HAL
open science

# Étude du chlore organique dans les sols et de sa formation en conditions biotiques et abiotiques

Aurélie Osswald

**To cite this version:**

Aurélie Osswald. Étude du chlore organique dans les sols et de sa formation en conditions biotiques et abiotiques. Sciences de la Terre. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0148 . tel-01495033

**HAL Id: tel-01495033**

**https://theses.hal.science/tel-01495033v1**

Submitted on 24 Mar 2017

**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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

**THÈSE**

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université de Lorraine en Géosciences

# ÉTUDE DU CHLORE ORGANIQUE DANS LES SOLS ET DE SA FORMATION EN CONDITIONS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES

par AURELIE OSSWALD

Soutenue publiquement le 6 juillet 2016

**MEMBRES DU JURY**

| | | |
|---|---|---|
| Mme Lucilla **BENEDETTI** | CEREGE, Université Aix en Provence | Rapporteur |
| Mme Corinne **PETIT** | LMGE Université de Clermont-Ferrand | Rapporteur |
| Mme Pascale **BAUDA** | LIEC Université de Lorraine | Examinateur |
| M Jean **LÉVÊQUE** | Biogéosciences Université de Bourgogne | Examinateur |
| Mme Corinne **LEYVAL** | LIEC Université de Lorraine | Directrice de thèse |
| Mme Anne **POSZWA** | LIEC Université de Lorraine | Co-directrice de thèse |
| M Yves **THIRY** | ANDRA, Paris | Invité |

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

UMR 7360 CNRS-UL - Bd des Aiguillettes 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

# Remerciements

Je remercie vivement l'ANDRA pour le financement de ma bourse de thèse et les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à adresser une reconnaissance particulière à Corinne Leyval, directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance et pour tous ses précieux conseils, pour sa disponibilité, pour son efficacité, sa patience.

Merci à Anne Poszwa, co-directrice de cette thèse, qui m'a guidée depuis 2011. Merci pour tous tes conseils, pour ta patience…

J'adresse également mes remerciements à Maïté Bueno, pour son accueil chaleureux à Pau, et pour nos échanges enrichissants. Je remercie également Emmanuelle Montargès-Pelletier, pour m'avoir initié à la spectrométrie Xanes.

Un immense merci à tout le personnel du LIEC… Patrick, Christian, Cécile, Thierry, David (pour ton acharnement sur l'AOX), Amélia, Joanne, Sylvie, Céline (pour les déjeuners au ru juste avant la fermeture), Géraldine, Dimitri (pour nos partages d'expérience).
Fadi (snow), coloc de bureau très sympa, merci pour ton optimisme et ta bonne humeur (parce que les libanais sont les meilleurs!).

Une pensée particulière à Christine pour ses nombreux coups de mains, ses conseils maternelles...et nos blabla sans fin.

Merci à Aurélien, Cindy, Micka (pour les stats à 2h du matin), Marine et Sophie (ma coloc de chambre)

Enfin, pour leurs soutien sans faille, pour leur adorable caractère de chaton...mille merci à toute l'équipe de Mamie-Geo et des danseurs du siuap (et d'ailleurs). A Esther (maman chat), Elo (bêêêê), Marion, Selmouch, Nelly, Pierrick (chami), Billy, Sofiane, Babette, Rémi, Aramis et Laura, Ivana, Jo Snow (pour ta vision du monde) et tous les autres…merci pour ces heures de danses endiablées !! Grâce à vous je me sens un peu plus libre et épanouis chaque jour!

Merci du fond du cœur !

# Table des matières

**Introduction Générale** ..... **3**

**1 Etat de l'art** ..... **9**

1.1 Les formes de chlore dans l'environnement ..... 9

1.2 Cycle du chlore dans un écosystème terrestre ..... 11

1.2.1 Apports de chlore aux sols ..... 11

1.2.2 Les sorties de chlore hors des sols ..... 14

1.3 Concentrations, stocks et paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols ..... 16

1.3.1 Concentrations et stocks de chlore dans les sols ..... 16

1.3.2 Paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols ..... 19

1.4 Processus de chloruration et de déhalogénation ..... 20

1.4.1 Processus de chloruration dans les sols ..... 20

1.4.2 Processus de déhalogénation ..... 24

1.5 Les techniques d'étude du chlore des sols ..... 25

1.5.1 Extractions du chlore organique et du chlore inorganique d'un échantillon de sol ..... 26

1.5.2 Mesures des teneurs en chlore des sols. ..... 26

1.5.3 Méthode de suivi de l'évolution des formes de chlore dans les sols ..... 27

1.6 Conclusion sur l'état de connaissance actuel des processus de chloruration et de déhalogénation dans les sols ..... 28

1.7 Objectifs de la thèse ..... 30

**2 Matériel, dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyses** ..... **35**

2.1 Matériel : Sites et sols étudiés ..... 35

2.1.1 Description des sites et des sols prélevés ..... 35

2.1.2 Méthode d'échantillonnage et données météorologiques. ..... 37

2.2 Dispositifs expérimentaux : incubations ..... 38

2.2.1 Stérilisation des sols ..... 39

2.2.2 Extraction de la microflore des sols ..... 39

2.2.3 Protocole de la première incubation : influence du sol, de l'ajout de chlore et des conditions d'aération ..... 41
2.2.4 Deuxième incubation : Influence de la ré-inoculation et de l'apport de Clin en conditions aérobies et anaérobies dans le sol irradié. ..... 42
2.2.5 Troisièmes incubations : du sol irradié et ré-inoculé avec ajout de $^{37}Cl$ ..... 43
2.3 Analyses réalisées sur les sols ..... 44
2.3.1 Mesures des teneurs en chlore des sols ..... 44
2.3.2 Analyse des autres paramètres physicochimiques des sols ..... 55
2.3.3 Analyse des paramètres microbiologiques ..... 56
2.3.4 Détermination de la spéciation du chlore dans les sols par spectrométrie XANES. ..... 62
2.3.5 Analyses statistiques ..... 67
**3 Méthodes de mesure des teneurs en chlore du sol : comparaison et choix ..... 71**
3.1 Matériel et méthode ..... 71
3.1.1 Protocoles d'extraction du chlore organique ..... 71
3.1.2 Protocole de solubilisation du chlore des échantillons solides pour l'analyse par ICP MS HR ..... 75
3.1.3 Optimisation de la méthode de mesure des teneurs en chlore par analyseur d'AOX. ..... 77
3.1.4 Comparaison de méthodes de mesures des formes de chlore ..... 79
3.2 Résultats ..... 79
3.2.1 Influence du protocole d'extraction employé sur les teneurs en chlore organique ..... 79
3.2.2 Influence du protocole de minéralisation ou d'extraction d'échantillons solides sur la récupération du chlore en solution pour l'analyse par ICP MS HR ..... 81
3.2.3 Influence des conditions de préparation et d'analyse sur les teneurs en chlore mesurées ..... 85
3.2.4 Comparaison de méthodes de mesures des formes de chlore ..... 90
3.2.5 Discussion - Conclusion sur l'influence des conditions d'extraction et d'analyse sur la mesure des teneurs en chlore ..... 95
**4 Influence des paramètres environnementaux et biophysicochimiques sur la répartition des teneurs en chlore dans les sols. ..... 101**

4.1 Répartition des teneurs en chlore au cours du temps. ..... 101
4.2 Conditions météorologiques avant les trois périodes de prélèvements des échantillons de sols ..... 106
4.3 Propriétés physico-chimiques des échantillons de sols ..... 108
4.3.1 Taux d'humidité des échantillons de sols ..... 108
4.3.2 Teneurs en carbone total et rapports C/N des échantillons de sols issus des trois campagnes de prélèvements. ..... 108
4.3.3 pH des échantillons de sols issus des 3 campagnes de prélèvements ..... 111
4.3.4 Teneurs en éléments totaux et échangeables dans les échantillons prélevés en 2012, 2013 et 2014 sur les sites des Vosges et de Meuse. ..... 112
4.3.5 Granulométrie mesurée sur les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. ..... 116
4.4 Caractéristiques microbiologiques des échantillons de sols ..... 117
4.4.1 Quantification des gènes 16S et 18S présents dans les échantillons de sols rélevés en 2012, 2013 et 2014. ..... 117
4.4.2 Activités enzymatiques FDA, laccase, amino-peptidase et phosphatase mesurées dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. ..... 120
4.5 Discussion sur l'influence des paramètres biophysicochimiques sur la répartition es teneurs en chlore dans les sols ..... 124
**5 Evolution des formes de chlore au cours du temps lors d'incubations en conditions biotiques et abiotiques et étude exploratoire de la spéciation du chlore ..... 135**
5.1 Activité de respiration des microorganismes et teneurs en chlore dans les incubations des sols VF et MF autoclavés et réinoculés ..... 138
5.1.1 Incubation de l'échantillon de sol forestier des Vosges (VF 2013) ..... 139
5.1.2 Incubation de l'échantillon de sol forestier de Meuse (MF 2013) ..... 140
5.2 Evolution des teneurs en chlore total et organique lors des incubations du sol VF2014 irradié : influence de la ré-inoculation et de l'apport de chlore inorganique. ..... 141
5.2.1 Activité de respiration des microorganismes ..... 141
5.2.2 Activités enzymatiques FDA, laccase, amino-peptidase et phosphatase ..... 143
5.2.3 Teneurs en chlore obtenues après incubations par analyseur d'AOX ..... 144

5.3 Analyse exploratoire par spectrométrie XANES de la spéciation du chlore des échantillons de sol incubés ..... 147
5.3.1 Spectres des standards..... 147
5.3.2 Spéciation du chlore dans les échantillons de sols des Vosges ..... 149
5.3.3 Spéciation du chlore dans les sols de Meuse ..... 153
5.3.4 Détermination du caractère aliphatique ou aromatique des composés organochlorés..... 155
5.4 Discussion : évolution des formes de chlore dans les sols lors des incubations en conditions stériles ou ré-inoculées, aérobies ou anaérobies, et avec ou sans ajout de chlore. ..... 156
5.4.1 Répartition des teneurs en chlore dans les sols incubés ..... 156
5.4.2 Apports de la spectrométrie XANES à l'étude de la spéciation du chlore dans les échantillons de sol incubés ..... 158
5.4.3 Influence du mode de stérilisation sur l'obtention des témoins abiotiques .... 159
5.4.4 Effet de l'inoculation microbienne des sols sur l'évolution des formes de ..... chlore..... 160
5.4.5 Effet de l'anaérobiose sur l'évolution des formes de chlore ..... 161
5.5 Conclusion ..... 162
**6 Contribution de l'activité microbienne a la formation de chlore organique dans un sol forestier lors d'une incubation avec du $^{37}$Cl comme traceur. ..... 165**
6.1 Introduction..... 169
6.2 Materials and methods ..... 171
6.2.1 Soil sampling and characterization ..... 171
6.2.2 Incubation experiments ..... 172
6.2.3 Microbial activity analyses ..... 173
6.2.4 Chlorine pool extraction..... 173
6.2.5 Chlorine analyses..... 176
6.2.6 Statistical analyses..... 178
6.3 Results ..... 178
6.3.1 Chlorine distribution in the sterilized forest soil samples. ..... 178
6.3.2 Chlorine distribution in the sterilized soil after two weeks of incubation in abiotic conditions ..... 179

6.3.3 Proportion of added $^{37}$Clin incorporated in organically bound chlorine after incubation with or without microbial inoculation ..... 180
6.4 Discussion ..... 184
6.4.1 Chlorine content in soil before incubation ..... 184
6.4.2 Abiotic formation of organically bound chlorine ..... 185
6.4.3 Organically bound chlorine formed during biotic incubation ..... 186
6.5 Conclusion ..... 188
7 Discussion Générale et Perspectives ..... **191**
7.1 Mesure des teneurs en chlore dans les sols ..... 192
7.1.1 Mesures par analyseur d'AOX ..... 192
7.1.2 Mesures par ICP MS HR ..... 193
7.1.3 Etude exploratoire de la spéciation des molécules organo-chlorées dans les sols par spectrométrie XANES ..... 194
7.2 Relation entre la teneur en chlore et les paramètres microbiologiques ..... dans les sols ..... 194
7.3 Mise en évidence expérimentale de la formation de chlore organique par des activités microbiennes dans des sols ..... 197
7.4 Suivi de la formation de chlore organique des sols par marquage et traçage au $^{37}$Cl : processus biotique ou abiotique ? ..... 198
7.5 Conclusion ..... 199
7.6 Perspectives ..... 202
**Bibliographie** ..... **207**
**Annexes** ..... **225**

# Liste des Figures


Figure 1.1. Principales sources d'apports (flux d'entrée) et de perte (flux de sortie) de chlore au sol.16

Figure 1.2. Teneurs en chlore des sols et processus de formation et de dégradation du chlore organique. ..... 25

Figure 1.3. Bilan des données obtenues dans la littérature sur le chlore dans les sols. ..... 29

Figure 2.1. Schéma explicatif de la méthode de prélèvement des échantillons de sols. ..... 37

Figure 2.2. Schéma des différentes modalités mises en place dans le premier dispositif ..... d'incubations. ..... 42

Figure 2.3. Schéma des différentes modalités mises en place dans le deuxième dispositif d'incubations. ..... 43

Figure 2.4. Schéma des différentes modalités mises en place dans la troisième série..... d'incubations. ..... 44

Figure 2.5. Protocole d'extraction et de mesure des teneurs en chlore organique extractible, organique non extractible et inorganique selon Bastviken et al. (2007). ..... 45

Figure 2.6. Schéma des différentes étapes de mesure du chlore par analyseur d'AOX..... 48

Figure 2.7. Exemple de signal électrique obtenu suite à une mesure par la cellule électrolytique. .... 49

Figure 2.8. Schéma de l'effet photo-électrique ..... 62

Figure 2.9. Spectre d'absorption des rayons X au seuil K du Cl. ..... 63

Figure 2.10. Vue de la chambre-échantillon (Flanck et al. (2006)). ..... 64

Figure 2.11. Spectres obtenus par spectrométrie XANES dans les travaux de Leri et al., 2007..... 66

Figure 3.1. Protocole simplifié d'extraction et de séparation du $Cl_O$ et du $Cl_{in}$ ..... 72

Figure 3.2. Colonne de filtration Xprep3 et principe de l'extraction du $Cl_O$ et $Cl_{in}$ ..... 73

Figure 3.3. Protocole d'extraction et de mesure des teneurs en $Cl_O$ et du $Cl_{in}$ selon la norme ..... NF 16166. ..... 74

Figure 3.4. Teneurs en $Cl_O$ obtenues pour VF2012 après application des 3 protocoles d'extraction..80

Figure 3.5. Teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ de l'échantillon VF2012 mesurées par chromatographie ionique après minéralisation des échantillons par combustion et piégeage dans les différentes solutions. ..... 81

Figure 3.6. Teneurs en $Cl_{TOT}$ du sol certifié mesurées par chromatographie ionique après piégeage dans les différentes solutions. ..... 82

Figure 3.7. Signal obtenu par ICP MS HR des solutions issues de la minéralisation par fusion alcaline. ..... 83
Figure 3.8. Teneurs en chlore obtenues par ICP MS HR après extraction au TMAH des échantillons de sols prélevés en 2014. ..... 85
Figure 3.9. Teneurs en $Cl_{TOT}$ obtenues pour VF2012 en fonction de la prise d'essai. ..... 86
Figure 3.10. Teneur en $Cl_O$ obtenue pour VF2012 selon 3 modalités. ..... 87
Figure 3.11. Contamination d'un échantillon de charbon actif en $Cl_{TOT}$ au cours du temps. ..... 88
Figure 3.12. Teneurs en $Cl_{TOT}$ obtenues pour VF2012 avec et sans humidification des gaz de combustion et avec ou sans ajout d'un catalyseur $V_2O_5$. ..... 89
Figure 3.13. Teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ pour les échantillons de sol VF2012 et MF2012 obtenues par deux analyseurs d'AOX. ..... 90
Figure 3.14. Teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ obtenues par analyseur d'AOX 1 et par activation neutronique pour CE, VF, VP, MF et MC. ..... 91
Figure 3.15. Teneurs en $Cl_{TOT}$ de l'horizon de sol CE certifiée, obtenues par activation neutronique et par analyseur d'AOX 1. ..... 93
Figure 3.16. Rendement de la mesure de chlore total ($Cl_{TOT}$) et organique ($Cl_O$) par analyseur d'AOX par rapport à l'activation neutronique pour les échantillons de sol CE, VF, VP, MF et MC. ..... 94
Figure 4.1. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons VF prélevés en 2012, 2013 et 2014. ..... 102
Figure 4.2. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX pour les échantillons VP prélevés en 2013 et en 2014. ..... 103
Figure 4.3. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons MF aux 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). ..... 104
Figure 4.4. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons MC aux 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). ..... 105
Figure 4.5. Hauteur de précipitations quotidiennes cumulées (mm) sur 15 jours avant la date de prélèvement de l'échantillon de sol pour les 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). ..... 106
Figure 4.6. Température moyenne (°C) relevée sur 15 jours avant la date de prélèvement des échantillons de sols pour les prélèvements de 2012, 2013 et 2014. ..... 107

Figure 4.7. Teneurs en carbone total pour l'ensemble des échantillons prélevés sur les différents sites étudiés aux 3 dates de prélèvements.
Figure 4.8. Rapports C/N calculés pour l'ensemble des échantillons prélevés sur les différents sites étudiés aux 3 dates de prélèvements.....110
Figure 4.9. pH des sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. .....111
Figure 4.10. Rapports 18S/16S dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. .....119
Figure 4.11. Activité d'hydrolyse de la FDA (U) mesurée dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014.....120
Figure 4.12. Activité phosphatase (U) dans les échantillons de sols prélevés en 2014.....121
Figure 4.13. Activité amino-peptidase (U) dans les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014. ..122
Figure 4.14. Activité laccase (U) dans les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014. .....123
Figure 4.15. Analyse en Composante Principale (ACP).....124
Figure 4.16. Analyse en Composante Principale (ACP). 128
Figure 5.1. Evolution de l'émission de $CO_2$ (moyennes ± écart-type) des échantillons VF2013 (a) et MF2013 (b) au cours de la première incubation.....139
Figure 5.2. Evolution de l'émission de $CO_2$ au cours de la seconde incubation pour les échantillons VF2014 placés en condition aérobie. .....142
Figure 5.3. Activité enzymatique FDA, Phosphatase, Amino-peptidase et Laccase (U) des échantillons VF2014 (incubations 2).....143
Figure 5.4. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{ONE}$) obtenues par analyseur d'AOX pour les échantillons VF2014 irradiés après 54 jours d'incubation en condition aérobie ré-inoculés (Ré-inoculé) ou non (Stérile) et avec (ajout Cl) et sans ajout de Cl.....145
Figure 5.5. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{ONE}$) obtenues par analyseur d'AOX pour les échantillons VF2014 irradiés après 54 jours d'incubation en condition anaérobie ré-inoculés (Ré-inoculé) ou non (Stérile) et avec (-ajout Cl) et sans ajout de Cl .....146
Figure 5.6. Spectres obtenus pour les standards $Cl_{in}$ ($CaCl_2$ et $NH_4Cl$) et $Cl_O$ (CTCH et TCA). .....148
Figure 5.7. Exemples de spectres obtenus pour 3 prises d'essai distinctes préparées à partir d'un échantillon de sol (VF2013 initial sans traitement.).....150
Figure 5.8. Position du maximum d'absorption (X1) en fonction de l'énergie d'ionisation E0 sur les spectres des sols des Vosges VF2013 initial sans traitement (V ), stérilisé par autoclave (VA), VF2014 stérilisé par irradiation (VI ), incubation 1 – Ré-inoculé (i1-VR), incubation 1 – Ré-inoculé ajout de Cl (i1-VRCl) ainsi que ceux des standards acide trichloroacétique

(TCA), chlorotétracycline (CTCH), chlorure de calcium ($CaCl_2$) et chlorure d'ammonium ($NH_4Cl$). ..... 151

Figure 5.9. Position du maximum d'absorption (X1) en fonction de l'énergie d'ionisation E0 pour les échantillons par rapport aux standards : a) VF2013 initial avant incubation (V), VF2014 incubés après irradiation (i2-VI), après irradiation et ré-inoculation ( i2-VR) ; b) les mêmes modalités avec ajout de chlore ( i2-VICl et i2-VRCl) ; c) les échantillons incubés en conditions anaérobies VF2014 irradié (i2-Via), irradié et ré-inoculé (i2-VRa) et d) les mêmes modalités avec ajout de chore ( i2-VIaCl et i2-VRaCl). Les standards sont : acide trichloroacétique (TCA), chlorotétracycline (CTCH), chlorure de calcium ($CaCl_2$) et chlorure d'ammonium ($NH_4Cl$). ..... 152

Figure 5.10. Comparaison des énergies maximales X1 du premier pic en fonction des énergies d'ionisation E0 des standards par rapport aux échantillons M et MA. ..... 154

Figure 5.11. Position du maximum de l'absorption (X1) en fonction de l'énergie d'ionisation ($E_0$) obtenues sur les spectres des échantillons de sol de Meuse par rapport aux standards 155

Figure 5.12. Exemple de spectre obtenu pour un échantillon M (MF2013 initial sans traitement) comparé aux spectres des standards CTCH et TCA ..... 156

Figure 6.1. Chlorine fraction extraction steps applied in our study based on ..... Bastviken et al. (2007). ..... 175

Figure 6.2. $CO_2$ emission over time during the incubation of microorganism-inoculated and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ ..... 180

Figure 6.3. FDA enzymatic activity in microorganism-inoculated (inoculated) and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ after 15 (T1) and 90 days (T2) of incubation.... 181

Figure 6.4. Natural chlorine contents in microorganism-inoculated (inoculated) and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ after 15 (T1) and 90 days (T2) of incubation, analyzed by HR-ICP-MS. ..... 182

Figure 6.5. Tracer $^{37}Cl$ chlorine contents in microorganism-inoculated (inoculated) and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ after 15 (T1) and 90 days (T2) of incubation, measured by ICP-MS-HR. ..... 183

Figure 7.1. Bilan de l'état de connaissance du cycle du chlore des sols ..... 191

Figure 7.2. Dynamique du chlore en fonction de l'écosystème considéré. L'ensemble des données a été moyenné sur les 3 saisons de prélèvements. ..... 200

# Liste des Tableaux

Tableau 1.1. Bilan des données issues de la littérature concernant les flux d'entrée de chlore au sol par dépôts secs et humides. ..... 12
Tableau 1.2. Bilan des données issues de la littérature concernant les teneurs et les stocks en chlore dans les sols ..... 18
Tableau 2.1. Appellations données aux horizons de sols étudiés et nombre d'échantillons prélevés chaque année, sur chaque site. ..... 36
Tableau 2.2. Appellations des fractions de chlore obtenues grâce au protocole de Bastviken et al. 2007 ..... 47
Tableau 2.3. Paramètres d'acquisition de l'ICP MS HR ..... 51
Tableau 2.4. Programme nécessaire à la réalisation d'une qPCR 16S et 16S. ..... 59
Tableau 2.5. Volumes de solution tampon, de substrat et longueur d'onde de mesure propre à chaque test enzymatiques. ..... 61
Tableau 2.6. Récapitulatif des échantillons analysés par spectroscopie d'absorption X. $Cl_o$ = chlore organique, $Cl_{in}$ Chlore minéral ou inorganique XANES. ..... 65
Tableau 3.1. Teneurs en chlore total ($Cl_{TOT}$) et en chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$) mesurées par l'analyseur d'AOX et par ICP MS HR pour les sols VF et MF et rendement de la mesure par ICP MS HR par rapport à l'analyseur AOX. ..... 95
Tableau 3.2. Influence des paramètres impliqués dans la méthode d'extraction et d'analyse sur les teneurs en chlore mesurées ..... 96
Tableau 3.3. Bilan des résultats obtenus suite à la comparaison des différentes méthodes de mesure des teneurs en chlore. ..... 97
Tableau 4.1. Taux d'humidité (%) des échantillons de sols pour les 3 dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014). ..... 108
Tableau 4.2. Teneurs en éléments totaux de l'ensemble des échantillons de sols prélevés aux trois dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014). ..... 113
Tableau 4.3. Teneurs en éléments échangeables, CEC et S/T mesurés sur les échantillons de sols prélevés aux trois dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014). ..... 114

Tableau 4.4. Granulométrie 5 fractions mesurée sur les échantillons de sols prélevés en 2013 et..... 2014 .....116
Tableau 4.5. Nombre de copies de gènes bactériens (16S) et fongiques (18S) dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. .....118
Tableau 5.1. Conditions de mise en incubation et mesures réalisées sur les sols pour les deux expériences.....136
Tableau 5.2. Récapitulatif des modalités et des appellations des échantillons analysés par spectrométrie XANES. .....137
Tableau 5.3. Energies d'ionisation E0 et énergie du premier pic X1 propres à chaque standard .....148
Table 6.1. Natural and tracer $^{37}$Cl chlorine contents measured by HR-ICP-MS in the irradiated soil after $^{37}$Clin spiking (T0) and after 15 days of incubation in abiotic conditions.....179

# Introduction générale

# Introduction Générale

Le chlore, élément chimique du groupe des halogènes le plus abondant dans l'environnement, participe à un cycle biogéochimique complexe au sein des écosystèmes terrestres. Les chlorures, forme inorganique, ont longtemps été considérés comme inertes dans les sols et faiblement réactifs vis à vis des phases minérales des sols. Cependant, de récentes études démontrent que des quantités non négligeables de chlore sont retenues dans les sols, sous une forme organique (Bastviken et al. 2006 ; Johanssen et al. 2003 ; Rodstedth et al. 2003). La dynamique du chlore dans les écosystèmes terrestres et sa rétention dans les sols paraissent en fait régulées par la formation et la dégradation de molécules organo-chlorées via des processus naturels essentiellement issus de l'activité microbienne du sol (Bastviken et al. 2009 ; Verhagen et al. 1998). Des études rapportent également la formation de molécules organochlorées par des processus abiotiques (Keppler et al., 2000). Les quantités de chlore retenues dans les sols et les processus à l'origine de ces changements de spéciation du chlore sont encore peu documentés. Par ailleurs les paramètres environnementaux contrôlant ces processus restent à identifier. La dynamique du chlore représente donc un sujet d'intérêt et plus particulièrement lorsque l'on considère la toxicité du chlore, surtout ci celui-ci se trouve sous forme radioactive $^{36}Cl$.

Ce travail de thèse a pour objectif global d'améliorer la compréhension des processus biotiques et abiotiques amenant à la formation du chlore organique dans les sols. Il a été réalisé dans le cadre d'un partenariat avec l'Agence nationale de traitement des déchets radioactifs (Andra, projet BIOCHLO fiche n°40).

Le manuscrit de thèse débute par un chapitre « état de l'art » qui permet de faire un état des lieux des connaissances actuelles sur le cycle biogéochimique du chlore, et plus particulièrement sur le comportement du chlore dans les sols et sur les processus de chloruration. Cette partie souligne les grandes questions qui se posent encore concernant le cycle du chlore dans les écosystèmes terrestres, notamment la mise en évidence de la contribution des microorganismes dans les processus de chloruration et permet de justifier les objectifs principaux de l'étude.

Le deuxième chapitre intitulé «matériel, dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyses » présente les sites et les échantillons de sols utilisés ainsi que les protocoles de préparation des échantillons et les différentes techniques d'analyses qui ont été appliquées dans les différentes parties de ce projet.

Deux approches ont été menées parallèlement: (a) l'étude d'une relation in situ entre les teneurs en chlore et les paramètres microbiologiques des sols, (b) la mise en évidence de la formation de chlore organique au cours du temps lors d'incubations de sol, en lien avec une activité microbiologique.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés dans les 4 chapitres suivants du manuscrit.

Le troisième chapitre présente les résultats des tests réalisés sur les méthodes d'extractions et de mesures des teneurs des différentes formes de chlore dans les sols afin de choisir celles qui seront employées dans la suite de l'étude (décrites dans le chapitre 2). En effet, l'acquisition d'un équipement de type analyseur d'AOX au LIEC au démarrage de la thèse a nécessité des mises au point sur l'analyse par cette technique. Par ailleurs, l'utilisation de l'ICP MS HR pour analyser le $^{37}Cl$ et le $^{35}Cl$ a aussi nécessité des mises au point, notamment pour l'analyse à partir d'échantillons solides.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit permet d'étudier les relations entre les paramètres biophysicochimiques et environnementaux et les teneurs en chlore mesurées dans les sols. Pour cela, les teneurs en chlore ont été déterminées dans quatre sols contrastés prélevés à trois dates de prélèvement. Les données météorologiques ont été relevées sur chaque site de prélèvements et les échantillons de sol prélevés ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques et microbiologiques.

Le cinquième chapitre présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'évolution des formes de chlore au cours de l'incubation des sols au laboratoire. L'approche développée a pour but de préciser la contribution de l'activité microbienne au processus biotique de chloruration dans les sols. Pour cela, des expériences d'incubations de sols ont été mises en place selon différentes modalités. Le suivi et la mesure de paramètres microbiologiques, ainsi

que la mesure des teneurs en chlore des sols après incubation visait à estimer la vitesse de formation du chlore organique, en association ou non avec la présence de microorganismes. Par ailleurs, plusieurs échantillons issus de ces dispositifs ont été analysés par spectroscopie d'absorption X, XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) afin de tester le potentiel de cette méthode pour étudier plus précisément la spéciation du chlore organique (formes aliphatiques et aromatiques) des échantillons issus de ces dispositifs.

Le sixième chapitre doit permettre de préciser la contribution biotique et abiotique à la formation de chlore organique grâce à la mise en place de dispositifs d'incubations avec du $^{37}Cl$ comme traceur et fait l'objet d'une publication soumise dans le journal Soil Biology and Biochemistry. Il a pour objectif (a) de préciser le rôle des microorganismes dans le processus de formation du chlore organique, et (b) de tester une nouvelle méthode faisant intervenir du $^{37}Cl$ pour suivre la dynamique du chlore dans les sols.

La mise en place de cette expérience se déroule en deux étapes, après enrichissement des sols en $Na^{37}Cl$. Les analyses du chlore isotopique ont été réalisées à l'aide d'un ICP MS HR en collaboration avec le laboratoire LCABIE de l'Université de Pau. La première étape permet de déterminer la répartition des formes de chlore dans le sol stérilisé juste après l'ajout de $^{37}Cl$ et leur évolution lors d'une incubation en conditions abiotiques. La deuxième étape, quant à elle, avait pour objectif de mettre en évidence une évolution de la répartition des teneurs en chlore dans le sol en présence d'activité microbienne au cours du temps.

Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit fait l'objet d'une synthèse générale et d'une discussion sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude. Elle permet d'expliciter en quoi ce travail a contribué à une meilleure compréhension du cycle biogéochimique du chlore notamment en mettant en évidence (i) la relation entre microorganismes et teneurs en chlore dans les sols (ii) la contribution biotique au processus de chloruration. Dans cette partie sont présentées les conclusions générales de l'étude et de nouvelles perspectives d'études de la dynamique du chlore organique dans les sols et du rôle des microorganismes sont proposées.

# Chapitre 1

# Etat de l’art

# 1 Etat de l'art

## 1.1 Les formes de chlore dans l'environnement

Le chlore compte parmi les 20 éléments les plus abondants à la surface de la Terre (Winterton et al., 2000) et sa distribution dans l'atmosphère dépend de la distance à la mer, de l'évapotranspiration et des précipitations (Ericksson, 1960).

Le chlore est un élément chimique électronégatif du groupe des halogènes. Par ailleurs, il constitue un puissant oxydant dans les systèmes vivants.

Les chlorures sont majoritairement présents dans le sang, dans le plasma à une concentration de 100 $mmol.L^{-1}$ et dans les fluides interstitiels où ils jouent un rôle dans la régulation des fonctions musculaires et dans la transmission synaptique dans le système neuronal (Yunos et al., 2010).

Le chlore est principalement présent dans l'environnement sous forme de deux isotopes stables : $^{35}Cl$ (76%) et $^{37}Cl$ (24%). Il existe également 7 isotopes radioactifs du chlore, dont le principal est le $^{36}Cl$ qui présente un temps de demi-vie très long ($3.10^5$ ans). Cet isotope radioactif $^{36}Cl$ est un émetteur de faible énergie et de faible radiotoxicité, naturellement produit par interaction entre les radiations cosmiques et le Ca, Cl et K à la surface des roches et dans les sols ainsi que par capture neutronique de $^{35}Cl$ (White et Broadley, 2001).

La forme inorganique (chlorures ; $Cl^-$) du chlore, majoritairement présente dans les eaux, a longtemps été considérée comme inerte et faiblement réactive vis à vis des phases minérales du sol. De ce fait, supposées conservatives, les concentrations en chlorures ont été utilisées dans de nombreuses études comme traceur des origines et mouvements d'eau (Conway et al., 1942 ; Herczeg et Leaney, 1997) ainsi que dans le cadre de modèles de transports de contaminants (Kirshner et al., 2000). Cependant, de récentes études ont démontré l'existence de formes organiques de chlore dans l'environnement (Johanssen et al., 2003 ; Rodstedth et al., 2003 ; Bastviken et al., 2006).

L'origine de ces composés organochlorés (composés aromatiques, aliphatiques) était initialement attribuée à des activités anthropiques (Clarke et al., 2009) : dans l'industrie, le chlore est utilisé pour la purification de l'eau, le blanchissement du papier et des vêtements ou encore pour la fabrication de plastiques. L'exposition humaine au chlore, et plus

précisément aux formes volatiles de chlore, a donc lieu dans de nombreuses situations, en liaison avec des activités industrielles comme lors d'activités domestiques, où il peut causer des dégradations sur le système respiratoire. Les risques encourus dépendent de l'intensité et de la durée de l'exposition (Winder, 2001). Winder (2001) précise que l'exposition au chlore sous forme gazeuse tolérée doit être inférieure à 3 ppm. Par ailleurs, les composés organochlorés, et plus précisément le chlorométhane, sont responsables en partie de la destruction de la couche d'ozone dans la stratosphère (Derendorp et al., 2012). Simpson et al. (2007) et Bottenheim et Chan (2006) rapportent en effet que, pendant la période estivale (printemps) dans les régions polaires, les ions halogénés sont convertis en espèces halogénées réactives qui réduisent la couche d'ozone à un niveau proche de zéro.

Il a récemment été démontré que les composés organochlorés sont également produits de façon naturelle dans les écosystèmes (Bastviken et al., 2007 ; Clarke et al., 2009 ; Gribble et al., 1992 ; Redon et al., 2011). Asplund et Grimvall (1991), Grimvall et deLeer (1995) et Öberg et al. (1998) rapportent même l'identification et la caractérisation chimique de plus de 5000 composés organochlorés produits naturellement. L'apport de chlore organique par les pluies, par exemple, correspond majoritairement à des composés polaires, volatils à semi-volatils (chloroforme, chloroethylène, trichloroéthane, dichlorométhane) (Laniewski et al., 1999). Les composés volatils sont cependant présents à de faibles concentrations, de l'ordre du ppt (Svensson et al., 2007). Dans les écosystèmes terrestres, ces composés organochlorés (anisoles chlorés) constituent une gamme de molécules de hauts poids moléculaire (> 1000Da ; Gribble et al., 1992 ; Hjelm et al., 1996) ainsi que des macromolécules de structures indéterminées comme les substances humiques (Müller et al., 1996 ; Myneni et al., 2002).
Le processus naturel de formation de chlore organique dans les sols est appelé chloruration. La formation de ce chlore organique naturel dans les sols serait lié à l'activité des microorganismes des sols (Bastviken et al., 2007). La déhalogénation, qui quant à elle, correspond au processus inverse, et permet le passage des formes organiques de chlore vers une forme inorganique. a également été observée (Clarke et al., 2009). Les processus de chloruration et de déhalogénation sont supposés se produire en même temps dans les sols.

Le chlore est donc présent dans tous les compartiments des écosystèmes à la fois sous une forme inorganique et sous une forme organique. La répartition de ces formes de chlore dans les écosystèmes terrestres et dans les sols en particulier semble être le résultat de

processus naturels complexes de formation (chloruration) et de dégradation (déhalogénation) du chlore organique. Par ailleurs, les compartiments des écosystèmes terrestres échangent entre eux des flux de chlore qui vont influencer les concentrations et stocks de chlore dans les sols.

## 1.2 Cycle du chlore dans un écosystème terrestre

### 1.2.1 Apports de chlore aux sols

#### 1.2.1.1 Sources de chlore à un écosystème

Le chlore peut atteindre le sol par les dépôts atmosphériques secs (gaz et particules) ou humides (pluies et neiges). Les dépôts dépendent de la distance à la mer, de la direction du vent, des précipitations et de l'évapotranspiration (Ericksson et al., 1960 ; Potts et al., 1978 ; Draaijers et al., 1996 ; Clarke et al., 2009). Les dépôts humides de chlore total en Europe varient de 0,5 à 220 kg.ha.an$^{-1}$ (Clarke et al., 2009) tandis que les dépôts secs de chlore total sont estimés en moyenne à 6 kg.ha.an$^{-1}$, soit 15-73% des dépôts totaux (Svensson et al., 2010).

Les dépôts secs et humides sont principalement constitués de chlore inorganique. En France, les dépôts (secs et humides) de chlore atmosphériques sont inférieurs à 6 kg.ha.an$^{-1}$ à l'Est contre 50 kg.ha.an$^{-1}$ à L'Ouest (Redon et al., 2011). Ces résultats mettent bien en évidence une influence marine sur les dépôts. Dans le cadre d'une étude menée au Danemark, les dépôts atmosphériques de chlore inorganique ($Cl_{in}$) sont estimés à 100 kg.ha.an$^{-1}$ (Öberg et Gron, 1998). En considérant une concentration moyenne de chlore inorganique dans les dépôts humides de 0,1 mg.L$^{-1}$, un dépôt humide moyen annuel mondial de 1100000 km$^3$.an$^{-1}$ et des dépôts secs deux fois plus importants, alors le dépôt global de chlore inorganique à l'échelle de la planète serait de 33 millions de t.an$^{-1}$ (Öberg, 2003).

Les dépôts secs et humides contiennent également du chlore organique (Ennel et Wennberg, 1991 ; Grimvall et al., 1991 ; Grimvall et deLeer., 1995). Laniewski et al. (1995) et Öberg et Gron (1998), estiment, dans le cadre d'une étude menée au Danemark, que le chlore organique apporté par les dépôts atmosphériques est de 0,38 kg.ha.an$^{-1}$. Considérant les précipitations dans le monde proches de 1100000 km$^3$.an$^{-1}$ (Graedel et al., 1993), Öberg (2003) estime que le dépôt total de chlore organique serait de 1,1 millions de t.an$^{-1}$. L'origine

de ce chlore organique dans les précipitations est encore peu connue. Des sources anthropiques, notamment des polluants industriels comme les pesticides, ont été trouvées à des concentrations de l'ordre du ppt (Stringet et Jonston, 2001). Ces teneurs sont bien plus faibles (de 3 ordres de grandeur) que celles mesurées pour le chlore organique total trouvé dans les précipitations, laissant suggérer une origine naturelle au chlore.

Le tableau 1. 1 permet de faire un bilan des données concernant les flux d'entrée de chlore au sol par les dépôts secs et humides.

Tableau 1.1. Bilan des données issues de la littérature concernant les flux d'entrée de chlore au sol par dépôts secs et humides.

| **Auteur** | **Informations supplémentaires** | **flux de chlore total** | **flux de chlore organique** | **flux de chlore inorganique** |
|---|---|---|---|---|
| Clarke et al. (2009) | Dépôts humides (Europe) | 0,5-220 kg.ha.an$^{-1}$ | | |
| Svensson et al. (2010) | Dépôts secs | 15-73% des dépôts totaux 6 kg.ha.an$^{-1}$ | | |
| Redon et al. (2011) | Est de la France | | | < 6 kg.ha.an$^{-1}$ |
| | Ouest de la France | | | 50 kg.ha.an$^{-1}$ |
| Öberg et Gron (1998) | Danemark | | 0,38 kg.ha.an$^{-1}$ | 100 kg.ha.an$^{-1}$ |
| Öberg (2003) | Dépôt global à l'échelle mondiale | | 1,1 millions de t.an$^{-1}$ | 33 millions de t.an$^{-1}$ |

Classiquement il existe 2 sources externes d'éléments à un écosystème terrestre peu anthropisé : les dépôts atmosphériques et l'altération des minéraux du sol. Cependant, rares sont les minéraux contenant du chlore dans les roches. Ainsi, seule l'altération de certaines roches riches en minéraux contenant du chlore (sylvine et halite) conduit à un enrichissement des sols en chlore inorganique, à des endroits très localisés.

Les concentrations les plus importantes en Cl sont retrouvées dans les roches sédimentaires de type évaporites (Melkerud et al., 1992). Les roches magmatiques de type felsiques (silicatées), comme le granite, contiennent des teneurs en chlore inorganique plus faibles que les roches mères mafiques (basalte). Les minéraux contenant du chlore correspondent notamment à la halite (NaCl) ou à la sylvine (KCl). Lovett et al. (2005) estiment,

dans le cadre d'une étude menée aux Etats-Unis, que la contribution de l'altération à la teneur en chlore total du sol est de 2% pour un site développé sur roche mère granitique.

Dans les écosystèmes anthropisés, Bastviken et al. (2013) rappellent que les entrées de chlorures au sol d'origine anthropique par les irrigations ou les fertilisations représentent une part importante, notamment sur sols agricoles. L'irrigation, même avec une eau de faible salinité (200 g $Cl.m^3$) contribue à un apport de 1000 $kg.ha.an^{-1}$ (Xu et al., 2000). De cette façon, elle peut conduire à une accumulation de chlore inorganique dans les sols (Rengasamy et al., 2010).

Le salage des routes en hiver peut également augmenter la concentration en chlore inorganique dans les eaux de surface et les eaux profondes, et donc indirectement dans les sols par pollution diffuse (Ramakrishna et Viraraghavan, 2005). Ceci est d'autant plus marqué dans les pays où les précipitations sous forme neigeuse sont abondantes. Dans le Sud-Est de la Suède, Tröjbom et al. (2008) estiment que l'apport de chlore inorganique par salage est de 35 à 56% du chlore inorganique total contenu dans le sol.

#### 1.2.1.2 Apport de chlore à la surface du sol par le recyclage de litière

Le chlore, du fait de sa forte électronégativité, est impliqué en tant qu'agent de chloruration ou d'oxydation dans les systèmes vivants (Neidleman et Geigert, 1986 ; Gribble et al., 1992). Les chlorures participent à l'osmorégulation des cellules dans les plantes, ou la quantité minimale requise est de 1$g.kg^{-1}$ (White et Broadley, 2001) et sont impliqués dans le processus de photosynthèse, ou ils jouent le rôle de co-facteur d'enzymes (Winterton et al., 2000).

Le chlore peut être apporté à la surface du sol par la matière organique issue des végétaux, et plus particulièrement par les dépôts, la dégradation de litière (feuilles, branches, racines) et les pluviolessivats dans les écosystèmes forestiers.

Van den Hoff et Thiry (2012) montrent que le prélèvement annuel de chlore par une forêt de pin développée en Belgique sur un sol de type podzol est 9 fois supérieur à son besoin

en chlore. L'excès de chlore inorganique retourne alors au sol par les pluviolessivats et par la litière.

Bien que le chlore soit majoritairement présent sous forme inorganique dans les plantes, il apparait que la proportion de chlore organique augmente dans la plante au cours de sa sénescence et de sa dégradation (Leri et Myneni, 2011). La litière peut ainsi contenir à la fois du chlore inorganique et du chlore organique (Johansson et al., 2003 ; Öberg et al., 2005).

Bastviken et al. (2013), estiment l'apport de chlore par la litière à 0,1-2,5 $kg.ha.an^{-1}$ sur des écosystèmes forestiers situés en France. En considérant une production annuelle mondiale de litière d'environ 54,8 milliards de tonnes, un ratio Cl/C moyen dans les produits en décomposition de 0,1 $mg.g^{-1}$ de matière organique, alors l'apport de chlore au sol par la végétation est de 5,5 millions de $t.an^{-1}$ (Öberg, 2003)

Le chlore apporté au sol par les pluviolessivats est deux fois plus important que celui des dépôts atmosphériques (41 et 20 $kg.ha.an^{-1}$, respectivement ; Redon et al., 2011). Il dépend par ailleurs de la distance à l'arbre (Öberg, 2003). Öberg (2003) estime le dépôt annuel de chlore organique par les pluviolessivats à 0,04 $g.m^2$, soit 2,25 millions de $t.an^{-1}$ à l'échelle du globe.

### 1.2.2 Les sorties de chlore hors des sols

Les pertes de chlore par drainage profond ou drainage latéral des solutions de sol qui vont rejoindre les nappes ou rivières sont documentées principalement pour le chlore inorganique (Bastviken et al., 2013). Les données sur les pertes de chlore organique par drainage sont rares. Öberg et al. (1998) rapportent cependant que les eaux de drainage semblent contenir une concentration en chlore organique deux fois plus faible que celle en chlore inorganique dans le cas d'une étude menée sur une forêt située au Danemark. Öberg et Gron (1998) estiment que le transport par drainage de chlore organique est de 0,07 $g.m^2.an^{-1}$, soit 0,63 $kg.ha.an^{-1}$ dans une étude menée dans une forêt d'épicéa située au Danemark. Considérant une concentration moyenne de carbone dans les eaux de drainage de 50 $mg.L^{-1}$ et un ratio $Cl_O/C$ de 2 mg de $Cl_O.g^{-1}$ C, alors on obtient une concentration moyenne à l'échelle

mondiale de chlore organique dans les eaux de drainage de 100 µg.$L^{-1}$ et un transport annuel de 4,7 millions de tonnes (Öberg, 2003).

Par ailleurs, bien qu'étant considéré comme un flux faisant partie du cycle biologique interne à l'écosystème, le prélèvement de chlore par les plantes constitue également une voie d'exportation du chlore hors du sol. Les plantes doivent en effet absorber suffisamment de chlore inorganique pour remplacer les pertes par chutes de litières, lessivage/lixiviation des feuilles et permettre une accumulation de Cl dans la biomasse. De la même façon, l'exploitation du bois de forêt constitue une perte de chlore de l'écosystème.

Van den Hoff et Thiry (2012) précisent qu'une proportion de chlorures peut également quitter le sol par volatilisation. Öberg et Gron (1998) rapportent en effet que la fragmentation de substances chlorées dans les sols peut conduire à la formation de composés chlorés volatils. Les pertes de chlore du sol sous forme gazeuse sont observées dans une large gamme d'écosystèmes (Dimmer et al., 2001 ; Rhew et al., 2002 ; Albers et al., 2011) et dans différentes régions climatiques (Yokouchi et al., 2002 ; Rhew et al., 2008 ; Albers et al., 2011). Il a également été observé que ces flux varient avec la saison (Dimmer et al., 2001 ; Haselmann et al., 2002). De précédentes études identifient 7 composés organochlorés volatils principaux. Les plus importants correspondent au chlorométhane et au chloroforme (Hoekstra et al., 2001 ; Haselmann et al., 2002 ; Wang et al., 2007 ; Mead et al., 2008). Dimmer et al. (2001) ont évalué les émissions naturelles de chloroforme et de chlorométhane dans une forêt de conifères à 0,13 g.$m^2$.$an^{-1}$ et 0,04 g.$m^2$.$an^{-1}$, respectivement.

La figure 1. 1 permet de faire un bilan des principales sources d'apports (flux d'entrée) et de pertes (flux de sorties) de chlore aux sols.

