$:
	Mg 1,1
	Ca 1,3
	Fe (III) 2,4
$pK_A = 3,2$	$\log K_{MB} = 3,39$
$pK_B = 9,4$	$\log K_{MA} - 1,15$ d'où :
$\Delta pK_A = 3,3$	Mg 2,6
$\Delta pK_B = 4,9$	Ca 3,6
	Fe (III) 6,98
	$\Delta LK_1 = 2,8$

_A site du type carboxylique

_B site du type phénolique

$\log K_{MA}$ constante de formation du métal avec le site _A

$\log K_{MB}$ constante de formation du métal avec le site _B

Tableau 1 Données génériques pour les AF de WHAM (Tipping, 1998)

Dans WHAM, chaque type de site est divisé en 4 sites (8 sites au total) et chaque pKa des 8 sites peut être exprimé suivant les équations suivantes. Les valeurs des pKa sont données dans le Tableau 2.

$$\text{Pour les sites carboxyliques} \quad pKi = pK_A + \frac{(2i-5)}{6} \Delta pK_A \quad (i=1-4)$$

$$\text{Pour les sites phénoliques} \quad pKi = pK_B + \frac{(2i-13)}{6} \Delta pK_B \quad (i=5-8)$$

Site du type carboxylique	Site du type phénolique
i=1 $\rightarrow pK_1 = 1,55$	i=5 $\rightarrow pK_5 = 6,95$
i=2 $\rightarrow pK_2 = 2,65$	i=6 $\rightarrow pK_6 = 8,58$
i=3 $\rightarrow pK_3 = 3,75$	i=7 $\rightarrow pK_7 = 10,21$
i=4 $\rightarrow pK_4 = 4,85$	i=8 $\rightarrow pK_8 = 11,85$

Tableau 2 pKa des 8 sites des données génériques de WHAM

Par comparaison des pKa obtenus pour nos acides fulviques dans le chapitre III, (Table 1, Article), nous avons calculé les constantes de complexation avec Ca, Mg, Fe(III) et Cu (Tableau 3) pour les site i=4 et 6 suivant les équation suivantes :

$$\text{Pour les sites carboxyliques} \quad \log K_i = \log K_{MA} + \frac{(2i-5)}{6} \Delta LK_1 \quad (i= 1-4)$$

$$\text{Pour les sites phénoliques} \quad \log K_i = \log K_{MB} + \frac{(2i-13)}{6} \Delta LK_1 \quad (i= 5-8)$$

Site du type carboxylique i=4	Site du type phénolique i=6
Ca $\rightarrow$ $\log K = 2,70$	Ca $\rightarrow$ $\log K = 2,79$
Mg $\rightarrow$ $\log K = 2,50$	Mg $\rightarrow$ $\log K = 2,11$
Fe(III) $\rightarrow$ $\log K = 3,80$	Fe(III) $\rightarrow$ $\log K = 6,51$
FeOH $^{2+}$ $\rightarrow$ $\log K = 3,80$	FeOH $^{2+}$ $\rightarrow$ $\log K = 6,51$
Cu(II) $\rightarrow$ $\log K = 3,50$	Cu(II) $\rightarrow$ $\log K = 5,50$
CuOH $^{+}$ $\rightarrow$ $\log K = 3,50$	CuOH $^{+}$ $\rightarrow$ $\log K = 5,50$

Tableau 3 Constantes de complexation entre les sites i=4, 6 des AF avec Ca, Mg, Cu et Fe

Pour les complexes mixtes entre AF et les premiers produits d'hydrolyses pour le Fe et Cu (CuOH $^{+}$ et FeOH $^{2+}$), les constantes de complexation sont considérées comme identiques à celles avec les ions libres (Tipping et al, 1998).

Ces constantes sont ensuite transformées suivant le formalisme d'entrée des données d'ECOSAT. Pour les constantes de complexation avec les ions libres, le formalisme est identique entre WHAM et ECOSAT. Par contre, il faut modifier les constantes des complexes mixtes. Les équations des constantes pour les complexes mixtes exprimées par WHAM et ECOSAT sont données ci-dessous.

$$AF^{-} + M^{Z+} + OH^{-} \Leftrightarrow AFMOH^{Z-1} \quad K_{ECOSAT} = \frac{[AFMOH^{Z-1}]}{[AF^{-}][M^{Z+}][OH^{-}]} \quad (1)$$

$$AF^{-} + MOH^{Z-1} \Leftrightarrow AFMOH^{Z-1} \quad K_{WHAM} = \frac{[AFMOH^{Z-1}]}{[AF^{-}][MOH^{Z-1}]} \quad (2)$$