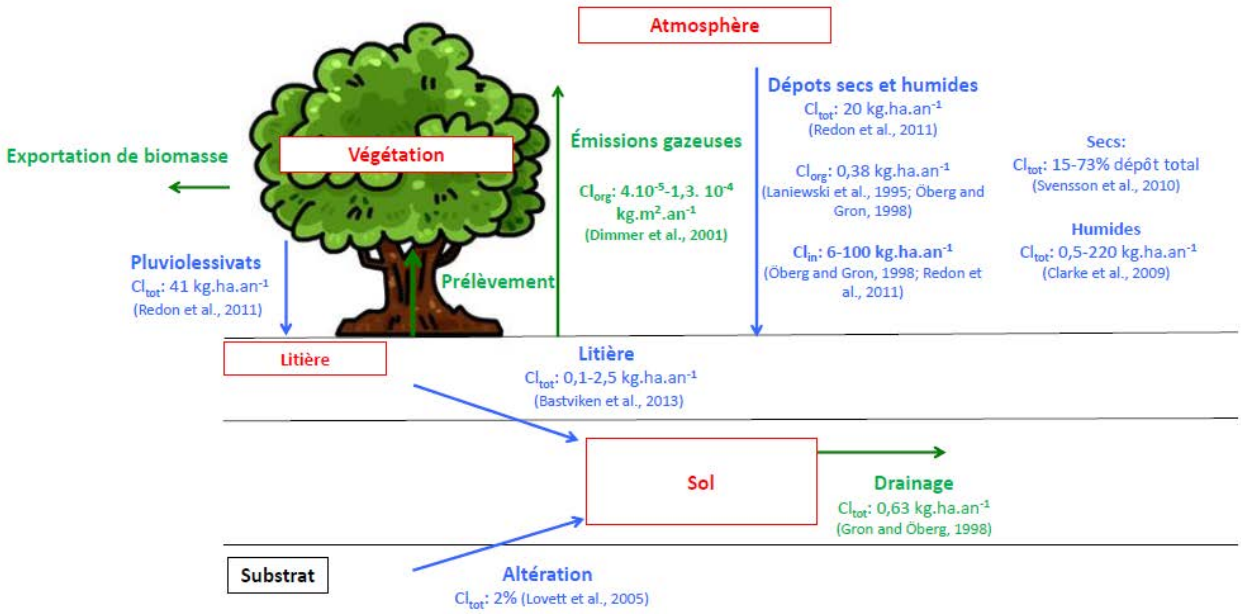



Figure 1.1. Principales sources d'apports (flux d'entrée) et de perte (flux de sortie) de chlore au sol.

Les teneurs en chlore dans les sols sont donc le résultat de flux d'entrées (apports de chlore au sol) et de flux de sorties (perte de chlore au sol). Ces flux correspondent à la fois à des flux de chlore inorganique et de chlore organique, bien que les flux de chlore inorganique soient dominants.

## 1.3 Concentrations, stocks et paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols

### 1.3.1 Concentrations et stocks de chlore dans les sols

Le tableau 1. 2 permet de faire un bilan des données connues sur les teneurs en chlore dans les sols. Les teneurs moyennes en chlore total mesurées dans les sols sont comprises entre 20 et > 1000 mg.kg$^{-1}$. La fraction de masse sèche que représente le chlore dans les sols, d'environ 0,01-0,5%, est du même ordre de grandeur que celle du phosphore (0,03-0,2%) (Öberg et al., 2002).

Dans les horizons de surface, les teneurs en chlore organique des sols sont en général supérieures à celles du chlore inorganique et représentent 80% du stock de chlore total (Öberg, 2003 ; Van den Hoff et Thiry, 2012 ; Pupier et al., 2015). Une étude menée au

Danemark estime le stock de chlore organique dans un sol forestier à 630 $kg.ha^{-1}$ (Öberg et Gron, 1998). Par ailleurs, différentes études mesurent des teneurs en chlore organique nettement supérieures (2 à 5 fois) dans l'horizon organique de surface (45-1041 $mg.kg^{-1}$) que dans les horizons plus profonds (25-340 $mg.kg^{-1}$) (Asplund et al., 1994 ; Redon et al., 2011 ; Pupier et al., 2015). A l'inverse, le rapport $Cl_O/C$ augmente avec la profondeur, de 1 dans la litière à 7 dans les couches profondes, et indique donc une préservation du chlore organique par rapport au carbone. Ceci suggère que les formes de chlore en profondeur sont faiblement biodisponibles et/ ou plus résistantes à la biodégradation (Öberg et al., 1998 ; Redon et al., 2011 ; Bastviken et al., 2013).

En considérant que le stock de carbone dans le sol dans le monde est de 1456 milliards de tonnes, que le rapport $Cl_O/C$ moyen est de 2,3, alors le stock de chlore organique dans la pédosphère (en considérant la totalité du profil) pourrait être équivalent à 3350 millions de tonnes (Öberg, 2003).

La concentration en chlore inorganique dans les sols, quant à elle, est comprise entre 37 et 130 $mg.kg^{-1}$ de sol, ce qui représente un stock dans les 15 premiers centimètres de sol compris entre 2 et 8 $mg.m^2$ (Johansson et al., 2000 ; Rodstedth et al., 2003). Dans les horizons de surface, la teneur en chlore inorganique est donc inférieure à la teneur en chlore organique. Cependant, en considérant que l'épaisseur totale des sols dans le monde est d'environ 2 mètres, que la densité moyenne des sols et de $1g.cm^3$ et que la concentration en chlore inorganique moyenne est de 100 $mg.kg^{-1}$ de sol, alors le stock de chlore inorganique dans la pédosphère (en considérant la totalité du profil) est estimé à 24 milliards de tonnes (Öberg, 2003). Ce stock de chlore inorganique calculé en considérant la totalité du profil de sol est donc supérieur à celui du chlore organique.

Tableau 1.2. Bilan des données issues de la littérature concernant les teneurs et les stocks en chlore dans les sols

| Teneurs en chlore | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Auteur** | **Type d'écosystème étudié** | **Teneur en chlore total** | **Teneur en chlore organique** | **Teneur en chlore inorganique** |
| Öberg et al. (2002) | | 20-1000 $mg.kg^{-1}$ | | |
| Asplund et al. (1994) ; Redon et al. (2011) ; Pupier et al. (2015) | Horizon de surface | | 45-1041 $mg.kg^{-1}$ | |
| | Horizon profond | | 25-340 $mg.kg^{-1}$ | |
| Johansson et al. (2000) ; Johansson et al. (2003) ; Rodstedth et al. (2003) | Ecosystème forestier (Suède) | | | 37-130 $mg.kg^{-1}$ |
| Redon et al. (2012) | Agricole | 19-100 $mg.kg^{-1}$ | | |
| | Prairie | 13-1248 $mg.kg^{-1}$ | | |
| | Forestier | 34-340 $mg.kg^{-1}$ | | |
| Redon et al. (2011) | Forestier | 90 $mg.kg^{-1}$ | | |
| | Cultivé | 50 $mg.kg^{-1}$ | | |
| | Prairie | 54 $mg.kg^{-1}$ | | |
| **Stocks de chlore** | | | | |
| **Auteur** | **Type d'écosystème étudié** | **Stocks de chlore total** | **Stocks de chlore organique** | **Stocks de chlore inorganique** |
| Öberg (2003) | Stock mondial dans la pédosphère | | 3350 millions de t | 24000 millions de t |
| | Horizon de surface | | 80% du chlore total | |
| Öberg et Gron (1998) | Ecosystème forestier (Danemark) | | 630 $kg.ha^{-1}$ | |

Contrairement aux flux, les stocks de chlore dans les horizons de surface des sols sont principalement dominés par le chlore organique. La répartition du chlore dans les sols semble donc influencée par des processus de formation (chloruration) et de dégradation (déhalogénation) de chlore organique.

### 1.3.2 Paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols

La répartition des teneurs en chlore organique et inorganique dans les sols dépend des flux d'entrée et de sortie de chlore hors des sols mais également des processus de chloruration et de déhalogénation dans les sols. Ainsi, les paramètres microbiologiques des sols, et indirectement les paramètres physico-chimiques et le climat influencent ces processus de transformation et stockage de chlore dans les sols sous une forme organique.

Redon et al. (2011) trouvent que les teneurs en chlore des sols varient selon les occupations végétales : les teneurs en chlore total sont plus importantes sous couvert végétal forestier (en moyenne de 90 $mg.kg^{-1}$) que sous couvert végétal cultivé ou de prairie (en moyenne 50 et 54 $mg.kg^{-1}$, respectivement ; tableau 1.2). Ces résultats sont en accord avec Redon et al. (2012), qui trouvent des teneurs en chlore total moyennes comprises entre 19 et 100 $mg.kg^{-1}$ dans des horizons de surface (0-30 cm) de sols agricoles, entre 13 et 1248 $mg.kg^{-1}$ dans des horizons de surface de sols de prairie (1248 $mg.kg^{-1}$ mesuré dans un sol salés) et entre 34 et 340 $mg.kg^{-1}$ dans des horizons de surface de sols forestiers. Johansson et al. (2003) mesurent également des concentrations en chlore organique plus faibles dans des sols développés sous forêts de feuillus que dans des sols sous forêts de conifères.

Enfin, le pH des sols ainsi que leur teneur en carbone semblent être corrélés avec les teneurs en chlore. Redon et al. (2012) montrent que la teneur en chlore total des sols augmente avec une diminution du pH. Par ailleurs, Redon et al. (2011, 2012), trouvent que la teneur en chlore total et la teneur en chlore organique sont étroitement liées à la teneur en carbone organique des sols et plus généralement à la teneur en matière organique. Ils montrent que la teneur en chlore organique est plus importante pour des sols forestiers à fortes teneurs en carbone et à faible pH.

La répartition des teneurs en chlore des sols semble également dépendre des paramètres microbiologiques des sols. En conditions contrôlées, Bastviken et al. (2007) montrent en effet la rétention rapide du chlore inorganique par les microorganismes : 20% du chlore inorganique ajouté initialement au sol est incorporé dans la biomasse microbienne en 5 jours (Bastviken et al., 2007). Ces résultats suggèrent que de fortes quantités de chlore sont retenues dans la biomasse microbienne des sols. Par ailleurs, Bastviken et al. (2009) trouvent que le processus de formation du chlore organique dans les sols est principalement gouverné par des processus microbiologiques qui impliquent des activités enzymatiques.

## 1.4 Processus de chloruration et de déhalogénation

### 1.4.1 Processus de chloruration dans les sols

#### 1.4.1.1 Taux de formation de chlore organique

En termes de taux de formation du chlore organique, Bastviken et al. (2007) montrent, grâce à une expérience de traçage au $^{36}Cl$, une formation de chlore organique en 4 mois, qui correspond à une rétention de 4% du chlore inorganique. La formation de chlore organique dans le sol est estimée à 0,036 $g.m^2$ dans une étude menée au Nord du Danemark sur des sols forestiers (Öberg et al., 1998). Un taux de transformation du chlore inorganique ajouté en chlore organique de 1,4-90 ng.g sol. $jour^{-1}$ est observé suite à la mise en place de dispositifs d'incubations (Gustavsson et al., 2012). Öberg et al. (2005), quant à eux, estiment par modélisation le taux de chloruration dans des sols forestiers à 2-13 $kg.ha.an^{-1}$. Öberg et al. (1996) montrent, grâce à des expériences réalisées en conditions contrôlées, que la formation de chlore organique lors de la décomposition d'aiguilles d'épicéa atteint 50 $mg.kg^{-1}$ d'aiguilles jusqu'à ce que 30-40% de la litière soit dégradée (3-4 ans). Ensuite, cette concentration baisse rapidement jusqu'à devenir nulle.

#### 1.4.1.2 Paramètres influençant la chloruration dans les sols

Concernant la possible influence du climat, Johansson et al. (2004), suggèrent que, comme la formation de chlore organique a été observée dans diverses études sous différents climats et pour différents types de sols, le climat n'a pas ou peu d'impact sur le processus de chloruration. Cependant, l'apport de chlore par les précipitations peut conduire à une augmentation de la teneur en chlore dans les sols et ainsi influencer les taux de formation de chlore organique. De plus, une partie de la formation de chlore organique a lieu principalement pendant la dégradation de la litière et est de ce fait dépendante de la saison (Myneni et al., 2002 ; Leri et Myneni, 2011). Öberg et al. (1996) démontrent un effet de la saison avec une formation de chlore organique maximale en automne et minimale en été.

Bien que le processus de chloruration ait lieu dans tous les types de sols (Redon et al., 2012), le type d'occupation du sol semble avoir une influence sur le taux de formation du chlore organique. Johansson et al. (2004), mettent en évidence que la concentration en chlore organique ainsi que le rapport Cltot/C est plus important dans un sol de forêt que dans un sol de rizière. Redon et al. (2012) observent également que les teneurs en chlore organique sont plus importantes dans un sol forestier que dans un sol cultivé ou un sol de prairie.

Par ailleurs, les taux de chloruration ne sont pas identiques dans tous les horizons du sol. Bastviken et al. (2013) rapportent que la formation de chlore organique est plus importante dans la litière que dans les couches de sol plus profondes.

#### 1.4.1.3 Processus biotique

Les processus de chloruration, observés dans tous les types de sols (Redon et al., 2012 ; Bastviken et al., 2013) seraient liés au recyclage de la matière organique (Öberg et al., 1998 ; Winterton et al., 2000) et seraient essentiellement liés à l'activité microbienne du sol (Verhagen et al., 1998 ; Bastviken et al., 2009). Bastviken et al. (2007) montrent en effet, dans le cadre d'une expérience d'enrichissement de sol au $^{36}Cl$, une rapide rétention dans les sols de chlore inorganique par les microorganismes, en accord avec une formation sur le long terme de chlore organique. Ces auteurs indiquent que la formation de chlore organique par un processus biotique est optimale en présence d'oxygène et à une température de 20°C

(Bastviken et al., 2009). Cependant, dans leur expérimentation, les auteurs n'incluent pas de sol stérile servant de témoin. Les mesures sont réalisées uniquement sur un sol non stérile et ne permettent pas de comparer les teneurs en chlore en l'absence de microorganismes. De ce fait, il serait pertinent de comparer un sol stérile à un sol non stérile. Öberg et al. (2002) et Gribble et al. (2003) associent la formation de composés organochlorés à l'activité des champignons, des lichens, de certains organismes marins ou encore des insectes. Matucha et al. (2007) démontrent également grâce à une expérimentation menée sur des sols forestiers, la formation d'acides chloroacétiques et de chloroforme par des processus microbiologiques impliqués dans la dégradation de substances humiques.

#### 1.4.1.4 Les organismes responsables de processus de chloruration

Le processus de chloruration semble le résultat de l'activité de nombreux organismes comme les bactéries, les champignons, les plantes, les algues, les insectes et les mousses (Clutterbuck et al., 1940 ; Hunter et al., 1987, deJong et Field, 1997 et Öberg et al., 2002). Harper et al. (1995) montrent la formation de chlorométhane par des champignons qui méthylent les chlorures. Les Basidiomycètes sont les principaux champignons à être impliqués dans la synthèse de composés organiques chlorés (Verhagen et al., 1998). En effet, 20 familles et 68 genres de Basidiomycètes produisent des composés halogénés de faible poids moléculaire avec plus de 81 métabolites chlorés. Les deux grandes catégories de métabolites halogénés produits par les Basidiomycètes sont les composés aromatiques halogénés et les composés aliphatiques halogénés (deJong et Field., 1997).

#### 1.4.1.5 Mécanisme microbien de chloruration

La chloruration est un processus qui peut avoir lieu à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules microbiennes.

La chloruration intracellulaire est régulée par des processus enzymatiques. Les enzymes impliquées correspondent à des halogénases et des perhydrolases. Dans ce cas, la chloruration sert à la détoxification ainsi qu'à la production de composés chimiques (antibiotiques), d'hormones, ou encore de phéromones qui servent de défense (vanPee et al., 2003).

Le processus extracellulaire, quand à lui, se produit suite à l'action d'enzymes telles que des hemes ou des haloperoxidases (vanPee et al., 2001) et conduit dans un premier temps à la formation de chlore réactif (HOCl) suite à la réaction entre les ions chlorures ($Cl^-$) et le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) (réaction 1). Le chlore réactif (HOCl) ainsi formé est un oxydant fort qui réagit avec la matière organique des sols et notamment les acides humiques (AH) pour former des composés organochlorés (ACl) (réaction 2) (Hoekstra et al., 1999 ; vanPee et Unversucht, 2003).

Réaction 1 : $H_2O_2 + Cl^- + H^+ + \text{Enzyme} = HOCl + H_2O + \text{Enzyme}$

Réaction 2 : $HOCl + AH = ACl + H_2O$

Dans ce cas, la production de chlore réactif a pour objectif de servir de bactéricide utilisé par les phagocytes pour détruire les microorganismes invasifs (Apel et Hirt, 2004). Il joue le rôle d'antibiotique qui va éliminer les compétiteurs d'une même ressource (Bengston et al., 2009) .

Le processus de chloruration dans les sols est par ailleurs issu d'un processus de défense des microorganismes contre l'oxygène ou d'autres molécules oxydantes. Un dysfonctionnement du système de régulation de l'oxygène et de ses métabolites produit l'espèce $H_2O_2$ qui est à l'origine d'un stress oxydant. Cette espèce est beaucoup plus toxique que l'oxygène lui-même (Gardès-Albert et al., 2003). En cas de stress oxydatif, les microorganismes intègrent le chlore inorganique et forment du chlore réactif à l'aide de leurs enzymes. Le chlore réactif réagit alors avec la matière organique des sols pour former des composés organiques chlorés (Bengston et al., 2012).

Le processus de chloruration peut également avoir pour objectif l'alimentation des microorganismes. Les enzymes de type chloroperoxydase ont par exemple la capacité de briser des liaisons C-C de composés organiques réfractaires, les rendant alors plus biodisponibles (Hoekstra et al., 1999 ; vanPee et Unversucht, 2003). DeJong et Field. (1997) et Johansson et al. (2000) démontrent que l'exposition de lignine au chlore réactif augmente sa biodisponibilité. Les microorganismes principalement impliqués dans la dégradation de la

lignine correspondent à des champignons, dont le plus important est *Trametes versicolor* (Bergbauer et al., 1991).

#### 1.4.1.6 Processus abiotique

Quelques études rapportent la formation de molécules organochlorées par des processus abiotiques (Keppler et al., 2000 ; Bastviken et al., 2009 ; Clarke et al., 2009). Fahimi et al. (2003) démontrent en effet que l'ajout de $Fe^{2+}$ ou de $Fe^{3+}$ à des substances humiques conduit à une augmentation de la production de chloroacétates.

Les processus de chloruration biotique et abiotique peuvent donc avoir lieu en même temps dans les sols.

### 1.4.2 Processus de déhalogénation

De nombreux auteurs ont montré l'existence de processus de déhalogénation dans les sols, qui correspondent à la minéralisation des composés organochlorés et qui conduisent à la formation de chlore inorganique (Aplund et Grimvall, 1991; Öberg et al., 1998; Bastviken et al., 2009 et Clarke et al., 2009). Ce processus de déhalogénation a lieu naturellement dans les sols (Bastviken et al., 2013) et est le résultat de la dégradation de la matière organique chlorée ou l'utilisation de molécules organiques chlorées comme accepteur d'électrons par les microorganismes (Pries et al., 1994). Lee et al. (2004) évaluent ainsi, grâce à un modèle de Langmuir-Hinshelwood utilisé pour décrire la cinétique de déhalogénation des composés organiques chlorés dans les sols, le taux de déhalogénation des éthylènes chlorés à 0,055-2,60 %. $jour^{-1}$

La figure 1. 2 permet de faire un bilan des teneurs en chlore mesurées dans les sols ainsi que des taux de formation et de dégradation du chlore organique.

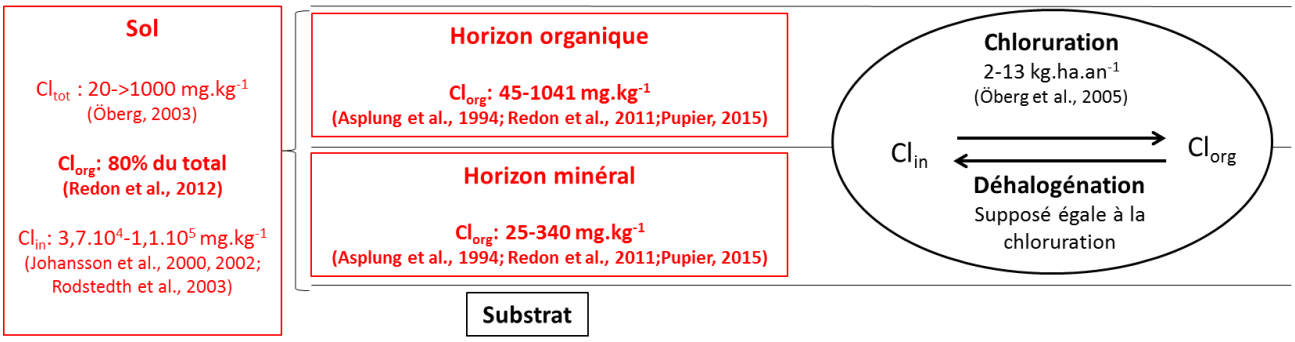



Figure 1.2. Teneurs en chlore des sols et processus de formation et de dégradation du chlore organique.

Les processus de chloruration et de déhalogénation se produisent parallèlement dans les sols (Asplund et Grimvall, 1991 ; Grimvall et deLeer, 1995 ; Clarke et al., 2009) et dans les calculs de bilan de masse, les taux de chloruration et de déhalogénation sont considérés comme étant du même ordre de grandeur (Öberg et al., 2005).

La mesure des teneurs en chlore est nécessaire à l'étude des processus de formation et de dégradation du chlore organique. Diverses méthodologies sont proposées dans la littérature.

## 1.5 Les techniques d'étude du chlore des sols

Cette partie présente les principales techniques d'analyses qui sont employées dans la littérature pour mesurer les teneurs en chlore total, chlore inorganique et chlore organique dans des échantillons solides ou liquides ainsi que pour suivre l'évolution des formes de chlore dans les sols au cours du temps. Dans toutes les méthodes, la mesure de la teneur en chlore organique et en chlore inorganique nécessite une étape préliminaire d'extraction de la fraction de chlore la plus labile du sol.

### 1.5.1 Extractions du chlore organique et du chlore inorganique d'un échantillon de sol

Bien que la littérature fasse référence à une grande diversité de protocoles (Asplund et al., 1994 ; Bastviken et al., 2007), le principe reste assez similaire. En bref, le sol subit une extraction à l'aide d'une solution de nitrates. Après filtration, le sol résiduel contient le chlore organique non extractible tandis que le filtrat contient le chlore inorganique et le chlore organique extractible du sol. Pour séparer ces deux fractions, du charbon actif qui permet l'adsorption du chlore organique extractible est ajouté au filtrat (Bastviken et al., 2007). Après filtration, le charbon actif contient le chlore organique extractible alors que le filtrat correspond au chlore inorganique. Après ces étapes d'extractions, le chlore organique non extractible et le chlore organique extractible peuvent être mesurés par les différentes méthodes détaillées ci-dessous. Le chlore inorganique, quand à lui, est mesuré par chromatographie ionique.

### 1.5.2 Mesures des teneurs en chlore des sols.

#### 1.5.2.1 Analyseur élémentaire de composés organiques halogénés (AOX)

La teneur en chlore (total et organique) d'un échantillon de sol peut être déterminée à l'aide d'un analyseur d'AOX. Cet appareil permet de déterminer les teneurs en halogènes totaux d'un échantillon. Les valeurs obtenues correspondent à la somme des concentrations en brome, en iode et en chlore. Cependant, Brady et Weil (2002) rapportent que le chlore est l'halogène le plus abondant dans le sol et que la somme des teneurs en iode et en brome est généralement inférieure à 1% et peut de ce fait être considérée comme négligeable. De cette façon, les teneurs en halogènes mesurées par AOX sont considérées comme égales aux teneurs en chlore.

L'analyseur d'AOX a initialement été développé pour déterminer la teneur en chlore (total et organique) d'un échantillon liquide. Son utilisation est appliquée à la détection de contaminations et de bio-déchets aquatiques, encadrée par la norme NF 16166, établie en 2012. Son utilisation pour la détermination des teneurs en chlore dans des échantillons solides

ainsi que pour la mesure des composés organiques volatils a été adaptée par la suite (Bastviken et al., 2007).

Lors de l'analyse de la teneur en chlore d'un échantillon de sol par un analyseur d' AOX, l'échantillon préalablement broyé est introduit dans l'analyseur d'AOX où il subit une combustion sous flux d'oxygène à 1000°C. Les halogénures ainsi formés sont ensuite mesurés par une cellule de titration microcoulométrique. La teneur en chlore est ainsi directement obtenue.

#### 1.5.2.2 Activation neutronique

Les teneurs en chlore des sols peuvent être mesurées par une technique dite d'activation neutronique (Redon et al., 2011). La méthode consiste à irradier un échantillon par un flux de neutrons. Cette réaction nucléaire provoque la transformation des éléments chimiques contenus dans l'échantillon en isotopes instables. Ces isotopes sont ensuite identifiés et quantifiés grâce à l'étude de leur spectre. Cette méthode est non destructive, sa limite de détection peut parfois atteindre les $10^{-12}$ g et elle ne nécessite pas de préparation d'échantillons supplémentaire. Elle constitue cependant une méthode de mesure très couteuse.

### 1.5.3 Méthode de suivi de l'évolution des formes de chlore dans les sols

Les études qui supposent une origine microbienne aux processus de chloruration et de déhalogénation dans les sols utilisent parfois une approche isotopique qui permet le suivi de molécules de chlore marquées et leur transformation entre des pools inorganiques, organiques et microbiens (Bastviken et al., 2007 ; Bastviken et al., 2009 ; Rohlenova et al., 2009). Ce suivi est réalisé à l'aide de l'isotope radioactif $^{36}Cl$, qui, d'un point de vue chimique, se comporte comme les isotopes naturels et stables de chlore. Cependant, comme il n'a pas le même nombre de neutrons, il peut être distingué des autres isotopes. Bastviken et al. (2007), (2009) et Rohlenova et al. (2009) ont mis en place ce suivi en enrichissant les sols étudiés en $^{36}Cl$, ajouté sous forme inorganique. Après mise en incubation des sols enrichis, le $^{36}Cl$ des sols est mesuré à l'aide d'un compteur à scintillation dans les différentes fractions de

chlore (organique et inorganique). La présence de $^{36}Cl$ organique dans les sols après incubations montre une formation de chlore organique au cours du temps (chloruration). Cette méthode de suivi au $^{36}Cl$ constitue une méthode précise, fiable qui permet une mesure directe de l'échantillon et l'estimation des taux de chloruration. Cependant, le suivi de l'évolution des formes de chlore à l'aide du traceur $^{36}Cl$ nécessite beaucoup de précautions de manipulation, du fait de sa radioactivité et ne permet pas de réaliser aisément les mesures complémentaires nécessaires au suivi des paramètres microbiologiques. Un marquage isotopique utilisant un isotope stable, tel que le $^{37}Cl$, mériterait d'être envisagé mais les méthodes de mesure de ces isotopes sont très rares.

## 1.6 Conclusion sur l'état de connaissance actuel des processus de chloruration et de déhalogénation dans les sols.

Les stocks de chlore dans les sols sont principalement dominés par le chlore organique ($Cl_{org}$) tandis que les flux (apports et pertes) de chlore se font surtout sous forme de chlore inorganique (Svensson et al., 2007 ; figure 1. 3). Cependant, Nyberg et al. (1999) ; Rodstedth et al. (2003) ; Bastviken et al. (2006) ; Svensson et al. (2010) notent un déséquilibre entre les entrées (sous forme de dépôts de chlore inorganique ($Cl_{in}$)) et les sorties de chlore à l'échelle du bassin versant. Le sol semble pouvoir agir (i) soit comme un puits, avec $Cl_{in}$ entrée > $Cl_{in}$ sortie : une partie du $Cl_{in}$ « entrée » est immobilisée dans le sol sous la forme de $Cl_O$, ce qui suggère la dominance du processus de chloruration, (ii) soit comme une source de chlore , avec $Cl_{in}$ entrée < $Cl_{in}$ sortie . Le $Cl_{in}$ sortant du sol correspond à la lixiviation des flux $Cl_{in}$ « entrée » et des flux $Cl_O$ transformé en $Cl_{in}$ par le processus de déhalogénation.

Concernant les processus de transformation du chlore dans les sols sur le long terme, les bilans établis dans la littérature considèrent le plus souvent des taux de chloruration identiques aux taux de déhalogénation (figure 1. 3 ; Öberg et al., 2005 ; Bastviken et al., 2013).

La littérature met en évidence une influence de la teneur en matière organique, du pH, du couvert végétal et des microorganismes (via leurs activités enzymatiques) sur la répartition des teneurs en chlore dans les sols. Cependant, le rôle des microorganismes sur cette répartition, tout comme celui des paramètres environnementaux qui la contrôle, sont encore mal compris. De la même façon, les processus de formation (chloruration) et de dégradation

(déhalogénation) du chlore organique dans les sols sont encore peu documentés. L'origine, supposée microbienne, du processus de chloruration n'a en effet pas encore été clairement démontrée. La formation de chlore organique en conditions abiotiques est encore peu étudiée, notamment en termes de cinétique. Les études qui supposent une origine microbienne au processus de chloruration (Bastviken et al., 2007 ; Bastviken et al., 2009 ; Rohlenova et al., 2009) emploient toutes une méthodologie identique qui fait intervenir un suivi par traçage isotopique à l'aide de l'isotope radioactif $^{36}Cl$. Cette technique d'étude, bien que très précise, nécessite des précautions de manipulations qui limitent la mesure et le suivi des paramètres microbiologiques des sols, pourtant nécessaires pour démontrer l'origine microbienne du processus de chloruration.

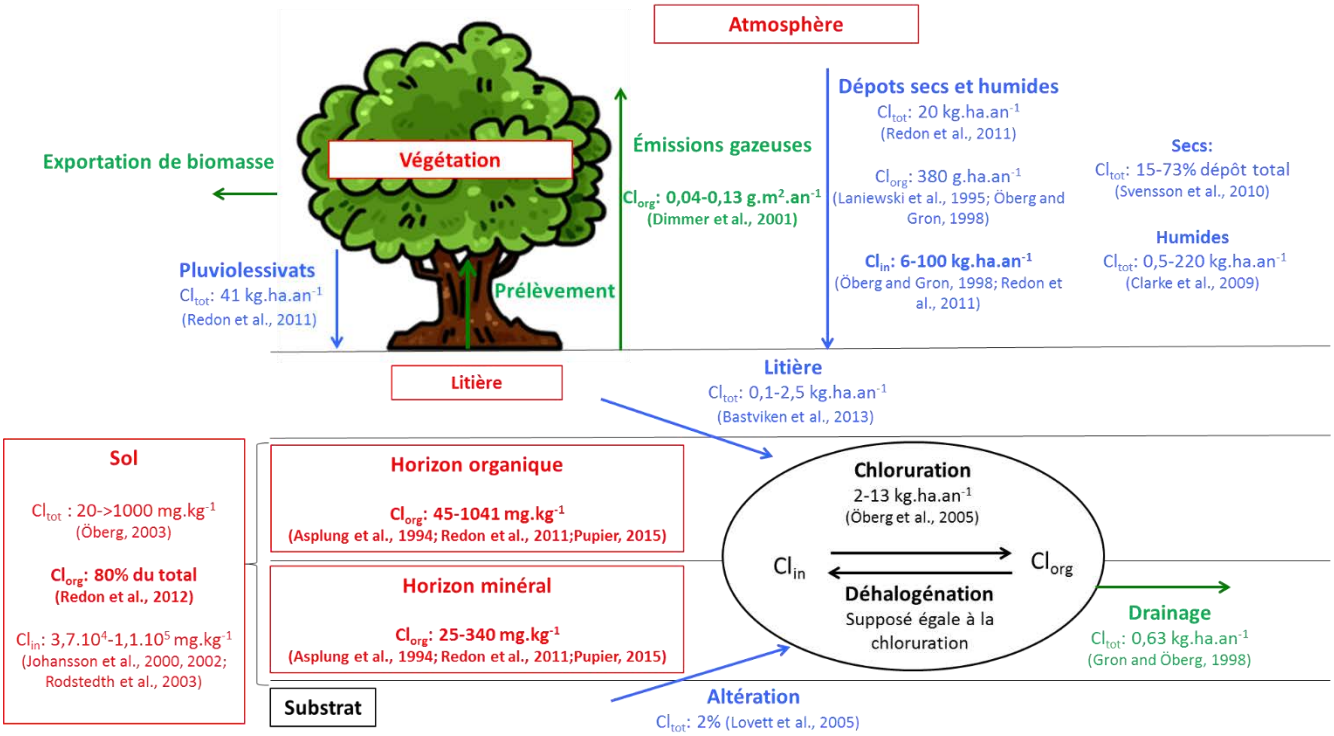



Figure 1.3. Bilan des données obtenues dans la littérature sur le chlore dans les sols. Les stocks contenus dans le sol sont identifiés en rouge. Les apports de chlore au sol (flux d'entrées) sont représentés par des flèches bleues. Les pertes (flux de sorties), quant à elles, correspondent aux flèches vertes. Les données sont issues des travaux cités précédemment.

## 1.7 Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette étude est d'améliorer la compréhension des processus biotique et abiotique amenant à la formation du chlore organique dans les sols. Nos travaux visent notamment à mettre en évidence le rôle des microorganismes (abondance, activité) dans les processus biotiques de chloruration.

Pour cela, plusieurs approches complémentaires comprenant des mesures *in situ* et des expériences au laboratoire ont été utilisées sur des sols contrastés.

La première partie de ce travail correspond au chapitre « Matériels et méthodes » dans lequel seront explicitées les méthodes employées pour obtenir les résultats présentés dans les chapitres suivants. Les types de sols étudiés, les techniques d'extraction et de mesure des teneurs en chlore, les analyses physico-chimiques et microbiologiques ainsi que celle permettant le suivi de la formation de chlore organique y sont notamment abordés.

Les résultats obtenus font l'objet de plusieurs chapitres. Le premier (chapitre 3) est consacré au développement des méthodes (i) d'extraction des échantillons de sol et (ii) de mesure des teneurs des différentes formes de chlore dans les sols. Différentes protocoles d'extraction du chlore nécessaires à la mesure des teneurs par AOX, par activation neutronique, et par ICP MS HR ont été testés. Ensuite, l'influence de certains paramètres de mesure a été déterminée afin d'optimiser la méthode de mesure des teneurs en chlore par AOX.

Dans le second chapitre de résultats (chapitre 4), les teneurs en chlore total et chlore organique ont été mesurées dans des sols présentant des caractéristiques physico-chimiques et biologiques contrastées, à différentes saisons sur 3 années. Les échantillons ont été prélevés dans l'horizon organo-minéral de surface (0-20cm) car c'est l'horizon le plus riche en carbone et en microorganismes. Par ailleurs, nous faisons l'hypothèse qu'il s'agit de la partie du sol où le phénomène de chloruration biotique est le plus facilement observable. Les échantillons ont été prélevés sur différents substrats et sous différentes occupations végétales, à des saisons contrastées. Plus précisément, deux sols ont principalement été étudiés : l'un développé sur grès siliceux dans les Vosges sous couvert végétal forestier ainsi

que sous prairie, et l'autre sur substrat carbonaté localisé en Meuse, sous culture et sous forêt. Ces échantillons de sols ont été prélevés a trois saisons (mars 2012, juin 2013 et mars 2014). Les relations entre les quantités de chlore et les propriétés physico-chimiques et microbiologiques des sols ont ensuite été étudiées.

Dans un troisième chapitre (chapitre 5), la contribution de l'activité microbienne au processus biotique de chloruration a été étudiée au laboratoire. Pour cela, des incubations ont été réalisées avec des échantillons de sols selon plusieurs modalités : stérilisés inoculés par les bactéries autochtones ou stérilisés non inoculés sur des périodes de temps de quelques semaines à plusieurs mois. Ces incubations ont été effectuées avec un ajout de chlore inorganique sous forme de sel NaCl, avec un suivi au cours du temps de l'activité microbienne et des formes organique et inorganique du chlore par analyseur d'AOX. Par ailleurs, la mesure de la spéciation du chlore organique (aliphatique, aromatique) dans les échantillons issus de ces incubations a été testée par spectrométrie XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure).

Enfin, dans le dernier chapitre de résultats (chapitre 6), afin de préciser la dynamique du chlore inorganique et le taux de chloruration, une expérience d'incubation a été réalisée, en enrichissant le sol par ajout de $^{37}$Cl sous forme de sel $Na^{37}Cl$. Les incubations ont été réalisées avec du sol stérilisé et ré-inoculé ou non par la microflore du sol. Ce marquage au $^{37}$Cl a permis un suivi de l'évolution du chlore inorganique ajouté au cours du temps de l'incubation. Des paramètres microbiologiques des sols (activités enzymatiques, activités de respiration) ont également été mesurés au cours du temps. Les analyses du chlore isotopique ont été réalisées à l'aide d'un ICP MS HR en collaboration avec le laboratoire LCABIE de l'Université de Pau. Ce chapitre fait l'objet d'une publication en révision dans le journal Soil Biology and Biochemistry.

Enfin, le chapitre 7 est une discussion générale de l'ensemble des résultats et propose de nouvelles perspectives d'étude de la dynamique du chlore organique dans les sols et du rôle des microorganismes sur les processus de chloruration et se termine par les conclusions générales de l'étude.

# Chapitre 2

## Matériel, dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyses

# 2 Matériel, dispositifs expérimentaux et méthodes d'analyses

## 2.1 Matériel : Sites et sols étudiés

Les horizons de quatre types de sols développés dans des contextes environnementaux (substrat, couvert végétal) contrastés ont été prélevés et étudiés : deux sols développés sur roche calcaire et deux sols développés sur roche acide. L'origine et la nature différente de ces deux sols devaient permettre d'observer les éventuelles différences ou similitudes de comportement du chlore dans des environnements variés. L'échantillon de sol prélevé correspond toujours à l'horizon organo-minéral de surface (A1, 0-20 premiers centimètres) car il s'agit de l'horizon le plus riche en chlore (Redon et al., 2011). Un sol à teneur en chlore certifiée a également été utilisé afin d'évaluer la justesse et la fidélité de nos mesures.

### 2.1.1 Description des sites et des sols prélevés

Les échantillons de sol prélevés sur roche calcaire sont issus du site de l'OPE[1] de l'ANDRA[2] à Bure (55), en Meuse, près de la commune de Montier sur Saulx. Le site est localisé à une altitude de 339 mètres. Le climat est continental avec une température moyenne annuelle de 10 °C et une pluviométrie de 1050 mm (Andra (2009)). Plus précisément, les échantillons de sols ont été prélevés sur les calcaires du Barrois et sous 2 couverts végétaux différents : sous forêt (essentiellement forêt de hêtre) et sous culture (champ de blé). Il s'agit d'un sol brun calcaire sous culture (Calcaric cambisol) et d'un sol brun calcique voire de rendzine brunifiée sous forêt (Calcic cambisol).

Les échantillons de sol prélevés sur roche acide, quant à eux, proviennent des Vosges (88), à proximité du col du Haut Jacques. Le site est localisé à une altitude de 605 mètres, et son climat est continental avec une température moyenne annuelle de 10.4 °C pour une pluviométrie de 1126 mm. Le substrat correspond au grès Intermédiaire. Les échantillons de

[1] OPE : Observatoire pérenne de l'environnement
[2] ANDRA : Agence nationale de traitement des déchets radioactifs

sol ont été prélevés sous deux couverts végétaux différents : sous forêt (essentiellement de hêtres, sapins et de pins) et sous prairie. Le sol sous forêt correspond alors à un sol brun acide (Adystic cambisol). Pour le sol sous prairie, l'identification n'a pas pu être faite, à cause de sa trop importante anthropisation.

Par ailleurs, un sol à teneur en chlore certifiée a été acquis en Janvier 2014. Il s'agit d'un échantillon de terre de référence GBW07455 de chez Sylab, prélevé en Chine. Sa teneur certifiée en chlore total est de 75 +/- 9 $mg.kg^{-1}$ (obtenue suite à des mesures inter-laboratoires réalisées par le fournisseur).

En résumé, les échantillons de sols étudiés proviennent de deux sites de Lorraine, l'un situé en Meuse et l'autre situé dans les Vosges. Sur chacun de ces sites les échantillons de sols ont été prélevés dans l'horizon A1 sous deux couverts végétaux différents : forêt et prairie pour le site des Vosges et forêt et culture pour le site de Meuse. Les horizons de sols ont été prélevés en plusieurs réplicas (3 ou 4) sur trois années consécutives (2012, 2013 et 2014). Par ailleurs, un sol à teneur en chlore certifiée a également été étudié. Les échantillons de sols sont désignés par des appellations qui sont celles utilisées dans tout le manuscrit (tableau 2. 1).

Tableau 2.1. Appellations données aux horizons de sols étudiés et nombre d'échantillons prélevés chaque année, sur chaque site.

| | **Site des Vosges** | | **Site de Meuse** | |
|---|---|---|---|---|
| **Année de prélèvement** | **Forêt** | **Prairie** | **Forêt** | **Culture** |
| | | | | |
| **2012** | VF2012 (3 réplicas) | | MF2012 (3 réplicas) | MC2012 (3 réplicas) |
| **2013** | VF2013 (4 réplicas) | VP2013 (4 réplicas) | MF2013 (4 réplicas) | MC2013 (4 réplicas) |
| **2014** | VF2014 (4 réplicas) | VP2014 (4 réplicas) | MF2014 (4 réplicas) | MC2014 (4 réplicas) |

### 2.1.2 Méthode d'échantillonnage et données météorologiques.

Les échantillons de sols des sites de Meuse et de Vosges (1.1 et 1.2) ont été prélevés sur chaque site à trois dates de prélèvements : mars 2012, juin 2013 et mars 2014, afin de prendre en compte un éventuel facteur saisonnier.

En mars 2012, les sols ont été échantillonnés sur chaque site en trois points à quelques mètres de distance. Chacun de ces points résulte de trois prélèvements homogénéisés sur le terrain. Trois échantillons composites sont ainsi obtenus pour chaque sol afin de limiter la variabilité spatiale (figure 2. 1). En 2012, le sol brun développé sur roche acide (Adystic cambisol) a été prélevé uniquement sous forêt, et non sous culture.

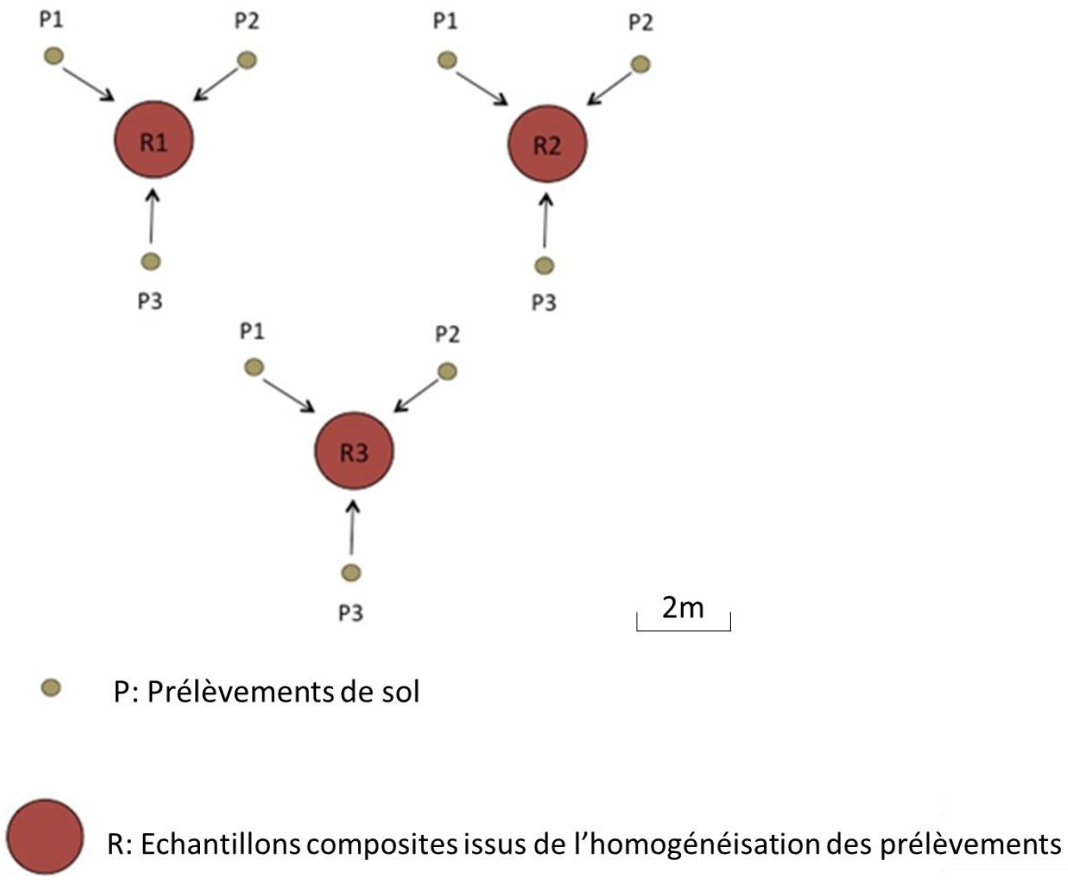



Figure 2.1. Schéma explicatif de la méthode de prélèvement des échantillons de sols.

Pour les prélèvements réalisés en juin 2013 et en mars 2014, la méthode d'échantillonnage était identique mais les sols ont été échantillonnés en quatre points. Un échantillon supplémentaire a été ajouté par rapport à 2012 afin d'obtenir une moyenne plus

représentative de l'éventuelle hétérogénéité du sol. Cette méthode de prélèvements permet ainsi d'obtenir quatre échantillons composites.

Dès le retour au laboratoire, une partie des sols échantillonnés est conservée en chambre froide pour réaliser des analyses d'activités microbiennes dans les jours suivant le prélèvement. Une autre partie des sols est conservée à -20 °C pour la quantification des gènes microbiens. Le reste des sols est séché à l'air pendant plusieurs semaines, puis tamisé à 2 mm et broyé finement avant les analyses de chlore et d'autres paramètres pour la caractérisation des sols (analyses totales C, N, capacité d'échange cationique, cations échangeables…).

Les conditions météorologiques aux dates de prélèvement des sols peuvent être définies par la hauteur de précipitations quotidiennes (mm) et par la température moyenne sous abri (°C). Pour le site de prélèvement des sols bruns acides, ces données météorologiques sont issues de la station de mesure de Ban de Sapt, située à une altitude de 590 mètres et à une distance d'environ 20 km par rapport au lieu de prélèvement des sols. La station de mesure concernée pour le site de prélèvements des sols bruns calcaires et calciques correspond à celle de Houdelaincourt, située à 390 mètres d'altitude et à une distance d'environ 12 km par rapport au lieu de prélèvement des sols.

## 2.2 Dispositifs expérimentaux : incubations

Des expériences d'incubation des échantillons de sol ont été réalisées afin de mettre en évidence l'effet de l'activité microbienne sur l'évolution des formes de chlore au cours du temps. La mise en incubation des sols permet d'accroitre l'activité des microorganismes et de comparer à des témoins abiotiques. Cette activité peut par ailleurs être contrôlée et suivie tout au long de l'incubation ainsi que les formes de chlore à la fin des incubations. Trois dispositifs d'incubation sous différentes modalités et conditions ont été mis en place. Les deux premières incubations ont été réalisées pour tester certains paramètres tels que l'ajout de chlore, le type de sol, les conditions d'incubation. Elles ont permis de définir les conditions de la troisième incubation qui a été réalisée avec ajout de $^{37}Cl$ inorganique pour suivre le processus de chloruration, et la contribution de l'activité microbienne à ce processus. Pour ces incubations, les sols ont été stérilisés et ré-inoculés par la microflore indigène.

### 2.2.1 Stérilisation des sols

Pour la première incubation, les sols ont été stérilisés par autoclavage (Apave) : deux étapes de stérilisation à 120 °C pendant 20 min avec 24 h d'intervalle.

Dans la deuxième et troisième incubation, les sols ont été stérilisés par irradiation aux rayonnements gamma (45-55 Kgray, Laboratoire Ionisos, Dagneux, 01). Ils ont pour cela été répartis dans des sacs plastiques doubles (25 g/sachets) avant irradiation, pour faciliter la manipulation en conditions stériles.

### 2.2.2 Extraction de la microflore des sols

Deux protocoles ont été utilisés pour extraire les bactéries des sols étudiés et inoculer une partie des sols stérilisés. Ces deux protocoles ont été testés afin de conclure sur celui qui permettrait d'extraire la plus grande quantité de bactéries.

• Extraction des bactéries par un gradient de Nycodenz

Pour réaliser cette étape de ré-inoculation, les bactéries ont été préalablement extraites à l'aide d'une solution de Nycodenz par une méthode faisant intervenir un gradient de densité (Balland et al, 2010): 5 g de sol sont ajoutés à 20 mL de solution de NaCl (8,5 $g.L^{-1}$) ainsi qu'à 5 g de billes de verre (2 mm de diamètre). L'ensemble est mis en agitation orbitale pendant 1h. Ensuite, 15 mL de la suspension obtenue sont placés dans un tube (plastique) de centrifugation de 50 mL. Un volume de 10 mL de solution de Nycodenz (1,3 $g.mL^{-1}$) est ajouté avec précautions dans le fond du tube. Le tube est alors centrifugé (Beckman Avanti TM J-25) à 10000 rpm pendant 1 h à 4 °C. Après centrifugation, une fine couche contenant les cellules bactériennes à extraire s'est formée entre le surnageant et la solution de Nycodenz. Cette couche est alors prélevée délicatement et placée dans un nouveau tube. Une solution de NaCl (8,5 $g.L^{-1}$) est ensuite ajoutée au tube (jusqu'à remplissage du tube) qui est alors centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 15 °C. Le surnageant est ensuite éliminé puis 200 µL de NaCl (0,85 %) sont ajoutés au culot. Le contenu du tube est ensuite à nouveau centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 15 °C. Cette étape de rinçage est encore répétée deux fois puis le culot

obtenu dans le fond du tube qui contient les cellules bactériennes après centrifugation est re-suspendu dans 500 µL d'eau ultrapure. Le tube est ensuite placé à 4 °C pour conservation.

Après cette étape d'extraction, le nombre de bactéries contenues dans la solution est compté à l'aide d'un microscope (Nikon Eclipse 80i). Pour cela, un volume de 20 µL de la solution bactérienne diluée d'un facteur 100 est placé sur une cellule de Thoma. Cette cellule correspond à une lame possédant un quadrillage composé de 16 grands carrés composés chacun de 16 petits carrés. On compte alors le nombre de bactéries moyen contenu dans un grand carré (obtenu après comptage pour 4 grands carrés). Ainsi, en connaissant le volume de solution bactérienne placé sur la cellule, les dimensions de la cellule et le nombre moyen de bactéries comptées dans un grand carré, on peut calculer le nombre de bactéries contenues dans 1mL de solution bactérienne en appliquant la formule suivante : Nombre de cellules.mL$^{-1}$= $N \times 2{,}5 \times 10^5$, avec N : nombre moyen de cellules compté dans un grand carré. Dans cette étude, cette méthode d'extraction est réalisée sept fois et a permis d'extraire en moyenne $4{,}7.10^8$ (± $2{,}7.10^8$) bactéries.mL$^{-1}$ de solution.

• Extraction des bactéries selon la méthode de Binet (1999)

Selon le protocole de Binet (1999), 10 g de sol sont ajoutés à 10 g de billes de verre (2mm) et 10 mL d'eau ultrapure puis agités pendant 1 h. La solution ainsi obtenue est ensuite filtrée à 5 µm (filtres Pall), placée dans un tube de centrifugation (plastique) puis centrifugée une première fois à 3290 rpm pendant 1 min. De cette façon, les particules lourdes de sols restantes dans la solution tombent au fond du tube. Le surnageant est récupéré, placé dans un nouveau tube puis centrifugé une nouvelle fois à 32900 pendant 10 min. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est re-suspendu dans 1 mL d'eau ultrapure afin de récupérer les cellules bactériennes.

Le nombre de cellules contenues dans la solution bactérienne est ensuite compté comme décrit précédemment à l'aide d'un microscope et d'une cellule de Thoma. Dans le cadre de cette étude, cette méthode d'extraction est réalisée dix fois et a permis d'extraire en moyenne $9{,}3.10^8$ (± $2{,}3.10^8$) bactéries.mL$^{-1}$ de solution.

### 2.2.3 Protocole de la première incubation : influence du sol, de l'ajout de chlore et des conditions d'aération

L'objectif de la première incubation était de tester l'influence du type de sol ainsi que de l'ajout de chlorure sur l'évolution des teneurs en chlore au cours du temps et l'activité des microorganismes. Ces incubations ont été réalisées avec les échantillons VF2013 (teneurs en chlore élevée) et MF2013 (teneurs en chlore moyennes)

Les échantillons de sol stérilisés par autoclavage ont été mis en incubations dans des flacons sérum (10 g de sol par flacon de 250 mL) selon deux modalités : stérilisés ou stérilisés puis ré-inoculés par les bactéries indigènes extraites par la méthode au Nycodenz (paragraphe II.2). Les échantillons de sols ont été ré-inoculés à une concentration d'environ $10^7$ bactéries.$g^{-1}$ sol.

Les flacons ont reçu ou non un ajout d'une solution de chlore inorganique (solution de NaCl ; quantité de NaCl ajoutée égale à la quantité initiale de chlore total, soit environ 120 mg.$kg^{-1}$ (1,2 mg NaCl par flacon) pour VF2013 et 50 mg.$kg^{-1}$ (0,5 mg NaCl par flacon) pour MF2013). Une partie des flacons a été mise en incubation en conditions aérobies (étape d'aération par ouverture des flacons pendant 15 min tous les deux jours en conditions axéniques afin d'apporter l'oxygène nécessaire aux bactéries aérobies). L'autre partie des flacons a été incubée en conditions limitées en oxygène (pas d'étape d'aération des sols ; Figure 2. 2).

L'expérience comportait 4 répétitions par modalité (40 flacons). L'incubation a duré 5 semaines en chambre d'incubation à 28 °C. Une mesure du $CO_2$ libéré a été réalisée tous les deux ou trois jours à l'aide d'un spectrophotomètre à infrarouge (BINOS 1004) afin de quantifier l'activité microbienne.

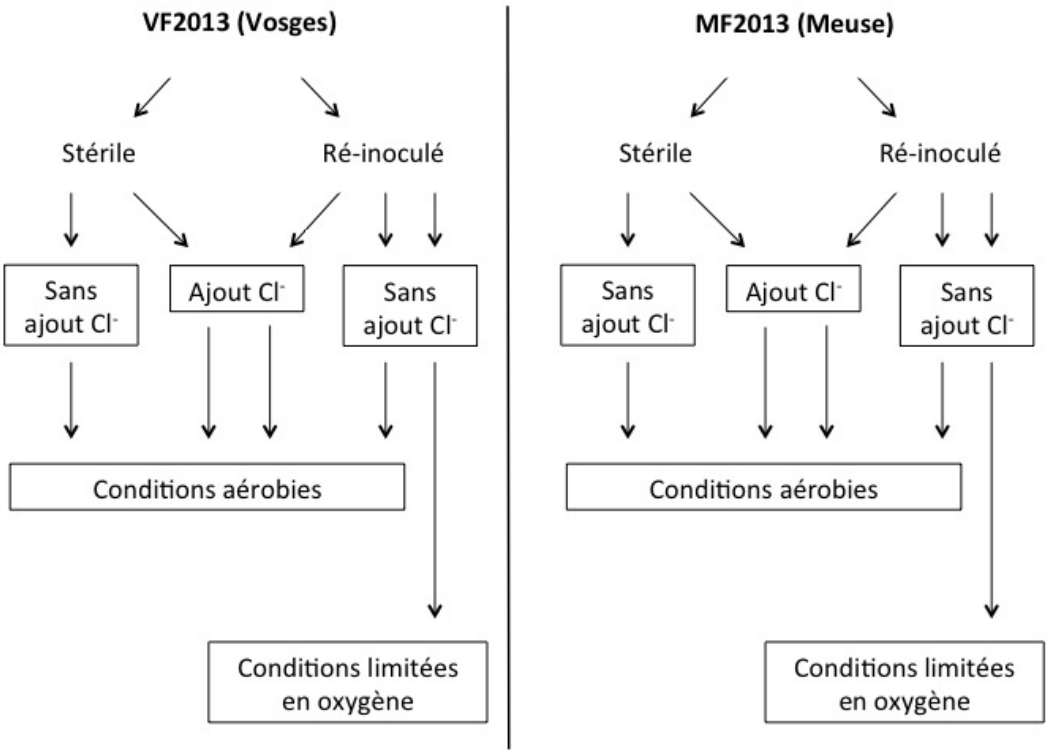



Figure 2.2. Schéma des différentes modalités mises en place dans le premier dispositif d'incubations. Nombre de répétitions : 4. Temps d'incubation : 5 semaines

### 2.2.4 Deuxième incubation : Influence de la ré-inoculation et de l'apport de Clin en conditions aérobies et anaérobies dans le sol irradié.

Cette deuxième incubation a été réalisée avec le sol VF2014. Les échantillons de sols (25 g de sol par flacon de 250 mL) ont cette fois été préalablement stérilisés par irradiation. Après stérilisation, les flacons de sols ont été ré-inoculés ou non avec les bactéries autochtones. La ré-inoculation a été réalisée avec une suspension de bactéries obtenue selon le protocole de Binet (1999) de façon à obtenir un nombre de bactéries d'environ $8.10^7$ bactéries.$g^{-1}$ de sol.

Chacune de ces modalités a ensuite été mise en incubation avec ou sans ajout de chlore inorganique. Cet ajout de chlore a été réalisé à l'aide d'une solution de NaCl de telle sorte que l'ajout final correspondait à une concentration de NaCl dans le sol incubé de 100 mg.$kg^{-1}$ (2,5 mg NaCl par flacon). Les flacons ont été mis en incubations en conditions aérobies et en conditions anaérobies strictes. La condition anaérobie a été obtenue et maintenue en remplaçant l'air présent dans les flacons par de l'azote à l'aide de l'appareil Mart Anoxomat. Chaque modalité était répétée 4 fois et les flacons ont été mis en incubation à 28 °C pendant

54 jours (Figure 2. 3). Une mesure du $CO_2$ libéré a été réalisée tous les deux ou trois jours, et les flacons placés en conditions aérobies ont été aérés comme pour les incubations précédentes (II.1).

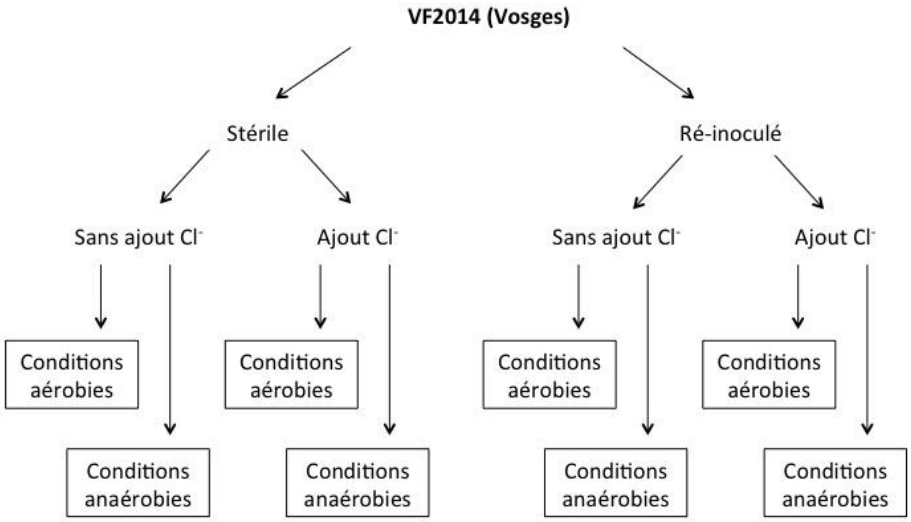



Figure 2.3. Schéma des différentes modalités mises en place dans le deuxième dispositif d'incubations. Nombre de répétitions : 4. Temps d'incubations : 54 jours

### 2.2.5 Troisièmes incubations : du sol irradié et ré-inoculé avec ajout de $^{37}Cl$

Le troisième type d'incubation avait pour objectif d'étudier la formation de chlore organique à partir d'un ajout de $^{37}Cl$ inorganique en conditions biotiques et abiotiques. La mise au point de la méthode de préparation des échantillons et de mesure des isotopes du chlore dans les échantillons est développée dans la partie 3.1.4.

Ces incubations ont été mises en place avec le sol MF2014. Les échantillons de sols (25 g par flacons de 250 mL) ont été d'abord stérilisés par irradiation puis enrichis en $Na^{37}Cl$ (98% $^{37}Cl$) de telle sorte que l'ajout final de $Na^{37}Cl$ soit d'environ 100 $mg.kg^{-1}$ par flacon (2,5 mg ; soit environ 61 $mg.kg^{-1}$ de $^{37}Cl$)

Cette expérience a été menée en deux parties. La première avait pour but de déterminer la répartition des formes de chlore dans le sol stérilisé juste après l'ajout de $^{37}Cl$, et leur évolution lors d'une incubation en conditions abiotiques (Figure 2. 4). Les échantillons de sols ont été soit directement prélevés après l'ajout (T0), soit mis en incubations en conditions

stériles et en conditions aérobies pendant 15 jours (T1). Chaque modalité a été réalisée avec 4 répétitions. L'émission de $CO_2$ a été mesurée tous les deux jours et l'ensemble des flacons est aéré pendant 15 min après chaque mesure.

La deuxième partie de cette incubation, quant à elle, avait pour objectif de mettre en évidence une évolution de la répartition des teneurs en chlore dans le sol en présence d'activité microbienne au cours du temps. Les échantillons de sol ont été mis en incubation selon deux modalités : stérile (non ré-inoculé) ou ré-inoculé avec les bactéries autochtones ($1.10^8$ bactéries.$g^{-1}$ de sol). Cette étape de ré-inoculation a été réalisée comme décrit précédemment selon le protocole d'extraction de Binet (1999). L'ensemble des flacons de sols a été mis en incubation en conditions aérobies. Chaque modalité a été réalisée avec 4 répétitions et deux temps de prélèvements. La moitié des dispositifs a été arrêté après 15 jours d'incubation (T1) et l'autre moitié après 3 mois (T2). De la même façon que pour les incubations précédentes, l'émission de $CO_2$ a été mesurée tous les deux jours et l'ensemble des flacons aéré pendant 15 min après chaque mesure.

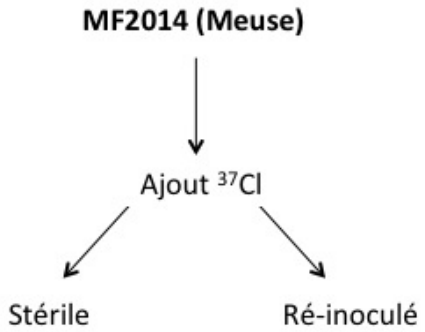



Figure 2.4. Schéma des différentes modalités mises en place dans la troisième série d'incubations. Nombre de répétitions : 4. Temps d'incubations T1 : 15 jours. T2 : 90 jours

## 2.3 Analyses réalisées sur les sols

### 2.3.1 Mesures des teneurs en chlore des sols

La quantification des teneurs en chlore organique et inorganique d'un sol nécessite une étape d'extraction préalable de l'échantillon. Plusieurs protocoles ont été testés (voir chapitre 3). Le protocole présenté dans ce chapitre 2 est celui qui a finalement été retenu pour les analyses dans les chapitres 4 à 7.

#### 2.3.1.1 Protocoles d'extraction du chlore organique et du chlore inorganique des échantillons de sol selon Bastviken et al. (2007)

Le protocole de Bastviken et al. (2007) (Figure 2. 5) permet de séparer deux fractions de chlore organique : le chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$) et le chlore organique extractible ($Cl_{OE}$). Le chlore inorganique ($Cl_{in}$) est également extrait et peut être analysé.

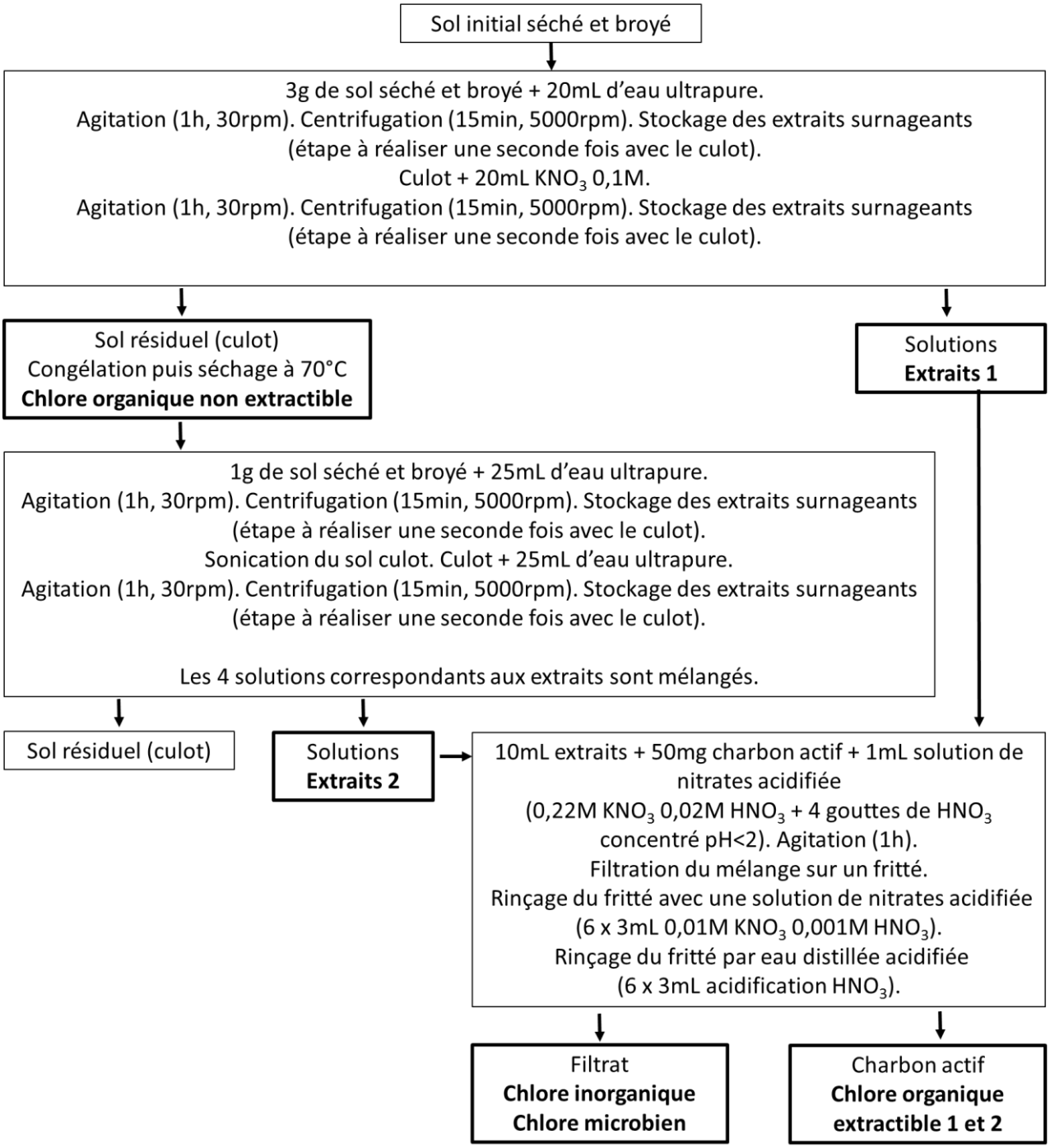



Figure 2.5. Protocole d'extraction et de mesure des teneurs en chlore organique extractible, organique non extractible et inorganique selon Bastviken et al. (2007).

Dans un premier temps, 3 g de sol séché et broyé sont placés dans un tube (plastique) de 50 mL avec 20 mL d'eau ultrapure. Les tubes sont alors agités sur un agitateur rotatif pendant 1h à 30 rpm puis centrifugés pendant 15 min à 5000 rpm. Après centrifugation, la solution constituant le surnageant, qui correspond à la première solution d'extraction est récupérée et conservée. 20 mL d'eau ultrapure sont ajoutés au flacon contenant le sol résiduel dans le culot qui subit une nouvelle étape de centrifugation (15 min, 30 rpm). La solution d'extraction est à nouveau récupérée et mélangée à la solution précédente. Ces deux étapes d'extraction par centrifugation sont répétées une nouvelle fois avec 20 mL de $KNO_3$ (0,1 M), qui remplace alors l'eau ultrapure. Les solutions d'extraction sont toutes mélangées entre elles ($Cl_{E1}$). Elles contiennent le chlore inorganique ($Cl_{in}$) et le chlore organique extractible 1 ($Cl_{OE1}$). Le culot solide obtenu après centrifugation correspond au chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$).

Ce culot subit ensuite une nouvelle étape d'extraction. Pour cela, 1 g de sol séché et broyé est placé dans un tube (plastique) de 50 mL avec 15 mL d'eau ultrapure. Les tubes sont alors agités sur un agitateur rotatif pendant 1 h à 30 rpm puis centrifugés pendant 15 min à 5000 rpm. Après centrifugation, la solution constituant le surnageant, qui correspond à la cinquième solution d'extraction est récupérée et conservée. 15 mL d'eau ultrapure sont ajoutés au flacon contenant le sol résiduel dans le culot qui subit une nouvelle étape de centrifugation (15 min, 30 rpm). La solution d'extraction est à nouveau récupérée et mélangée à la solution précédente. Le sol résiduel subit alors une étape de sonication avant d'être à nouveau extrait avec 15 mL d'eau ultrapure. Cette étape est réalisée deux fois et les quatre solutions d'extractions obtenues sont toutes mélangées entre-elles. Elles sont nommées « extrait 2 » ($Cl_{E2}$) et contiennent le chlore organique extractible 2 et le chlore contenu dans les cellules microbiennes. Le sol résiduel contient alors le chlore organique associé aux acides humiques et aux acides fulviques du sol ($Cl_{FA-HA}$).

Pour avoir accès à la teneur en chlore organique extractible 1 et 2 ($Cl_{OE1}$, $Cl_{OE2}$), à la teneur en chlore inorganique ($Cl_{in}$) et à la teneur en chlore contenu dans les cellules microbiennes ($Cl_M$), une étape d'extraction supplémentaire est nécessaire. Pour cela, 10 mL de solution d'extraction ($Cl_{E1}$ ou $Cl_{E2}$) sont ajoutés à 50 mg de charbon actif ainsi qu'à 1 mL de solution de nitrate acidifiée à pH inférieur à 2 (0,22M $KNO_3$ 0,02M $HNO_3$ et quelques gouttes de $HNO_3$ concentré). L'ensemble est agité pendant 1 h à 30 rpm à l'aide d'un agitateur rotatif

puis filtré sur un fritté en quartz à l'aide d'une colonne de filtration Xprep3 (TE instrument). Le charbon actif contenu sur le fritté est ensuite rincé 6 fois à l'aide de 3 mL d'une solution de nitrate acidifée (0,01 M $KNO_3$ 0,001 M $HNO_3$) puis 6 fois avec de l'eau ultrapure acidifiée (ajout de quelques gouttes de $HNO_3$ concentré). Après ces étapes de filtration-rinçage, le filtrat contient le chlore inorganique ($Cl_{in}$) et le chlore contenu dans les cellules microbiennes ($Cl_M$). Le charbon actif contenu sur le fritté contient le chlore organique extractible 1 et 2 ($Cl_{OE1}$ et $Cl_{OE2}$). Le tableau 2. 2 résume les différentes fractions de chlore obtenues à l'aide de ce protocole et leur donne des appellations, qui seront celles employées dans la suite du manuscrit.

Tableau 2.2. Appellations des fractions de chlore obtenues grâce au protocole de Bastviken et al. 2007

| Forme de chlore | Appellation |
|---|---|
| Chlore total | $Cl_{TOT}$ |
| Chlore organique non extractible | $Cl_{ONE}$ |
| Chlore organique extractible 1 | $Cl_{OE1}$ |
| Chlore organique extractible 2 | $Cl_{OE2}$ |
| Chlore extraits 1 | $Cl_{E1}$ |
| Chlore extraits 2 | $Cl_{E2}$ |
| Chlore inorganique | $Cl_{in}$ |
| Chlore microbien | $Cl_M$ |
| Chlore associé aux acides humiques et fulviques | $Cl_{FA-HA}$ |
| Chlore organique total | $Cl_O$ |

#### 2.3.1.2 Mesures des teneurs en chlore par analyseur d'AOX

Les mesures des teneurs en chlore présentes dans les échantillons solides sont réalisées à l'aide d'un analyseur d'AOX (Adsorbable Organic Halogens, Xplorer TE instrument). Ces mesures réalisées par l'analyseur d'AOX ont fait l'objet au préalable d'une étape de calibration (chapitre 3). La méthode de mesure présentée dans ce chapitre 2 correspond à celle qui a finalement été retenue pour les travaux de thèse (chapitre 4 à 6).

L'analyseur d'AOX permet de déterminer les teneurs en halogènes (brome, iode et chlore) d'un échantillon. La somme des teneurs en iode et en brome étant considérée comme négligeable, les teneurs en halogènes mesurées par l'analyseur d'AOX sont supposées correspondre aux teneurs en chlore total ($Cl_{TOT}$).

Pour obtenir la teneur en chlore d'un échantillon solide, une prise d'essai de 200mg (Figure 2. 6 A), placée sur un fritté en quartz dans un passeur (Figure 2. 6 B) est introduite directement dans l'AOX à l'aide d'une cuillère en quartz où elle subit une combustion par pyrolyse dans le four (four à 1000 °C, Figure 2. 6 C). Cette combustion transforme le chlore en chlorures d'hydrogène gazeux. Ces gaz sont transférés dans laveur de gaz rempli d'acide sulfurique (95 %) qui piège l'eau encore présente dans les gaz. Les chlorures d'hydrogène gazeux, libérés de toutes traces d'eau, atteignent alors une cellule électrolytique de titration argentimétrique (Figure 2. 6 D) qui contient de l'acide acétique (75 %).

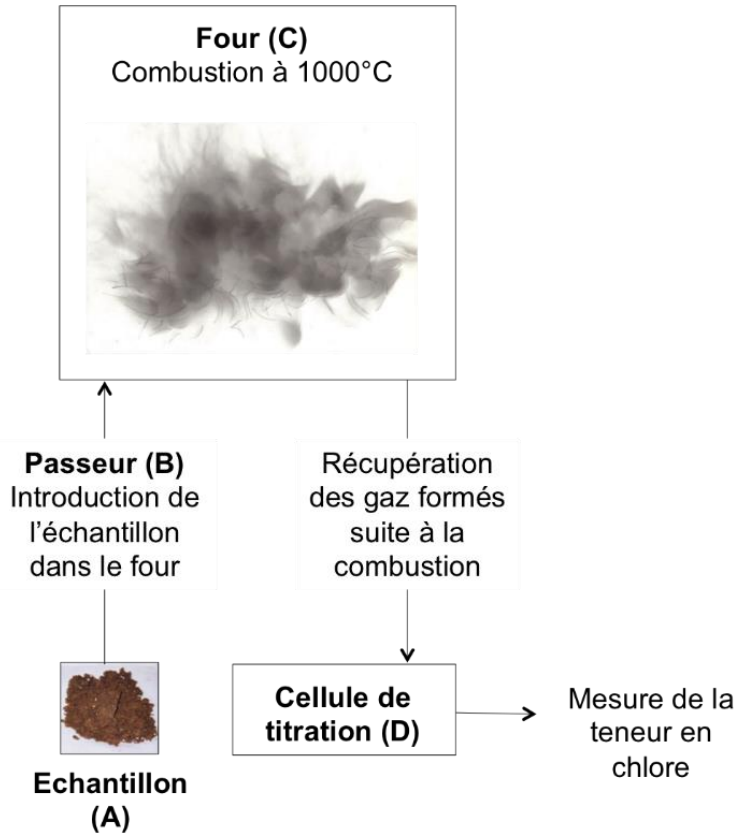



Figure 2.6. Schéma des différentes étapes de mesure du chlore par analyseur d'AOX.

Les chlorures d'hydrogène, très solubles dans ce milieu, vont se dissoudre. Le chlore se retrouve alors sous forme d'ions chlorures qui vont réagir avec l'électrode en argent pour former un précipité de chlorure d'argent. La perte d'ion argent sur l'électrode est mesurée et traduite en signal électrique (figure 2. 7). La teneur en chlore de l'échantillon est alors obtenue en intégrant l'aire présente sous le pic.

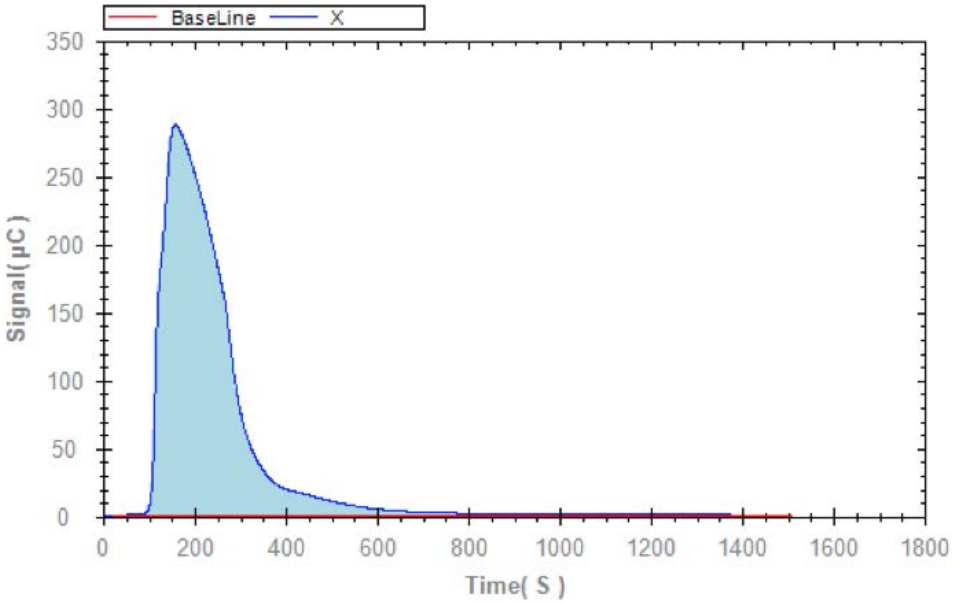



Figure 2.7. Exemple de signal électrique obtenu suite à une mesure par la cellule électrolytique.

#### 2.3.1.3 Mesures des teneurs en chlore par activation neutronique

La méthode consiste à irradier un échantillon par un flux de neutrons. Cette réaction nucléaire va provoquer la transformation des éléments chimiques contenus dans l'échantillon en isotopes instables. Ces isotopes sont ensuite identifiés et quantifiés grâce à l'étude de leur spectre. Cette méthode est non destructive et ne nécessite pas de préparation supplémentaire. Dans le cadre de cette étude, les mesures par activation neutronique ont été réalisées par le Reactor Instituut Delft, situé aux Pays-Bas.

#### 2.3.1.4 Mesures des teneurs en chlore ($^{37}Cl$) et des rapports isotopiques par ICP MS HR.

La mesure du $^{37}Cl$ et du $^{35}Cl$ a été réalisée à l'aide d'un ICP MS HR dans le laboratoire LCABIE-IPREM (Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement

et les matériaux) à Pau, avec l'aide de Maïté Bueno. Cette méthode nécessite la minéralisation et la mise en solution du chlore des échantillons solides.

*2.3.1.4.1 Principe de la méthode de mesures par ICP MS HR.*

L'ICP MS HR est un spectromètre de masse à plasma induit par haute fréquence et haute résolution ($m/\Delta m$> 10 000 ; Thermo Scientific, Germany), qui permet de distinguer les isotopes du chlore $^{35}Cl$ et $^{37}Cl$. Il permet la séparation, l'identification et la quantification des éléments d'un échantillon en fonction de leur masse, de leur charge et de leur vitesse. Il correspond à l'association d'une torche à plasma générant des ions à un spectromètre de masse qui permet la séparation de ces ions. Plus précisément, l'analyse des échantillons par ICP MS HR se fait en 4 étapes : (i) introduction/nébulisation, (ii) ionisation, (iii) séparation en masse et (iv) détection :

(i) L'échantillon liquide est introduit dans l'appareil où il subit une nébulisation grâce à un flux d'Argon. Il est alors transformé en une suspension de très fines gouttelettes.

(ii) L'aérosol ainsi formé est introduit dans un plasma par une chambre de pulvérisation de Scott et par un nébuliseur concentrique en quartz (Gass Expansion, Hawthorn, Australie) où il est ionisé. Les paramètres d'acquisition des données sont présentés dans le tableau 2. 3.

(iii) Les ions ainsi obtenus sont accélérés. Ils rencontrent alors un système de lentilles électrostatiques qui extrait les ions positifs. Ces ions sont ensuite séparés en fonction de leur masse, de leur charge et de leur vitesse à l'aide d'un quadripôle émettant un champ électromagnétique. La fréquence appliquée au quadripôle permet de sélectionner les ions transmis présentant alors un rapport m/z particulier. Le quadripôle joue donc le rôle de filtre.

(iv) Les ions sélectionnés passent ensuite par un multiplicateur qui permet d'atteindre un nombre important d'ions. Le signal obtenu correspond à un nombre de coups (impulsions) qui permet d'accéder directement à la concentration de l'élément analysé. L'ensemble est relié à une interface informatique permettant de traiter les résultats.

L'ICP MS HR est un outil d'analyse hautement performant pour la détermination des rapports isotopiques dans les systèmes naturels. Une solution constituée de 1.0 µg $L^{-1}$ of Li, B, K, Na, Sc, Co, Fe, Ga, Y, Rh, In, Ba, Lu, Tl and U in 5 % (v/v) $HNO_3$ est utilisée pour optimiser le réglage de l'appareil. L'effet mémoire du système d'introduction a été contrôlé par rinçage à l'aide d'une solution d'eau ultrapure (18.2 MΩ, Millipore), d'une solution de méthanol à 2% (v/v) ou d'hydroxyde d'ammonium à 5% (v/v) après aspiration d'une solution standard en chlorures (100 µg $L^{-1}$). Cette technique présente cependant quelques biais : les interférences (autre éléments avec le même rapport m/z ou association d'un élément de masse équivalente à un élément donné). Par exemple, le $^{37}Cl$ peut être remplacé par $^{36}Ar^{1}H^{+}$, $^{12}C^{12}C^{13}C^{+}$. Pour contrer ce problème, la sélection des ions doit se faire pour des masses très précises (3 chiffres après la virgule). Pour cela, il existe deux modules associés à l'ICP MS HR : un module de séparation par masse et vitesse (secteur magnétique) et un module de séparation par énergie cinétique (secteur électrostatique) ainsi qu'un jeu de fentes plus ou moins larges qui permet de sélectionner l'ion à la sortie du quadripôle. Cette méthode permet alors d'accéder à une haute résolution (R= m/Δm=10000). Le tableau 2. 3 permet de définit les paramètres d'acquisition de l'appareil.

Tableau 2.3. Paramètres d'acquisition de l'ICP MS HR

| | |
|---|---|
| RF (W) | 1150 |
| Flux de plasma (L. $min^{-1}$) | 16 |
| Flux de gaz auxiliaire (L. $min^{-1}$) | 0,90 |
| Flux du nébuliseur (L. $min^{-1}$) | 0,99 |
| Position de la torche | A optimiser tous les jours |
| Echantillonneur et cônes | Nickel |
| Fenêtre d'aquisition | 150% |
| Fenêtre d'intégration | 80% |
| Nombre d'échantillons par pics | 20 |
| Temps de residence par échantillons (ms) | 50 |
| Nombre de scans par isotopes | 3 × 40 |
| Temps d'acquisition total (min) | 6 |

*2.3.1.4.2 Dissolution des échantillons solides à l'aide d'une solution de TMAH*

L'ICP MS HR permet uniquement l'analyse d'échantillons sous forme liquide. Les échantillons de sol à analyser ont donc été préalablement minéralisés. La méthode de minéralisation retenue (voir chapitre 3) consiste en la dissolution des échantillons sous haute température en présence d'une base forte, le TMAH (hydroxyde de tétraméthylammonium).

Une prise d'essai de 200 mg d'échantillon de sol séché est placée dans un tube (plastique) à fond plat de 50 mL avec 1 mL de solution de TMAH ainsi que 4 mL d'eau ultrapure. Les tubes sont ensuite placés sur une plaque chauffante (DigiPrep– SCP Science) à 80 °C pendant 180 min. L'utilisation de tubes à fonds plats est nécessaire pour assurer un maximum de surface de contact des tubes avec la plaque chauffante. Les solutions récupérées après minéralisation sont ensuite filtrées à 0,45 µm (filtres Pall) puis diluées dans de l'eau ultrapure. Le facteur de dilution, qui est le même pour tous les échantillons, est de 50. Les échantillons ainsi préparés sont ensuite prêts pour l'analyse par ICP MS HR.

*2.3.1.4.3 Analyse du $^{37}Cl$ et du $^{35}Cl$ par ICP MS HR et traitement des données*

Les teneurs en chlore dans les différentes fractions ont ensuite été mesurées dans les échantillons liquides par ICP MS HR grâce à la méthode de dilution isotopique inverse (Hintelmann and Evans. 1997).

Dans le cas de la mise en place d'un traçage isotopique, les échantillons sont préalablement enrichis en traceur ($^{37}Cl$). Ils présentent alors une composition isotopique modifiée. La quantification des concentrations naturelles (75,26% $^{35}Cl$ + 24,24% $^{37}Cl$ = chlore naturel) et enrichies (2% $^{35}Cl$ + 98% $^{37}Cl$ = chlore traceur) de l'élément dans l'échantillon est alors obtenue par dilution isotopique inverse (RID). Pour cela, les rapports isotopiques sont mesurés avant et après ajout d'une quantité connue de chlore de composition isotopique naturelle. Ces ajouts constituent des ajouts dosés et le chlore ajouté correspond alors à un étalon.

Le rapport isotopique optimal est calculé pour chaque échantillon afin d'estimer la quantité de chlore naturel à ajouter aux échantillons via l'étalon, ceci permettant de limiter les erreurs de propagation durant le calcul de dilution isotopique (Hoelzl et al. 1998). Il s'agit du rapport à atteindre pour que le calcul soit le plus juste possible. Ce rapport optimal est calculé de la façon suivante :

$$R_{optimal} = \sqrt{(R_{naturel} \times R_{échantillon})}$$

Avec :

- $R_{naturel}$ : Rapport $^{35}Cl/^{37}Cl$ de l'étalon de chlore de composition isotopique naturelle utilisé pour l'ajout dosé.
- $R_{échantillon}$ : Rapport $^{35}Cl/^{37}Cl$ mesuré dans l'échantillon avant ajout dosé.

La concentration en chlore total (= naturel + traceur) est alors obtenue grâce à la formule suivante :

$$C = \frac{C' \times w' \times W_{at} \times (R \times {}^{37}A_{naturel} - {}^{35}A_{naturel})}{w \times W'_{at} \times ({}^{35}A_{échantillon} - R \times {}^{37}A_{échantillon})}$$

Avec :

- C : concentration de Cl total (= naturel + Cl traceur) dans l'échantillon
- C' : concentration de l'ajout (ajout dosé)
- w, w' : masses de l'échantillon et de l'ajout (ajout dosé)
- Wat : masse atomique de Cl dans l'échantillon
- W'at : masse atomique de Cl ajouté (ajout dosé)
- R : rapport $^{35}Cl/^{37}Cl$ mesuré après l'ajout (ajout dosé)
- $^{37;35}A_{échantillon}$: abondance de l'isotope 35 et 37 dans l'échantillon avant ajout
- $^{37;35}A_{naturel}$: abondance de isotope 35 et 37 dans l'ajout (blanc enrichi à l'aide d'une solution de chlore de composition isotopique naturelle)

L'abondance correspond à la proportion de chacun des isotopes par rapport à l'ensemble des isotopes.

La concentration en chlore naturel [Cl naturel] correspond à la concentration en chlore naturellement présent dans l'échantillon (composé de 75,76 % de $^{35}Cl$ et 24.24 % de $^{37}Cl$). La concentration en Cl traceur [Cl traceur] est composée de 2 % de $^{35}Cl$ et 98 % de $^{37}Cl$.

Les concentrations de chlore naturel et de chlore traceur peuvent ensuite être calculées à partir de la concentration en chlore total grâce à la formule suivante :

$$[Cl_{naturel}] = \frac{C \times {}^{35}A_{échantillon}}{{}^{35}A_{naturel}}$$

$$[\mathrm{Cl}_{traceur}] = \frac{C \times {}^{35}A_{échantillon} - [(\frac{{}^{35}A_{naturel}}{{}^{37}A_{naturel}}) \times C \times {}^{37}A_{échantillon}]}{\left(\frac{{}^{35}A_{traceur}}{{}^{37}A_{traceur}}\right) - (\frac{{}^{35}A_{naturel}}{{}^{37}A_{naturel}})}$$

Avec :

- $^{37;\,35}A_{traceur}$: abondance de l'isotope 35 et 37 dans l'étalon (blanc enrichi à l'aide d'une solution de chlore de composition isotopique enrichit

Le rapport isotopique optimal est calculé pour chaque échantillon afin de limiter les erreurs de propagation durant le calcul de dilution isotopique (Hoelzl et al., 1998). Tous les rapports isotopiques obtenus ont été préalablement corrigés du biais de masse en utilisant un modèle linéaire après détermination des facteurs de biais de masse avec les abondances naturelles du standard (Heumann et al., 1998). Les incertitudes de mesures sont définies en combinant des incertitudes analytiques à celles liées à la moyenne et à l'écart type de chaque échantillon (n = 3).

#### 2.3.1.5 Mesures des chlorures par chromatographie ionique.

Les teneurs en chlore inorganique ($Cl_{in}$) ont été également mesurées au laboratoire par chromatographie ionique (ICS 3000 Dionex) dans les échantillons liquides. L'échantillon liquide est injecté sur une colonne échangeuses d'anions (groupement ammonium quaternaire) chargée positivement. Les chlorures de l'échantillon chargés négativement vont donc se fixer dans un premier temps sur la colonne. Ils sont ensuite décrochés et transportés en fonction de leur vitesse, de leur charge, de leur masse et de leur taille par un éluant (KOH) vers une cellule conductimétrique. L'utilisation d'étalons permet d'établir une droite de calibration afin d'accéder aux concentrations.

### 2.3.2 Analyse des autres paramètres physicochimiques des sols

#### 2.3.2.1 Mesure du taux d'humidité des sols après prélèvements.

Le taux d'humidité des échantillons de sols a été évalué dès le retour au laboratoire après prélèvements sur les différents sites. Pour cela, une portion de 30 g de sol est séchée à l'air pendant plusieurs semaines. La différence de poids avant et après séchage permet d'accéder à l'humidité des sols (%).

#### 2.3.2.2 Mesure de la teneur en carbone et en azote des sols.

La mesure des concentrations totales en carbone et en azote a été réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire (Flash EA 1112 Thermo) pour les échantillons de sol après prélèvements. Pour cela, 30 mg de sol séché, tamisé à 2 mm et broyé sont déposés dans une capsule en étain qui est ensuite introduite dans l'analyseur. La capsule subit une combustion par pyrolyse (940 °C). Les gaz ($CO_2$ et NO) issus de cette combustion sont alors séparés par une colonne de chromatographie gazeuse et les teneurs en C et N sont détectés par conductivité thermique sous forme élémentaire.

#### 2.3.2.3 Mesure du pH (eau) des sols.

Le pH des sols a été mesuré au laboratoire pour l'ensemble des sols après prélèvements en suivant le protocole suivant : 10 g de sol séché et tamisé (2 mm) sont mélangés à 20 mL d'eau ultrapure puis agités pendant 1 h. Après 24 h de repos, le pH des sols est mesuré dans les solutions de sol à l'aide d'un pH-mètre (Choffel Electronique) après étalonnage de l'électrode.

#### 2.3.2.4 Mesures de la granulométrie, de la CEC et de la teneur en calcium, en phosphore, en éléments totaux et échangeables des sols.

Les autres paramètres physico-chimiques des échantillons de sols après prélèvements ont été mesurées par le LAS[3] de l'INRA d'Arras. Ils s'agit de la granulométrie 5 fractions (NF X 31-107), le calcaire ($CaCO_3$ NF ISO 10693), le phosphore ($P_2O_5$ NF ISO 11263) par la méthode Olsen, la capacité d'échange cationique par la Méthode Metson (NF X 31-130), le Fe par la méthode Mehra-Jackson (ICP AES), les teneurs en Ca, Mg, Mn, K, Na (ICP AES NF ISO 22036) et les teneurs en Na, Mg, Ca et K échangeables (EAF NF X 31-108) par dosage des solutions d'extraction des sols à l'acétate d'ammonium.

### 2.3.3 Analyse des paramètres microbiologiques

Les paramètres microbiologiques qui sont déterminés pour chaque échantillon de sols prélevé ou incubé permettent de quantifier les microorganismes et d'évaluer leur activité dans les sols.

#### 2.3.3.1 Quantification du nombre de copies de gènes 16S et 18S des échantillons

La quantification du nombre de copies de gènes ARNr16S et ARNr18S permet d'estimer respectivement le nombre de bactéries et de champignons présents dans les échantillons de sol.

Pour cela, une première étape d'extraction de l'ADN des sols a été réalisée (kit FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Santa Ana, USA)). Cette étape consiste à lyser (lyse mécanique et enzymatique) les cellules (bactériennes entre autres) et à libérer leurs contenus

[3] LAS : Laboratoire des Analyses de Sol

cellulaires, dont les acides nucléiques, dans un tampon. Ces acides nucléiques sont séparés des protéines par une extraction de phase dans un mélange phénol/chloroforme puis précipités dans une solution d'isopropanol. Plus précisément, la première étape qui consiste à la lyse (mécanique et enzymatique) des cellules est réalisée en mélangeant 500 mg de sol (congelé) dans un tube (plastique) contenant la matrice de lyse (billes de céramiques et de silice ; « Lysing Matrix », MP Biomedicals, Santa Ana, USA) avec 978 µL de tampon phosphate de sodium et 122 µL de tampon MT (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) qui permettent une meilleure homogénéisation et solubilisation des protéines. Le tube est ensuite placé dans un vibrobroyeur (Fastprep-24) pendant 40 secondes (force 6.0) puis centrifugé pendant 10 min à 13000 g. L'étape suivante, qui consiste à précipiter les protéines, est réalisée en transférant la totalité du surnageant dans un microtube (plastique) de 2 mL avec 250 µL de réactif PPS (protein precipitation solution ; MP Biomedicals, Santa Ana, USA). La solution ainsi obtenue est ensuite mélangée par inversion des tubes 10 fois afin de faire précipiter les protéines. Le tube est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 13000 g. Pour fixer l'ADN sur une matrice, 1 mL de silice (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) est ajouté à la totalité du surnageant dans un tube (plastique) de 15 mL. La solution est ensuite mélangée par inversion des tubes pendant 2 minutes. Les tubes sont ensuite placés pendant 3 minutes à température ambiante. La fixation de l'ADN chargé négativement se fait sur la matrice. Après élimination de 500 µL de surnageant, 600 µL de la matrice sont placés après re-suspension dans une colonne de filtration. La colonne est ainsi centrifugée pendant 1 minute à 13000 g puis le liquide recueilli dans le réservoir est éliminé. Cette étape est répétée jusqu'à épuisement total du surnageant. Ensuite, 500 µL de solution de lavage SEWS-M (MP Biomedicals, Santa Ana, USA ) sont ajoutés au tube puis mélangés par pipetage/refoulement et centrifugés à 13000 g pendant 1 minute. Le réservoir est vidé une dernière fois puis le tube est à nouveau centrifugé pendant 2 minutes à 13000 g et placé pendant 5 minutes à température ambiante pour sécher la matrice. La dernière étape consiste à éluer l'ADN en ajoutant au tube 100 µL de DES (eau ultrapure sans DNAse et de RNAse ; MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Après re-suspension de la matrice, le tube est mis à incuber pendant 5 minutes à 55°C sur un bloc chauffant (Benchmark) puis il est centrifugé à 13000 g pendant 1 minute afin de récupérer l'ADN en solution. Les extraits d'ADN ainsi obtenus sont conservés à -20°C en attendant les étapes suivantes.