En utilisant les constantes d'hydrolyse données par ECOSAT exprimées par l'équation 3 -pour le métal considéré- et en combinant les équations 1 et 2, on arrive à l'équation 4 donnant une relation simple entre K_{ECOSAT} et K_{WHAM} . Les constantes ainsi calculées sont regroupées dans le Tableau 4.

$$M^{Z+} + OH^{-} \Leftrightarrow MOH^{Z-1} \quad K_{HydroECOSAT} = \frac{[MOH^{Z-1}]}{[M^{Z+}][OH^{-}]} \quad (3)$$

$$K_{ECOSAT} = K_{WHAM} \times K_{HydroECOSAT} \quad (4)$$

Site du type carboxylique i=4	Site du type phénolique i=6
Ca → log K = 2,70	Ca → log K = 2,79
Mg → log K = 2,50	Mg → log K = 2,11
Fe(III) → log K = 3,80	Fe(III) → log K = 6,51
FeOH ²⁺ → log K = 15,61	FeOH ²⁺ → log K = 18,32
Cu(II) → log K = 3,50	Cu(II) → log K = 5,50
CuOH ⁺ → log K = 9,8	CuOH ⁺ → log K = 12,1

Tableau 4 Constantes WHAM transformées pour ECOSAT

Les mêmes transformations sont effectuées pour intégrer dans ECOSAT les constantes des acides fulviques extraits du sol total (Chapitre III) et les constantes des autres fractions organiques étudiées. De plus, ces constantes ont été corrigées pour une force ionique nulle suivant l'équation de Davies (Tableau 6)

Site du type carboxylique	Site du type phénolique
Pour NA :	
Cu(II) → log K = 3,69	
CuOH ⁺ → log K = 10,59	
Pour S et CC:	Pour Na, S et CC
Cu(II) → log K = 3,69	CuOH ⁺ → log K = 12,76
CuOH ⁺ → log K = 11,57	

Tableau 5 Constantes des AF du sol extraits Chapitre III

En comparant avec les valeurs obtenues d'après WHAM, les constantes de complexation sont similaires pour le Cu avec les groupements carboxylique et légèrement sous-estimer pour les constantes de complexation des complexes mixtes. Un récapitulatif est des constantes utilisées pour la MOD est donné dans le Tableau 6.

Constantes de formation des complexes	
AF-S1-Ca → log K°=2,70 AF-S2-Ca → log K°=2,79 AF-S1-Mg → log K°=2,50 AF-S2-Mg → log K°=2,11 AF-S1-Fe(III) → log K°=3,80 AF-S1-Fe(III)OH → log K°=15,61 AF-S2-Fe(III)OH → log K°=18,33 Constantes calculées à partir des données et équations de Tipping, 1998 et Tipping et al, 2002 (cf. annexe E)	Constantes déterminées au chapitre III recalculés pour I=0 par correction avec les coefficients d'activité donnés par l'équation de Davies $\log(\gamma_z) = -0,51 \times z^2 \left(\left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \right) - 0,3I \right)$ I= force ionique z=charge de l'ion

Tableau 6 Constantes utilisées pour la complexation des métaux avec les MOD

Annexe G :

Données d'entrée et de validation pour prévision de la spéciation du cuivre

1. La solution du sol

Les valeurs obtenues pour les différents éléments ont été mesurées lors de l'étude menée au Chapitre V. Toutes les données ont été utilisées comme données d'entrée pour la modélisation sauf les teneurs en Cu en solution qui ont été utilisées comme données de validation. Les valeurs ci-dessous résultent de la moyenne de trois microcosmes indépendants.

1.1. Caractéristiques de la solution du sol sans ajout de Cu (microcosme H₂O t=0j)

	<i>pH</i>	Na mmol.l ⁻¹	K mmol.l ⁻¹	Ca mmol.l ⁻¹	Mg mmol.l ⁻¹	Fe μmol.l ⁻¹	Cu μmol.l ⁻¹	Cl mmol.l ⁻¹	NO ₃ mmol.l ⁻¹	SO ₄ mmol.l ⁻¹	CO ₃ mmol.l ⁻¹	COD mg C.l ⁻¹
NA	7,31	0,32	0,97	4,22	0,75	38,26	3,36	0,68	1,65	1,92	0,27	52,25
S	7,18	0,31	1,48	2,58	0,56	56,38	3,14	0,62	1,83	0,78	0,22	96,22
CC	7,24	0,56	1,11	5,77	0,84	74,84	1,84	0,94	8,01	1,60	0,17	109,60