Ensuite, une seconde étape de PCR (Réaction de polymérisation en chaine) qui permet la réplication d'une portion de taille connue de brins d'ADN en un nombre suffisant pour permettre son analyse est pratiquée sur les extraits d'ADN (Feslke et al., 1998 ; Heuer et al., 1999). Pour cela, l'ADN est tout d'abord dénaturé, afin d'obtenir de l'ADN à l'état de simple brin. Les amorces viennent ensuite s'hybrider de manière spécifique à chacun des simples brins et délimitent ainsi la région d'ADN à amplifier. Finalement, l'ADN polymérase (Taq polymérase) permet de réaliser la réplication de l'ADN délimité par les amorces. L'ensemble de ces étapes constitue un cycle. Une PCR est réalisée sur un nombre de cycles déterminés.

Plus précisément, un mélange réactionnel est réalisé en mélangeant 5 µL de tampon Taq (Thermo Scientific), 3 µL de MgCl2 (25 mM ;Thermo Scientific), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,2 µL de Taq polymérase (5 unités. $\mu L^{-1}$), 0,5 µL de BSA, 0,25 µL de DMSO, 1 µL d'amorce 1 (foward ; 10 µM ; 968F pour la PCR 16S, Fung SF pour la PCR 18S), 1 µL d'amorce 2 (reverse ; 10 µM ; 1401R pour la PCR 16S, FF 390R pour la PCR 18S) et 38,0510 pM. $\mu L^{-1}$ d'eau QSP. Ensuite, 49 µL de mélange réactionnel sont ajoutés à 1 µL d'extrait d'ADN dans des microtubes (plastique ; eppendorf). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Bio Rad, MJ Mini) pendant 2h30 (Feslke et al., 1998 et Heuer et al., 1999 ; 33 cycles). La première phase de l'amplification correspond à la phase de dénaturation initiale, qui dure 4 minutes à 95 °C. Les cycles, quant à eux, correspondent à une phase de dénaturation de 30 secondes à 95 °C, suivit d'une phase d'hybridation de 30 secondes à 63 °C (-0,5°C/cycle) et d'une phase d'élongation de 30 secondes à 72 °C. Enfin, l'amplification se termine par la phase d'élongation finale, qui dure 7 minutes à 72 °C.

Ces deux premières étapes sont validées grâce une électrophorèse sur gel d'agarose (Major Science Mini-150), qui permet de visualiser l'ADN. Cette étape sert à estimer la quantité (taille) et la qualité de l'ADN extrait ou amplifié par PCR. Pour cela, une première étape consiste à couler un gel d'agarose (70 $g.L^{-1}$) avec des puits. Le gel ainsi obtenu est placé dans une cuve contenant le tampon de migration (TAE ; Tris 484 g, Acétate 114,2 mL, EDTA 37 g, $H_20$ qsp 2 L) et les puits sont remplis avec 10 µL d'amplicons mélangés à 2 µL de tampon de charge. Un puit est chargé avec 1 µL de marqueur de taille (mélange de molécules d'ADN de tailles connues). Un courant électrique (125 V) est ensuite appliqué au gel pendant 20 min afin de faire migrer l'ADN (chargé négativement) présent dans les puits. Après cette étape, le gel est placé dans un bain de bromure d'éthidium (1 $mg.L^{-1}$) puis rincé à l'eau pour être enfin soumis à un rayonnement UV qui permet de visualiser l'ADN. Le bromure d'éthidium vient

s'intercaler entre les brins d'ADN et devient alors fluorescent lorsqu'il est soumis à un rayonnement UV. Une image numérique de gel est ensuite enregistrée grâce à une caméra reliée à un ordinateur (Geldoc, Biorad). Le résultat obtenu est une image présentant des bandes qui permettent de savoir si l'ADN a été correctement amplifié.

La dernière étape consiste à la réalisation de la qPCR (PCR quantitative en temps réel absolu) qui permet de quantifier les gènes 16S (Cébron et al., 2009) et 18S (Thion et al., 2012). Le protocole est le suivant : un mélange réactionnel est réalisé en mélangeant 10 µL de IQ SYBR Green Supermix, 0,4 µL de BSA, 0,2 µL de DMSO, 0,08 µL de T4gp32 (500 $\mu g.mL^{-1}$), 0,8 µL d'amorce 1 (foward, 10 µM ; 968F pour la qPCR 16S, Fung SF pour la qPCR 18S), 0,8 µL d'amorce 2 (reverse ; 10 µM ; 1401R pour la qPCR 16S, FF 390R pour la qPCR 18S) et 19 µL d'eau QSP. Ensuite, 19 µL de mélange réactionnel sont mélangés à 1 µL d'extrait d'ADN. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Bio Rad, MJ Mini ; 39 et 44 cycles). Les programmes d'amplification sont différents pour les gènes 16S et 18S (tableau 2. 4).

Tableau 2.4. Programme nécessaire à la réalisation d'une qPCR 16S et 16S.

| | **qPCR 16S** | **qPCR 18S** |
|---|---|---|
| **Programme** | 95°C, 5min (1 cycle)<br>95°C, 20 s ; 56°C, 20 s ; 72°C, 30 s ; 82°C, 5 s (39 cycles)<br>72°C, 5 min ; 95°C, 30 s ; 51°C, 5 s ; 95°C, 0,5 C | 95°C, 5min (1 cycle)<br>95°C, 20 s ; 50°C, 20 s ; 72°C, 30 s ; 80°C, 10 s (44 cycles)<br>72°C, 5 min ; 95°C, 10 s ; 65°C, 5 s ; 95°C, 0,5 C |

Après amplification, la quantité de gènes 16S et 18S est obtenue en mesurant la densité optique de la solution grâce à une courbe d'étalonnage.

#### 2.3.3.2 Mesures d'activité enzymatique.

Les enzymes sont les principaux médiateurs de la dégradation, de la minéralisation de la matière organique et du fonctionnement du cycle des éléments. Elles sont donc utilisées pour observer les réponses des écosystèmes aux perturbations et servent ainsi d'indicateurs (Burns and Dick. 2002 ; Marx et al. 2001). Dans notre étude, la mesure de leur abondance

permet d'estimer l'activité des microorganismes présents et de corréler celle-ci aux formes de chlore présentes dans les sols.

Les enzymes sélectionnées dans cette étude ont été choisies pour représenter les principales voies de dégradation de la matière organique et le fonctionnement des grands cycles biogéochimiques:

- Diacetate de fluoréscéine (FDA ; hydrolyse représentant une activité globale)
- Laccase (oxydo-réductase impliquée dans le cycle du carbone)
- Phosphatase alcaline (hydrolase impliquée dans le cycle du phosphore)
- Amino-peptidase (hydrolase impliquée dans le cycle de l'azote)

Ces activités enzymatiques ont été mesurées suivant le protocole établi dans les travaux de Stauffer et al, (2014) pour l'ensemble des sols après prélèvements ainsi que pour les sols issus de la deuxième série d'incubations. Pour la troisième incubation, seule l'activité FDA a été mesurée.

La mesure des activités d'hydrolyse de la FDA, phosphatase alcaline et amino-peptidase s'effectuent de la façon suivante : Une solution de sol est réalisée en mélangeant 2,5 g de sol frais dans 50 mL de tampon approprié pour chaque enzyme puis agités dans un agitateur orbital (Stuart Scientific) à 250 rpm pendant 10 minutes. Ils sont ensuite soniqués pendant 2 minutes puis agités une nouvelle fois pendant 10 minutes à 250 rpm. Le test peut alors être réalisé en mélangeant un volume de 25 µL de la suspension de sol dans une microplaque noire (Greiner bio-one 96 puits) avec la solution tampon et le substrat. Les mesures de fluorescence des microplaques sont réalisées toutes les heures pendant 6 h avec un spectrophotomètre (Safas Monaco Xenius SP2000 XC) et les microplaques sont placées à l'obscurité à 28 °C entre chaque mesure. L'activité enzymatique est ensuite déduite d'une courbe étalon propre à chaque enzyme qui a été préalablement réalisée à l'aide d'un standard.

Pour l'activité laccase, le protocole est différent : 400 µL de solution de sol sont ajoutés à 100 µL de solution substrat et à 1mL d'une solution tampon dans un microtube (plastique) de 1,5 mL. Le tube est ensuite placé à 37 °C pendant 10 minutes dans un agitateur à 50 rpm puis centrifugé à 10000 rpm à 4 °C pendant 5 minutes pour stopper la réaction. Un volume de

250 µL de la solution obtenue est placé dans une microplaque noire à fond transparent (Greiner bio-one 96 puits) et l'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas Monaco Xenius SP2000 XC). L'appareil fait intervenir la Loi de Beer-Lambert qui permet ensuite d'avoir accès à la valeur d'activité enzymatique.

Toutes les activités enzymatiques ont été mesurées sur sol frais, dans des conditions de pH et de température contrôlées. Les volumes de solution tampons, de substrat ainsi que la longueur d'onde de mesure propre à chaque test enzymatique sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2. 5)

Tableau 2.5. Volumes de solution tampon, de substrat et longueur d'onde de mesure propre à chaque test enzymatiques

| Activités mesurées | Cycle | Solution de sol | Tampon | Substrat | Longueur d'onde de mesure |
|---|---|---|---|---|---|
| **Laccase** | Carbone | 400 µL | Acétate 1mL 50mM pH 5 | 2,2'-azinobis-(3ethylbenzothiazoline-6-sulfononicacid) diamonium salt) 100 µL 5 0mM (Sigma Aldrich) | Absorbance 418 nm |
| **Phosphatase alcaline** | Phosphate | 25 µL | Phosphate 95µL 0,1M pH 7,5 MES 100µL 0,1M pH 6 | 4-MUB-phosphate 30 µL 1 mM (Sigma Aldrich) | Excitation 330 nm Emission 450 nm |
| **Amino-peptidase** | Azote | 25 µL | Phosphate 95µL 0,1M pH 7,5 Trizma 100µL 0,05M pH 8 | L-Leucine-7-amino-4-methylcoumarin 30 µL 1 mM (Sigma Aldrich) | Excitation 342 nm Emission 440 nm |
| **Hydrolyse de la FDA** | Activité globale | 25 µL | Potassium Phosphate 195µL 60mM pH 7,6 | Diacetate de fluoréscéine 30 µL 400 µg/mL (Sigma Aldrich) | Excitation 490 nm Emission 523 nm |

### 2.3.4 Détermination de la spéciation du chlore dans les sols par spectrométrie XANES.

#### 2.3.4.1 Principe de la méthode spectrométrique XANES.

La spectroscopie d'absorption des rayons X permet de décrire l'environnement local autour d'un atome donné (quelques Å) et permet d'en déduire son état d'oxydation, sa coordination et la nature, la distribution spatiale des atomes voisins.

Les spectres obtenus décrivent l'évolution du coefficient d'absorption en fonction de l'énergie du faisceau incident sur une gamme d'énergie réduite, de 100 à quelques centaines d'eV avec une résolution spectrale de 0,1 à 2 eV. Le phénomène physique à l'origine de cette évolution ou des variations du coefficient est l'absorption des photons X, suivi de l'éjection d'un électron de cœur de l'atome absorbant, qu'on appelle aussi effet photo-électrique (figure 2. 8).

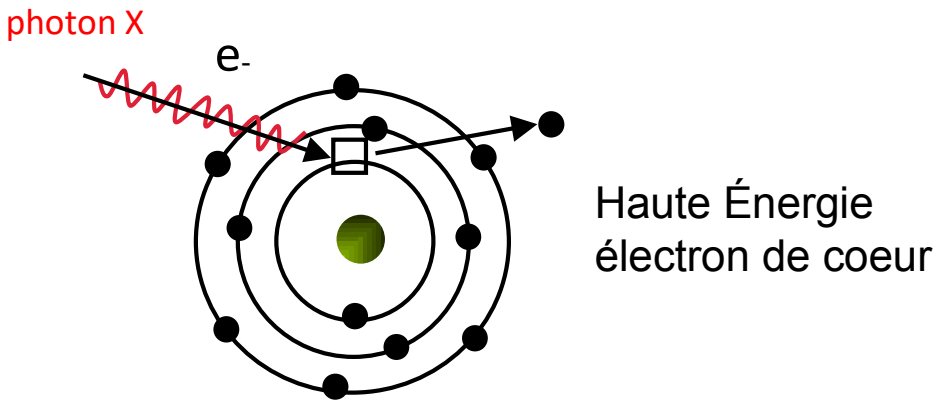



Figure 2.8. Schéma de l'effet photo-électrique

L'avantage majeur de la technique est que les énergies d'ionisation ou encore les énergies pour lesquelles l'effet photoélectrique se produit sont des valeurs discrètes spécifiques d'une couche électronique donnée d'un atome donné. Ainsi en se plaçant dans une gamme d'énergie avoisinant l'énergie des électrons de cœur des atomes de chlore, on ne mesure que le phénomène d'absorption par les atomes de chlore. Les spectres obtenus sont généralement décrits selon deux ou trois régions, la première région avant seuil qui décrit les transitions électroniques autorisées, la région du seuil pour laquelle les photons incidents sont absorbés et des électrons éjectés de l'atome (ou région XANES, X ray Absorption Near Edge

Structure) et la région qui s'étend sur plusieurs centaines d'eV après le seuil d'absorption, est la région dénommée EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure (Figure 2. 9).

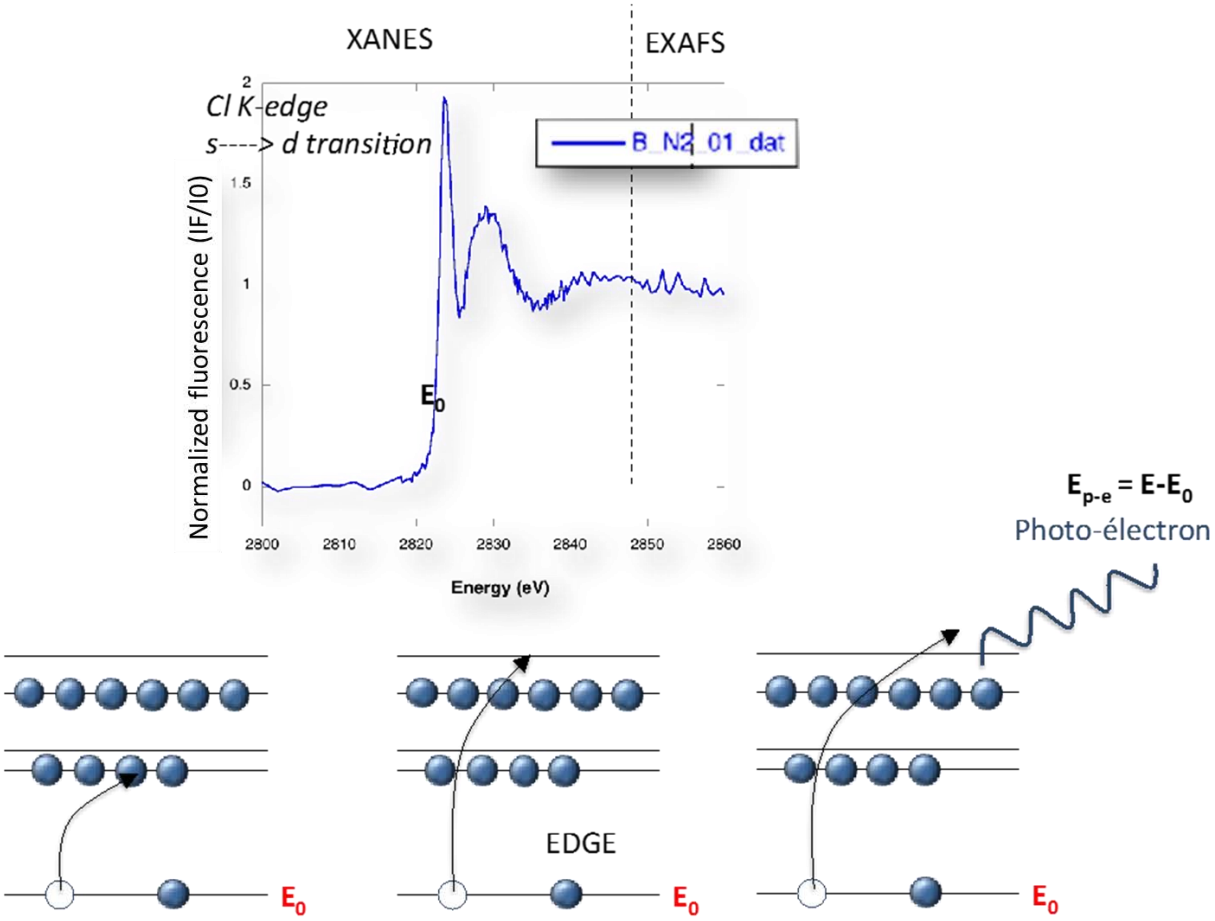



Figure 2.9. Spectre d'absorption des rayons X au seuil K du Cl.

L'énergie d'ionisation $E_0$ correspond à l'énergie du seuil d'absorption (communément prise comme le maximum de la dérivée première du spectre)

#### 2.3.4.2 Préparation des échantillons pour les mesures de spectroscopie et conditions de mesure

Pour les échantillons de sol, environ 30 mg de sol séché sont broyés finement dans un mortier puis pressés à l'aide d'un pastilleur (2 tonnes) pour former une pastille (6 mm). L'échantillon est fixé sur un portoir en cuivre par du scotch carbone, placé dans la chambre «échantillon » (Figure 2. 10) et mis sous vide (pompe turbo-moléculaire). Le portoir en cuivre est relié par une tresse en cuivre à un réservoir d'azote liquide (température de l'échantillon

d'environ -100 °C), rempli une fois que la pression dans l'enceinte est suffisamment faible. La faible température a pour objectif de diminuer ou ralentir les dommages liés au rayonnement (volatilisation du chlore, production de radicaux). L'obturateur de la ligne n'est ouvert que lorsque la température et la pression sont stables.

Les échantillons de référence ont été mesurés à l'aide d'un porte–échantillon en boutonnière. Les mesures ont été effectuées sur la ligne de lumière LUCIA du synchrotron SOLEIL. La ligne est installée au niveau d'un élément d'insertion de type onduleur, qui garantit une meilleure brillance du faisceau. L'intensité du courant dans l'anneau était de l'ordre de 400 mA pour nos mesures. Le rayonnement X incident est monochromatisé par un monochromateur à cristaux et focalisé sur l'échantillon par des miroirs de type Kirkpatrick-Baez.

Dans le cas de nos échantillons, les concentrations en chlore nous ont contraints à travailler par mesure de la fluorescence X directement liée à l'absorption des rayons X. La fluorescence constitue un des phénomènes physiques de désexcitation de l'atome.

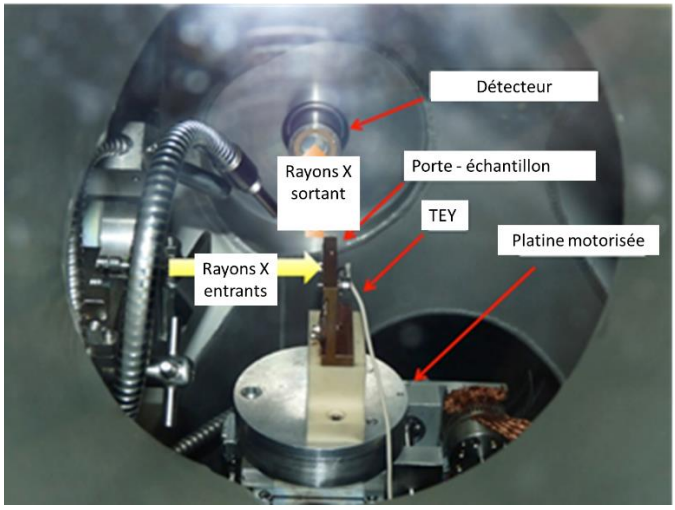



Figure 2.10. Vue de la chambre-échantillon (Flanck et al. (2006)).

Les spectres ont été enregistrés entre 2800 et 2880 eV (région XANES du spectre) avec un pas en énergie de 0,2 dans la région du seuil (2818-2840 eV) et 0,5 eV après seuil (2840-2860). Le temps d'acquisition est de 1 sec par point. Ce temps d'acquisition par point a été

choisi afin de pouvoir détecter des modifications de la spéciation du chlore sous le faisceau de rayons X et pour chaque échantillon entre 3 et 5 spectres ont été enregistrés.

Le tableau 2. 6 présente les échantillons qui ont été choisis pour ces analyses. Les échantillons ont été choisis afin de tester l'influence de différentes traitements sur la spéciation du chlore : stérilisation par autoclave, stérilisation par irradiation, ré-inoculation, incubation en conditions aérobies et anaérobies, avec ou sans ajout de sels de chlore.

Tableau 2.6. Récapitulatif des échantillons analysés par spectroscopie d'absorption X. $Cl_o$ = chlore organique, $Cl_{in}$ Chlore minéral ou inorganique XANES.

| **Avant incubation** | |
|---|---|
| **Echantillon** | **Modalité** |
| MF2013 | initial sans traitement |
| | stérilisé par autoclave |
| VF2013 | initial sans traitement |
| | stérilisé par autoclave |
| VF2014 | stérilisé par irradiation |
| **Première expérience d'incubations** | |
| MF2013 | ré-inoculé |
| | ré-inoculé ajout de sels de chlore minéral |
| | autoclavé ajout de sels de chlore minéral |
| VF2013 | ré-inoculé |
| | ré-inoculé ajout de sels de chlore minéral |
| **Seconde expérience d'incubations** | |
| VF2014 | ré-inoculé |
| | ré-inoculé ajout de sels de chlore minéral |
| | ré-inoculé anaérobie |
| | ré-inoculé ajout de sels de chlore minéral anaérobie |
| | irradié |
| | irradié ajout de sels de chlore minéral |
| | irradié anaérobie |
| | irradié ajout de sels de chlore minéral anaérobie |
| **Solutions Standards** | |
| Acide trichloroacétique ($Cl_O$) aliphatique TCA | |
| Chlorotétracycline ($Cl_O$) aromatique CTCH | |
| Chlorure de calcium ($Cl_{in}$) $CaCl_2$ | |
| Chlorure d'ammonium ($Cl_{in}$) $NH_4Cl$ | |

Des standards en solution aqueuse de $Cl_O$ (CTCH et TCA) et $Cl_{in}$ ($CaCl_2$ et $NH_4Cl$) ont été analysés. Les composés CTCH et TCA correspondent à des standards organochlorés respectivement aromatique et aliphatique.

#### 2.3.4.3 Méthode de traitement des spectres

L'analyse des spectres XANES a été effectuée grâce au logiciel Athena (Ravel and Newville., 2005). Tout d'abord, l'ensemble des spectres obtenus pour un même échantillon (ou même pastille) sont moyennés à condition que tous les scans ou tous les spectres soient superposables et qu'aucune évolution de la spéciation du chlore ne soit détectée entre deux spectres successifs. Dans le cas d'une évolution, seul le premier spectre mesuré est retenu.

L'interprétation qualitative des spectres s'est fondée sur la publication de Leri et al. (2007) (Figure 2. 11).

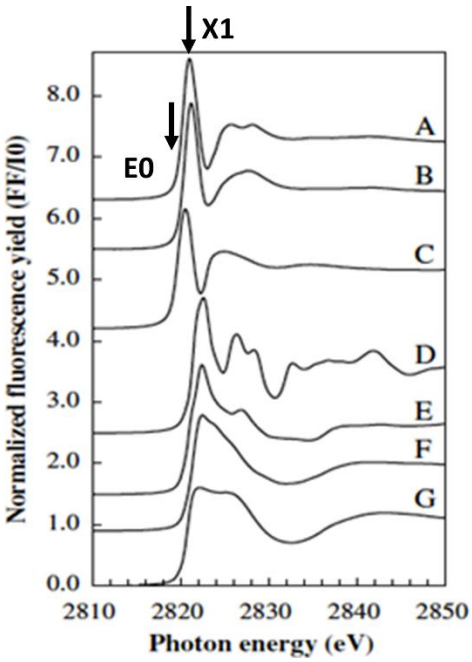



Figure 2.11. Spectres obtenus par spectrométrie XANES dans les travaux de Leri et al., 2007. A, B = tétrachlorophénol, chlorophénol rouge (chlore organique aromatique), C = chlorodécane (chlore organique aliphatique), D, E, F = KCl solide, trizma-HCl solide, glycine-HCl solide (chlore inorganique).

Les spectres A, B et C ont été obtenus pour trois composés organochlorés, respectivement du tétrachlorophénol (A) du chlorophénol (B) et du chlorodécane (C). Les deux premiers ont une partie organique aromatique, alors que le spectre C a une partie organique aliphatique. D'un point de vue spectral, le caractère aromatique du ligand organique, décale le seuil d'absorption de quelques eV vers les plus hautes énergies (0,2 à 0,4 eV) et la première oscillation (X1) est décalée également vers les plus hautes énergies. Les spectres suivants sont obtenus pour des composés iorganiques ou minéraux, du KCl solide (D), du trizma-HCl solide

(F), du HCl solide avec ajout de glycine (G) et du HCl aqueux (H) respectivement. Ces spectres montrent que le seuil d'absorption du chlore inorganique est décalé d'environ 2-2,2 eV vers les plus hautes énergies.

Les spectres des échantillons ainsi que les valeurs correspondantes de E0 et X1 ont été comparés à ceux obtenus pour les standards du $Cl_O$ (CTCH, TCA) ou du $Cl_{in}$ ($CaCl_2$, $NH_4Cl$) afin de positionner nos échantillons entre les deux pôles du chlore inorganique et des composés organo-chlorés.

Des combinaisons linéaires (Linear Combination Fitting) ont été effectuées avec le même programme Athena pour tenter de mettre en évidence de manière numérique les évolutions de la spéciation du chlore. Pour ce faire, des spectres de sols, présentant des caractéristiques extrêmes (caractéristiques organiques ou inorganiques) ont été utilisés.

### 2.3.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées sur l'ensemble des données ont été obtenues grâce au module XLSTAT du logiciel Microsoft Excel©. Les tests statistiques les plus employés correspondent à des ANOVA.

# Chapitre 3

# Méthodes de mesure des teneurs en chlore du sol : comparaison et choix

# 3 Méthodes de mesure des teneurs en chlore du sol : comparaison et choix

L'analyse de la littérature a fait apparaître l'existence de plusieurs méthodes d'analyses des formes de chlore dans les sols, et l'absence de méthode de référence. L'acquisition d'un équipement de type analyseur d'AOX au LIEC au démarrage de la thèse a nécessité des mises au point sur l'analyse par cette technique, notamment pour l'appliquer à des sols, alors qu'elle est dédiée aux analyses des formes de chlore en solution. Cette technique de mesure par analyseur d'AOX a notamment été comparée à celle par activation neutronique. Par ailleurs, l'utilisation de l'ICP MS HR pour analyser les isotopes $^{37}Cl$ et $^{35}Cl$ (naturels et apportés sous forme de traceur) a aussi nécessité des mises au point, notamment pour l'analyse à partir d'échantillons solides. Ce troisième chapitre avait pour objectif de tester les méthodes d'extraction des sols préalables à l'analyse des formes de chlore par analyseur d'AOX et par ICP MS HR puis de tester les méthodes d'analyse du chlore et de les comparer afin de choisir celles qui devaient être employées dans la suite des travaux de thèse. Ce troisième chapitre présente les méthodologies testées puis les résultats obtenus suite à ces essais. Ces essais ont permis dans un premier temps de comparer les résultats obtenus suite à l'application de divers protocoles d'extraction, de solubilisation et de séparation du chlore organique pour l'analyse par AOX ou par ICP MS HR. Ce chapitre porte ensuite sur l'influence de plusieurs paramètres intervenant dans la mesure directe des teneurs en chlore par analyseur d'AOX. Enfin, il aborde l'influence de la technique de mesure employée pour déterminer les teneurs en chlore, et conclut sur le choix des méthodes retenues.

## 3.1 Matériel et méthode

### 3.1.1 Protocoles d'extraction du chlore organique

La quantification des teneurs en chlore organique et inorganique d'un sol nécessite une étape d'extraction préalable de l'échantillon. Trois protocoles ont été testés : un protocole simplifié, celui de la norme NF, et celui décrit par Basviken et al., (2007).

#### 3.1.1.1 Premier protocole d'extraction : protocole simplifié de séparation du chlore inorganique et du chlore organique total

Un premier protocole d'extraction relativement simple permettant la séparation du chlore organique total ($Cl_O$) et du chlore inorganique ($Cl_{in}$) a été développé au laboratoire (Figure 3. 1).

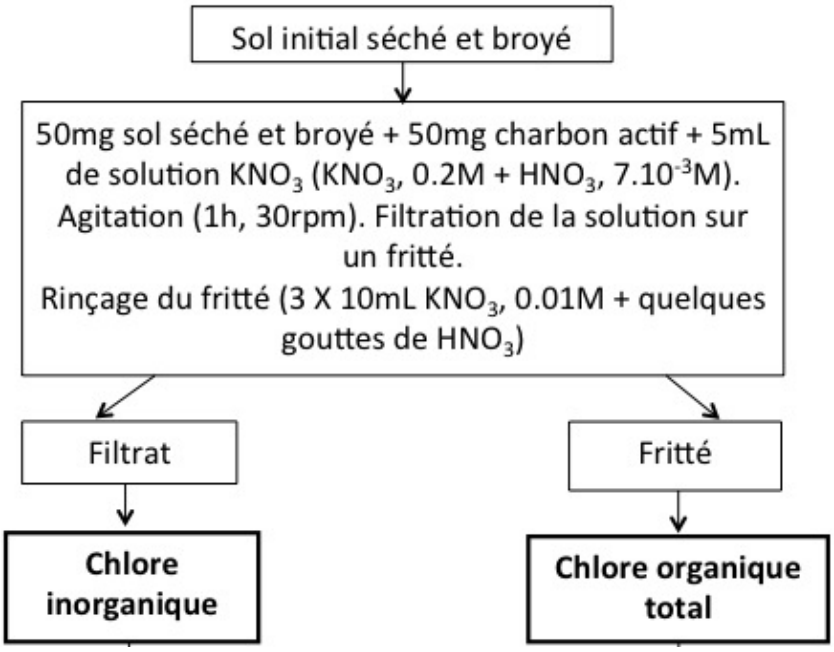



Figure 3.1. Protocole simplifié d'extraction et de séparation du $Cl_O$ et du $Cl_{in}$

Dans un premier temps, 50mg de sol séché à l'air, tamisé (2 mm) et broyé sont ajoutés à 5mL de solution d'extraction ($KNO_3$, 0.2M + $HNO_3$, $7.10^{-3}$M) ainsi qu'à 50mg de charbon actif (Merk ; qui permet le piégeage du chlore organique extractible). L'ensemble est mis en agitation pendant une heure, à une fréquence de 30 rpm. Le mélange est ensuite versé sur une colonne de filtration (Xprep3, Figure 3. 2). La filtration se fait sous flux d'argon sur un fritté en quartz placé à la base de la colonne. Ce fritté est ensuite rincé avec une solution de nitrates (3 fois 10 mL 0.01M $KNO_3$ + quelques gouttes de $HNO_3$).

Le fritté contient le chlore organique total ($Cl_O$) en partie dans le sol résiduel (dans lequel reste le chlore organique non extractible) et en partie sur le charbon actif (où est piégé le chlore organique extractible). Les solutions d'extraction et de rinçage (filtrat), récupérées à

la sortie de la colonne de filtration, contiennent le $Cl_{in}$ de l'échantillon. La teneur en $Cl_O$ a été mesurée par analyseur d'AOX pour l'horizon de sol VF2012 après application de ce protocole d'extraction.

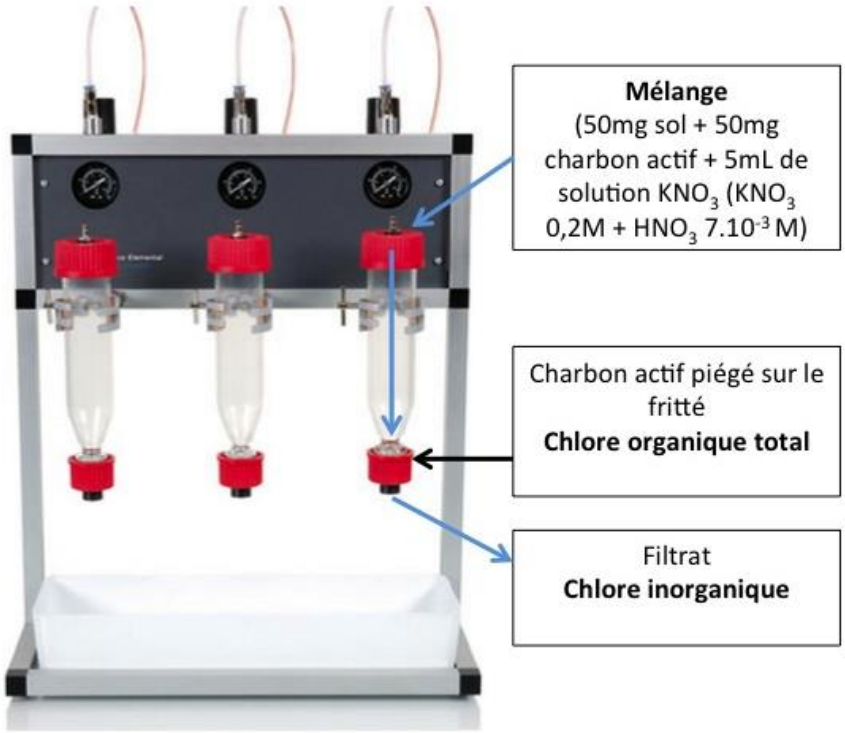



Figure 3.2. Colonne de filtration Xprep3 et principe de l'extraction du $Cl_O$ et $Cl_{in}$

#### 3.1.1.2 Deuxième protocole d'extraction : issu de la norme NF

Le protocole établi par la norme NF 16166 a également été testé dans cette étude. Le protocole est assez similaire au protocole simplifié développé au laboratoire mais dans celui-ci est utilisée une solution de nitrate de sodium (Figure 3. 3).

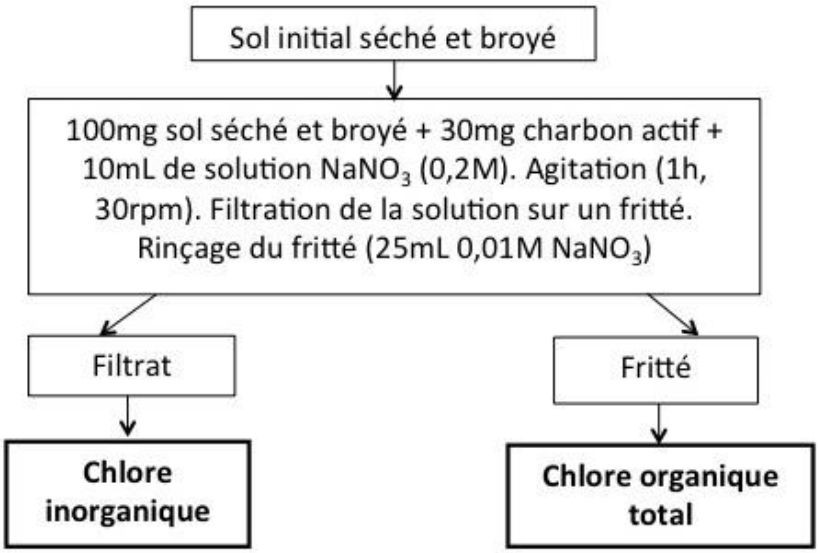



Figure 3.3. Protocole d'extraction et de mesure des teneurs en $Cl_O$ et du $Cl_{in}$ selon la norme NF 16166.

Dans un premier temps, 100mg de sol séché, tamisé (2mm) et broyé sont ajoutés à 30mg de charbon actif ainsi qu'à 10mL de solution d'extraction (0.2M $NaNO_3$). L'ensemble est mis en agitation pendant une heure, à 30 rpm puis filtré sur un fritté à l'aide d'une colonne de filtration Xprep3. Ce fritté est ensuite rincé à l'aide de 25mL de $NaNO_3$ 0,01M.

Le $Cl_{in}$ est contenu dans les solutions d'extraction et de rinçage (filtrat) alors que le $Cl_O$ est présent dans le charbon actif et dans le sol résiduel obtenu après extraction. La teneur en $Cl_O$ a été mesurée par analyseur d'AOX pour l'horizon de sol VF2012 après application de ce protocole d'extraction.

#### 3.1.1.3 Troisième protocole : selon Bastviken et al . (2007)

Ce troisième protocole, issu des travaux de Bastviken et al. (2007), est assez similaire au deuxième protocole d'extraction (norme NF) mais il permet de séparer deux fractions de chlore organique : le chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$) et le chlore organique extractible ($Cl_{OE}$). Le protocole plus détaillé, qui sera celui principalement utilisé dans la thèse, est décrit dans le chapitre 2.3.1.1. La teneur en $Cl_O$ a été mesurée par analyseur d'AOX pour l'horizon de sol VF2012 après application de ce protocole d'extraction.

### 3.1.2 Protocole de solubilisation du chlore des échantillons solides pour l'analyse par ICP MS HR

L'ICP MS HR permet uniquement l'analyse d'échantillons sous forme liquide. Le chlore à analyser dans les échantillons de sol lors des expériences d'incubations a donc dû être préalablement solubilisé. Pour cela, plusieurs méthodes ont été testées afin de déterminer (i) celle qui permettait d'obtenir le meilleur rendement de minéralisation ou d'extraction et (ii) celle qui permettait une mesure précise et répétable par ICP-MS-HR. Cette partie présente les différents protocoles de minéralisation qui ont été testés.

#### 3.1.2.1 Minéralisation des échantillons à l'aide du module de combustion de l'analyseur d'AOX

Cette première méthode consiste à minéraliser par combustion dans l'analyseur d'AOX les échantillons de sols. Après combustion, les gaz sont normalement analysés par la cellule électrolytique de l'analyseur d'AOX pour accéder aux concentrations en chlore. Pour l'analyse isotopique par ICP MS HR, les gaz sont récupérés dans différentes solutions qui ont été sélectionnées d'après les travaux de Balcone-Boissard et al. (2009) et Bing-Xian et al. (2013) et testées afin de connaître le rendement de piégeage du $Cl_{gaz}$ dans chacune d'elles :

- $Na_2SO_3$ (4mM) dans une solution de NaOH (25mM)
- KOH ($10^{-4}$ M)
- $Na_2CO_3$ (5,4mM), $NaHCO_3$ (5,1 mM)
- TMAH (0,5%)
- NaOH (25mM)
- $H_2O_2$ ($3.10^{-3}$ mM)
- $Na_2SO_3$ ($4.10^{-4}$ mM)
- NaOH $10^{-4}$ M
- $Na_2SO_4$ $10^{-3}$ M
- $Na_2SO_4$ $10^{-4}$ M
- $Na_2SO_4$ $10^{-3}$ M dans NaOH $10^{-4}$ M
- $Na_2SO_4$ $10^{-4}$ M dans NaOH $10^{-4}$ M

Les essais utilisant les 7 premières solutions ont été réalisés avec l'échantillon de sol VF2012, sur le sol total ($Cl_{TOT}$) et sur le sol résiduel ($Cl_{ONE}$) obtenu après application du protocole d'extraction de Bastviken (chapitre 2.3.1.1). Pour les 5 solutions restantes, les mesures ont été réalisées avec l'échantillon de sol CE et la fraction $Cl_{TOT}$. La prise d'essai de sol initialement introduite dans l'analyseur d'AOX pour combustion est de 200 mg et le volume final de solution choisie permettant de récupérer les gaz est de 12,5 mL pour chaque échantillon.

Après piégeage des gaz, les solutions sont analysées par chromatographie ionique (ICS 3000 Dionex) afin d'estimer le pourcentage de chlore solubilisé.

#### 3.1.2.2 Minéralisation des échantillons par fusion alcaline

Cette deuxième méthode consiste à réaliser une minéralisation par fusion alcaline des échantillons de sols. Ce type de minéralisation permet de détruire les composants organiques et les réseaux cristallins de l'échantillon pour faciliter leur mise en solution. Pour cela, 100 mg d'échantillon sont calcinés dans un creuset à l'aide d'un fondant de métaborate et tétraborate de lithium à haute température. Les solutions ainsi préparées sont ensuite prêtes pour passage à l'ICP MS HR.

Cette méthode de minéralisation des échantillons de sols (solides) a été testée avec l'échantillon CE sur les fractions $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$, cette dernière étant obtenue selon le protocole de Bastviken et al. (2007).

#### 3.1.2.3 Extraction des échantillons solides au TMAH

Cette troisième méthode d'extraction du chlore des sols consiste à extraire les halogènes contenus dans les échantillons à haute température en présence d'une base forte, le TMAH (hydroxyde de tétraméthylammonium). Le protocole plus détaillé est présenté dans le chapitre 2.3.1.4.2.

Les premiers essais de cette méthode d'extraction ont été réalisés sur les horizons de sols VF2014 et MF2014 pour les fractions solides correspondant au $Cl_{TOT}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{ONE}$ obtenues après application du protocole de Bastviken et al. (2007). Les solutions d'extraction résultantes ainsi que les fractions liquides correspondant au $Cl_{in}$ et $Cl_{E1}$ ont été analysées par ICP MS HR.

### 3.1.3 Optimisation de la méthode de mesure des teneurs en chlore par analyseur d'AOX.

Afin d'optimiser la mesure des teneurs en chlore, l'influence de la prise d'essai, l'humidité des gaz de combustion, la température de combustion ou encore le type de charbon actif utilisé pour les extractions ont été testés.

#### 3.1.3.1 Influence de la prise d'essai d'échantillon sur la mesure de la teneur en chlore

Pour avoir accès à la teneur en chlore dans un échantillon solide ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$ et $Cl_{OE1}$ : respectivement dans le sol total, le sol extrait et le charbon actif), l'échantillon solide est directement introduit dans l'analyseur d'AOX. Si le chlore dans l'échantillon est réparti de façon hétérogène, la prise d'essai de l'échantillon peut avoir une influence sur le résultat obtenu.

Afin de tester cette éventualité, la teneur en $Cl_{TOT}$ a été mesurée pour différentes prises d'essai de sol total: 50, 100 et 200mg (prise d'essai maximum possible). Ces essais ont été réalisés uniquement sur l'échantillon de sol VF2012.

#### 3.1.3.2 Influence de l'acidification de la solution d'extraction et de l'ajout de charbon actif sur la mesure de la teneur en chlore organique total.

La solution d'extraction ($KNO_3$ 0,2M + $HNO_3$ $7.10^{-3}$ M) ainsi que la solution de rinçage ($KNO_3$ 0,01M + 4 gouttes $HNO_3$) utilisée dans le premier protocole d'extraction (protocole simplifié) sont toutes deux acidifiées (pH2) à l'aide d'acide nitrique ($HNO_3$). Cette acidification, et par conséquent le pH de ces solutions, peut éventuellement jouer un rôle sur la mesure des teneurs en $Cl_O$. Cette éventualité a été testée en réalisant une série de mesures des teneurs

en $Cl_O$ après application du premier protocole (protocole simplifié) en utilisant une solution d'extraction ($KNO_3$ 0,2M) et de rinçage ($KNO_3$ 0,01M) acidifiée (pH 2) ou non acidifiée (pH 6). Ces essais ont été réalisés avec l'échantillon de sol VF2012.

Les protocoles d'extraction font également intervenir du charbon actif pour piéger la fraction de chlore organique extractible et la séparer de la fraction de chlore inorganique. Afin de vérifier que le charbon actif permet bien le piégeage de la totalité du chlore organique extractible, des essais de mesures des teneurs en $Cl_O$ après extraction ont été réalisés sans utilisation de charbon actif. Dans ce cas, 50 mg de sol sont ajoutés à 5 mL de solution d'extraction ($HNO_3$ 0,2M + $HNO_3$ $7.10^{-3}$ M) et mélangés pendant 1 h à 30 rpm. La solution est ensuite filtrée dans une colonne de filtration Xprep3. Le filtrat contient alors en théorie le $Cl_{in}$ et le $Cl_{OE1}$ et le sol présent sur le filtre contient le $Cl_{ONE}$. Ces essais ont été réalisés pour VF2012 et comparés aux résultats obtenus avec utilisation de charbon actif (partie 3. 1. 2. 2)

Par ailleurs, si la microporosité du charbon actif agit comme un piège pour le chlore organique extractible, elle peut également piéger d'autres composés présents dans l'air pendant la période de stockage et d'utilisation du charbon, provoquant ainsi sa contamination. Pour tester cette éventualité, la teneur en $Cl_{TOT}$ présente dans une prise d'essai de 50 mg de charbon actif a été mesurée après différents temps de stockage du charbon actif à l'air libre du laboratoire où sont réalisées les extractions : t = 0 ; 1 ; 2 ; 5,5 ; 21,5 ; 26 et 32 heures. Les résultats permettront d'établir une cinétique de contamination du charbon actif à l'air.

#### 3.1.3.3 Rôle du type de combustion sur la mesure des teneurs en chlore

Les échantillons de sols, ayant ou non subi au préalable une extraction, sont soumis à une combustion dans le four de l'analyseur d'AOX afin d'avoir accès aux teneurs en chlore. Afin de vérifier si cette étape de combustion, réalisée à 1000°C, est totale, des essais ont été menés en faisant varier la température et l'humidité lors de la combustion. Pour cela, la teneur en $Cl_{TOT}$ a été mesurée en ajoutant aux échantillons de l'oxyde de vanadium ($V_2O_5$) devant servir de catalyseur afin d'augmenter la température de combustion du four et en humidifiant

ou non le gaz de combustion $O_2$. Ces essais ont été réalisés sur VF2012 et comparés aux résultats obtenus sans humidification et sans ajout de catalyseur.

### 3.1.4 Comparaison de méthodes de mesures des formes de chlore

Afin de tester la fiabilité de mesure de notre analyseur d'AOX, les teneurs en chlore des échantillons VF2012 et MF2012 ont aussi été mesurées par un analyseur d'AOX situé aux Pays-Bas (TE Instrument, même marque et même modèle que l'analyseur d'AOX du LIEC). Les mesures ont été réalisées pour le $Cl_{TOT}$ et le $Cl_O$ obtenu après application du premier protocole d'extraction (protocole simplifié ; 3.1.1.1).

De plus, afin de comparer les teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX aux teneurs en chlore obtenues par une autre méthode, les teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ ont été mesurées par analyseur d'AOX et par activation neutronique sur les échantillons VF, VP, MF et MC aux 3 dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014) et sur le sol CE.

Enfin, les teneurs en $Cl_{TOT}$ et en $Cl_{ONE}$ pour les horizons VF2014 et MF2014 ont été mesurées par ICP MS HR et par analyseur d'AOX afin de comparer les méthodes de mesure.

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Influence du protocole d'extraction employé sur les teneurs en chlore organique

Les teneurs en $Cl_O$ (chlore organique total : $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{OE2}$) mesurées par analyseur d'AOX en fonction de l'utilisation de l'un des trois protocoles d'extraction (simplifié, NF et Bastviken) sur l'horizon de sol VF2012 sont présentées dans la Figure 3. 4.

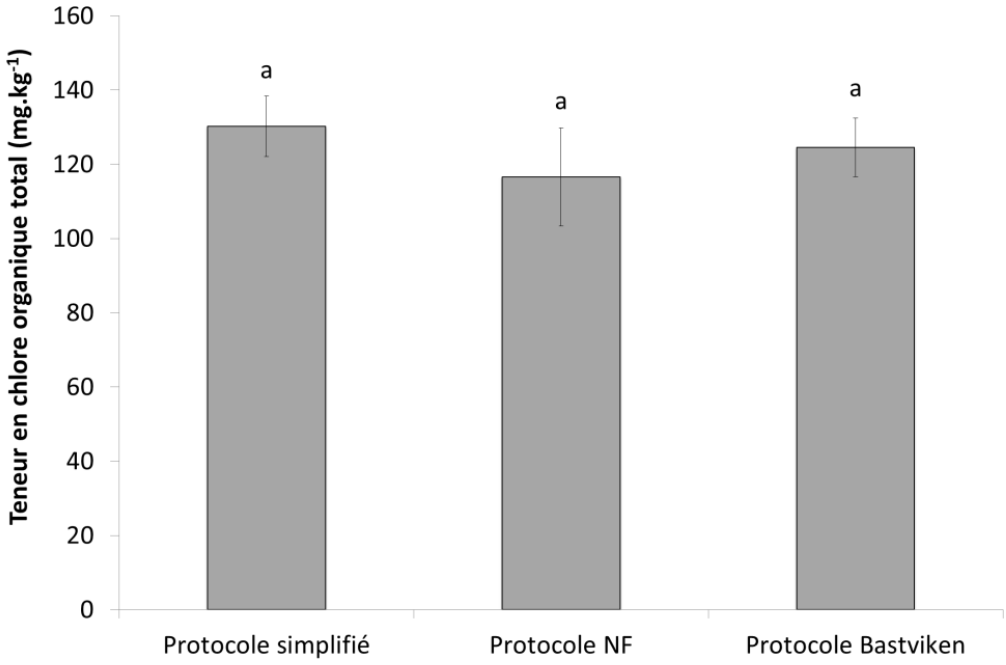



Figure 3.4. Teneurs en $Cl_O$ obtenues pour VF2012 après application des 3 protocoles d'extraction. Les différentes fractions de chlore obtenues grâce au protocole 3 sont regroupées pour former une seule forme de $Cl_O$. Moyenne ± écart-type (n=3).Test statistique : ANOVA a un facteur (protocole). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

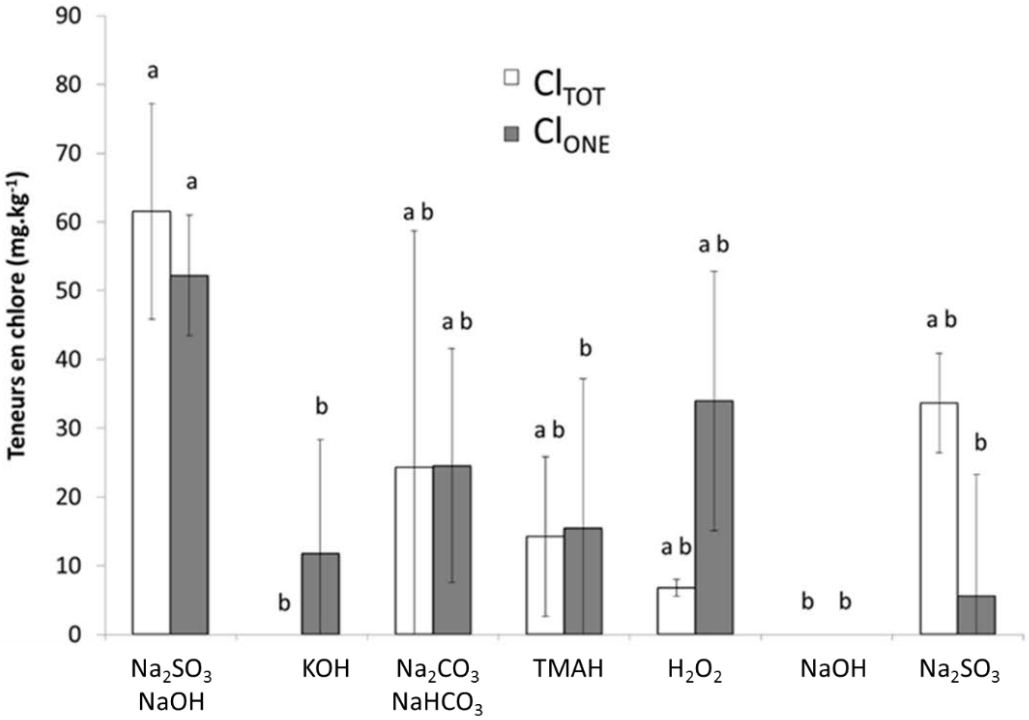
La teneur en $Cl_O$, d'environ 130 $mg.kg^{-1}$, n'est pas significativement différente quel que soit le protocole d'extraction du sol employé. Les données sont répétables, avec des écarts-types ne dépassant pas les 20%.

Les teneurs en $Cl_O$ étant similaires entre les 3 protocoles d'extraction testés, le protocole employé pour la récupération du $Cl_O$ avant analyse par analyseur d'AOX ne semble pas avoir d'influence sur le résultat obtenu. Cependant, le protocole simplifié et le protocole issu de la norme NF permettent uniquement d'accéder à la teneur $Cl_O$, sans distinction des différentes formes de $Cl_O$. A l'inverse, le protocole d'extraction proposé par Bastviken et al. (2007), inclut plusieurs étapes successives d'extractions qui permettent la séparation du chlore organique extractible ($Cl_{OE1}$ et $Cl_{OE2}$) et du chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$). C'est pourquoi cette méthode a été retenue dans les expérimentations suiventes de la thèse.

### 3.2.2 Influence du protocole de minéralisation ou d'extraction d'échantillons solides sur la récupération du chlore en solution pour l'analyse par ICP MS HR

#### 3.2.2.1 Minéralisation des échantillons à l'aide du module de combustion de l'analyseur d'AOX

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ mesurées par chromatographie ionique (ICS 3000 Dionex) dans une première série de solutions utilisées pour piéger le chlore gazeux après combustion de l'échantillon VF2012 sont présentées sur la Figure 3. 5.




| Facteur | Teneurs en chlore |
|---|---|
| Solution de piégeage | ns<br>$Na_2SO_3$-NaOH = $Na_2CO_3$-$NaHCO_3$ = TMAH = NaOH = $Na_2SO_3$<br>$Na_2CO_3$-$NaHCO_3$ = TMAH = NaOH = $Na_2SO_3$ = KOH = $H_20_2$<br>$Na_2SO_3$-NaOH > KOH = $H_2O_2$ |
| Forme de chlore | ns<br>$Cl_{ONE}$ = $Cl_{TOT}$ |

Figure 3.5. Teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ de l'échantillon VF2012 mesurées par chromatographie ionique après minéralisation des échantillons par combustion et piégeage dans les différentes solutions. Moyenne ± Ecart-type (n= 3). Test statistique : ANOVA à deux facteurs (forme de chlore – solution). Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05).

La solution de $Na_2SO_3$ (0,5 $g.L^{-1}$) dans 25 mM de NaOH permet le piégeage d'un maximum de chlore ($Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$). Dans ce cas, le piégeage est d'environ 60 $mg.kg^{-1}$ pour le chlore total (soit environ 50% de la teneur en $Cl_{TOT}$ connue dans cet échantillon).

Cependant, cette solution est trop concentrée en NaOH pour être analysée par ICP MS HR. En effet, les premiers tests réalisés ont permis de constater que la concentration de la solution de NaOH ne devait pas dépasser les $10^{-4}$ M (pour éviter tout effet de saturation dans l'appareil).

Ces premiers tests ont conduit à mener une seconde série de tests de rendement de piégeage de chlore dans des solutions très peu concentrées (pour éviter les effets de saturation de l'ICP MS HR). Ces mesures sont réalisées après combustion du sol certifié pour le $Cl_{TOT}$ (valeur attendue en $Cl_{TOT}$ de 75 $mg.kg^{-1}$) et les résultats sont présentés sur la Figure 3. 6

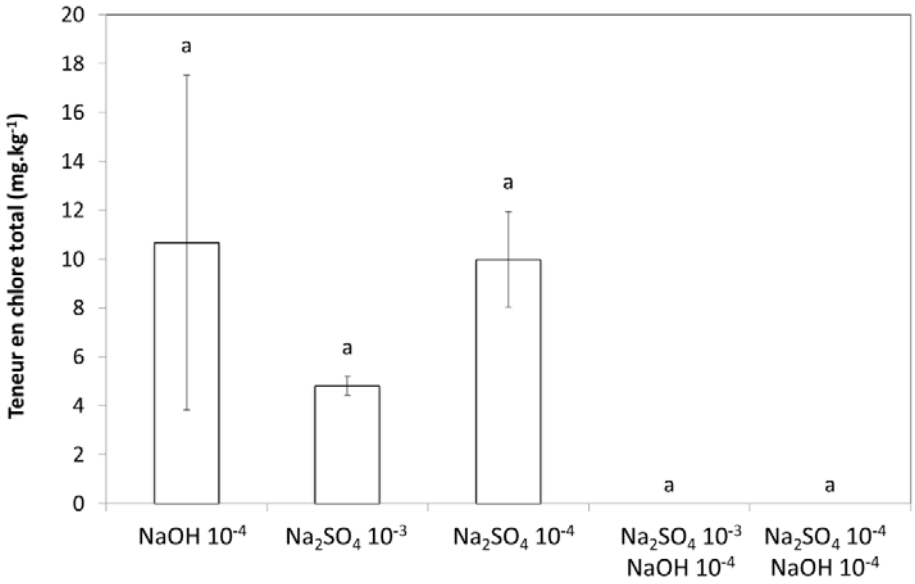



Figure 3.6. Teneurs en $Cl_{TOT}$ du sol certifié mesurées par chromatographie ionique après piégeage dans les différentes solutions. Moyenne ± Ecart-type (n = 3). Test statistique : ANOVA à un facteur (solution). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

Le rendement de piégeage est très faible : Les solutions de NaOH $10^{-4}$ et $Na_2SO_4$ $10^{-4}$ qui ont en moyenne le plus fort rendement permettent de piéger seulement 10 $mg.kg^{-1}$ de chlore alors que la valeur connue en $Cl_{TOT}$ est de 75 $mg.kg^{-1}$. Lorsque NaOH est ajouté à la solution de $Na_2SO_4$ la concentration de chlore extraite est non quantifiable.

Les tests de cette méthode de minéralisation et de différentes solutions de récupération du chlore sous forme liquide indiquent la difficulté d'arriver à de bons rendements.

#### 3.2.2.2 Minéralisation des échantillons par fusion alcaline

Les résultats obtenus suite à la minéralisation de l'échantillon CE par fusion alcaline ($Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$) sont présentés sur la Figure 3. 7. Les solutions de fusion ont directement été passées sur ICP MS HR. Les valeurs attendues sont respectivement de 70 $mg.kg^{-1}$ et 38,3 $mg.kg^{-1}$ pour le $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ (mesures par activation neutronique).

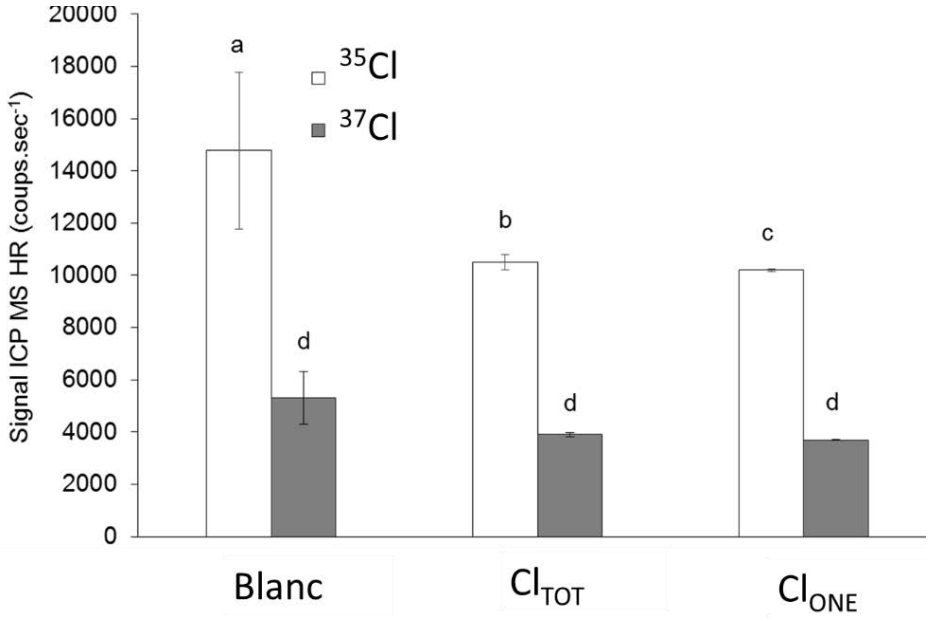


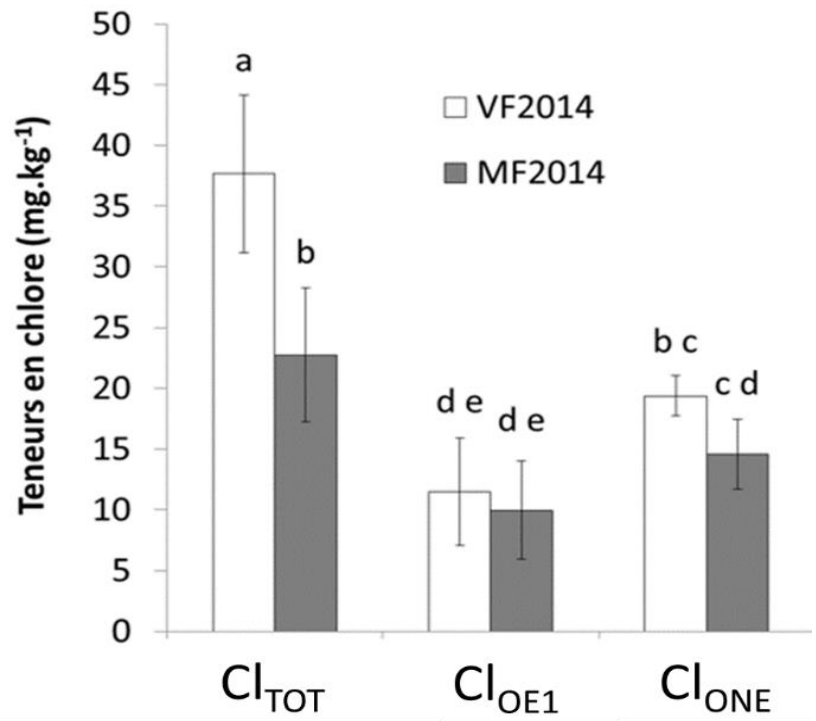

Figure 3.7. Signal obtenu par ICP MS HR des solutions issues de la minéralisation par fusion alcaline. Moyenne ± Ecart-type (n = 3) Test statistique : ANOVA à deux facteurs (forme de chlore et isotope du chlore). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0.05).

Le signal obtenu pour le blanc (fondant de métaborate et tétraborate de lithium sans échantillon) est toujours supérieur (ou égal) à celui obtenu pour les solutions de minéralisation des échantillons. Le blanc n'étant donc pas suffisamment propre pour être acceptable, les résultats obtenus pour les échantillons ne peuvent pas être pris en compte. La méthode de minéralisation par fusion alcaline n'est donc pas retenue.

#### 3.2.2.3 Extraction du chlore des échantillons solides au TMAH

Les teneurs en chlore mesurées par ICP MS HR dans les solutions d'extraction par le TMAH sont présentées sur la Figure 3. 8. Les mesures réalisées par ICP MS HR pour l'ensemble des formes de chlore sont relativement bien répétables (écart types ne dépassant jamais les 10 $mg.kg^{-1}$). Les teneurs mesurées pour $Cl_{E1}$ sont faibles, ce qui est en accord avec la littérature (Bastviken et al, 2007). Cependant, les teneurs en $Cl_{in}$ mesurées par chromatographie ionique (ICS 3000 Dionex) semblent ici très surestimées.

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées par ICP MS HR (38 et 23 $mg.kg^{-1}$ pour VF2014 et MF2014, respectivement) sont très proches de celles obtenues par analyseur d'AOX (43 et 26 $mg.kg^{-1}$ pour VF2014 et MF2014, respectivement). Les teneurs en $Cl_{ONE}$ mesurées par ICP MS HR (22 et 15 $mg.kg^{-1}$ pour VF2014 et MF2014, respectivement), ne représentent que 55 à 65 % des teneurs mesurées par analyseur d'AOX (40 et 23 $mg.kg^{-1}$ pour VF2014 et MF2014, respectivement). Ces résultats suggèrent que cette technique d'extraction du chlore des échantillons solides à l'aide d'une solution de TMAH peut être utilisée dans la suite de l'étude pour le $Cl_{TOT}$. Pour le $Cl_{ONE}$, la méthode n'extrait pas la totalité de la fraction. Toutefois cette méthode a été retenue parmi celles testées pour les mesures par ICP MS HR dans les solutions d'extraction.




| *Facteur* | *Teneurs en chlore* |
|---|---|
| *Site* | * <br> *Vosges > Meuse* |
| *Forme de chlore* | * <br> $Cl_{TOT} > Cl_{ONE} > Cl_{OE1}$ |

Figure 3.8. Teneurs en chlore obtenues par ICP MS HR après extraction au TMAH des échantillons de sols prélevés en 2014. Moyenne ± Ecart-type (n=4). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Test statistique : ANOVA à deux facteurs (forme de chlore-site). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05).

### 3.2.3 Influence des conditions de préparation et d'analyse sur les teneurs en chlore mesurées

Dans les parties suivantes, les différentes formes de chlore obtenues avec le protocole d'extraction de Bastviken et al., (2007) ont été regroupées en une seule forme qui correspond au $Cl_O$. Comme les trois protocoles d'extraction conduisaient à des résultats non statistiquement différents (paragraphe 2.1), cette partie regroupe des résultats obtenus avec différents protocoles d'extraction, sans que ceux-ci soient distingués.

#### 3.2.3.1 Influence de la prise d'essai et du mode de combustion des échantillons sur la mesure du chlore par analyseur d'AOX

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ obtenues pour l'échantillon de sol VF2012 pour différentes prises d'essai sont présentées sur la Figure 3. 9.

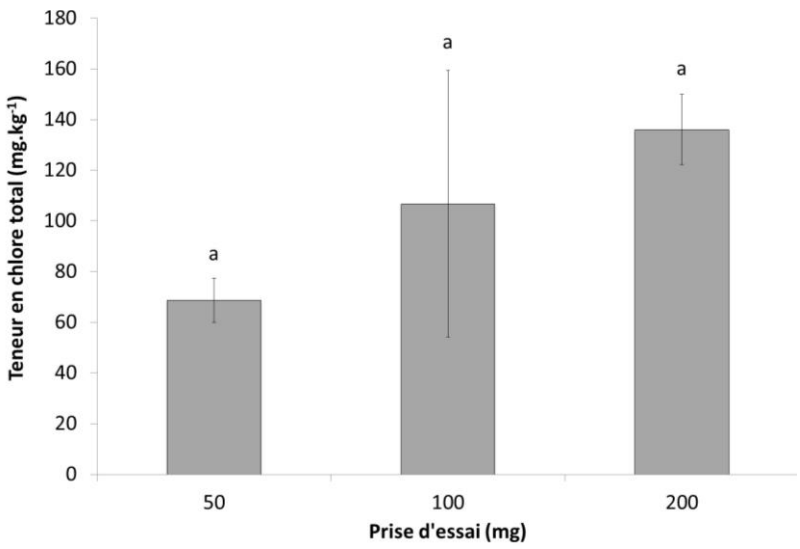



Figure 3.9. Teneurs en $Cl_{TOT}$ obtenues pour VF2012 en fonction de la prise d'essai. Moyenne ± écart-type (n = 3). Test statistique : ANOVA à un facteur (prise d'essai). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées pour des prises d'essai de 50, 100 et 200 mg sont respectivement d'environ 70, 105 et 130 $mg.kg^{-1}$. La teneur en $Cl_{TOT}$ augmente donc avec la prise d'essai, mais elle n'est pas proportionnelle à la taille de la prise d'essai. Comme la prise d'essai d'un échantillon ne peut pas excéder 200 mg (car le fritté de l'analyseur d'AOX est trop petit pour contenir une plus grosse quantité d'échantillon), alors cette prise d'essai « maximale » a été retenue pour les analyses de $Cl_{TOT,}$ mais également pour les analyses de $CL_{ONE}$.

#### 3.2.3.2 Influence du pH de la solution d'extraction et du charbon actif sur la teneur en chlore organique mesurée par analyseur d'AOX.

Les conditions d'extraction du sol, étape préliminaire nécessaire à la mesure des teneurs en $Cl_O$, peuvent avoir une influence sur le résultat obtenu. Plus précisément, le

paramètre pH de la solution d'extraction et l'effet de l'ajout de charbon actif à la solution d'extraction ont été testés. Les teneurs en $Cl_O$ obtenues pour l'horizon de sol VF2012 après application du premier protocole d'extraction (protocole simplifié), utilisant une solution d'extraction acidifiée ou non et du charbon actif ou non sont présentées dans la Figure 3. 10.

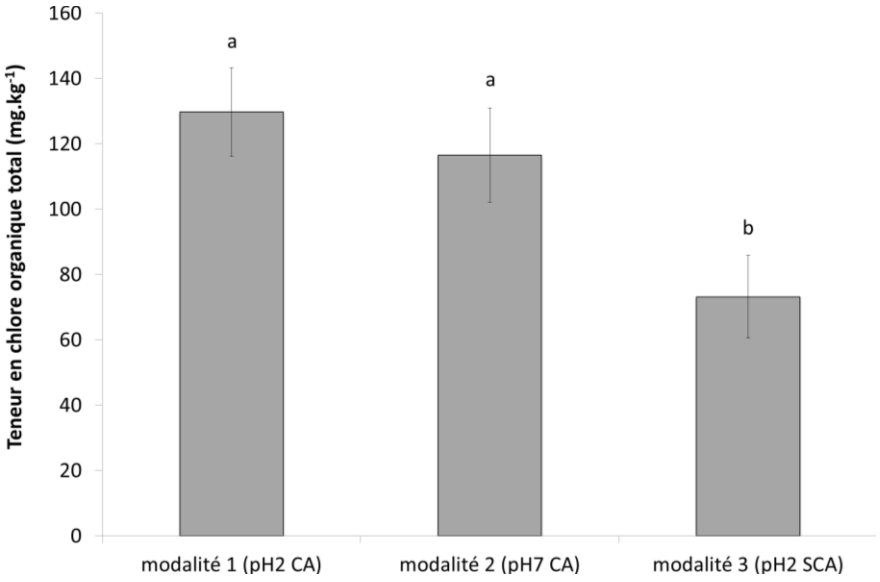



Figure 3.10. Teneur en $Cl_O$ obtenue pour VF2012 selon 3 modalités. Modalité 1 : acidification de la solution d'extraction (pH2) et utilisation de charbon actif (CA) pour le piégeage du $Cl_O$. Modalité 2 : pas d'acidification de la solution d'extraction (pH7) et utilisation de charbon actif (CA) pour le piégeage du $Cl_O$. Modalité 3 : acidification de la solution d'extraction (pH2) et pas d'utilisation de charbon actif (SCA) pour le piégeage du $Cl_O$ (prise d'essai : 50mg). Moyenne ± écart-type (n = 3). Test statistique : ANOVA à deux facteurs (acidification – ajout de charbon). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

La teneur en $Cl_O$ mesurée pour l'échantillon de sol, d'environ 130 $mg.kg^{-1}$, est identique lorsqu'elle est mesurée suite à l'application d'un protocole d'extraction incluant l'utilisation ou non d'une solution d'extraction acidifiée et incluant toujours l'utilisation de charbon actif. L'ANOVA indique ainsi qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'acidification de la solution sur les résultats obtenus. A l'inverse, la teneur en $Cl_O$ est significativement plus faible (environ 70 $mg.kg^{-1}$) lorsqu'elle est mesurée après extraction avec une solution d'extraction acidifiée (pH 2) mais sans utilisation de charbon actif. Le pH de la solution d'extraction ne semble donc pas avoir d'influence sur la mesure de la teneur en $Cl_{TOT}$. L'utilisation de charbon actif permet le piégeage du $Cl_O$ dans sa porosité. Il est donc nécessaire à la récupération de la totalité du $Cl_O$.

Cependant, si la porosité du charbon actif piège les molécules de $Cl_O$ de l'échantillon, elle peut alors également piéger du chlore atmosphérique. Il y a un risque de contamination du charbon actif au cours du temps. La Figure 3. 11, présente la teneur en $Cl_{TOT}$ contenue dans un échantillon de charbon actif exposé à l'air ambiant et permet d'estimer la contamination de ce charbon actif sur une durée courte.

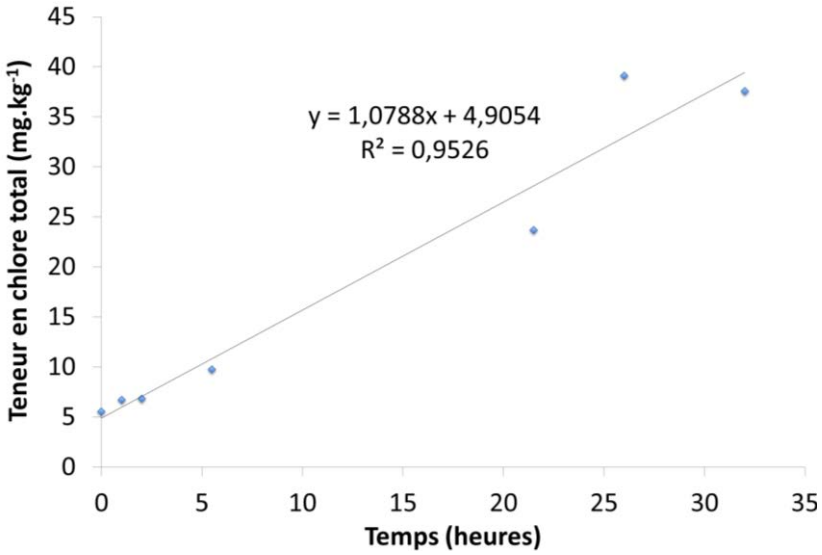



Figure 3.11. Contamination d'un échantillon de charbon actif en $Cl_{TOT}$ au cours du temps.

La teneur en $Cl_{TOT}$ contenue dans l'échantillon de charbon actif augmente graduellement avec le temps (de 5 $mg.kg^{-1}$ en début d'expérience à 40 $mg.kg^{-1}$ après 32 heures d'exposition). Le charbon actif piège donc bien des molécules de chlore présentes dans l'atmosphère et peut de ce fait être rapidement contaminé.

Par ailleurs, au début de l'expérience, le charbon actif présentait déjà une concentration de 5 $mg.kg^{-1}$ de chlore total. Le charbon actif utilisé pour cette expérience avait donc déjà subi une précédente contamination. Pour limiter ces risques de contamination, il est indispensable d'utiliser un charbon actif neuf ou peu exposé à l'air libre lors de chaque série d'extractions du sol nécessaire au piégeage du $Cl_O$ pour analyse.

### 3.2.3.3 Influence du type de combustion sur les teneurs en chlore mesurées

Les résultats issus des tests d'optimisation de la combustion de l'échantillon par le four de l'analyseur d'AOX sont présentés dans la Figure 3. 12.

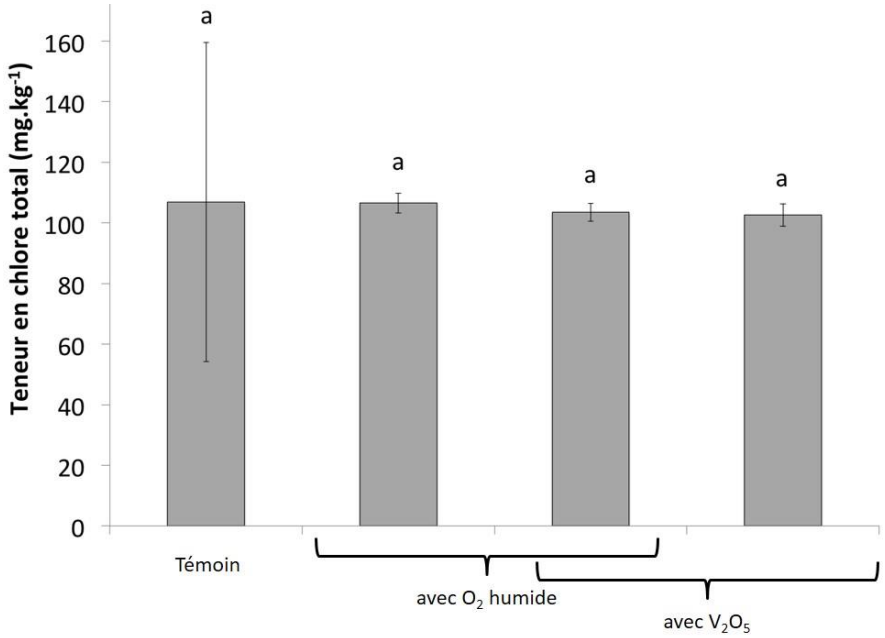



Figure 3.12. Teneurs en $Cl_{TOT}$ obtenues pour VF2012 avec et sans humidification des gaz de combustion et avec ou sans ajout d'un catalyseur $V_2O_5$ (prise d'essai : 50 mg). Témoin : mesure réalisée sans ajout de catalyseur et sans humidification des gaz de combustion. Moyenne ± écart-type (n = 3). Test statistique : ANOVA à deux facteurs (humidification – ajout de $V_2O_5$). Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

La teneur en $Cl_{TOT}$ mesurée pour l'échantillon de sol ne varie pas significativement lorsque l'échantillon subit une minéralisation avec ou sans humidification du gaz $O_2$ de combustion (sans ajout de catalyseur $V_2O_5$). Les résultats sont identiques lorsque la combustion est réalisée avec ajout d'un catalyseur $V_2O_5$ pour augmenter la température de combustion dans le four. Enfin, la teneur en $Cl_{TOT}$ obtenue en combinant l'ajout d'un catalyseur et l'humidification des gaz de combustion n'est pas significativement différente de la teneur en chlore obtenue suite à une combustion « classique » (sans humidification des gaz de combustion et sans ajout de catalyseur). Les paramètres humidité des gaz de combustion et température de combustion de l'échantillon n'influencent donc pas les teneurs en chlore mesurées.

### 3.2.4 Comparaison de méthodes de mesures des formes de chlore

Cette partie relate l'influence du type d'appareil utilisé sur la détermination des teneurs en chlore d'un échantillon de sol.

#### 3.2.4.1 Influence de l'analyseur d'AOX utilisé sur la mesure des teneurs en chlore

La comparaison des teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ des échantillons de sol VF2012 et MF2012 obtenues sur deux analyseurs d'AOX est illustrée dans la Figure 3. 13.

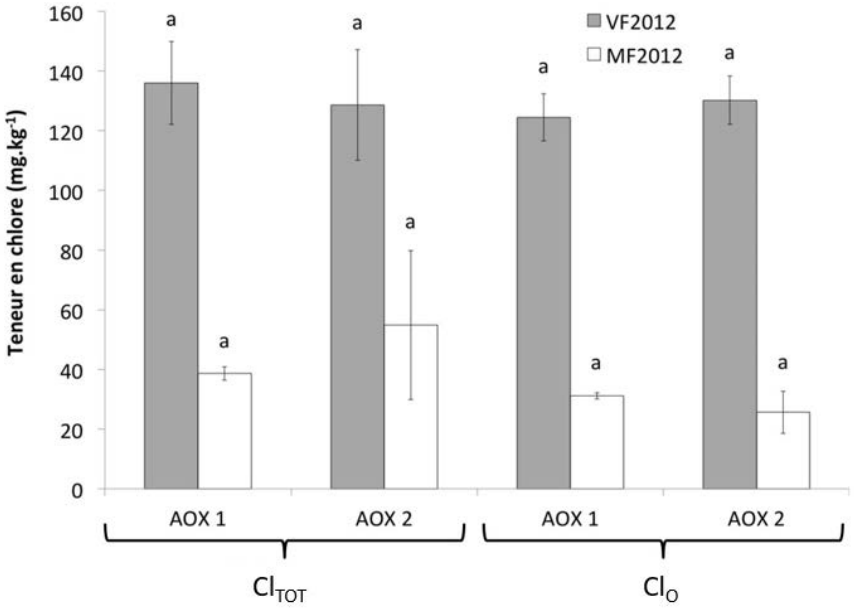



Figure 3.13. Teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ pour les échantillons de sol VF2012 et MF2012 obtenues par deux analyseurs d'AOX. AOX 1 : LIEC (Nancy, France) ; AOX 2: compagnie TE Instrument, Pays-Bas. Moyenne ± écart-type (n = 3). Test statistique : ANOVA à deux facteurs (AOX – forme de chlore). Les ANOVA ont été faites séparément pour chaque échantillon de sol. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées pour l'échantillon de sol VF2012, de l'ordre de 130 $mg.kg^{-1}$, ne sont pas significativement différentes lorsqu'elles sont mesurées par l'analyseur d'AOX 1 ou par l'analyseur d'AOX 2. De la même façon, pour VF2012, aucune différence n'est constatée entre les teneurs en $Cl_O$ mesurées par les deux appareils.

Concernant l'échantillon de sol MF2012, les résultats acquis sur les deux appareils ne sont pas significativement différents, que ce soit pour le $Cl_{TOT}$ et pour le $Cl_O$. Les teneurs en $Cl_{TOT}$ et en $Cl_O$ sont toujours proches de 40 $mg.kg^{-1}$.

L'analyseur d'AOX employé pour déterminer les teneurs en chlore d'un échantillon de sol ne semble donc pas avoir d'influence sur le résultat obtenu.

#### 3.2.4.2 Comparaison des résultats obtenus par analyseur d'AOX et activation neutronique

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ mesurées par analyseur d'AOX ont été comparées aux résultats obtenus par activation neutronique, afin de confronter ces deux techniques de mesure. Ces mesures des teneurs en chlore ont été effectuées sur différents échantillons de sol (Figure 3. 14).

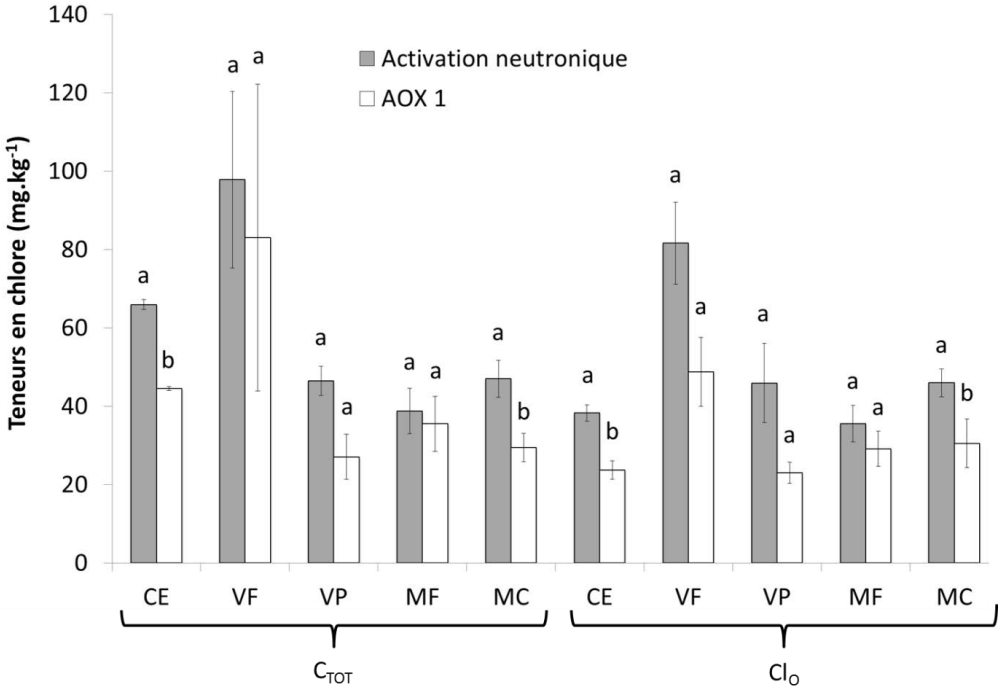



Figure 3.14. Teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ obtenues par analyseur d'AOX 1 et par activation neutronique pour CE, VF, VP, MF et MC. Les résultats obtenus pour VF, VP, MF et MC correspondent aux résultats moyennés pour les 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyenne ± écart-type (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Tests statistiques : test t de Student. Les résultats obtenus par AOX 1 et par activation neutronique sont comparés par paires pour une même forme de chlore et un même échantillon de sol. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05).

Les teneurs en $Cl_{TOT}$ sont comprises entre 25 et 100 $mg.kg^{-1}$ respectivement pour les échantillons MF, VF et VP. Pour chaque échantillon, ces valeurs ne sont pas significativement différentes lorsqu'elles sont mesurées par l'analyseur d'AOX 1 et par activation neutronique, bien que les valeurs aient tendance à être plus basses lorsqu'obtenues par analyseur d'AOX. Pour CE et MC, les résultats obtenus par activation neutronique sont significativement supérieurs à ceux obtenus par analyseur d'AOX 1.

Les teneurs en $Cl_O$ montrent des tendances similaires à celles observées pour les teneurs en $Cl_{TOT}$. Les résultats sont non significativement différents lorsqu'ils sont obtenus par analyseur d'AOX 1 et par activation neutronique pour VF, VP et MF et les teneurs en $Cl_O$ sont significativement supérieures lorsqu'elles sont mesurées par activation neutronique pour CE et MC.

L'ensemble des résultats obtenus est assez reproductible, avec des écarts-type ne dépassant jamais les 20%, excepté pour les teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_O$ des échantillons VF pour lesquels l'écart type peut atteindre 50%, sans doute parce que les échantillons des 3 années, qui différaient beaucoup pour VF (voir chapitre 4), ont été moyennés.

Globalement, la méthode de mesure des teneurs en chlore par analyseur d'AOX permet donc d'aboutir à des résultats similaires à ceux obtenus par activation neutronique. Les valeurs obtenues par analyseur d'AOX sont toujours plus faibles que celles obtenues par activation neutronique, bien que la différence ne soit pas toujours significative.

La teneur en $Cl_{TOT}$ certifiée de l'échantillon CE a été comparée aux teneurs en $Cl_{TOT}$ obtenues par analyseur d'AOX 1 et par activation neutronique afin de déterminer la méthode de mesure la plus juste (Figure 3. 15).

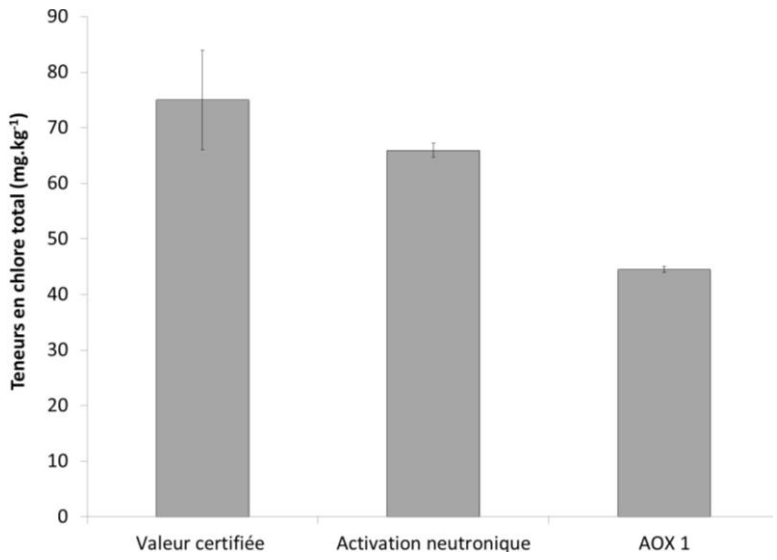



Figure 3.15. Teneurs en $Cl_{TOT}$ de l'horizon de sol CE certifiée, obtenues par activation neutronique et par analyseur d'AOX 1. Moyenne ± écart-type (n = 4).

La teneur certifiée en $Cl_{TOT}$ pour CE est égale à 75 ± 9 $mg.kg^{-1}$. La mesure de cet échantillon de sol par activation neutronique permet d'obtenir une valeur de 65 ± 1 $mg.kg^{-1}$ contre seulement 45 ± 0,5 $mg.kg^{-1}$ lorsque la teneur en $Cl_{TOT}$ est mesurée par analyseur d'AOX 1. La méthode de mesure par activation neutronique permettrait ainsi d'accéder à un résultat plus proche de la valeur certifiée que par analyseur d'AOX.

Il est possible d'estimer un rendement de mesures réalisées par analyseur d'AOX 1 par rapport à celles obtenues par activation neutronique. La Figure 3. 16 permet d'observer ces rendements pour les horizons de sols CE, VF, VP, MF et MC pour les teneurs en $Cl_{TOT}$ et en $Cl_O$

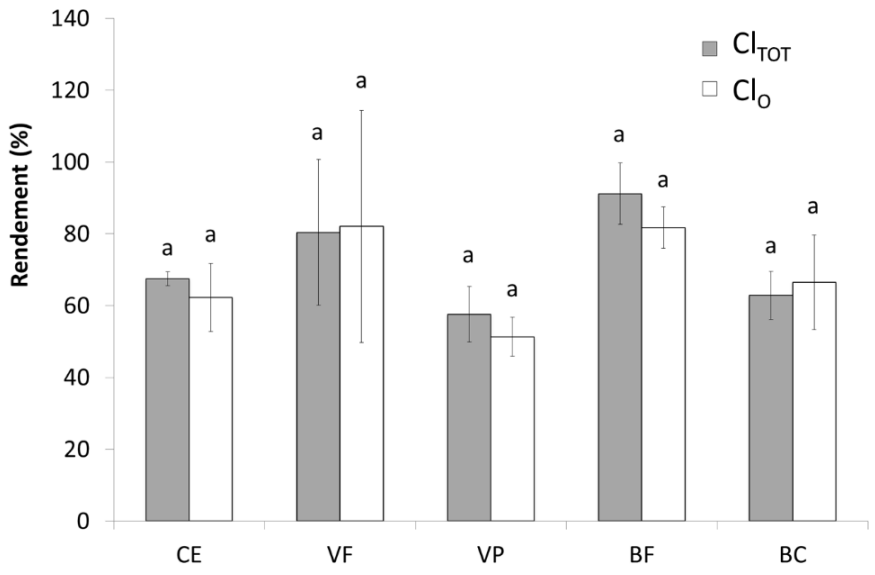



Figure 3.16. Rendement de la mesure de chlore total ($Cl_{TOT}$) et organique ($Cl_O$) par analyseur d'AOX par rapport à l'activation neutronique pour les échantillons de sol CE, VF, VP, MF et MC. Les résultats obtenus pour VF, VP, MF et MC correspondent aux résultats moyennés pour les 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyenne ± écart-type (n = 3). Test statistique : ANOVA à un facteur (sol). Les ANOVA ont été réalisées séparément pour le $Cl_{TOT}$ et le $Cl_O$. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (P<0,05)

Les rendements obtenus pour le $Cl_{TOT}$, d'environ 60%, par rapport à la mesure réalisée par activation neutronique, sont significativement les mêmes pour les sols CE, VP et MC (respectivement 67, 57 et 62%). Pour VF (80%) et MF (91%), les rendements ne sont pas significativement différents des précédents mais une tendance à des valeurs plus élevées est observée (moyenne de 85%). Concernant le $Cl_O$, les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes : le rendement est d'environ 60 % pour les sols CE, VP et MC (62, 51 et 66% respectivement) et 80% en moyenne pour les horizons VF (82%) et MF (81%). Ainsi, il semblerait que les horizons de sols agricoles (de culture ou de prairie) présentent en moyenne des rendements inférieurs (environ 60%) à ceux des horizons de sols forestiers (environ 80%). Ce rendement étant variable selon les sols, il est difficilement envisageable de proposer un facteur de correction systématique des mesures par analyseur d'AOX.

#### 3.2.4.3 Comparaison des résultats obtenus par analyseur d'AOX et par ICP MS HR

Les résultats des analyses effectuées sur les sols VF2014 et MC2014 après extraction au TMAH (Figure 3. 8) ont été comparés à ceux obtenus sur les mêmes échantillons de sols par analyseur d'AOX. Les valeurs obtenues par ICP MS HR sont inférieures à celles obtenues

par analyseur d'AOX. Un « rendement » pour les fractions $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ obtenues par ICP MS HR par rapport à l'analyse de ces fractions par analyseur d'AOX a été calculé. Il varie entre les formes de chlore, il est de 88% pour $Cl_{TOT}$ et est supérieur à 55% pour $Cl_{ONE}$ (Tableau 3. 1).

Tableau 3.1. Teneurs en chlore total ($Cl_{TOT}$) et en chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$) mesurées par l'analyseur d'AOX et par ICP MS HR pour les sols VF et MF et rendement de la mesure par ICP MS HR par rapport à l'analyseur AOX.

| | **$Cl_{TOT}$ (mg.kg$^{-1}$)** | | **$Cl_{ONE}$ (mg.kg$^{-1}$)** | |
|---|---|---|---|---|
| | **VF2014** | **MF2014** | **VF2014** | **MF2014** |
| **ICP MS HR** | 38 | 23 | 22 | 15 |
| **AOX** | 43 | 26 | 40 | 23 |
| **Rendement (%)** | 88 | 88 | 55 | 65 |

### 3.2.5 Discussion - Conclusion sur l'influence des conditions d'extraction et d'analyse sur la mesure des teneurs en chlore

Le tableau 3. 2 permet de faire un résumé des paramètres d'analyses qui ont été testés et de leur influence ou non sur les résultats obtenus.

Tableau 3.2. Influence des paramètres impliqués dans la méthode d'extraction et d'analyse sur les teneurs en chlore mesurées

| **Influence des protocoles d'extraction** | |
|---|---|
| | **Résultat** |
| **Protocole d'extraction du chlore organique et inorganique** | Résultats identiques pour le $Cl_O$<br>Protocole Bastviken permettant de distinguer $Cl_{OE}$ et $Cl_{ONE}$ |
| **Protocole de solubilisation du chlore** | Solubilisation au TMAH permet de récupérer le plus de chlore |
| **Paramètres testés lors de l'extraction du sol avant mesure des teneurs en chlore** | |
| | **Résultat** |
| **Acidification de la solution d'extraction** | L'acidification de la solution d'extraction n'influence pas la récupération du $Cl_O$ |
| **Ajout de charbon actif** | L'ajout de charbon actif à la solution d'extraction est nécessaire au piégeage et à la récupération de tout le $Cl_O$ |
| **Paramètres testés lors de la mesure des teneurs en chlore par analyseur AOX** | |
| | **Résultat** |
| **Prise d'essai** | Plus la prise d'essai est grande, plus la teneur en $Cl_{TOT}$ augmente. La prise d'essai retenue est de 200mg. |
| **Humidification des gaz de combustion $O_2$** | L'humidification des gaz de combustion $O_2$ n'influence pas les teneurs en chlore mesurées |
| **Utilisation d'un catalyseur ($V_2O_5$)** | L'utilisation d'un catalyseur $V_2O_5$ n'influence pas les teneurs en chlore mesurées |

Parmi les différents tests mis en place pour déterminer les paramètres impliqués dans la méthode d'analyse et de préparation des échantillons, l'humidification des gaz de combustion $O_2$ et l'utilisation d'un catalyseur $V_2O_5$ pour optimiser la combustion de l'échantillon dans le four de l'analyseur d'AOX lors de la mesure de la teneur en $Cl_{TOT}$ ne semblent pas avoir d'influence sur le résultat obtenu. Il en est de même pour l'acidification de la solution d'extraction utilisée pour avoir accès à la teneur en $Cl_O$. A l'inverse, la prise d'essai de l'échantillon introduite dans l'analyseur d'AOX joue un rôle sur le résultat obtenu : plus la prise d'essai est importante, plus la teneur en chlore mesurée est élevée. La prise d'essai retenue pour mesurer les teneurs en $Cl_{TOT}$ et en $Cl_{ONE}$ (non testée) sur les échantillons solides est ainsi de 200 mg.