1.2. Caractéristiques de la solution du sol avec ajout de Cu (microcosme Cu t=0j)

	<i>pH</i>	Na mmol.l ⁻¹	K mmol.l ⁻¹	Ca mmol.l ⁻¹	Mg mmol.l ⁻¹	Fe μmol.l ⁻¹	Cu μmol.l ⁻¹	Cl mmol.l ⁻¹	NO ₃ mmol.l ⁻¹	SO ₄ mmol.l ⁻¹	CO ₃ mmol.l ⁻¹	COD mg C.l ⁻¹
NA	6,62	0,72	1,20	16,68	2,23	74,33	10,68	34,92	1,44	1,54	0,17	21,72
S	6,64	0,47	2,91	24,44	1,90	112,76	9,58	29,02	1,75	0,74	0,14	26,42
CC	6,68	0,85	1,97	13,92	1,96	149,67	12,64	26,59	5,48	1,38	0,13	71,50

1.2. Quantité de cuivre liée aux MOP

Les fractionnements granulo-densimétriques ont été réalisés suivant un protocole adapté de Balesdent et al. (1991). La quantité de cuivre mesurée avec les MOP a servi de donnée de validation

1.2.1. Sols sans ajout de Cu

fraction	NA		S		CC	
	mg de Cu kg ⁻¹ de fraction	mg de Cu lié aux MOP	mg de Cu kg ⁻¹ de fraction	mg de Cu lié aux MOP	mg de Cu kg ⁻¹ de fraction	mg de Cu lié aux MOP
MOP 50-200 µm	486,7	3,7	369,0	4,6	203,4	5,9
MOP 200-2000 µm	395,1	1,8	281,3	1,6	114,8	3,7

1.2.2. Sols avec ajout de Cu

fraction	NA		S		CC	
	mg de Cu kg ⁻¹ de fraction	mg de Cu lié aux MOP	mg de Cu kg ⁻¹ de fraction	mg de Cu lié aux MOP	mg de Cu kg ⁻¹ de fraction	mg de Cu lié aux MOP
MOP 50-200 µm	2575,0	19,3	2190,0	27,6	1676,7	48,8
MOP 200-2000 µm	1873,0	8,4	1313,3	7,6	649,7	20,7

Annexe H : Oxydes de fer et de manganèse

1. Oxydes de manganèse

1.1. Extraction des oxydes de manganèse

La proportion d'oxydes de manganèse dans les sols a été estimée par extraction à l'hydroxylamine suivant un protocole modifié de Chao (1972) :

↪ 0,5 g d'échantillon et 25 ml d'hydroxylamine hydrochloride ($\text{NH}_2\text{OH HCl}$ 0,5 N, pH=2) sont agités à température ambiante pendant 120 min dans l'obscurité

↪ L'échantillon est centrifugé à 5000 tr/min pendant 15 min et le surnageant est récupéré

↪ L'opération est répétée encore 2 fois

↪ Le Mn est dosé dans les surnageants extraits par absorption atomique

Les quantités de Mn extraites sont données dans le tableau ci-après

	Quantité de Mn extraite mg.kg^{-1} de sol	Oxydes de Mn mg.kg^{-1} de sol
NA	560 ± 91	1008 ± 163
S	500 ± 137	900 ± 246
CC	526 ± 142	947 ± 255

La teneur en oxydes de Mn –utilisée comme donnée d'entrée pour la modélisation- est obtenue en multipliant la quantité de Mn extraite par 1,8 en se basant sur la proportion de Mn dans la formule chimique de la birnessite ($\text{Na}_4\text{Mn}_{14}\text{O}_{27}9\text{H}_2\text{O}$) (Lapaire, 2007). Les teneurs en oxydes de Mn dans NA, S et CC sont similaires (Tableau 1). Ces résultats sont cohérents car il s'agit de sols développés sur une même roche mère

1.2. Donnée de réactivité

Pour modéliser les interactions oxydes de Mn et Cu pour nos échantillons, nous avons utilisé NICA-Donnan et les paramètres déterminés par Ponthieu (2003) pour la birnessite oxydes de Mn (Tableau 2).