L'ajout de charbon actif s'est révélé indispensable, il permet de piéger tout le $Cl_{OE}$ et évite donc la sous-évaluation des teneurs en $Cl_O$, mais le risque de contamination du charbon actif par l'air ambiant a été mis en évidence et nécessite des précautions (utilisation de charbon actif neuf ou récemment ouvert).

Concernant la méthode de solubilisation du chlore nécessaire aux mesures par ICP MS HR, il est apparu que la méthode faisant intervenir l'utilisation de TMAH est la plus efficace, car elle permet le piégeage de la presque totalité du $Cl_{TOT}$ et d'environ 60 % du $Cl_{ONE}$.

Le tableau 3. 3 permet de faire un bilan sur la comparaison des différentes méthodes de mesure des teneurs en chlore testées dans cette étude.

Tableau 3.3. Bilan des résultats obtenus suite à la comparaison des différentes méthodes de mesure des teneurs en chlore.

| **Méthodes comparées** | **Résultat** |
|---|---|
| **AOX1/AOX2** | Pas de différence entre analyseurs d'AOX |
| **AOX1/activation neutronique** | Teneurs en chlore mesurées par activation neutronique > teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX |
| **AOX1/ICP MS HR** | Teneurs en chlore mesurées par ICP MS HR < teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX |

L'analyseur d'AOX utilisé ne semble pas avoir d'influence sur les teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$ et $Cl_O$) mesurées. Les résultats obtenus par une même méthode sont répétables. La méthode de mesure des teneurs en chlore par analyseur d'AOX 1 peut donc être utilisée dans le cadre de cette étude pour la comparaison de sols et de modalités. Toutefois, les teneurs en $Cl_{TOT}$ et en $Cl_O$ obtenues par analyseur d'AOX 1 sont souvent inférieures à celles obtenues par activation neutronique. Cette méthode semble sous-estimer les concentrations en chlore, comme l'indiquent les résultats obtenus avec le sol certifié. S'il fallait apporter un facteur de correction aux mesures réalisées par analyseur d'AOX, il serait de +37 % pour le $Cl_{TOT}$ et de +40% pour le $Cl_O$ pour les sols anthropisés, et de +14 % et de +18 % pour les sols forestiers. Il

apparaît ainsi difficile de proposer un facteur de correction systématique des mesures par analyseur d'AOX. Par ailleurs, une seule valeur certifiée a été utilisée, et il serait sans doute nécessaire de multiplier les valeurs de référence pour d'autres sols.

De même, pour les analyses par ICP MS HR, un facteur de correction aurait pu être utilisé, puisque les teneurs obtenues sont elles-mêmes plus faibles que celles obtenues par analyseur d'AOX mais pour les mêmes raisons que pour l'analyseur d'AOX, le choix a été fait de ne pas corriger les valeurs obtenues.

En conclusion, les teneurs en chlore pourront être mesurées par analyseur d'AOX dans la suite de ce travail, mais en considérant que les valeurs obtenues par cette technique sont inférieures à celles obtenues par activation neutronique pour un sol de référence, elles peuvent donc être sous-estimées.

Dans la suite de ce travail, les mesures des teneurs en chlore seront déterminées à l'aide d'un analyseur d'AOX en introduisant une prise d'essai de 200 mg d'échantillon dans l'appareil. Pour la mesure des teneurs en $Cl_O$, le protocole d'extraction du sol avant analyse correspondra au protocole de Bastviken et al. (2007), qui inclut l'utilisation de charbon actif.

# Chapitre 4

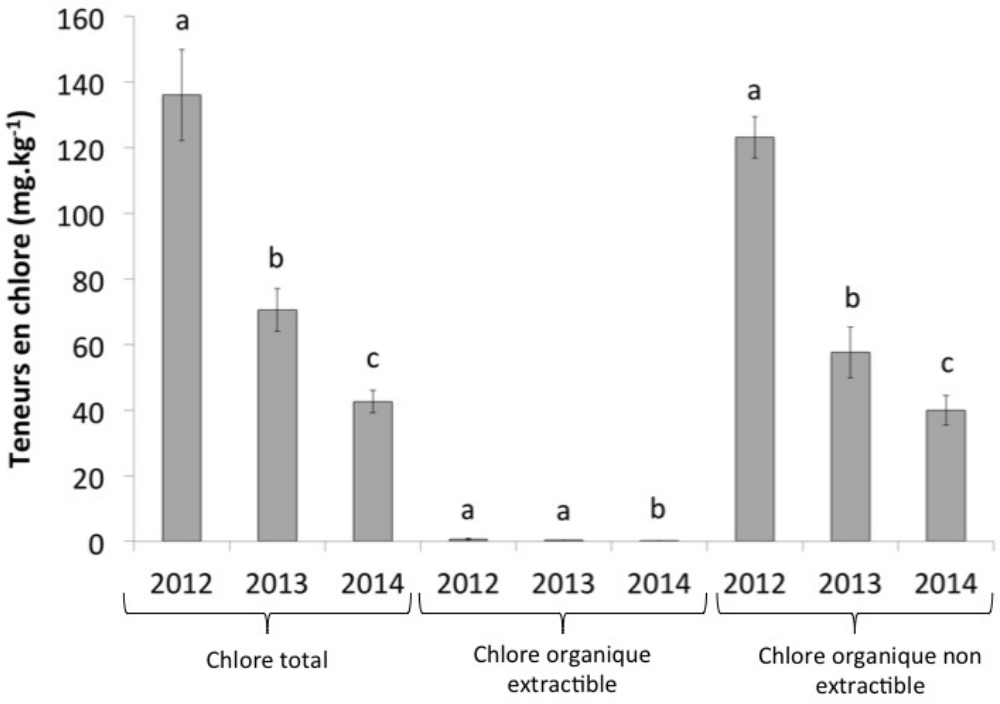
## Influence des paramètres environnementaux et biophysicochimiques sur la répartition des teneurs en chlore dans les sols.

# 4 Influence des paramètres environnementaux et biophysicochimiques sur la répartition des teneurs en chlore dans les sols.

Le travail présenté dans ce quatrième chapitre a pour objectif d'étudier les paramètres environnementaux et édaphiques des sols qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols. Pour cela les teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) ont été déterminées dans quatre sols contrastés (horizons organo-minéraux des sols VF, VP, MF, MC, Chapitre 2.1) prélevés à trois dates de prélèvement (mars 2012, juin 2013 et mars 2014). Les teneurs des différentes formes de chlore ont été obtenues par analyseur d'AOX lors d'une même série d'analyses après application du protocole d'extraction de Bastviken et al. (2007) (chapitre 2.3.1.1). Les données météorologiques relevées sur chaque site de prélèvements ont été mesurées. Les échantillons de sol prélevés ont aussi fait l'objet d'analyses physico-chimiques (pH, C/N, granulométrie, éléments totaux et échangeables) et microbiologiques (quantification des gènes ARNr 16S et ARNr 18S, et mesure des activités enzymatiques, chapitre 2.3.3). L'ensemble de ces données a été analysé pour étudier les relations entre les paramètres biophysico-chimiques et environnementaux et les teneurs en chlore mesurées dans les sols.

## 4.1 Répartition des teneurs en chlore au cours du temps.

Les teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) dans les échantillons VF prélevés en 2012, 2013 et 2014, et mesurées par analyseur d'AOX, sont présentées dans la Figure 4. 1. Les données précises sont reportées en annexe 1.

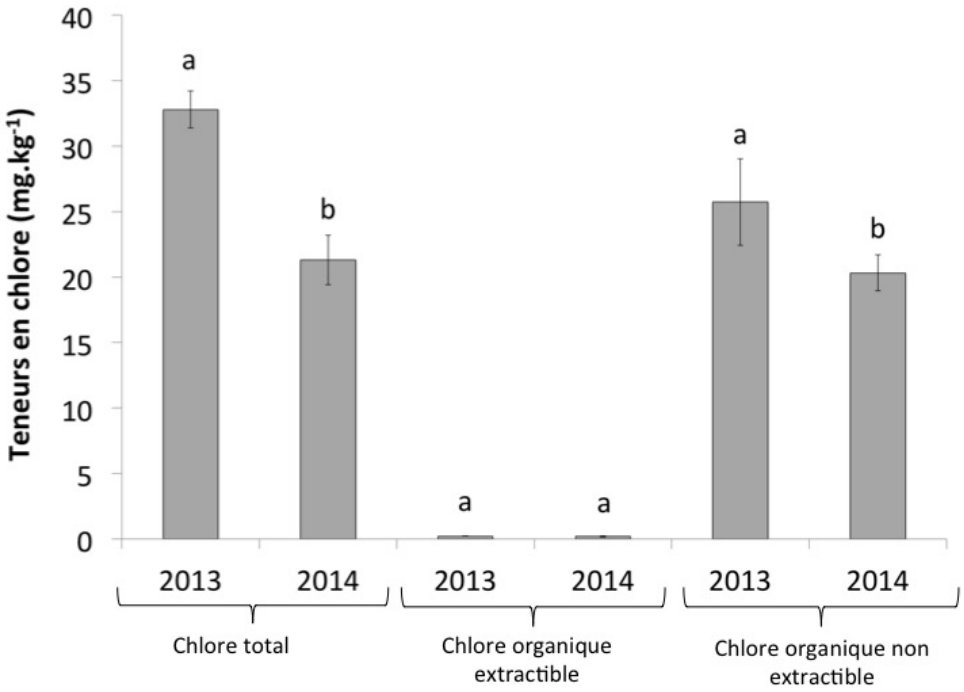



| Facteurs | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{OE1}$ | $Cl_{ONE}$ |
|---|---|---|---|
| Année | * <br> 2012 > 2013 > 2014 | * <br> 2012 = 2013 > 2014 | * <br> 2012 > 2013 > 2014 |

Figure 4.1. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons VF prélevés en 2012, 2013 et 2014. Moyennes ± écart-type, (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (année), P<0,05).

La teneur en $Cl_{TOT}$ est significativement plus élevée en 2012 et diminue lors des deux prélèvements suivants (de 135 mg.kg$^{-1}$ en 2012 à 40 mg.kg$^{-1}$ en 2014). Le $Cl_{ONE}$ suit la même répartition, avec des teneurs variant de 120 mg.kg$^{-1}$ en 2012 à 40 mg.kg$^{-1}$ en 2014. La teneur en $Cl_{ONE}$ représente presque tout le $Cl_{TOT}$. Concernant le $Cl_{OE1}$, les teneurs, toujours inférieures à 1 mg.kg$^{-1}$ (annexe 1), sont aussi plus faibles en 2014 qu'en 2012.

La Figure 4. 2 correspond aux teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) de l'échantillon de sol VP prélevé en 2013 et 2014.

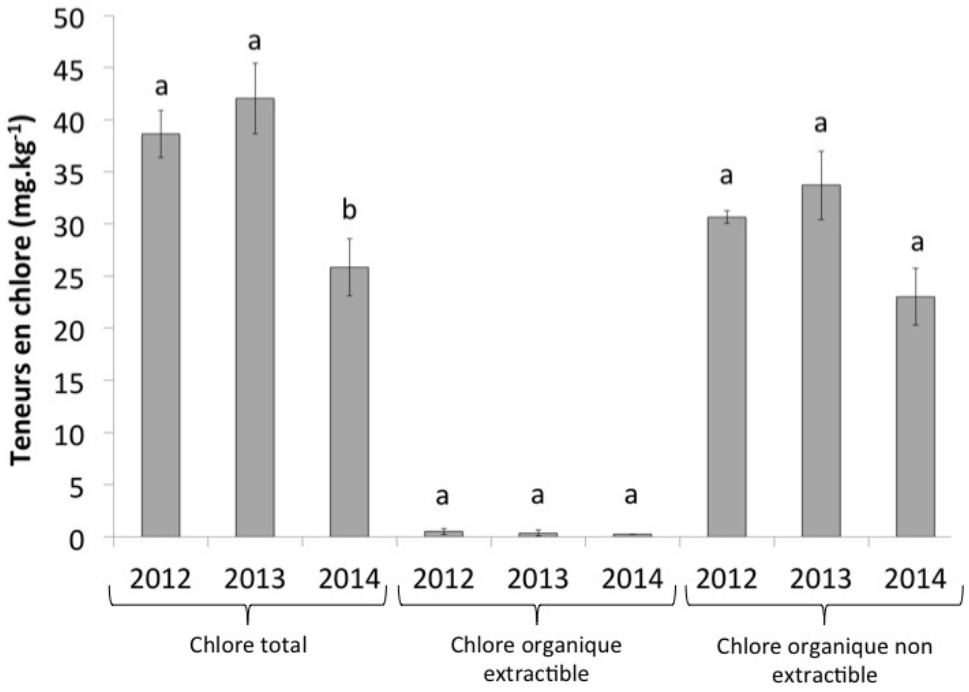



| Facteurs | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{OE1}$ | $Cl_{ONE}$ |
|---|---|---|---|
| Effet année | * <br> 2013 > 2014 | ns <br> 2013 = 2014 | * <br> 2013 > 2014 |

Figure 4.2. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX pour les échantillons VP prélevés en 2013 et en 2014. Moyennes ± écart-type, n = 4. Les effets significatifs sont représentés par un astérisque et non significatifs par ns, respectivement. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (année), P<0,05).

La teneur en $Cl_{ONE}$ mesurée dans le sol, de l'ordre de 27 $mg.kg^{-1}$ en 2013 et de 20 $mg.kg^{-1}$ en 2014, est significativement plus élevée en 2013. Cette fraction représente 88 % du $Cl_{TOT}$ (de 32 $mg.kg^{-1}$ en 2013 et 22 $mg.kg^{-1}$ en 2014). La teneur en $Cl_{OE1}$, quant à elle, est très faible (toujours <1$mg.kg^{-1}$ ; annexe 1) et non significativement différente entre 2013 et 2014.

Les teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées dans l'échantillon MF prélevé en 2012, 2013 et 2014 par analyseur d'AOX, sont présentées dans la Figure 4. 3.

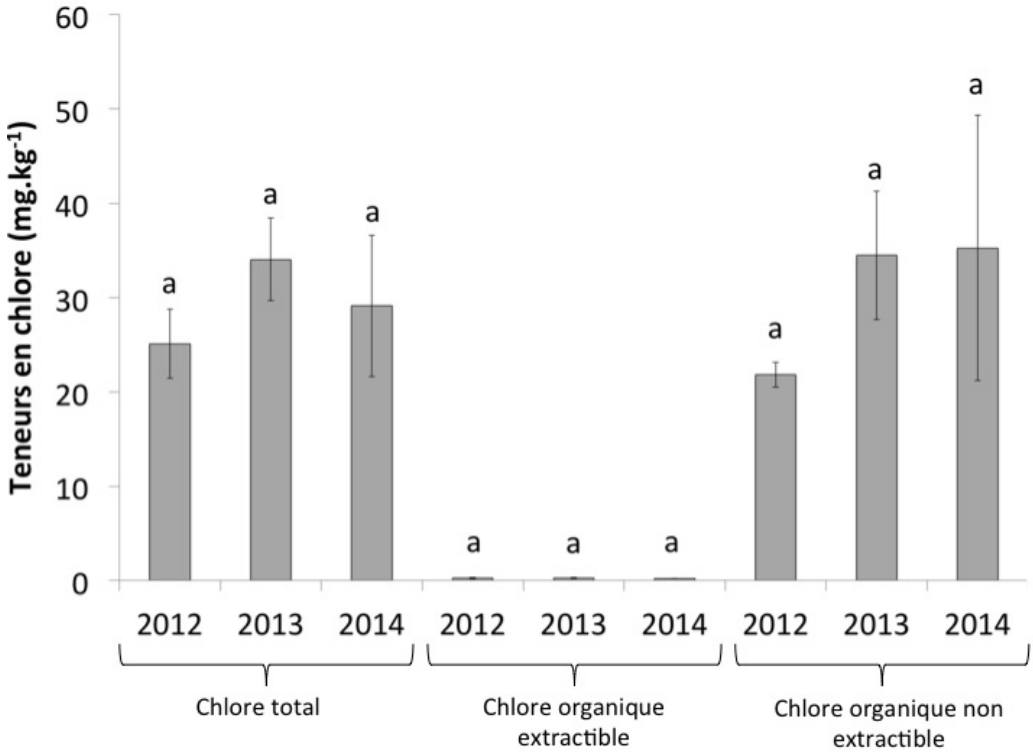



| Facteurs | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{OE1}$ | $Cl_{ONE}$ |
|---|---|---|---|
| Effet année | * <br> 2012 = 2013 > 2014 | ns <br> 2012 = 2013 = 2014 | ns <br> 2012 = 2013 = 2014 |

Figure 4.3. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons MF aux 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyennes ± écart-type, (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque et non significatifs par ns, respectivement Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (année), P<0,05).

D'après la Figure 4. 3, la teneur en $Cl_{TOT}$ ne varie pas dans les échantillons prélevés en 2012 et 2013 (en moyenne 40 mg.kg$^{-1}$). En revanche, elle est significativement inférieure dans les échantillons prélevés en 2014 (25 mg.Kg$^{-1}$). Le $Cl_{ONE}$, en moyenne de 27 mg.kg$^{-1}$, représente 83 % du $Cl_{TOT}$ mais n'est pas significativement différent entre les années de prélèvements. Le $Cl_{OE1}$, quant à lui, présente des teneurs très faibles (intérieures à 1 mg.kg$^{-1}$ ; annexe 1) et non différentes entre les années de prélèvement.

La Figure 4. 4 correspond aux teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) obtenues par analyseur d'AOX dans l'échantillon MC prélevé en 2012, 2013 et 2014.




| Facteurs | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{OE1}$ | $Cl_{ONE}$ |
|---|---|---|---|
| Effet année | ns<br>2012 = 2013 = 2014 | ns<br>2012 = 2013 = 2014 | ns<br>2012 = 2013 = 2014 |

Figure 4.4. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons MC aux 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyennes ± écart-type (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (année), P<0,05).

La teneur en $Cl_{TOT}$, en moyenne de 30 mg.kg$^{-1}$, n'est pas significativement différente entre les années de prélèvements. Le $Cl_{ONE}$ suit la même répartition, avec une teneur moyenne d'environ 27 mg.kg$^{-1}$. La teneur en $Cl_{ONE}$ représente donc environ 90 % du $Cl_{TOT}$. Concernant le $Cl_{OE1}$, les teneurs, toujours inférieures à 1 mg.kg$^{-1}$ (annexe 1), sont beaucoup plus faibles.

## 4.2 Conditions météorologiques avant les trois périodes de prélèvements des échantillons de sols

Les données météorologiques telles que la hauteur cumulée de précipitations et la température moyenne, calculées à partir des relevés quotidiens de Météo-France durant les 15 jours avant prélèvement des échantillons issus des sites de Meuse et des Vosges en 2012, 2013 et 2014, sont présentées sur les Figures 4. 5 et 4. 6.

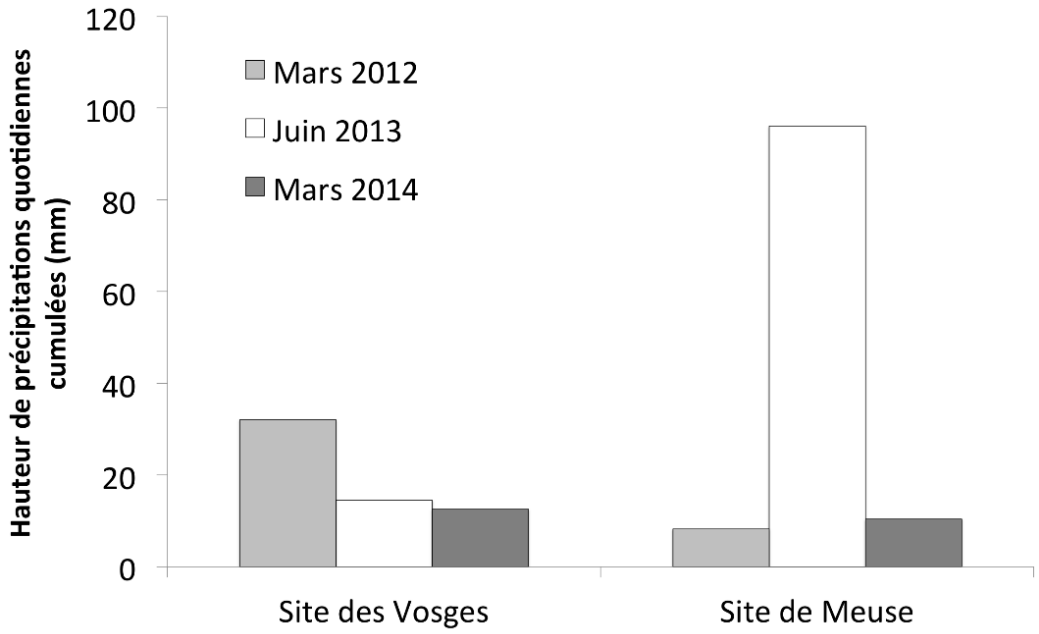
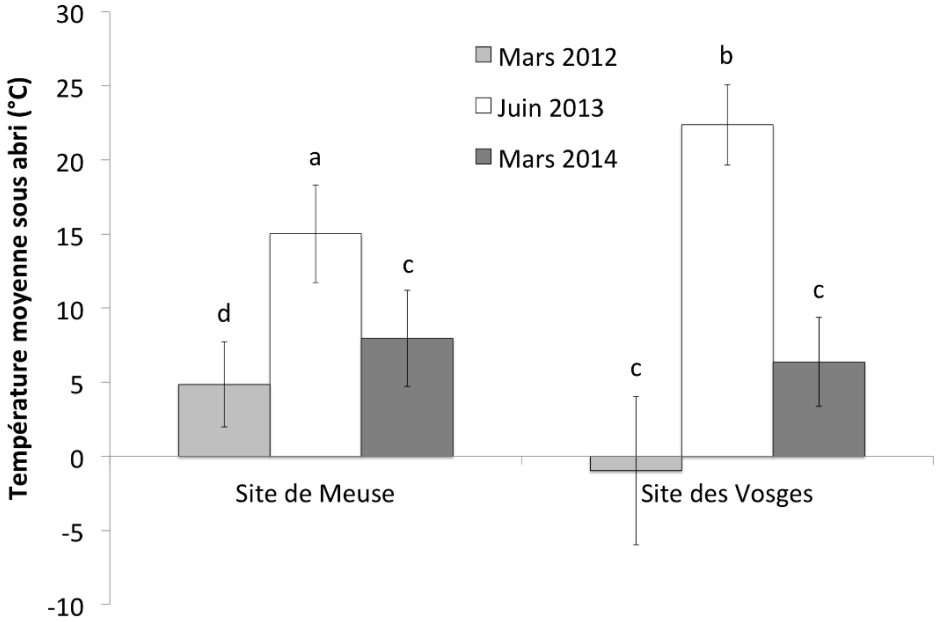



Figure 4.5. Hauteur de précipitations quotidiennes cumulées (mm) sur 15 jours avant la date de prélèvement de l'échantillon de sol pour les 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Les données sont issues des stations Météo-France les plus proches des sites de prélèvements (chapitre 2)

Concernant le site des Vosges, la hauteur cumulée des précipitations sur les 15 jours avant prélèvement en mars 2012 est d'environ 35 mm. Les précipitations sont d'environ 20 mm pour les prélèvements de 2013 et 2014, donc légèrement plus faibles que pour le prélèvement de 2012.

Concernant le site de Meuse, la hauteur cumulée de précipitations est sensiblement la même durant les 15 jours avant le prélèvement de mars 2012 et de mars 2014 (en moyenne de 10 mm). Par contre, Les précipitations sont beaucoup plus importantes avant le prélèvement de juin 2013 et atteignent presque 100 mm.




| Facteurs | Température moyenne |
|---|---|
| Année | *<br>2013 > 2014 > 2012 |
| Site | Ns<br>Meuse = Vosges |

Figure 4.6. Température moyenne (°C) relevée sur 15 jours avant la date de prélèvement des échantillons de sols pour les prélèvements de 2012, 2013 et 2014. Moyennes ± écarts-types. n = 15. Les effets significatifs et non significatifs sont représentés par un astérisque et par ns, respectivement. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

Les températures moyennes enregistrées à proximité des sites Vosges et Meuse durant les 15 jours avant prélèvement sont les plus faibles en mars 2012 (respectivement -2 et 5°C pour le site des Vosges et le site de Meuse) et les plus élevées en juin 2013 (respectivement 22 et 15°C pour le site des Vosges et le site de Meuse). Pour le prélèvement de mars 2014, des températures moyennes intermédiaires ont été enregistrées (respectivement 6 et 7 °C).

## 4.3 Propriétés physico-chimiques des échantillons de sols

### 4.3.1 Taux d'humidité des échantillons de sols

Le taux d'humidité (%) de chaque échantillon de sol mesuré après prélèvement est référencé dans le tableau 4. 1.

Tableau 4.1. Taux d'humidité (%) des échantillons de sols pour les 3 dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyenne ± écarts-types. n = nombre d'échantillons composites prélevés chaque année (soit n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et n = 4 en 2014).

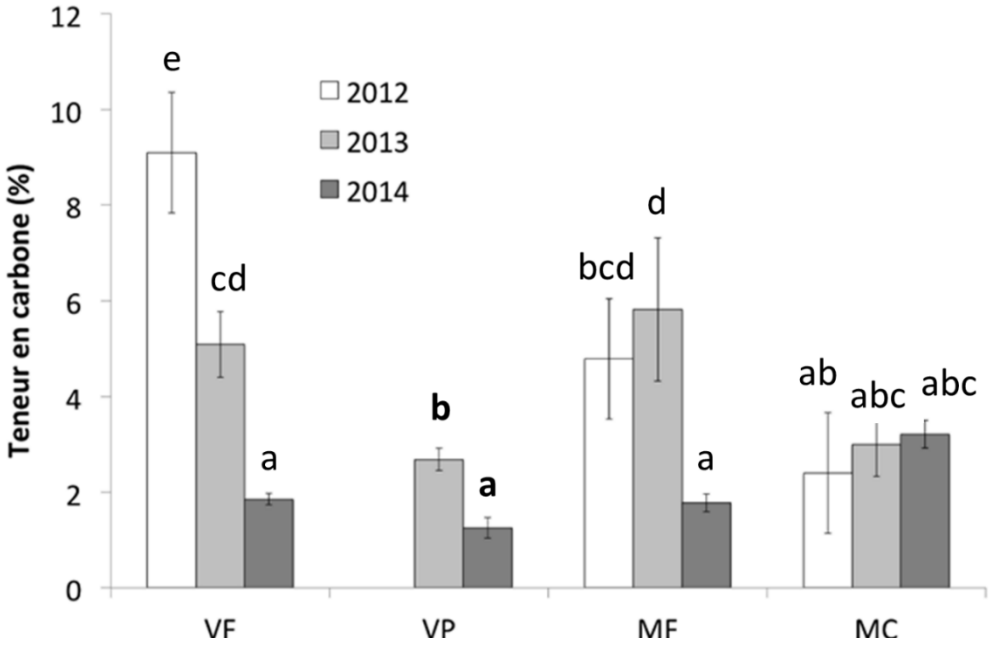
| Année de prélèvement | VF (%) | VP (%) | MF (%) | MC (%) |
|---|---|---|---|---|
| **2012** | 28,26 ± 2,85 | | 24,81 ± 5,16 | 18,79 ± 2,14 |
| **2013** | 15,67 ± 1,81 | 14,57 ± 2,50 | 28,88 ± 2,87 | 22,35 ± 0,35 |
| **2014** | 17,99 ± 4,42 | 18,97 ± 3,15 | 22,00 ± 3,09 | 22,51 ± 2,47 |

Le taux d'humidité des échantillons de sol provenant du site des Vosges (VF et VP), en moyenne de 16%, est sensiblement le même en 2013 et 2014. Il est plus important en 2012 dans l'échantillon VF (environ 28%), année où les précipitations cumulées sur 15 jours avant prélèvements étaient les plus élevées.

Le taux d'humidité des échantillons de sols prélevés sur le site de Meuse (MF et MC), de 20% en moyenne, est sensiblement le même pour les 3 années de prélèvements. Il est par ailleurs plus important que celui des sols prélevés sur le site des Vosges en 2013 et 2014.

### 4.3.2 Teneurs en carbone total et rapports C/N des échantillons de sols issus des trois campagnes de prélèvements.

Les teneurs en carbone total (%) des échantillons de sols VF ; VP, MF et MC aux trois dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014) sont représentées sur la Figure 4. 7.




| Facteur | Carbone total<br>VF-MF-MC | | Carbone total<br>VP |
|---|---|---|---|
| Année | *<br>2012 = 2013 > 2014 | | *<br>2013 < 2014 |
| Site | *<br>VF > MF > MC | | |

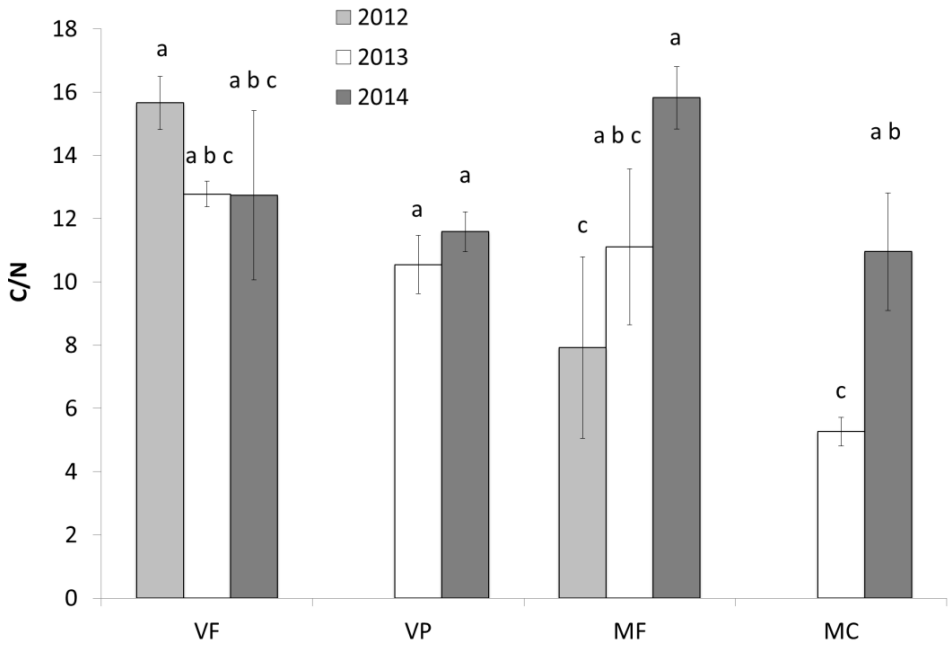
Figure 4.7. Teneurs en carbone total pour l'ensemble des échantillons prélevés sur les différents sites étudiés aux 3 dates de prélèvements. Moyennes± écarts-types, (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05 pour VF, MF et MC et ANOVA à un facteur (année), P<0,05 pour VP).

La teneur en carbone total correspond à du carbone organique dans les sols VF, VP et MF (pas de carbone inorganique). Cependant, la teneur en carbone total des échantillons MC correspond à la fois à du carbone organique et à du carbone inorganique, du fait de la richesse des échantillons en calcaire actif (Tableau 4. 2).

Pour chaque site, les échantillons de sols forestiers présentent des teneurs en carbone total plus importantes que les échantillons de sols développés sous couvert végétal agricole (culture et prairie).

Les teneurs en carbone total diminuent avec les années pour les échantillons du site des Vosges (de 9 à 2%). Pour les échantillons du site de Meuse, la teneur en carbone total est identique entre 2012 et 2013 (respectivement 5% et 3% pour MF et MC). En 2014, la teneur en carbone total est plus faible pour les échantillons MF et identique pour les échantillons MC.

Les rapports C/N calculés à partir des mesures des échantillons de sols VF, VP, MF et MC aux trois dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014) sont présentés sur la Figure 4. 8.



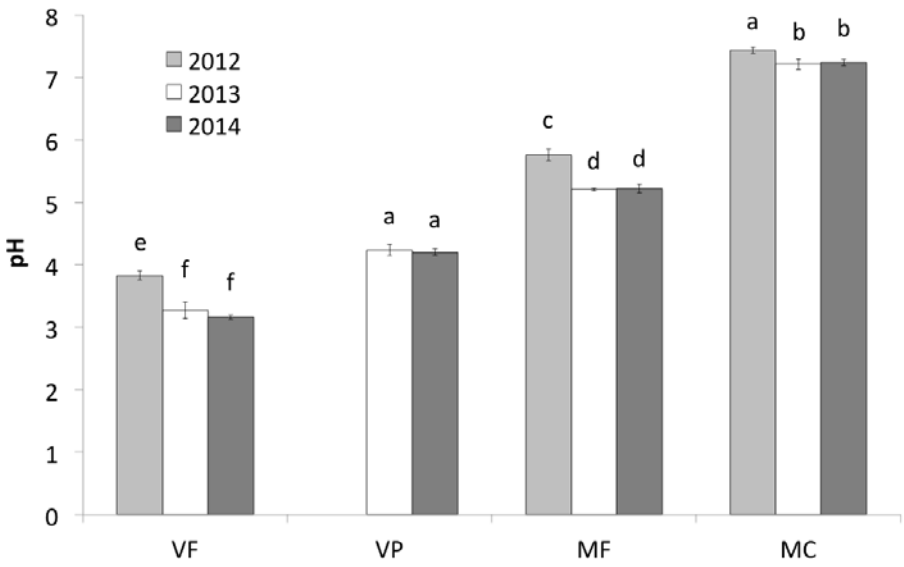

| Facteur | C/N |
|---|---|
| Année | ns<br>2014 = 2013 = 2012 |
| Site | ns<br>VF = VP = MF = MC |

Figure 4.8. Rapports C/N calculés pour l'ensemble des échantillons prélevés sur les différents sites étudiés aux 3 dates de prélèvements. Moyennes ± Ecart-type, (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

Les rapports C/N ne sont pas significativement différent entre les sites (Meuse et Vosges). Pour les échantillons VF et VP, le rapport C/N n'est pas significativement différent entre les années de prélèvement. Concernant les échantillons de sols développés sur le site de Meuse, les rapports C/N augmentent avec les années (de 7 à 16 pour MF et de 5 à 11 pour MC), bien que la différence ne soit significative qu'entre 2012 et 2014 pour MF.

### 4.3.3 pH des échantillons de sols issus des 3 campagnes de prélèvements

Le pH de chacun des échantillons de sols mesuré après prélèvement en 2012, 2013 et 2014 est représenté sur la Figure 4. 9.




| Facteur | pH |
|---|---|
| site | *<br>VF < VP < MF < MC |
| année | *<br>2012 > 2013 = 2014 |

Figure 4.9. pH des sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. Moyenne ± Ecart-type (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et n = 4 en 2014). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

Le pH des échantillons de sols prélevés sur le site des Vosges (en moyenne de 4) est toujours plus faible que celui des échantillons prélevés sur le site de Meuse (en moyenne de 6,5). Par ailleurs, sur un même site, les échantillons développés sous couvert végétal forestier (VF et MF) présentent des pH significativement plus faibles que ceux des échantillons développés sous prairie ou sous culture (VP et MC).

Sur les sites VF, MF et MC, le pH des échantillons prélevés en 2012 est significativement supérieur à celui des échantillons prélevés en 2013 et 2014. Les pH des échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014, quant à eux, sont identiques.

### 4.3.4 Teneurs en éléments totaux et échangeables dans les échantillons prélevés en 2012, 2013 et 2014 sur les sites des Vosges et de Meuse.

Les concentrations en éléments totaux et échangeables ainsi que la CEC dans les échantillons prélevés en 2012, 2013 et 2014 sur les sites des Vosges et de Meuse sont présentés dans les tableaux 4. 2 et 4. 3.

Tableau 4.2. Teneurs en éléments totaux (teneurs en fer, manganèse, potassium, magnésium, sodium, calcium, calcaire et phosphore) de l'ensemble des échantillons de sols prélevés aux trois dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyennes ± écarts-types ; n = nombre d'échantillons composites prélevés chaque année (soit n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et n = 4 en 2014).

| Sols | Fer (Fe) | Manganèse (Mn) | Potassium (K) | Magnésium (Mg) | Sodium (Na) | Calcium (Ca) | Calcaire (CaCO3) | Phosphore (P2O5) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | g/100g | $mg.kg^{-1}$ | $mg.kg^{-1}$ | $g.kg^{-1}$ | $mg.kg^{-1}$ | $g.kg^{-1}$ | $g.kg^{-1}$ | $mg.kg^{-1}$ |
| **VF** | | | | | | | | |
| **2012** | 0,71 ± 0,11 | 21,9 ± 5,8 | 274 ± 14 | 0,177 ± 0,021 | 23 ± 2 | 0,04 ± 0,01 | | 17 ± 3 |
| **2013** | 0,70 ± 0,03 | 22,1 ± 29,9 | 58 ± 5 | 0,013 ± 0,001 | 8 ± 1 | <0,02 | <1 | 15 ± 1 |
| **2014** | 1,01 ± 0,03 | 125,8 ± 19,3 | 62 ± 6 | 0,009 ± 0,001 | 5 ± 1 | <0,02 | <1 | 12 ± 1 |
| **VP** | | | | | | | | |
| **2013** | 0,62 ± 0,01 | 57,4 ± 5,0 | 70 ± 112 | 0,027 ± 0,004 | 11 ± 1 | 0,57 ± 0,06 | <1 | 17 ± 3 |
| **2014** | 0,94 ± 0,03 | 68,5 ± 18,8 | 99 ± 26 | 0,028 ± 0,006 | 5 ± 1 | 0,23 ± 0,04 | <1 | 19 ± 2 |
| **MF** | | | | | | | | |
| **2012** | 5,64 ± 0,20 | 27,4 ± 3,4 | 425 ± 181 | 1,019 ± 0,036 | 18 ± 1 | 2,66 ± 0,18 | | 20 ± 3 |
| **2013** | 6,14 ± 0,76 | 112,7 ± 28,9 | 141 ± 18 | 0,102 ± 0,016 | 18 ± 5 | 2,77 ± 0,23 | <1 | 17 ± 1 |
| **2014** | 4,02 ± 0,38 | 56,7 ± 12,2 | 115 ± 125 | 0,025 ± 0,011 | 8 ± 1 | 0,20 ± 0,13 | <1 | 24 ± 3 |
| **MC** | | | | | | | | |
| **2012** | 5,05 ± 0,75 | 3,9 ± 0,1 | 549 ± 24 | 5,683 ± 0,152 | 12 ± 3 | 3,25 ± 0,17 | | 33 ± 5 |
| **2013** | 3,93 ± 0,30 | 8,4 ± 3,4 | 263 ± 22 | 0,893 ± 0,076 | 9 ± 1 | 4,58 ± 0,82 | 53 ± 30 | 54 ± 6 |
| **2014** | 4,89 ± 0,67 | 18,3 ± 9,8 | 195 ± 63 | 0,566 ± 0,353 | 11 ± 1 | 3,44 ± 0,66 | 24 ± 12 | 38 ± 12 |

Tableau 4.3. Teneurs en éléments échangeables (teneurs en potassium, magnésium, sodium, calcium), CEC et S/T mesurés sur les échantillons de sols prélevés aux trois dates de prélèvements (2012, 2013 et 2014). Moyennes ± écarts-types ; n = nombre d'échantillons composites prélevés chaque année (soit n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et n = 4 en 2014).

| Sols | Potassium (K) $cmol^{+}.kg^{-1}$ | Magnésium (Mg) $cmol^{+}.kg^{-1}$ | Sodium (Na) $cmol^{+}.kg^{-1}$ | Calcium (Ca) $cmol^{+}.kg^{-1}$ | CEC Metson $cmol^{+}.kg^{-1}$ | S/T (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **VF** | | | | | | |
| **2012** | 0,107 ± 0,005 | 0,022 ± 0,003 | 0,075 ± 0,005 | 0,21 ± 0,04 | 16,9 ± 3,2 | 2,4 |
| **2013** | 0,148 ± 0,012 | 0,106 ± 0,003 | 0,036 ± 0,001 | <0,1 | 12,7 ± 0,4 | 2,3 |
| **2014** | 0,157 ± 0,016 | 0,072 ± 0,005 | 0,023 ± 0,002 | <0,1 | 9,1 ± 0,3 | 2,8 |
| **VP** | | | | | | |
| **2013** | 0,179 ± 0,029 | 0,221 ± 0,032 | 0,049 ± 0,002 | 2,85 ± 0,32 | 7,3 ± 0,3 | 45,2 |
| **2014** | 0,254 ± 0,066 | 0,232 ± 0,049 | 0,021 ± 0,002 | 1,13 ± 0,19 | 6,2 ± 0,3 | 26,4 |
| **MF** | | | | | | |
| **2012** | 0,166 ± 0,007 | 0,124 ± 0,005 | 0,059 ± 0,002 | 13,30 ± 0,86 | 17,7 ± 1,0 | 77,1 |
| **2013** | 0,359 ± 0,046 | 0,842 ± 0,1301 | 0,077 ± 0,205 | 13,83 ± 1,15 | 20,7 ± 1,1 | 73,0 |
| **2014** | 0,295 ± 0,319 | 0,203 ± 0,088 | 0,035 ± 0,006 | 1,02 ± 0,67 | 9,1 ± 1,6 | 17,1 |
| **MC** | | | | | | |
| **2012** | 0,215 ± 0,009 | 0,691 ± 0,019 | 0,039 ± 0,011 | 16,27 ± 0,87 | 17,1 ± 0,2 | 100,7 |
| **2013** | 0,673 ± 0,056 | 7,348 ± 0,629 | 0,038 ± 0,004 | 22,09 ± 4,14 | 20,6 ± 0,7 | 146,4 |
| **2014** | 7,312 ± 11,714 | 4,655 ± 2,900 | 0,048 ± 0,004 | 17,23 ± 3,29 | 18,6 ± 2,8 | 157,2 |

Les échantillons de sols prélevés sur le site de Meuse (MF et MC) sont globalement plus riches en éléments totaux Fe, K, Mg, Ca, $CaCO_3$ et $P_20_5$ que ceux provenant du site des Vosges (VF et VP). Sur un même site, en ce qui concerne les diverses occupations des sols, il apparaît que les échantillons de sols issus de milieux agricoles (culture, prairie), sont généralement plus riches en éléments totaux que les sols forestiers. Les échantillons de sols VP sont notamment plus riches en Mn, Mg et Ca que les échantillons VF. De la même façon, les échantillons MC sont plus riches en K, Mg, Ca, $CaCO_3$ et $P_2O_5$ que les échantillons MF.

Sur tous les sites, les teneurs en éléments échangeables K, Mg, Ca sont variables en fonction des années de prélèvement (Tableau 4. 3) :

- La teneur en potassium des échantillons MC, passe d'environ 0,4 $cmol^+.kg^{-1}$ en moyenne entre 2012 et 2013 à plus de 7,3 $cmol^+.kg^{-1}$ en 2014.
- La teneur en magnésium pour les échantillons MC évolue considérablement entre 2012 (environ 0,7 $cmol^+.kg^{-1}$) et 2013-2014 (en moyenne 6 $cmol^+.kg^{-1}$).
- La teneur en calcium pour les échantillons MF passe d'environ 13 $cmol^+.kg^{-1}$ pour les années 2012 et 2013 à 1 $cmol^+.kg^{-1}$ pour l'année 2014.

Mais il est possible de distinguer certaines tendances, visibles lors des 3 dates de prélèvement :

- Les teneurs en éléments échangeables K, Mg, Ca sont plus élevées pour les échantillons du site de Meuse que pour les échantillons du site des Vosges.
- Les échantillons de sols occupés par des activités agricoles (culture, prairie), présentent des teneurs en éléments échangeables K, Mg, Ca plus importantes que les échantillons de sols forestiers.

La CEC est très variable, entre 9 et 20 $cmol^+.kg^{-1}$ selon les années, dans les sols occupés par de la forêt (VF et MF). Elle est plus stable dans les sols agricoles, assez élevée dans les échantillons MC (entre 16 et 20 $cmol^+.kg^{-1}$) et faible dans les échantillons VP (6-7 $cmol^+.kg^{-1}$)

Le taux de saturation S/T est toujours très faible pour les échantillons VF alors qu'il est plus élevé sur les échantillons VP (26-45%). Les échantillons MF sont légèrement désaturés en 2012 et 2013 (17-77%) alors que les sols MC sont saturés.

### 4.3.5 Granulométrie mesurée sur les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014.

La texture (granulométrie) mesurée sur les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014 est présentée dans le tableau 4. 4.

Tableau 4.4. Granulométrie 5 fractions (argiles, limons fins, limons grossiers, sables fins, sables grossiers) mesurée sur les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014 (moyenne ± écarts-types, n= 4).

| Sols | Argile (< 2 µm) | Limons fins (2/20 µm) | Limons grossiers (20/50 µm) | Sables fins (50/200 µm) | Sables grossiers (200/2000 µm) |
|---|---|---|---|---|---|
| **VF (%)** | | | | | |
| **2013** | 15,8 ± 6,9 | 14,9 ± 4,0 | 7,1 ± 1,8 | 31,5 ± 8,2 | 30,7 ± 8,6 |
| **2014** | 17,0 ± 7,1 | 16,4 ± 4,0 | 8,9 ± 3,4 | 32,1 ± 1,8 | 25,7 ± 12,5 |
| **VP (%)** | | | | | |
| **2013** | 15,7 ± 9,8 | 13,7 ± 7,2 | 6,6 ± 2,6 | 33,0 ± 9,3 | 30,9 ± 14,0 |
| **2014** | 14,5 ± 4,6 | 14,1 ± 14,9 | 7,1 ± 11,4 | 24,8 ± 9,7 | 39,6 ± 37,9 |
| **MF (%)** | | | | | |
| **2013** | 39,9 ± 16,3 | 24,7 ± 9,6 | 12,0 ± 6,0 | 16,5 ± 12,3 | 7,0 ± 12,8 |
| **2014** | 23,9 ± 36,8 | 27,0 ± 8,0 | 14,9 ± 3,6 | 26,5 ± 38,7 | 7,8 ± 11,9 |
| **MC (%)** | | | | | |
| **2013** | 40,7 ± 18,0 | 30,9 ± 23,7 | 14,3 ± 5,7 | 11,6 ± 12,1 | 2,6 ± 5,5 |
| **2014** | 38,6 ± 36,8 | 28,5 ± 13,0 | 13,9 ± 8,8 | 14,2 ± 23,1 | 5,0 ± 22,4 |

Les échantillons de sols issus du site de Meuse (MF et MC) présentent une granulométrie plus riche en éléments fins (argile, limons fins, limons grossiers) que les échantillons de sols développés sur les sites des Vosges (VF et VP), plus riches en éléments grossiers (sables fins et grossiers). Ainsi, la texture des échantillons provenant du site des

Vosges est limono-sableuse. La texture des échantillons du site de Meuse, quant à elle, est limono-argileuse.

Sur chaque site, la granulométrie est globalement similaire entre les échantillons de sols prélevés les différentes années de prélèvements

## 4.4 Caractéristiques microbiologiques des échantillons de sols

### 4.4.1 Quantification des gènes ARNr 16S et ARNr 18S présents dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014.

Les nombres de copies de gènes d'ADNr 16S (bactériens) et 18S (fongiques) mesurés dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014 sont présentés dans le tableau 4. 5.

Tableau 4.5. Nombre de copies de gènes bactériens (16S) et fongiques (18S) dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. Moyennes ± écarts-types (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Deux ANOVA à deux facteurs (temps, site) ont été réalisées : une avec les données des 3 années pour les sols VP et MF, l'autre pour les années 2013 et 2014 avec les 4 sols.. Les effets significatifs sont représentés par un astérisque dans le tableau des ANOVA en -dessous (P<0,05). Les données ayant les mêmes lettres pour un même sol aux différentes dates de prélèvement ne sont pas significativement différentes (test post-hoc).

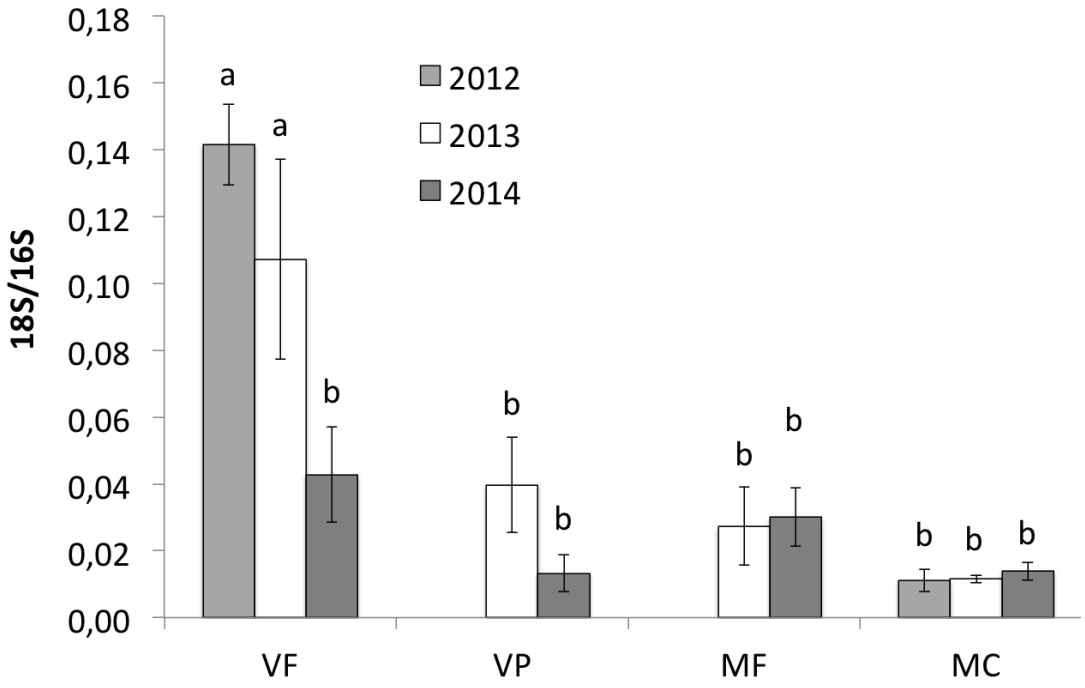
| Sols | Nombre de copies de gènes 16S /g sol sec) | Nombre de copies de gènes 18S /g de sol sec) |
|---|---|---|
| **VF** | | |
| **2012** | $3,72.10^{6} \pm 1,45.10^{5}$ a | $5,26.10^{5} \pm 2,47.10^{4}$ a |
| **2013** | $3,91.10^{9} \pm 4,96.10^{8}$ b | $4,30.10^{8} \pm 1,64.10^{8}$ b |
| **2014** | $2,50.10^{9} \pm 8,36.10^{8}$ b | $9,69.10^{7} \pm 2,91.10^{7}$ b |
| **VP** | | |
| **2013** | $4,11.10^{9} \pm 9,79.10^{8}$ a | $1,62.10^{8} \pm 5,72.10^{7}$ a |
| **2014** | $3,02.10^{9} \pm 7,76.10^{8}$ a | $3,84.10^{7} \pm 1,60.10^{7}$ b |
| **MF** | | |
| **2013** | $5,76.10^{9} \pm 1,56.10^{9}$ a | $1,42.10^{8} \pm 4,39.10^{7}$ a |
| **2014** | $2,58.10^{9} \pm 9,76.10^{8}$ b | $7,46.10^{7} \pm 2,74.10^{7}$ b |
| **MC** | | |
| **2012** | $8,29.10^{6} \pm 7,47.10^{6}$ a | $1,04.10^{5} \pm 1,07.10^{5}$ a |
| **2013** | $1,51.10^{9} \pm 5,77.10^{8}$ b | $1,74.10^{7} \pm 7,75.10^{6}$ b |
| **2014** | $2,25.10^{9} \pm 8,50.10^{8}$ b | $3,06.10^{7} \pm 1,25.10^{7}$ b |

| Facteur | 16S 2013-2014 | 18S 2013-2014 | 16S 2012-2013-2014 | 18S 2012-2013-2014 |
|---|---|---|---|---|
| Année | * 2013 > 2014 | * 2013 > 2014 | * 2012 < 2013= 2014 | * 2012 < 2013= 2014 |
| Sol | * MC < MF = VF = VP | * VF > VP = MC = MF | * VF > MC | * VF > MC |

Le nombre de copies de gènes ARNr 16S est plus élevé par rapport à celui des gènes ARNr 18S pour l'ensemble des échantillons de sols étudiés aux 3 dates de prélèvements. Les échantillons MC présentent des quantités de gènes ARNr 16S plus faibles que les échantillons MF, VF et VP en 2013 et 2014. La quantité de gènes ARNr 18S est significativement plus élevée pour les échantillons VF que pour les échantillons MC, VP et MF en 2013 et 2014. La comparaison des nombres de copies de gènes ARNr 16S et ARNr 18S entre les 3 années (VF et MC) montrent des nombres plus faibles en mars 2012, à la période la plus froide des trois

années, par rapport aux prélèvements de juin 2013 et mars 2014. La comparaison des données pour les 4 sols sur les années 2013 et 2014 montre un nombre de copies de gènes ARNr 16S et ARNr 18S plus élevés en 2013 (pour l'horizon VF pour 16S et pour les horizons VP et VF pour 18S).

Les rapports 18S/16S pour les échantillons de sols prélevés à ces trois dates sont représentés sur la Figure 4. 10.




| Facteur | 18S/16S |
|---|---|
| Site | Ns<br>VP = MF |
| Année | ns<br>2013 = 2014 |

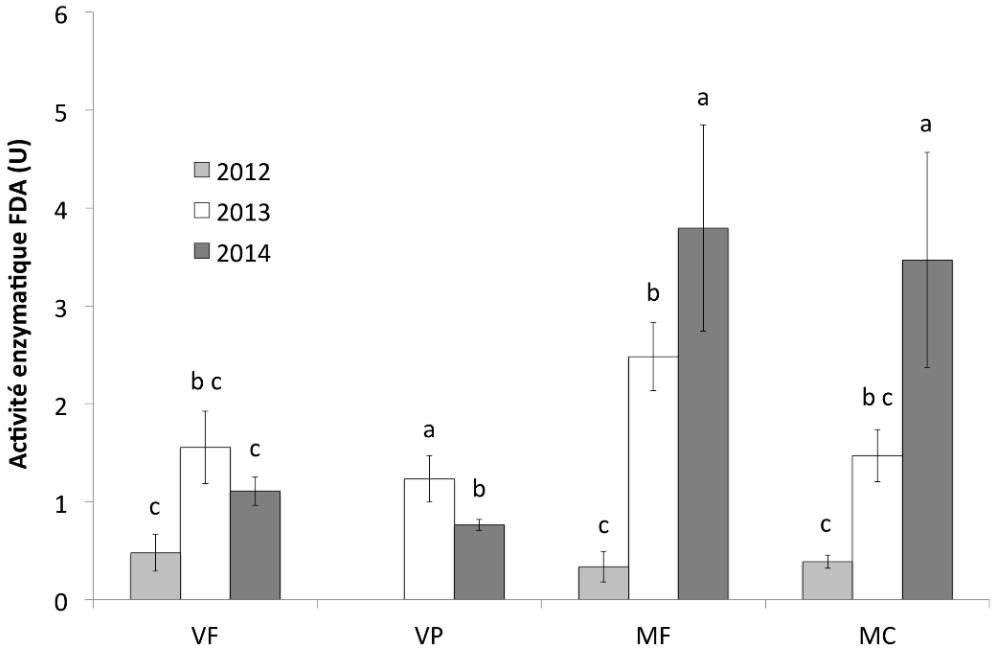
Figure 4.10. Rapports 18S/16S dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. Moyenne ± Ecart type (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014). Les effets non significatifs sont indiqués par ns. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

Les rapports 18S/16S les plus élevés sont obtenus pour les échantillons de sol VF prélevés en mars 2012 et juin 2013 (respectivement 0.14 et 0.10). Dans les autres échantillons

les rapports 18S/16S ne sont pas significativement différents, quelle que soit l'année de prélèvement (entre 0,02 et 0,04).

### 4.4.2 Activités enzymatiques FDA, laccase, amino-peptidase et phosphatase mesurées dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014.

Les activités enzymatiques d'hydrolyse de la FDA, amino-peptidase, phosphatase et laccase, ont été mesurées sur les échantillons de sols étudiés afin d'évaluer l'activité microbienne des sols (respectivement Figures 4. 11, 4. 12, 4. 13 et 4. 14).




| Facteur | FDA (VF – MF – MC) | FDA (VP) |
|---|---|---|
| Site | *<br>MF = MC > VF | |
| Année | *<br>2014 > 2013 > 2012 | *<br>2013 > 2014 |

Figure 4.11. Activité d'hydrolyse de la FDA (U) mesurée dans les échantillons de sols prélevés en 2012, 2013 et 2014. Moyenne ± Ecart type (n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014) pour VF, MF et MC ; ANOVA à un facteur (année) pour VP. Les effets significatifs sont indiqués par un astérisque. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

Pour les échantillons de sols provenant du site des Vosges (VF et VP), l'activité de FDA est en moyenne de 1U. Cette activité ne varie pas en fonction des années de prélèvement dans les échantillons VF mais elle est plus faible en mars 2014 qu'en juin 2013 dans les échantillons VP.

Excepté en mars 2012, l'activité FDA mesurée dans les échantillons de sols développés sur le site de Meuse (MF et MC), est plus élevée que celle mesurée dans les sols prélevés dans les Vosges. Sur le site de Meuse, cette activité FDA est plus forte dans les échantillons de mars 2014 que dans ceux de juin 2013 et mars 2012 (globalement de 0,5 à 4 pour MF et MC).

L'activité enzymatique phosphatase mesurée en mars 2014 dans les échantillons de sols juste après leur prélèvement est présentée sur la Figure 4. 12.

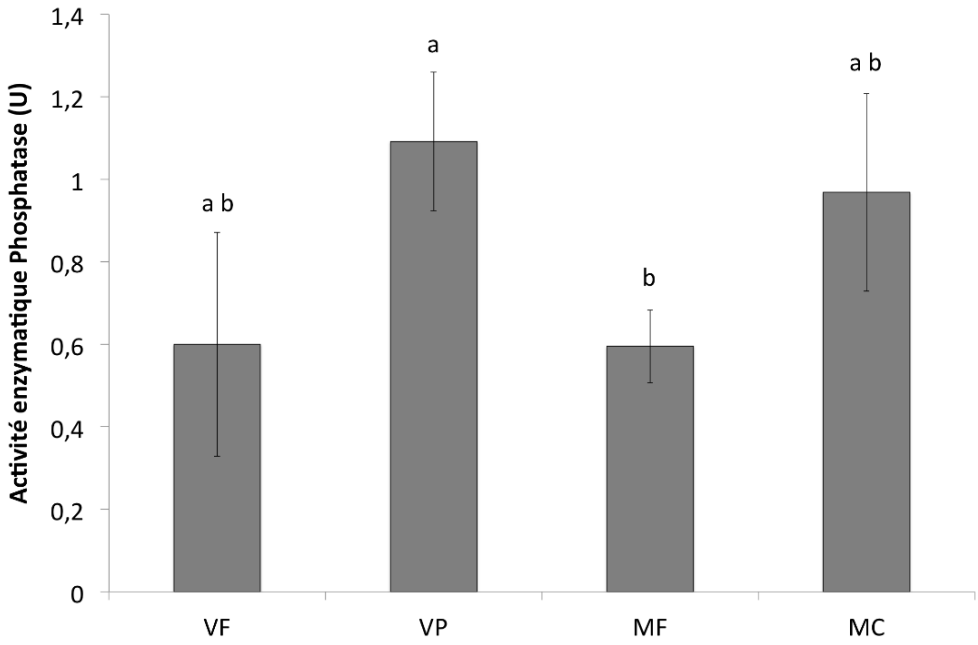
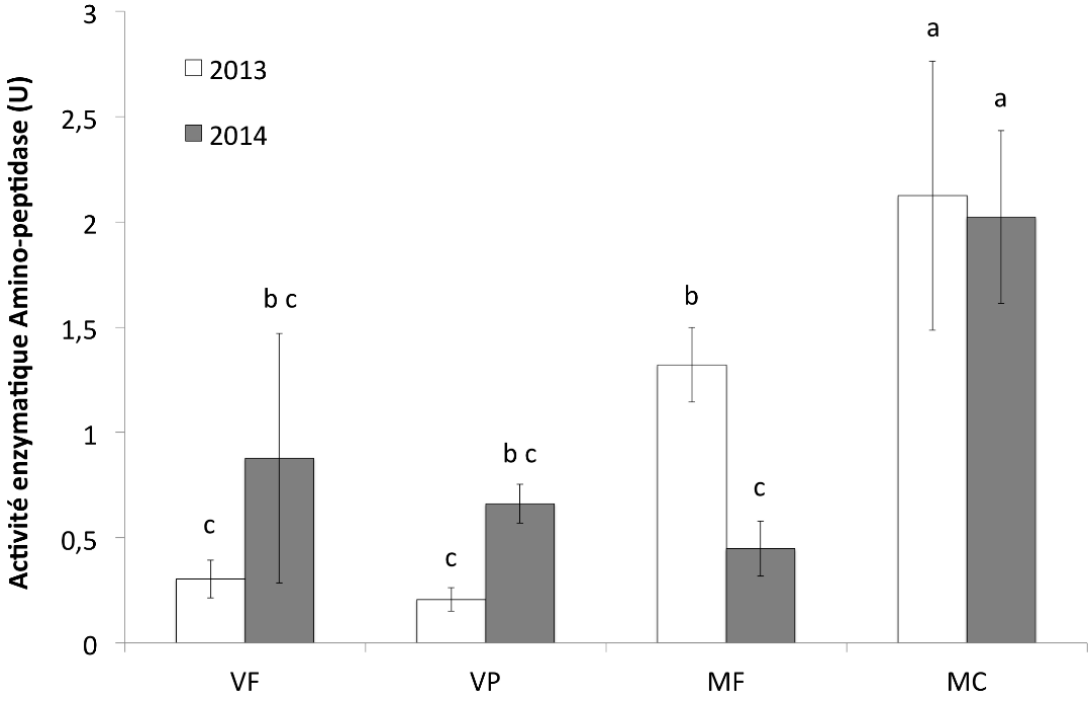



Figure 4.12. Activité phosphatase (U) dans les échantillons de sols prélevés en 2014. Moyenne ± Ecart-type. n = nombre d'échantillons composites prélevés en 2014, soit n = 4. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (site), P<0,05).

Cette activité n'est pas significativement différente entre les échantillons prélevés sur VF, VP et MC. Elle ne diffère significativement qu'entre VP et MF.

L'activité enzymatique amino-peptidase mesurée en juin 2013 et mars 2014 dans les échantillons de sols juste après leur prélèvement est représentée sur la Figure 4. 13.



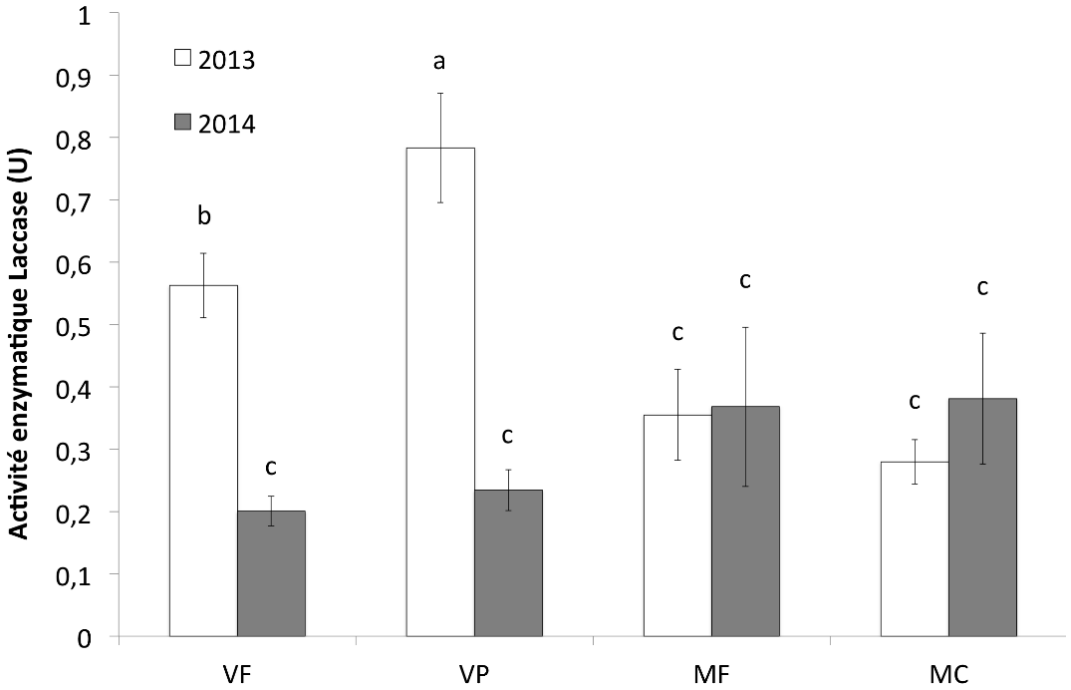

| Facteurs | Amino-peptidase |
|---|---|
| Site | *<br>MC > MF = VF = VP |
| Année | ns<br>2013 = 2014 |

Figure 4.13. Activité amino-peptidase (U) dans les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014. Moyenne ± Ecart-type. n = = 4. Les effets significatifs et non significatifs sont indiqués par un astérisque et par ns, respectivement. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

Concernant les échantillons de sols développés sur le site des Vosges (VF et VP), l'activité amino-peptidase est identique quelle que soit l'année de prélèvement considérée et l'occupation végétale (en moyenne de 0,5 U).

L'activité amino-peptidase mesurée dans les échantillons MC est significativement supérieure à celle mesurée dans les échantillons des Vosges (environ 2 U en 2013 et 2014). L'activité dans les échantillons MF est moins importante que dans les échantillons MC. En mars 2014, cette activité est très proche de celle mesurée dans les échantillons Vosges.

L'activité laccase mesurée en juin 2013 et en mars 2014 dans les échantillons de sols après prélèvement est présentée sur la Figure 4. 14.




| Facteur | Laccase |
|---|---|
| Site | * <br> VP > VF = MF = MC |
| Année | * <br> 2013 > 2014 |

Figure 4.14. Activité laccase (U) dans les échantillons de sols prélevés en 2013 et 2014. Moyenne ± Ecart-type. n = 4. Les effets significatifs sont indiqués par un astérisque. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (année-site), P<0,05).

En juin 2013, l'activité laccase est significativement plus élevée dans les échantillons prélevés sur le site des Vosges (VF et VP autour de 0,7 U) que dans les échantillons prélevés en Meuse (MF et MC autour de 0,3 U), quel que soit le couvert végétal considéré. En mars 2014, les activités laccase ne sont plus significativement différentes entre sites (entre 0,2 et 0,3 U pour VF, VP, MF et MC).

## 4.5 Discussion sur l'influence des paramètres biophysicochimiques sur la répartition des teneurs en chlore dans les sols

Plusieurs Analyses en Composante Principale (ACP) ont été réalisées en prenant en compte diverses caractéristiques des sols (physico-chimiques et microbiologiques) afin d'identifier les paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols. Les ACP qui sont présentées dans cette partie correspondent à celles qui permettent d'apporter le plus d'éléments de réponse quant aux corrélations entre teneurs en chlore et paramètres mesurés.

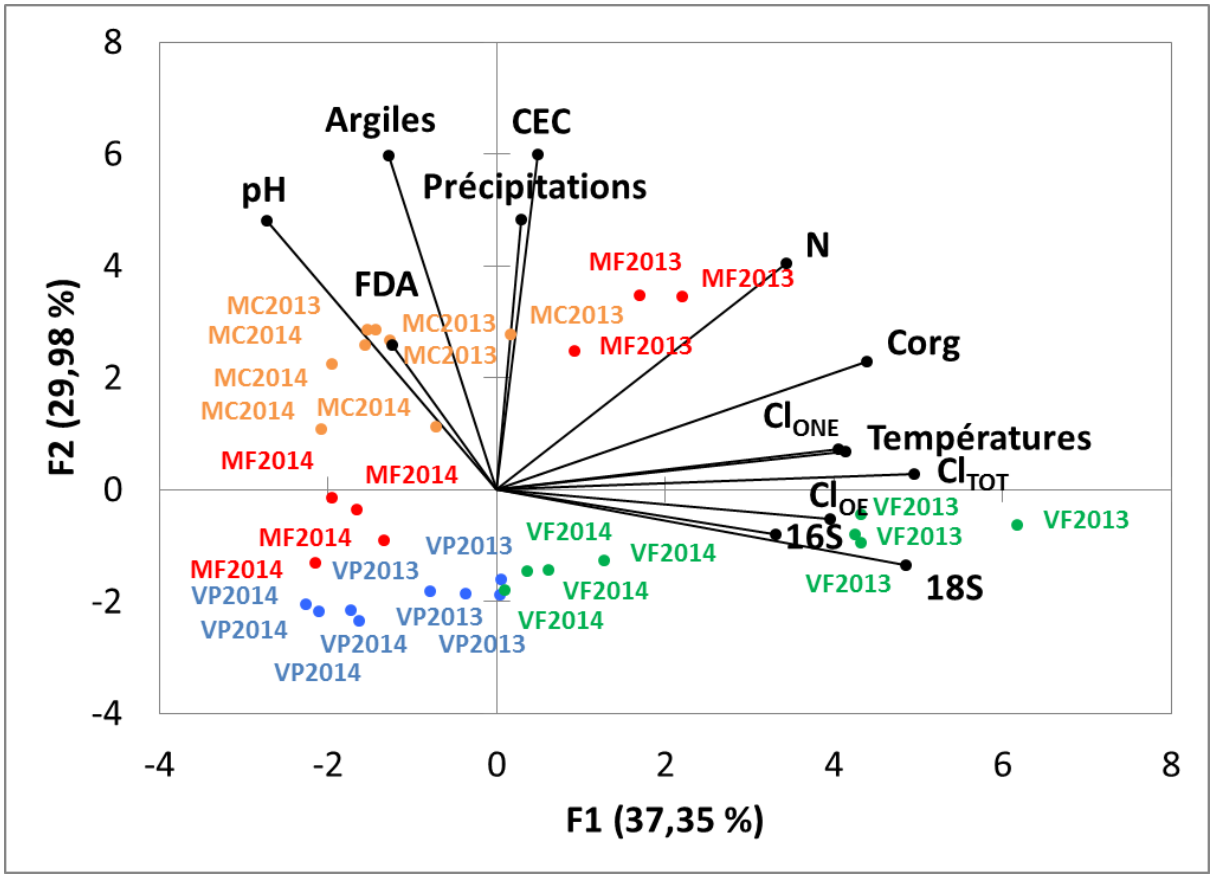



Figure 4.15. Analyse en Composante Principale (ACP). Les variables correspondent à la teneur en chlore total ($Cl_{TOT}$), en chlore organique extractible ($Cl_{OE1}$), en chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$), à la teneur en argiles, au pH, à la CEC, l'activité enzymatique FDA, aux teneurs en Corg et en N, aux quantités de gènes 16S et 18S et aux données météorologiques (précipitations et températures) en 2013 et 2014.

La Figure 4. 15 inclut les teneurs en $Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$, la teneur en carbone organique et en azote, les quantités de gènes ARNr 16S et ARNr 18S, la CEC, le pH, la teneur en argiles,

les précipitations et la température ainsi que l'activité enzymatique FDA mesurés pour l'ensemble des horizons de sol prélevés en 2013 et 2014. Une ACP incluant également les données de l'année 2012 a été réalisée mais elle mettait surtout en évidence les quantités de gènes ARNr 16S et ARNr 18S très différentes en 2012 par rapport aux années 2013 et 2014 et n'a donc pas été retenue.

La Figure 4. 15 permet de mettre en évidence une corrélation entre les teneurs en $Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$ et $Cl_{OE1}$, ce qui confirme notamment la répartition similaire observée entre $Cl_{ONE}$ et $Cl_{TOT}$ sur les Figures 4. 1, 4. 2, 4. 3 et 4. 4. Redon et al. (2011, 2012) démontrent également une corrélation entre le $Cl_{TOT}$ et le $Cl_{ONE}$. Dans notre étude, le $Cl_{ONE}$ représente, en moyenne pour les 3 années de prélèvements, 89% du $Cl_{TOT}$ pour l'échantillon de sol VF, 87% pour l'échantillon VP, 78% pour l'échantillon MF et 95% pour l'échantillon MC. Ces proportions de $Cl_{ONE}$ par rapport au $Cl_{TOT}$ sont similaires à celles calculées par Redon et al. (2012), pour lesquels le $Cl_{ONE}$ représente 87%, 83% et 89% du $Cl_{TOT}$ respectivement dans des échantillons de sols de surface (0-30 cm) cultivés, de prairie et forestiers. Redon et al. (2011) montrent également que pour un humus (horizon organique) et un horizon de sol minéral, le $Cl_{ONE}$ compte pour 75 et 89% du $Cl_{TOT}$, respectivement. Dans notre étude, le $Cl_{OE1}$, quant à lui, étant toujours inférieur à 1 $mg.kg^{-1}$ (Figures 4. 1, 4. 2, 4. 3 et 4. 4), représente une très faible proportion du $Cl_{TOT}$ (< 1%), assez proche de celle estimée par Redon et al. (2011), qui considèrent la teneur en $Cl_{OE1}$ comme négligeable. **Dans les sols étudiés dans ce travail la fraction $Cl_{ONE}$ représente la majeure partie du $Cl_O$ et du chlore total du sol**.

D'après la Figure 4. 15, l'axe 1, qui explique 37% des variations, sépare les échantillons VF2013 des autres, en lien avec des teneurs en chlore, en carbone organique, les nombres de copies de gènes ARNr 16S et ARNr 18S ainsi que des températures plus élevées. Les échantillons de sols VF sont plus riches en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$) que les échantillons des autres sites. L'axe 2, qui explique 30 % des variations, discrimine les échantillons de sol du site de Meuse de ceux du site des Vosges, en lien avec les précipitations, la teneur en argiles, la CEC et le pH.

Sur chaque site (Meuse ou Vosges), la comparaison des résultats (Figures 4. 15, 4. 1,4. 2, 4. 3 et 4. 4) indique que les échantillons de sols développés sous couvert végétal forestier

(VF et de manière moins nette MF) présentent des teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$) plus importantes que celles mesurées pour les échantillons de sols agricoles (VP et MC). Les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées sur les échantillons de sols dans notre étude sont en effet comprises entre 25 et 140 $mg.kg^{-1}$ sous forêt (MF et VF), entre 20 et 35 $mg.kg^{-1}$ sous prairie (VP) et entre 25 et 35 $mg.kg^{-1}$ sous culture (MC). Ces gammes de valeurs sont en accord avec les travaux de Redon et al. (2012), qui trouvent, dans une étude menée sur 51 sols français issus du réseau RMQS (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols), des teneurs en $Cl_{TOT}$ moyennes de 50 $mg.kg^{-1}$ pour des échantillons de sols de surface (0-30 cm) agricoles, des teneurs moyennes de 54 $mg.kg^{-1}$ pour des échantillons de sols de surface de prairie et des teneurs moyennes de 90 $mg.kg^{-1}$ pour des échantillons de sols de surface forestiers. **Les teneurs en chlore dans les sols étudiés ici varient en fonction de l'usage des sols (agriculture ou forêt).**

Les horizons de sol étudiés se distinguent également par leur pH (Figures 4. 15 et 4. 9). Le pH des échantillons de sols du site des Vosges est plus faible que celui des échantillons provenant de Meuse. Ces résultats s'expliquent par la nature de la roche mère sur laquelle les sols se développent : les sols du site des Vosges se développent sur du grès acide tandis que les sols du site de Meuse se développent sur un substrat calcaire, induisant un pH plus élevé dans les sols. Les échantillons VF, les plus riches en chlore sont les sols avec les plus bas pH. Ces résultats suggèrent que plus le pH des horizons de sols étudiés est faible, plus la teneur en $Cl_{TOT}$ et en $Cl_O$ est élevée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Redon et al. (2012), qui montrent une relation entre la teneur en $Cl_{TOT}$ et le pH des sols. **Nos travaux confirment donc que les teneurs en chlore sont plus élevées dans les sols à pH acide.**

Les horizons de sols étudiés présentent des teneurs en carbone organique différentes. L'ACP (Figure 4. 15) permet de mettre en évidence une corrélation entre les teneurs en chlore et la teneur en carbone organique. D'après la Figure 4. 8, le rapport C/N mesuré en 2012 est significativement plus important pour l'échantillon de sol VF que pour les échantillons de sols MF, et a une répartition similaire à celui du chlore. Une ACP a été réalisée en incluant le rapport C/N au lieu de C et N séparément, mais le paramètre était moins discriminant. La teneur en carbone total (Figure 4. 7) diminue au cours des années de prélèvement pour les échantillons de sols provenant du site des Vosges, comme pour la teneur en chlore. La teneur en chlore des horizons de sols étudiés semble donc plus importante dans les sols avec une

teneur en carbone total et un rapport C/N plus élevé. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Redon et al. (2011, 2012), qui montrent que la teneur en $Cl_{TOT}$ et la teneur en $Cl_O$ sont étroitement liées à la teneur en carbone organique des sols et plus généralement à la teneur en matière organique.

**Les teneurs en chlore des sols semblent donc étroitement liées à la teneur en carbone organique.**

Bastviken et al. (2009), Öberg et al. (1998), Winterton et al. (2000), et Verhagen et al. (1998) montrent que le processus de chloruration de la matière organique est principalement gouverné par des processus microbiologiques en lien avec des activités enzymatiques, dépendantes du substrat disponible (matière organique) et du pH. Matucha et al. (2007) démontrent également grâce à une expérimentation menée sur des sols forestiers, la formation d'acide chloroacétique et de chloroforme par des processus microbiologiques impliqués dans la dégradation de substances humiques. Hoekstra et al. (1999) et vanPee et Unversucht (2003) montrent que le processus de chloruration constitue une voie d'alimentation des microorganismes. Les enzymes microbiennes de type chloroperoxydase sont impliquées dans la dégradation des liaisons C-C de composés organiques réfractaires, les rendant alors plus biodisponibles. Johansson et al. (2000) et DeJong et Field. (1997) démontrent également que l'exposition de lignine au chlore augmente sa biodisponibilité. Ces différents travaux tendent à montrer qu'il existe une relation entre les activités microbiennes et les teneurs en chlore dans les sols. Or, dans l'ACP de la Figure 4. 15, aucune corrélation entre les teneurs en chlore et l'activité enzymatique FDA n'est observée. Cependant, l'activité enzymatique FDA, bien que considérée comme reflétant l'activité microbienne globale, correspond à une activité d'hydrolase. Or, comme souligné précédemment, les activités microbiennes impliquées dans le processus de chloruration correspondent à des haloperoxydases. La relation entre teneurs en chlore et activités microbiennes n'est peut-être pas observable grâce à la FDA, même si elle reflète une activité globale. La Figure 4. 16 correspond à une ACP réalisée en prenant en compte toutes les activités enzymatiques mesurées en 2014 (FDA, amino-peptidase, laccase, phosphatase).

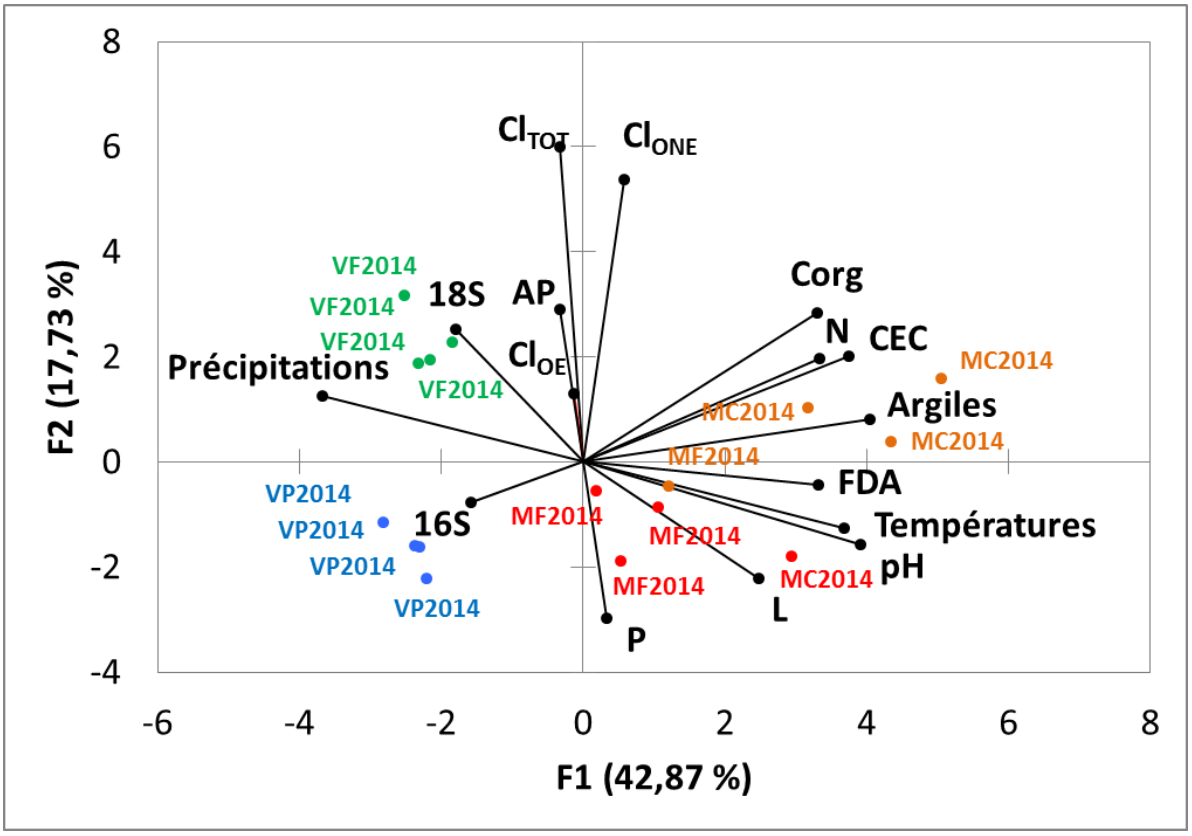



Figure 4.16. Analyse en Composante Principale (ACP). Les variables correspondent à la teneur en chlore total ($Cl_{TOT}$), en chlore organique extractible ($Cl_{OE1}$), en chlore organique non extractible ($Cl_{ONE}$), à la teneur en argiles, au pH, à la CEC, aux activités enzymatiques FDA, laccase (L), amino-peptidase (AP), phosphatase (P), laccase (L), aux teneurs en Corg et en N, aux quantités de gènes 16S et 18S et aux données météorologiques (précipitations et températures).

D'après cette ACP, l'axe 1, qui explique 43 % des variations, sépare les échantillons de sol du site de Meuse de ceux du site des Vosges, et les paramètres explicatifs sont le C, N, FDA, taux d'argiles, pH et températures. Les teneurs en chlore ne semblent pas être corrélées avec les activités enzymatiques FDA, et laccase. A l'inverse, les activités enzymatiques amino-peptidase et phosphatase semblent corrélées avec les teneurs en chlore, selon l'axe 2, qui explique 18% des variations, et discrimine VF de VP ou MF. Cependant, le vecteur associé à l'activité amino-peptidase est deux fois plus petit que celui du $Cl_{TOT}$ et du $Cl_{ONE}$. La corrélation observée n'est donc pas très robuste.

Les échantillons de sols étudiés présentent des quantités de gènes ARNr 16S et ARNr 18S différentes (Figure 4. 10). Les rapports 18S/16S diminuent au cours des années pour les échantillons de sols provenant du site des Vosges, comme pour les teneurs en chlore. Une ACP

incluant le rapport 18S/16S (données non présentées) a permis de montrer une corrélation entre teneurs en chlore et rapport 18S/16S. Par ailleurs, d'après la Figure 4. 15, les quantités de gènes ARNr 16S et ARNr 18S sont corrélées avec les teneurs en chlore total et organique non extractible. Il semble donc que plus le rapport 18S/16S et plus les quantités de gènes ARNr 16S et ARNr 18S des échantillons de sol étudiés sont élevés, plus les teneurs en chlore total et organique sont importantes. Bastviken et al. (2007), montrent en effet, dans le cadre d'une expérience d'enrichissement de sol au $^{36}Cl$, une rapide rétention dans les sols de chlore inorganique par les microorganismes (20% du chlore inorganique ajouté initialement au sol est incorporé dans la biomasse microbienne en 5 jours), en accord avec une formation sur le long terme de chlore organique, suggérant que de fortes quantités de chlore sont retenues dans la biomasse des sols. **Il semble donc exister une relation entre microorganismes et teneurs en chlore dans les sols.**

Plus précisément, les champignons, estimés par le nombre de copies de gènes ARNr 18S, sont généralement plus abondants dans les sols forestiers et conduisent de ce fait à une augmentation du rapport 18S/16S. D'après la Figure 4. 10, les rapports 18S/16S sont effectivement plus importants pour les échantillons du sol forestier VF par rapport aux autres sols. C'est dans les échantillons de ce sol forestier VF que les teneurs en chlore sont les plus importantes (Figures 4. 1 et 4. 3). Les teneurs en chlore mesurées dans les échantillons de sols semblent donc être corrélées à la quantité de champignons présente dans les sols. La Figure 4. 15 confirme ces observations car la quantité de gènes ARNr 18S est davantage corrélée aux teneurs en chlore que la quantité de gènes ARNr 16S (vecteur plus long). En effet, Clutterbuck et al. (1940) ; Hunter et al. (1987), deJong et Field (1997) et Öberg et al. (2002) suggèrent que le processus de chloruration correspond au résultat de l'activité de nombreux organismes comme les champignons. Gribble et al. (2003) associent aussi la formation de composés organochlorés à l'activité des champignons. Harper et al. (1995) montrent également la formation de chlorométhane par des champignons qui méthylent les chlorures. Verhagen et al. (1998) précisent par ailleurs que les Basidiomycètes sont les principaux champignons à être impliqués dans la synthèse de composés organiques chlorés : 20 familles et 68 genres de Basidiomycètes produisent des composés halogénés de faible poids moléculaire avec plus de 81 métabolites chlorés. **La formation de chlore organique dans les sols pourrait donc être liée à la quantité, et à l'activité, des champignons des sols.**

Les échantillonnages ont été réalisés lors de saisons très contrastées : hiver très froid en mars 2012, printemps doux en juin 2013 et hiver doux en mars 2014. Ces différences de saisons et de températures lors des prélèvements entre les années peuvent expliquer certains résultats comme les abondances microbiennes et les activités enzymatiques plus faibles en 2012 qu'en 2013 et 2014 (tableau 4. 5, Figure 4. 11). Par ailleurs, les teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$) mesurées pour les échantillons VF et VP sont plus faibles au cours des années, donc ne semblent pas répondre de la même manière aux variations de température.
D'après la Figure 4. 15, les teneurs en chlore seraient corrélées avec la température, mais il peut s'agir d'une relation indirecte en lien avec l'activité microbienne. Les travaux de Öberg et al. (1996) qui démontrent un effet de la saison avec une formation de chlore organique maximale en automne et minimale en été. De la même façon, d'après Myneni et al., 2002 et Leri et Myneni, 2011, une partie de la formation de chlore organique a lieu principalement pendant la dégradation de la litière et est de ce fait dépendante de la saison. Les précipitations, quant à elles, semblent avoir moins d'influence sur les teneurs en chlore. **Indirectement, les variations saisonnières de température semblent donc pouvoir influencer les teneurs en chlore présentes dans les sols.**

En conclusion de ce chapitre, la teneur en $Cl_{ONE}$ dans les échantillons de sol prélevés est quasiment équivalente à la teneur en $Cl_{TOT}$. Les teneurs en chlore les plus importantes sont observées dans les horizons de surface des sols forestiers, surtout sous peuplements mixtes sapins/hêtres se développant sur roche acide (VF). Sous forêt l'apport de matière organique est important via les chutes de litières, pluviolessivats et renouvellement annuel des racines fines. De plus, ces sols ont la particularité d'avoir de faibles pH et un turn-over de la matière organique plutôt lent, qui conduit à une accumulation de cette matière organique et en particulier de carbone organique dans les horizons superficiels des sols. Ces sols qui présentent des teneurs en carbone organique élevées présentent également des teneurs en chlore importantes. La matière organique, et plus précisément le carbone organique, représente un substrat pour la croissance des microorganismes. De cette façon, le turn-over étant lent, le processus de déhalogénation peut être supposé faible et les microorganismes capables de chloruration produisent du chlore organique qui s'accumule. Cette hypothèse confirme les fortes teneurs en chlore mesurées dans ces sols. Cependant, aucune corrélation

robuste entre les teneurs en chlore et les activités enzymatiques étudiées n'a pu être observée dans cette étude. Par contre, il apparait que les échantillons de sols les plus riches en carbone et chlore organiques présentent des rapports 18S/16S les plus importants ainsi que des teneurs en gènes ARNr 18S les plus élevées. Les teneurs en chlore semblent donc être liées aux quantités de microorganismes des sols. Nos résultats suggèrent que les paramètres environnementaux et édaphiques jouent sur le type de microorganismes présents et influencent certaines activités spécifiques agissant sur le cycle du carbone et du chlore.

**La répartition des teneurs en chlore des sols dépend donc du pH, de l'usage des sols, de la teneur en carbone organique, de la quantité de microorganismes des sols, notamment de la quantité de champignons. Plus précisément, les sols forestiers à faibles pH où les champignons sont prédominants présentent un turn-over de la matière organique qui est plutôt lent, conduisant à une accumulation de carbone organique et des teneurs élevées en chlore organique. La combinaison des paramètres physico-chimiques et microbiologiques semble ainsi conditionner les teneurs plus ou moins importantes de chlore organique et par conséquent, de chlore total.**

# Chapitre 5

## Evolution des formes de chlore au cours du temps lors d'incubations en conditions biotiques et abiotiques et étude exploratoire de la spéciation du chlore

# 5 Evolution des formes de chlore au cours du temps lors d'incubations en conditions biotiques et abiotiques et étude exploratoire de la spéciation du chlore

L'objectif de ce cinquième chapitre est de préciser la contribution de l'activité microbienne au processus de chloruration dans les sols. Pour cela, deux expériences d'incubations de sols ont été mises en place selon différentes modalités (stériles, inoculées, ajout ou non de chlore sous forme inorganique NaCl, conditions aérobies ou anaérobies). Le suivi et la mesure de paramètres microbiologiques, ainsi que la mesure des teneurs en chlore des sols dans les différentes conditions expérimentales après incubations devaient permettre de mettre en évidence la formation de $Cl_O$, en association ou non avec la présence de microorganismes. Le tableau 5. 1 rappelle les différentes conditions d' incubation des sols, ainsi que les mesures réalisées sur les sols pendant et à la fin des incubations. Les détails des méthodes employées sont présentés dans le chapitre 2.

Tableau 5.1. Conditions de mise en incubation et mesures réalisées sur les sols pour les deux expériences.

| | Première expérience | Deuxième expérience |
|---|---|---|
| **Conditions de mise en incubation** | | |
| **Echantillons de sol** | VF2013 et MF2013 | VF2014 |
| **Temps d'incubation (jours)** | 35 jours | 55 jours |
| **Méthode de stérilisation** | Autoclavage | Irradiation |
| **Modalités** | 5 modalités (2 facteurs croisés, + 1)<br><br>- Stérilisé/ stérilisé ré-inoculé<br>- Avec/sans ajout de Clin<br>- Stérilisé ré-inoculé incubé sous apport limité en oxygène | modalités (3 facteurs croisés)<br><br>- Stérile/stérilisé réinoculé<br>- Avec/sans ajout de Clin<br>- Aérobie/anaérobie |
| **Chlore inorganique ajouté (modalités « ajout de Clin »)** | VF2013 : 73 $mg.kg^{-1}$<br>MF2013 : 30 $mg.kg^{-1}$ | VF2014 : 61 $mg.kg^{-1}$ |
| **Mesures réalisées sur les sols** | | |
| **Paramètres microbiologiques suivis** | - Emission de $CO_2$ | - Emission de $CO_2$<br>- Activités enzymatiques :<br>FDA<br>Laccase<br>Amino-peptidase<br>Phosphatase |
| **Technique de mesure des teneurs en chlore** | Activation neutronique (une seule répétition analysée) | Analyseur d'AOX |

Dans la première incubation, les échantillons de deux sols ont été utilisés (VF2013 et MF2013). Les teneurs en chlore ont été mesurées par activation neutronique (chapitre 2-3.1.3) avec une seule répétition. Dans la seconde incubation, un seul sol a été étudié, et celui issus du site des Vosges a été choisi car les teneurs en $Cl_O$ étaient les plus importantes. La mesure des teneurs en chlore a été réalisée par analyseur d'AOX (chapitre 2-3.1.2).

Plusieurs échantillons de sols issus de ces incubations ont été analysés par spectroscopie d'absorption X, XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) afin de déterminer une éventuelle évolution des formes de chlore au cours du temps et afin de préciser la spéciation du $Cl_O$ (aliphatique, aromatique) des échantillons issus de ces incubations. Le tableau 5. 2 synthétise les modalités et les appellations des échantillons analysés par cette technique. Les détails concernant les modalités et la méthode de mesure sont présentés dans le chapitre 2.3.4

Tableau 5.2. Récapitulatif des modalités et des appellations des échantillons analysés par spectrométrie XANES.