Paramètres	Valeurs	Signification
b	0,2	Permet de calculer le volume du gel de Donnan
$Q_{\max}$	2,575 mol/kg	Quantité de sites réactifs
p	0,32	Paramètre d'hétérogénéité intrinsèque de la birnessite
Log K_H	4,22	Constante d'affinité du proton avec la birnessite
n_H	0,07	Paramètre de non idéalité du proton
Log K_{Cu}	4,70	Constante d'affinité du Cu avec la birnessite
n_{Cu}	0,50	Paramètre de non idéalité du Cu
Log K_{CuOH}	12,0	Constante d'affinité du CuOH avec la birnessite
n_{CuOH}	0,50	Paramètre de non idéalité du l'hydroxyde de Cu
Paramètres NICA-Donnan pour la birnessite déterminés par Ponthieu (2003)		

2. Oxydes de fer

2.1. Extraction des oxydes de fer

La proportion d'oxydes de fer dans les sols a été estimée par extraction au Dithionite de Na suivant le protocole adapté de Mehra et Jackson (1959) :

↳ 1,5 g d'échantillon et 30ml de solution tampon (0,3 M Citrate de sodium + 1,0 M NaHCO_3) sont placés au bain-marie à 80°C dans un flacon

↳ 0,5 g de dithionite de Na sont ajoutés en 3 fois. Après chaque addition, le flacon est agité pendant 1 minute puis occasionnellement pendant une durée totale de 15 minutes

↳ Après ces 15 minutes, 5 ml d'une solution saturée de NaCl sont ajoutés pour faciliter la floculation et le mélange est réchauffé au bain marie pendant 5 minutes

↳ Le surnageant est extrait par centrifugation à 5000 tr/min pendant 15 min et le Fe dosé par absorption atomique.

La quantité de fer extraite est donnée dans le tableau ci-après

	Quantité de Fe extraite g.kg ⁻¹ de sol	Oxydes de Fe g.kg ⁻¹ de sol
NA	15,23 ± 0,37	25,89 ± 0,62
S	13,58 ± 0,53	23,08 ± 0,90
CC	13,04 ± 0,61	22,17 ± 1,04

La teneur en oxydes de fer -utilisée comme donnée d'entrée pour la modélisation- est obtenue en multipliant la quantité de Fe extraite par 1,7 (Lumsdon, 2004). La teneur en oxydes de Fe dans les sols amendés (S et CC) est plus faible que pour NA. Néanmoins la teneur en oxydes de Fe reste de même ordre de grandeur entre NA, S et CC.

2.1. Donnée de réactivité

Dans les sols résident deux types d'oxydes de fer : les oxydes de fer amorphes tels que la ferrihydrite (HFO) et les oxydes de fer cristallisés tels que la goethite. Nous avons utilisé le modèle développé par Dzombak et Morel (1990) pour décrire l'interaction entre les oxydes de fer et le Cu pour nos sols. Les paramètres de ce modèle sont donnés dans le Tableau ci-dessous.

Paramètres	Valeurs	Signification
DS ₁	5,64 10 ⁻² sites/nm ²	Densité de site pour S ₁
DS ₂	2,26 sites/nm ²	Densité de site pour S ₂
log K _{S₁O⁻}	-8,93	Constante de dissociation de S ₁
log K _{S₁OCu⁺}	2,89	Constante d'affinité avec le Cu avec S ₁
log K _{S₁OH₂⁺}	7,29	Constante d'affinité avec le proton avec S ₁
log K _{S₂O⁻}	-8,93	Constante de dissociation de S ₂
log K _{S₂OCu⁺}	2,89	Constante d'affinité avec le Cu avec S ₂
log K _{S₂OH₂⁺}	7,29	Constante d'affinité avec le proton avec S ₂
S	100 m ² /g	Surface spécifique

Paramètres du modèle développé par Dzombak et Morel (1990)

Annexe I :

Extractions séquentielles du cuivre pour NA, S et CC avec ou sans ajout de cuivre

Réactifs et protocole utilisés

Les extractions séquentielles ont été effectuées selon le protocole de Schuman et al, 1985. Elles permettent de séparer 6 compartiments d'extraction qui sont détaillés dans le tableau ci-dessous. Les extractions séquentielles ont été réalisées par l'équipe de Dijon (UMR INRA Microbiologie et Géochimie des Sols - équipe GéoSol) sur les mêmes échantillons

	Compartiment d'extraction	Extractant
Phase 1	Echangeables	Nitrate de magnésium
Phase 2	MOS	Eau de javel
Phase 3	Oxydes de manganèse	Hydroxylamine
Phase 4	Oxydes de fer amorphes	Réactif de Tamm
Phase 5	Oxydes de fer cristallisé	Réactif de Tamm + acide ascorbique
Phase 6	Silicates et autres minéraux (fraction résiduelle)	Minéralisation avec acide fluorhydrique, nitrique et perchlorique

Résultats

Sol sans ajout de Cuivre (60 mg/kg)

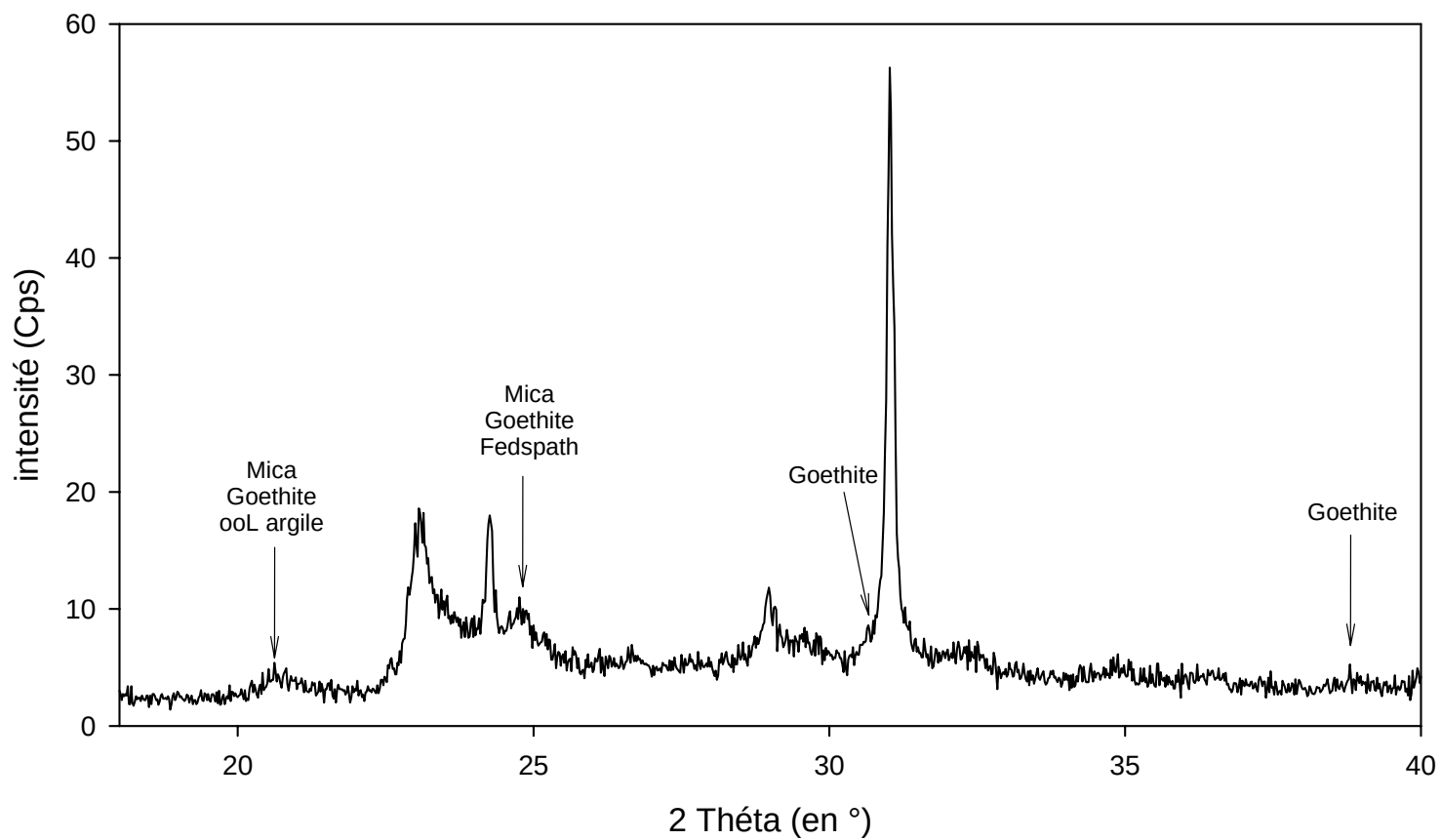
Compartiment d'extraction	% de Cu extrait		
	NA	S	CC
Echangeable	> 0,1	> 0,1	> 0,1
MOS	12	22	39
Oxydes de manganèse	32	23	4
Oxydes de Fer amorphes	34	32	32
Oxydes de Fer cristallisé	2	4	8
Résidu	20	18	18

Sol avec ajout de Cuivre (250 mg/kg)

Compartiment d'extraction	% de Cu extrait		
	NA	S	CC
Echangeable	> 0,1	> 0,1	> 0,1
MOS	18	30	62
Oxydes de Manganèse	40	32	10
Oxydes de fer amorphes	30	26	20
Oxydes de fer cristallisé	6	4	2
Résidu	6	6	5

Annexe J :
Analyse aux rayons X des fractions fines (NA)

1. Mise en évidence d'oxydes de fer cristallisés (poudre)



2. Les argiles du sol (dépôt orienté)