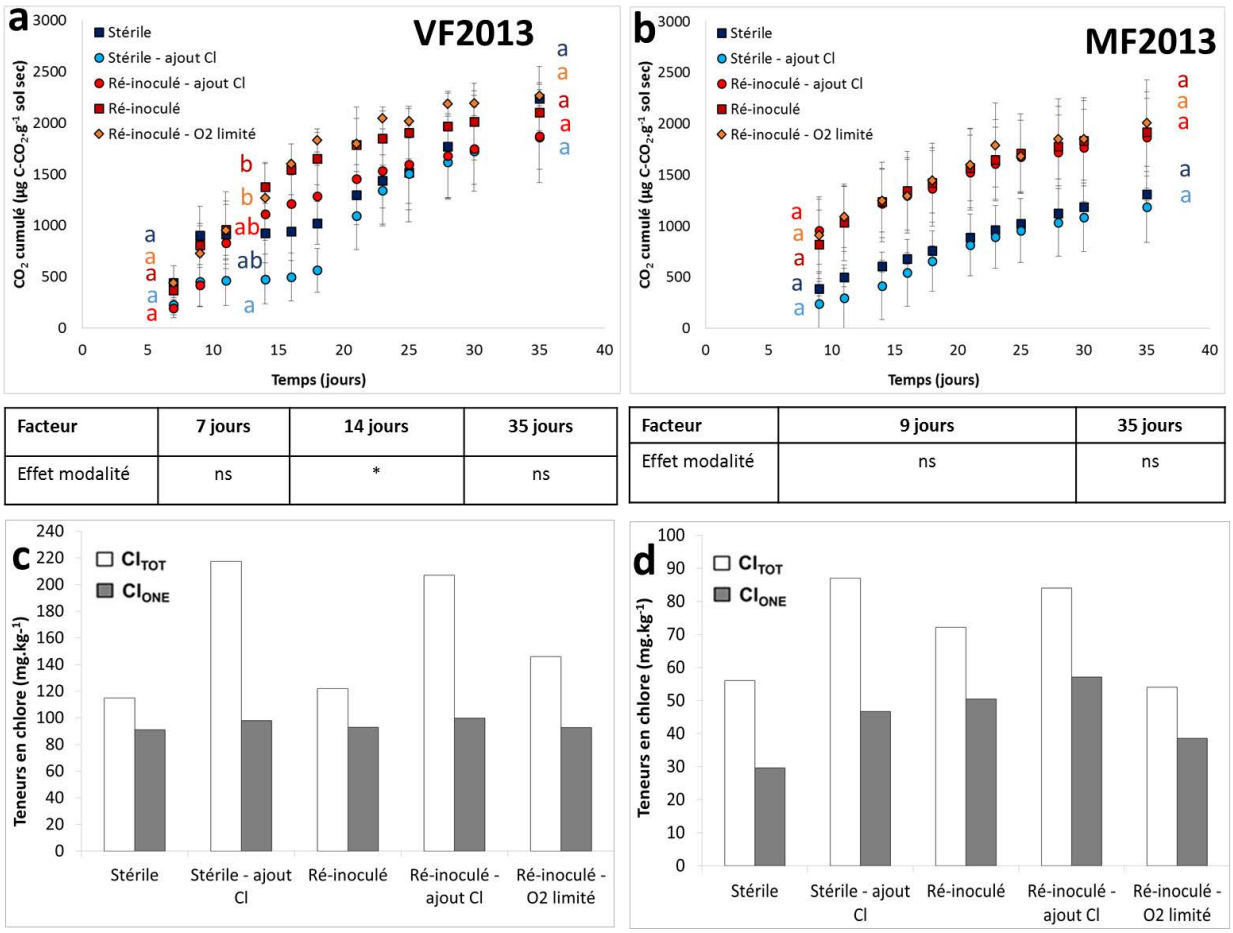
| **Site de Meuse** | |
|---|---|
| **Echantillon** | **Appellation** |
| MF2013 initial sans traitement | M |
| MF2013 stérilisé par autoclave | MA |
| MF2013 incubation 1 – ré-inoculé | i1-MR |
| MF2013 incubation 1 – ré-inoculé ajout de chlore | i1-MRCl |
| MF2013 incubation 1 – autoclavé ajout de chlore | i1-MACl |
| **Site des Vosges** | |
| **Echantillon** | **Appellation** |
| VF2013 initial sans traitement | V |
| VF2013 stérilisé par autoclave | VA |
| VF2014 stérilisé par irradiation | VI |
| VF2013 incubation 1 – ré-inoculé | i1-VR |
| VF2013 incubation 1 – ré-inoculé ajout de chlore | i1-VRCl |
| VF2014 incubation 2 – ré-inoculé | i2-VR |
| VF2014 incubation 2 – ré-inoculé ajout de chlore | i2-VRCl |
| VF2014 incubation 2 – ré-inoculé anaérobie | i2-VRa |
| VF2014 incubation 2 – ré-inoculé ajout de chlore anaérobie | i2-VRaCl |
| VF2014 incubation 2 – irradié | i2-VI |
| VF2014 incubation 2 – irradié ajout de chlore | i2-ICl |
| VF2014 incubation 2 – irradié anaérobie | i2-VIa |
| VF2014 incubation 2 – irradié ajout de chlore anaérobie | i2-VIaCl |
| **Standards** | |
| **Echantillon** | **Appellation** |
| Acide trichloroacétique ($Cl_O$) | TCA |
| Chlorotétracycline ($Cl_O$) | CTCH |
| Chlorure de calcium ($Cl_{in}$) | $CaCl_2$ |
| Chlorure d'ammonium ($Cl_{in}$) | $NH_4Cl$ |

Le traitement des spectres obtenus suite à l'analyse de ces échantillons par spectrométrie XANES a été réalisé grâce au logiciel Athena. Par ailleurs, les spectres ont été identifiés et classés d'après les travaux de Leri et al. (2007).

Ce chapitre est structuré en quatre parties. La première partie décrit les résultats des premières incubations. Ces résultats permettent de discuter de l'influence du sol, de la stérilisation par autoclavage et de l'ajout de chlore sur l'activité microbienne et sur les teneurs en chlore des sols. La deuxième partie présente les résultats des secondes incubations. Ceux-ci montrent l'influence de la réinoculation du sol irradié, en présence et en absence de Clin ajouté, sur les teneurs en chlore. Les résultats obtenus suite aux mesures réalisées par spectrométrie XANES sont présentés dans la troisième partie. Enfin, la quatrième et dernière partie discute et fait la synthèse des résultats obtenus.

## 5.1 Activité de respiration des microorganismes et teneurs en chlore dans les incubations des sols VF et MF autoclavés et réinoculés

L'évolution de l'émission de $CO_2$ mesurée au cours du temps ainsi que les teneurs en chlore mesurées par activation neutronique pour les échantillons VF2013 et MF2013 issus de la première incubation sont présentées sur la Figure 5. 1.




| Facteur | 7 jours | 14 jours | 35 jours |
|---|---|---|---|
| Effet modalité | ns | * | ns |

| Facteur | 9 jours | 35 jours |
|---|---|---|
| Effet modalité | ns | ns |

Figure 5.1. Evolution de l'émission de $CO_2$ (moyennes ± écart-type) des échantillons VF2013 (a) et MF2013 (b) au cours de la première incubation. Moyennes ± écart-type (n=3). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les points ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (ANOVA à un facteur (modalité), P<0,05 à T = 7, 14 et 35 jours pour VF2013 et T=9 et 35 jours pour MF2013) et teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ mesurées par activation neutronique sur une répétition par modalité de VF2013 (c) et MF2013 (d) (n= 1).

### 5.1.1 Incubation de l'échantillon de sol forestier des Vosges (VF 2013)

L'émission de $CO_2$ augmente graduellement de 200 à 7 jours à 2500 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$ à 35 jours pour les échantillons VF2013 autoclavé ré-inoculés, avec ou sans ajout de $Cl_{in}$ et pour les échantillons ré-inoculés incubés sous apport en oxygène limité. Pour le sol autoclavé (noté « stérile » sur Figure 5. 1), l'émission de $CO_2$ augmente en début d'incubation puis atteint un plateau entre 10 et 20 jours (autour des 500 et 1000 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$ pour les modalités sols autoclavés avec et sans ajout de chlore, respectivement). Entre 20 et 35 jours d'incubation, l'émission de $CO_2$ augmente à nouveau pour atteindre une valeur maximale d'environ 2000

µg C-$CO_2$.$g^{-1}$. A 35 jours, il n'y a pas de différence significative entre le sol autoclavé et le sol autoclavé et réinoculé suggérant une contamination microbienne dans le sol autoclavé. Concernant l'effet de l'ajout de chlore, il semble que les modalités avec ajout de chlore présentent des émissions de $CO_2$ plus faibles que les modalités sans ajout de chlore, mais la différence n'est pas significative. Enfin, aucune différence significative n'est constatée entre les modalités aérobies et les modalités en condition d'apport en oxygène limité. En raison de la contamination des échantillons de sol autoclavé, les analyses de chlore ont été réalisées sur un seul réplicat, pour donner une indication sur les teneurs trouvées.

Les teneurs de $Cl_{TOT}$ (Figure 5. 1 c) mesurées en fin d'incubation sont du même ordre de grandeur (en moyenne 125 mg.$kg^{-1}$) pour les modalités sans ajout de chlore. Les modalités avec ajout de chlore présentent également des teneurs en $Cl_{TOT}$ comparables, de l'ordre de 220 mg.$kg^{-1}$, et la différence avec les échantillons sans chlore ajouté semble correspondre à la quantité de chlore ajoutée. Les teneurs en $Cl_{ONE}$, quant à elles, sont du même ordre de grandeur quelle que soit la modalité considérée (en moyenne 95 mg.$kg^{-1}$) et représentent environ 76 % du chlore des modalités sans ajout de chlore. Cependant, l'absence de répétitions ne permet pas d'identifier d'éventuelles différences significatives des proportions de $Cl_{ONE}$ par rapport au $Cl_{TOT}$ entre les modalités.

### 5.1.2 Incubation de l'échantillon de sol forestier de Meuse (MF 2013)

Les modalités autoclavées ré-inoculées présentent une émission de $CO_2$ qui augmente graduellement de 1000 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$ à 8 jours à 2000 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$ à 35 jours. L'émission de $CO_2$ pour les modalités autoclavées (stériles), quant à elle, augmente de 250 à 8 jours à 1000 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$ à 35 jours et bien qu'elle semble plus basse, elle n'est pas significativement différente des modalités ré-inoculées. Aucune différence significative d'émission de $CO_2$ n'est constatée non plus entre les modalités avec ou sans ajout de chlore. Enfin, les modalités ré-inoculées en conditions d'apport en oxygène limité présentent des émissions de $CO_2$ non significativement différentes de celles obtenues pour les modalités inoculées en conditions aérobies. Comme pour le sol VF2013, cette absence de différence significative nous a conduit à n'analyser les teneurs en chlore que pour une seule répétition.

Les analyses des teneurs en $Cl_{TOT}$ dans les échantillons en fin d'incubation (Figure 5. 1d) semblent présenter des variations (respectivement 55 et 70 $mg.kg^{-1}$ pour les modalités autoclavées et autoclavées ré-inoculées), mais l'absence de répétitions dans cette analyse limite l'interprétation de ces données. Les teneurs en $Cl_{TOT}$ des échantillons avec ajout de chlore (en moyenne 85 $mg.kg^{-1}$) sont plus élevées que celles des échantillons sans ajout de chlore, et la différence correspond à la quantité de Cl ajoutée.

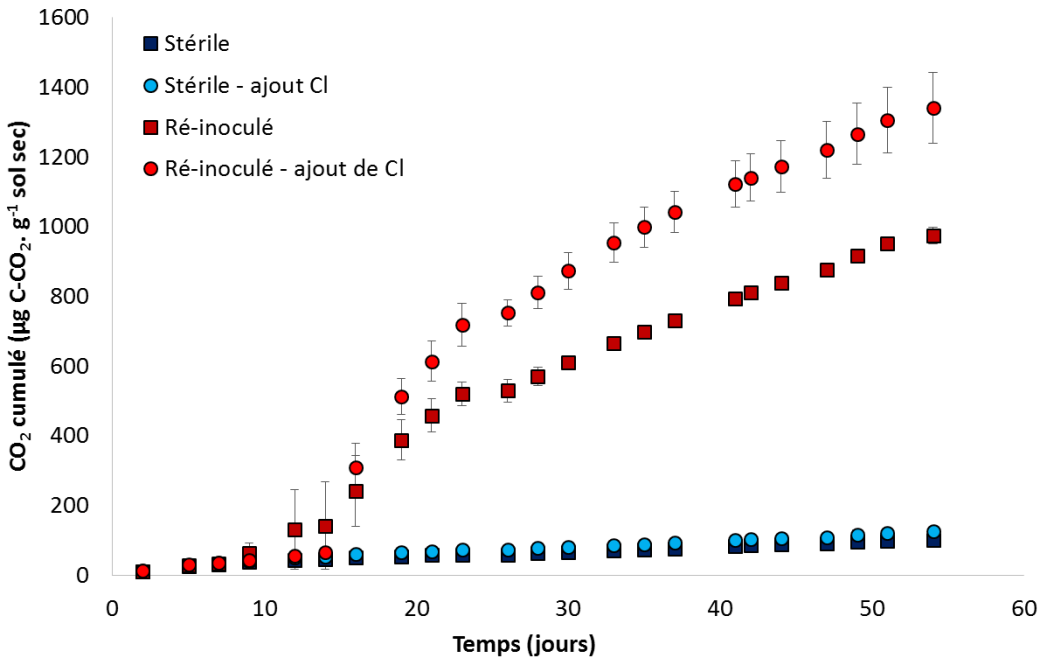
Les teneurs en $Cl_{ONE}$ semblent plus élevées dans les échantillons ré-inoculés et ré-inoculés avec ajout de chlore que dans les échantillons des modalités autoclavées et autoclavées avec ajout de chlore, mais l'absence de répétitions dans cette analyse, et l'augmentation de l'émission de $CO_2$ au cours du temps dans les échantillons autoclavés, ne permet pas de conclure. Enfin, les teneurs en $Cl_{ONE}$ des échantillons ré-inoculés avec un apport limité d'oxygène semblent légèrement plus faibles que celles des échantillons ré-inoculés (condition aérobie).

## 5.2 Evolution des teneurs en chlore total et organique lors des incubations du sol VF2014 irradié : influence de la ré-inoculation et de l'apport de chlore inorganique.

### 5.2.1 Activité de respiration des microorganismes

L'évolution de l'émission de $CO_2$ mesurée sur les échantillons VF2014 incubés en condition aérobie est présentée sur la Figure 5. 2.

Pour rappel, l'émission de $CO_2$ des sols incubés en condition anaérobies n'a pas été suivie. En effet, pour éviter une éventuelle entrée d'oxygène, les flacons sont restés fermés toute la durée de l'incubation.




| Facteurs | T0 | TF |
|---|---|---|
| Effet modalité | ns | * Inoculé ajout de Cl > Inoculé > Stérile = Stérile ajout de Cl |

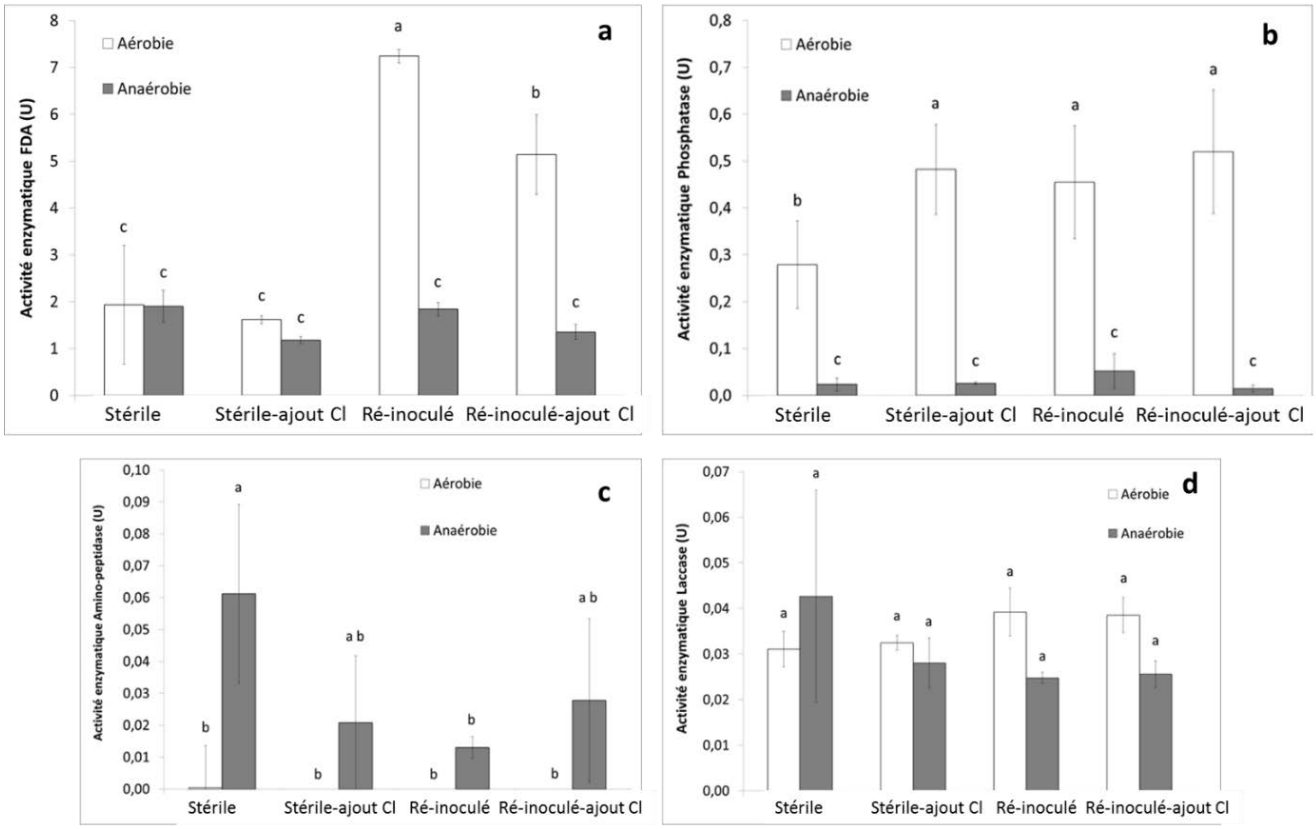
Figure 5.2. Evolution de l'émission de $CO_2$ au cours de la seconde incubation pour les échantillons VF2014 placés en condition aérobie. Moyennes ± écart-type (n= 3). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les points ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents (ANOVA à un facteur (modalité), P<0,05 à T = 2 et 54 jours)

Pour les modalités irradiées (avec ou sans ajout de $Cl_{in}$), l'émission de $CO_2$ reste très faible et augmente très légèrement de 0 à 100 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$ durant les 54 jours d'incubation.

Dans les modalités ré-inoculées (avec et sans ajout de $Cl_{in}$), l'émission de $CO_2$ est faible pendant les dix premiers jours, puis la production de $CO_2$ augmente considérablement. Cette émission de $CO_2$ est significativement plus importante dans les modalités ré-inoculées avec ajout de chlore que dans les modalités ré-inoculées sans ajout de chlore (maximum à 54 jours de 1400 et 900 µg C-$CO_2$.$g^{-1}$, respectivement).

### 5.2.2 Activités enzymatiques FDA, laccase, amino-peptidase et phosphatase

Les activités enzymatiques FDA, laccase, amino-peptidase et phosphatase mesurées dans les échantillons VF2014 après la seconde incubation sont présentées sur la Figure 5. 3.




| Facteurs | FDA | Phosphatase | Amino-peptidase | Laccase |
|---|---|---|---|---|
| Effet condition | * aérobie > anaérobie | * aérobie > anaérobie | * anaérobie > aérobie | ns |
| Effet modalité | * Ré-inoculé > ré-inoculé ajout de Cl > Stérile = Stérile ajout de Cl | ns | * Stérile = ré-inoculé ajout de Cl = Stérile ajout de chlore > Ré-inoculé | ns |

Figure 5.3. Activité enzymatique FDA, Phosphatase, Amino-peptidase et Laccase (U) des échantillons VF2014 (incubations 2). Moyennes ± écart-type (n=3). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à deux facteurs (condition - modalité), P<0,05).

En fin d'incubation, l'activité d'hydrolase de la FDA est faible (2U) dans les sols irradiés (modalités stériles avec ou sans ajout de chlore ; conditions aérobies et anaérobies) ainsi que

dans ceux irradiés et ré-inoculés en conditions anaérobies. A l'inverse, l'activité FDA mesurée est plus importante dans les sols des modalités ré-inoculées, incubés en conditions aérobies. Par ailleurs, les modalités ré-inoculées sans ajout de chlore présentent des activités plus importantes (7 U) que les modalités ré-inoculées avec ajout de chlore (5 U).

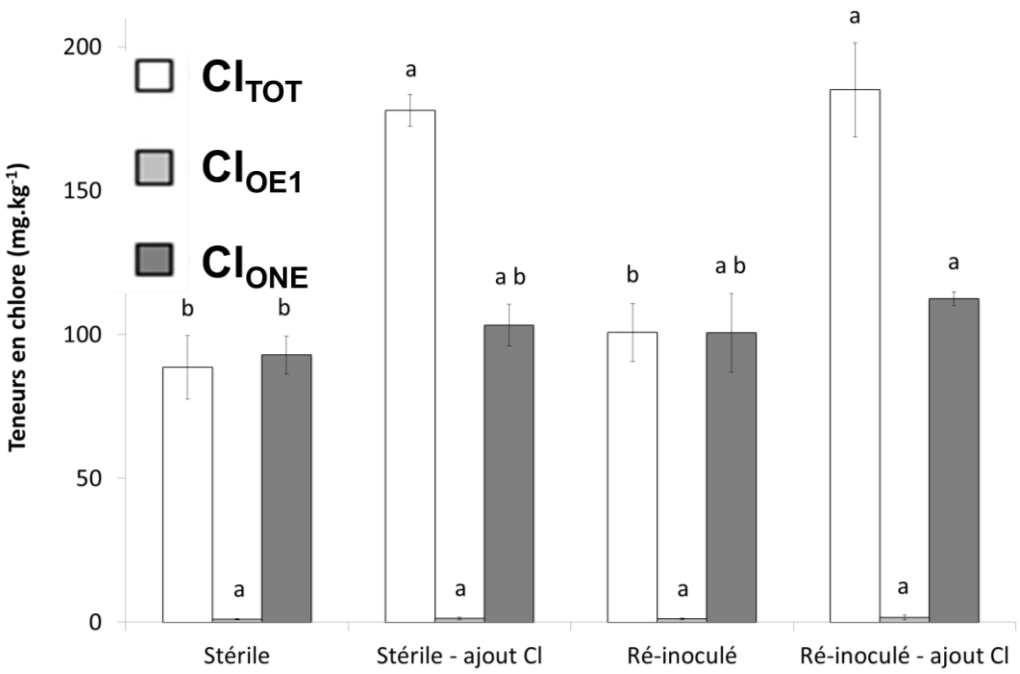
L'activité enzymatique phosphatase est toujours faible pour l'ensemble des échantillons, quelle que soit la modalité, bien que les sols incubés en conditions aérobies présentent des activités plus importantes (en moyenne 0,4 U) que les échantillons anaérobies (inférieure à 0,1 U). En conditions aérobies, l'activité phosphatase est significativement plus faible pour le sol irradié que pour les autres traitements.

Les échantillons de sol irradiés placés en condition aérobie présentent des activités enzymatiques amino-peptidase significativement plus faibles (inférieures à 0,01 U) que les échantillons incubés en condition anaérobie (0,06 U). Pour les modalités aérobies (ré-inoculées, avec ou sans chlore), les activités amino-peptidase ne sont pas significativement différentes entre les échantillons et restent très faibles pour l'ensemble de ces échantillons.

Les activités enzymatique laccase mesurées sont très faibles et ne sont pas significativement différentes entre les modalités (aérobie et anaérobie ; 0,035 U en moyenne).

### 5.2.3 Teneurs en chlore obtenues après incubations par analyseur d'AOX

Les teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons VF2014 incubés en conditions aérobies sont présentées sur la Figure 5. 4.




| Facteurs | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{OE1}$ | $Cl_{ONE}$ |
|---|---|---|---|
| Effet modalité | * Ré-inoculé ajout de chlore = stérile ajout de Cl > Ré-inoculé = Stérile | ns | * Ré-inoculé ajout de chlore = stérile ajout de Cl = Ré-inoculé > Stérile |

Figure 5.4. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{ONE}$) obtenues par analyseur d'AOX pour les échantillons VF2014 irradiés après 54 jours d'incubation en condition aérobie ré-inoculés (Ré-inoculé) ou non (Stérile) et avec (ajout Cl) et sans ajout de Cl. Moyennes ± écart-type (n=3). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (modalité), P<0,05).

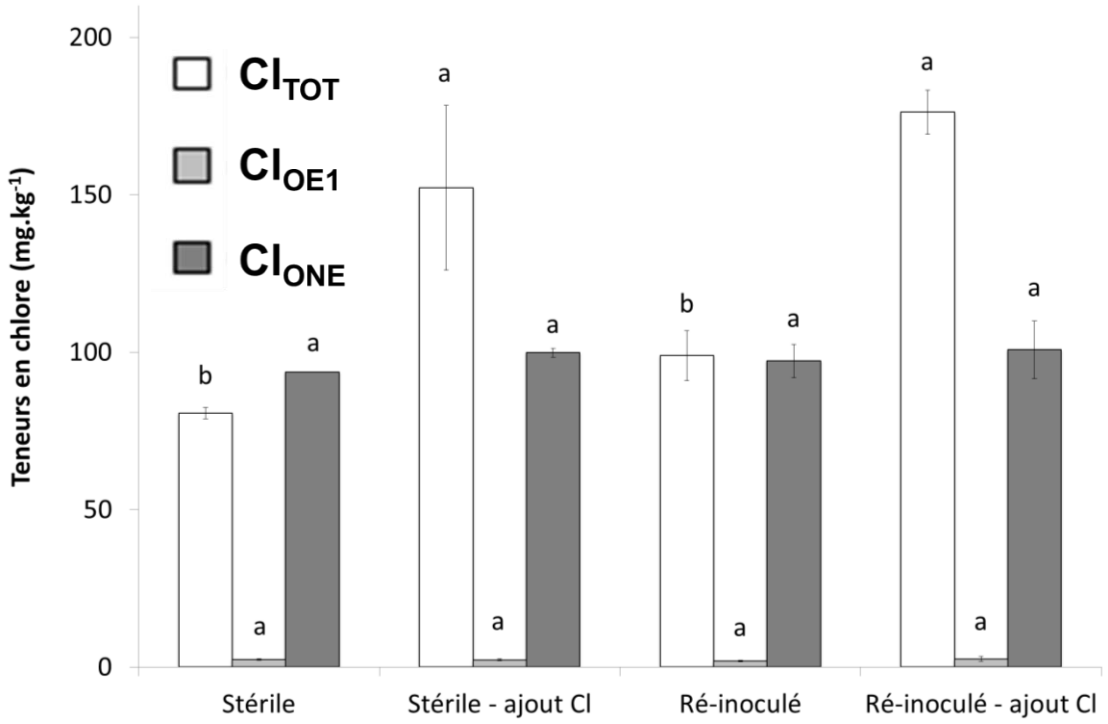
Les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées après 54 jours d'incubation ne sont pas significativement différentes entre les modalités irradiées et irradiées ré-inoculées sans ajout de chlore (en moyenne 80 $mg.kg^{-1}$). De la même façon, les teneurs en $Cl_{TOT}$ ne sont pas significativement différentes pour les modalités avec ajout de chlore (irradiées et irradiées ré-inoculées ; en moyenne 175 $mg.Kg^{-1}$), mais elles sont plus élevées qu'en absence de Cl ajouté.

La teneur en $Cl_{ONE}$ est significativement plus élevée pour la modalité irradiée ré-inoculée avec ajout de chlore que pour la modalité irradiée (témoin stérile), alors que la modalité irradiée avec ajout de chlore et la modalité irradiée ré-inoculée ne sont pas

significativement différentes du témoin stérile. Ainsi une partie du Clin ajouté a été transformée en $Cl_{ONE}$ sous l'effet de la réinoculation microbienne. Le $Cl_{ONE}$ représente presque la totalité du chlore dans les sols des modalités sans ajout de $Cl_{in}$.

Les teneurs en $Cl_{OE1}$, quant à elles, sont très faibles et ne sont pas significativement différentes quelle que soit la modalité considérée (environ 1 $mg.kg^{-1}$).

La Figure 5. 5 illustre les teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX pour l'ensemble des échantillons VF2014 incubés en conditions anaérobies.




| Facteurs | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{OE1}$ | $Cl_{ONE}$ |
|---|---|---|---|
| Effet modalité | * Ré-inoculé ajout de chlore = stérile ajout de Cl > Ré-inoculé = Stérile | ns | ns |

Figure 5.5. Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{ONE}$) obtenues par analyseur d'AOX pour les échantillons VF2014 irradiés après 54 jours d'incubation en condition anaérobie ré-inoculés (Ré-inoculé) ou non (Stérile) et avec (-ajout chlore) et sans ajout de chlore. Moyennes ± écart-type (n=3). Les effets significatifs sont représentés par un astérisque. Les effets non significatifs sont représentés par ns. Les barres ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur (modalité), P<0,05).

Globalement, les teneurs en $Cl_{TOT}$, $Cl_{OE1}$ et $Cl_{ONE}$ des échantillons incubés en condition anaérobie présentent une répartition identique à celle des échantillons incubés en condition aérobie : Les teneurs en $Cl_{TOT}$, d'environ 80 $mg.kg^{-1}$, sont similaires entre les modalités sans ajout de chlore (irradiées et irradiées ré-inoculées). Les modalités avec ajout de chlore (irradiées et irradiées ré-inoculé) présentent également des teneurs en $Cl_{TOT}$ identiques (en moyenne 160 $mg.Kg^{-1}$).

La teneur en $Cl_{ONE}$ représente presque la totalité du chlore pour les modalités sans ajout de $Cl_{in}$ (en moyenne 80 $mg.kg^{-1}$) et n'est pas significativement différente entre les différentes modalités. La différence significative obtenue entre les modalités irradiées (stérile) et les modalités irradiées ré-inoculées avec ajout de $Cl_{in}$ pour les échantillons placés en conditions aérobies (Figure 5. 4) n'est donc pas observée en conditions anaérobies.

Enfin, les teneurs en $Cl_{OE1}$ (environ 1 $mg.kg^{-1}$) sont très faibles et sont identiques quelle que soit la modalité considérée.

## 5.3 Analyse exploratoire par spectrométrie XANES de la spéciation du chlore des échantillons de sol incubés

D'après les travaux de Leri et al. (2007), les spectres obtenus par spectrométrie XANES sont définis notamment par les positions des énergies E0, X1 et X2. Ces positions d'énergies sont particulières pour le $Cl_{in}$ et pour le $Cl_{O.}$ (chapitre 2.3.4).

Les spectres obtenus pour les standards organiques TCA et CTCH ainsi que pour les standards inorganiques $CaCl_2$ et $NH_4Cl$ permettent d'observer l'allure de chaque type de spectre ($Cl_{in}$ et $Cl_O$) et de définir les positions des énergies propres à chaque forme de chlore ($Cl_{in}$ et $Cl_O$).

### 5.3.1 Spectres des standards.

La Figure 5. 6 présente les spectres obtenus pour les 4 standards analysés dans notre étude.

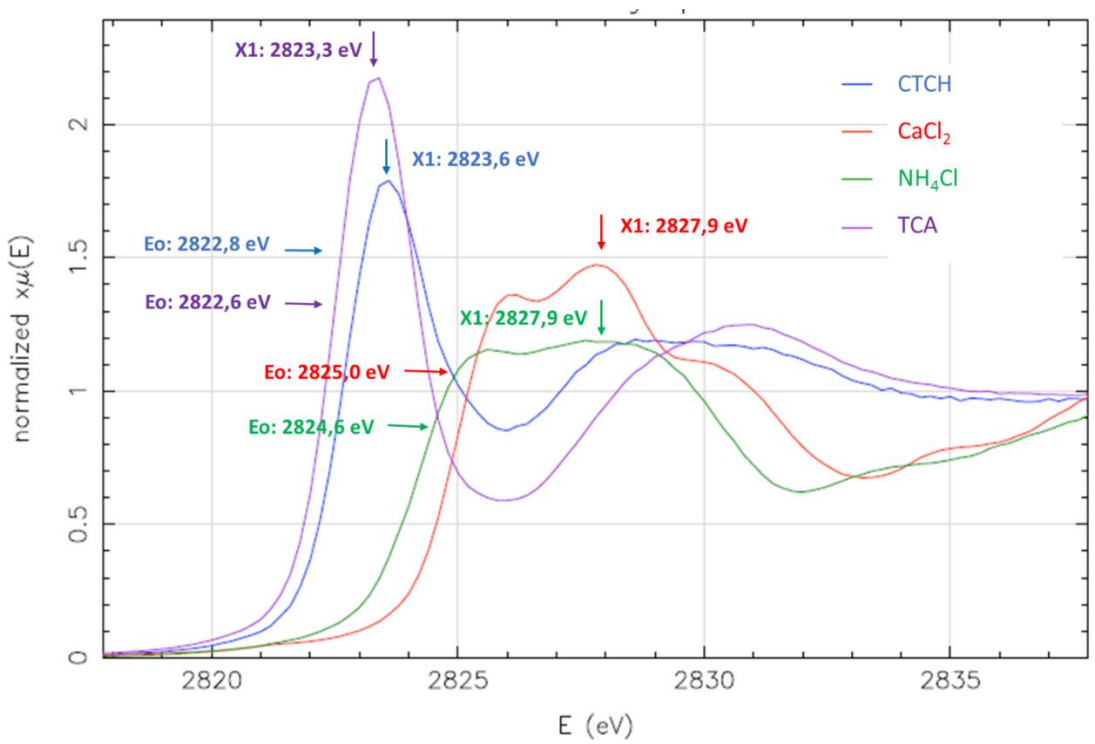



Figure 5.6. Spectres obtenus pour les standards $Cl_{in}$ ($CaCl_2$ et $NH_4Cl$) et $Cl_O$ (CTCH et TCA). Pour chaque spectre sont données les valeurs de E0 (énergie d'ionisation) et X1 (énergie au maximum du seuil d'absorption)

Le tableau 5. 3 permet de récapituler les énergies E0 et X1 obtenues à partir des spectres de chaque standard ($Cl_{in}$, $Cl_O$ aromatique et $Cl_O$ aliphatique).

Tableau 5.3. Energies d'ionisation E0 et énergie du premier pic X1 propres à chaque standard ($Cl_{in}$, $Cl_O$ aromatique et $Cl_O$ aliphatique).

| | **CTCH** | **TCA** | **$NH_4Cl$ et $CaCl_2$** |
|---|---|---|---|
| **E0** | Proche de 2822,8 eV | Proche de 2822,6 eV | De 2824,6 eV à 2825,0 eV |
| **X1** | Proche de 2823,6 eV | Proche de 2823,3 eV | Proche de 2827,9 eV |

Sur les spectres des standards $Cl_O$, le premier pic est bien identifié, alors que celui-ci est très large sur les spectres des standards $Cl_{in}$.

L'énergie d'ionisation E0 du standard en $Cl_O$ TCA est plus faible de 0,2 eV que celle du standard en $Cl_O$ CTCH. De la même façon, l'énergie du premier pic X1 du standard TCA est plus faible de 0,3 eV par rapport au standard CTCH.

Concernant les standards en $Cl_{in}$, les énergies d'ionisation sont comprises entre 2824,6 eV et 2825 eV. L'énergie du premier pic X1, quant à elle, est proche de 2827,9 eV pour $NH_4Cl$ et pour $CaCl_2$.

## 5.3.2 Spéciation du chlore dans les échantillons de sols des Vosges

### 5.3.2.1 Sols initiaux et stérilisés

Lors des mesures réalisées sur les sols initiaux (sans traitement), des résultats très hétérogènes ont été obtenus : les spectres enregistrés lors de l'analyse de différentes prises d'essai (différentes pastilles) d'un même échantillon de sol pouvaient présenter des caractéristiques très distinctes.

La Figure 5. 7 montre les spectres obtenus pour différentes pastilles (prises d'essai) préparées à partir d'un même échantillon de sol (VF2013 initial sans traitement). Pour ces différentes pastilles, dans certains cas nous avons pu enregistrer un spectre correspondant à du chlore aux caractéristiques proches d'un composé organo-chloré (Figure 5. 7 a), et dans d'autres cas un spectre correspondant à du chlore aux caractéristiques proches d'un composé chloré inorganique (Figure 5. 7c). La Figure 5. 7b correspond à un spectre qui présente des caractéristiques intermédiaires suggérant la présence de chlore organique et de chlore inorganique.

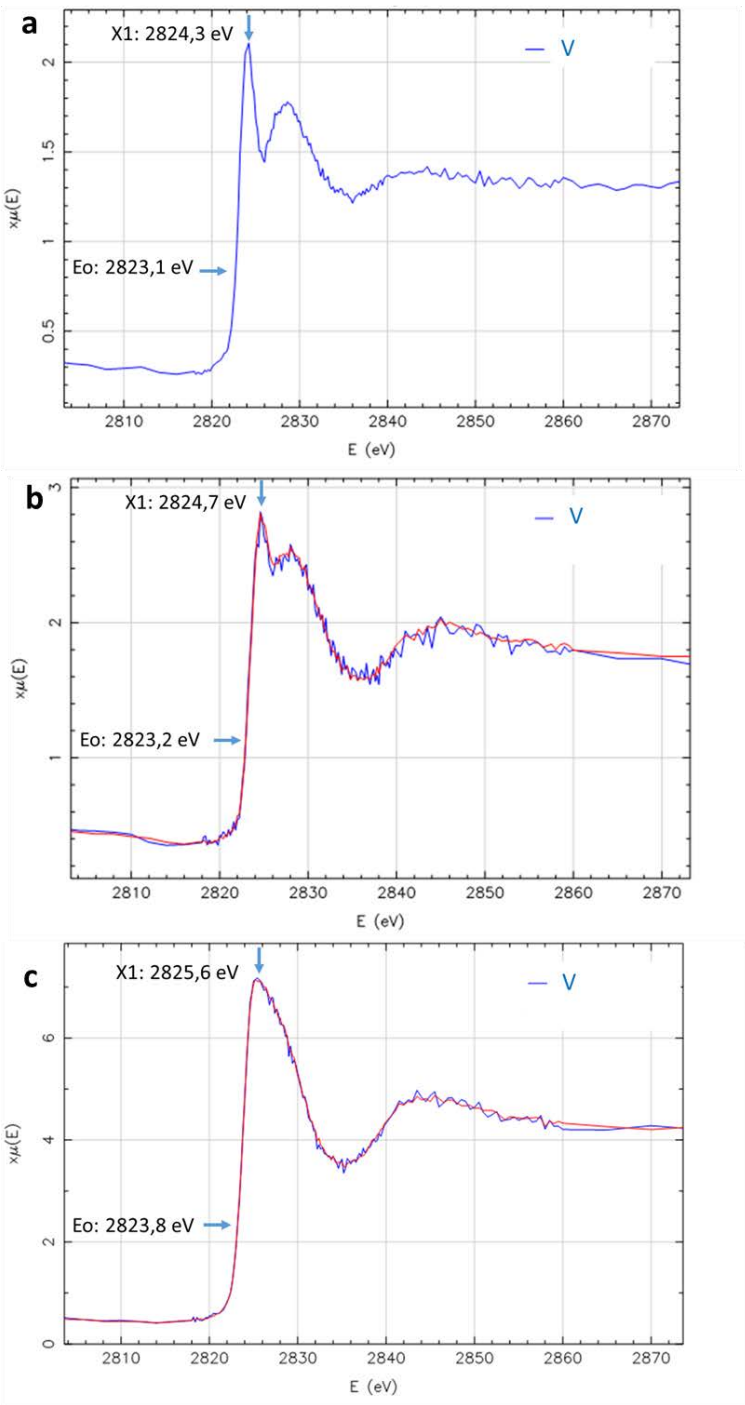



Figure 5.7. Exemples de spectres obtenus pour 3 prises d'essai distinctes préparées à partir d'un échantillon de sol (VF2013 initial sans traitement.) E0 : énergie d'ionisation. X1: énergie au maximum du seuil d'absorption

La relation entre les positions en énergie E0 et X1 calculées à partir des spectres obtenus pour différentes prises d'essai de sols des Vosges (V initial sans traitement, VA (autoclavé), VI (irradié), i1-VR (incubation 1 – autoclavé Ré-inoculé), i1-VRCl (incubation 1 – autoclavé Ré-inoculé ajout de chlore) et de standards, est illustrée sur le graphe de la Figure 5. 8.

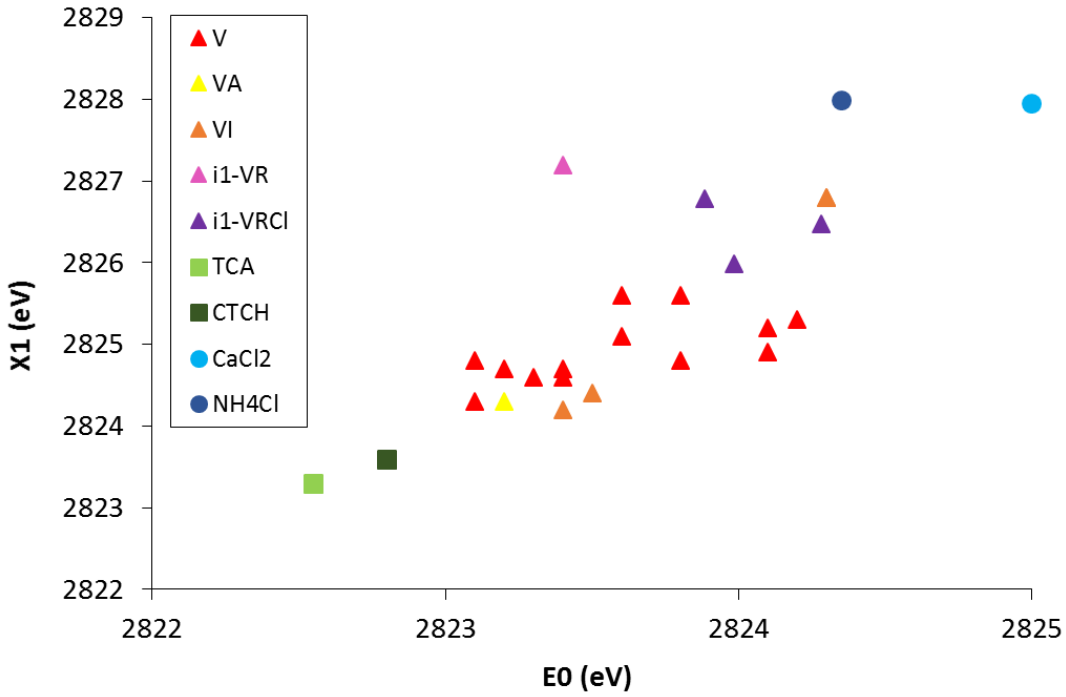



Figure 5.8. Position du maximum d'absorption (X1) en fonction de l'énergie d'ionisation E0 sur les spectres des sols des Vosges VF2013 initial sans traitement (V ), stérilisé par autoclave (VA), VF2014 stérilisé par irradiation (VI ), incubation 1 – Ré-inoculé (i1-VR), incubation 1 – Ré-inoculé ajout de chlore (i1-VRCl) ainsi que ceux des standards acide trichloroacétique (TCA), chlorotétracycline (CTCH), chlorure de calcium ($CaCl_2$) et chlorure d'ammonium ($NH_4Cl$).

Ce type de représentation permet de positionner les échantillons entre deux pôles, l'un de chlore inorganique ($CaCl_2$, $NH_4Cl$) et l'autre de chlore organique (TCA, CTCH). Ce graphe met en évidence l'hétérogénéité du signal obtenu pour le sol initial des Vosges (non stérilisé ni incubé, V), mais aussi pour le sol irradié (VI). Cependant, le signal obtenu lors de l'analyse de ces échantillons de sol a des caractéristiques (E0, X1) qui ne sortent jamais des limites données par les composés standards. Des études complémentaires sont nécessaires pour expliquer rigoureusement cette hétérogénéité.

Les points correspondants aux échantillons de sol ré-inoculés et incubés avec ajout de chlore inorganique (i1-VRCl) semblent légèrement plus proches des standards minéraux $NH_4Cl$ et $CaCl_2$ que les échantillons de sol initial. Un seul échantillon a été analysé pour le sol ré-inoculé sans ajout de chlore (i1-VR), qui a une valeur de X1 plus élevée que celle du sol initial, mais d'autres mesures seraient nécessaires pour confirmer cette observation.

La Figure 5. 9 illustre les positions des énergies maximales X1 du premier pic en fonction de l'énergie d'ionisation E0 obtenues à partir des spectres (i) des échantillons de sol des Vosges après la seconde incubation et (ii) des standards en $Cl_{in}$ et $Cl_O$

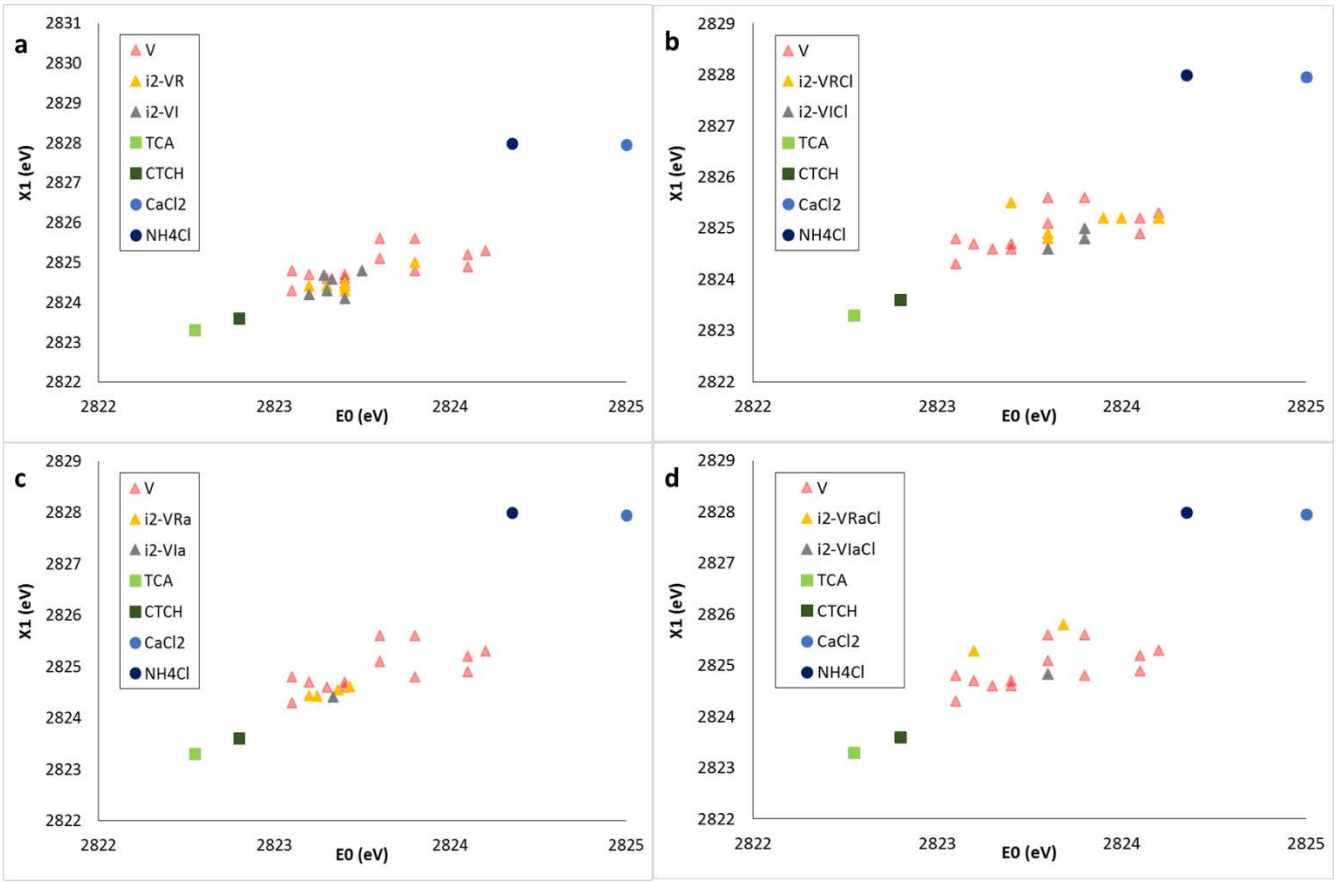



Figure 5.9. Position du maximum d'absorption (X1) en fonction de l'énergie d'ionisation E0 pour les échantillons par rapport aux standards : a) VF2013 initial avant incubation (V), VF2014 incubés après irradiation (i2-VI), après irradiation et ré-inoculation ( i2-VR) ; b) les mêmes modalités avec ajout de chlore ( i2-VICl et i2-VRCl) ; c) les échantillons incubés en conditions anaérobies VF2014 irradié (i2-Via), irradié et ré-inoculé (i2-VRa) et d) les mêmes modalités avec ajout de chore ( i2-VIaCl et i2-VRaCl). Les standards sont : acide trichloroacétique (TCA), chlorotétracycline (CTCH), chlorure de calcium ($CaCl_2$) et chlorure d'ammonium ($NH_4Cl$).

Comme dans la Figure précédente, les variations importantes observées pour les échantillons de sol initial (V) sont reportées. Le sol irradié (i2VI) semblerait moins dispersé et plus proche du pôle organique que le sol initial. Les échantillons de sol ré-inoculé en conditions aérobies et aérobies présentent des spectres avec des positions d'énergies qui sembleraient également plus concentrées et proches du pôle organique (i2-VR, i2-VRa,) (Figure 5. 9 a et c)

ce qui n'est pas le cas pour les échantillons avec ajout de Clin ( i2-VICl, i2-VIaCl) (Figure 5. 9 b et d).

Les positions des énergies des modalités aérobies (i2-VR, i2-VI et i2-VRCl, i2-VICl) semblent respectivement comparables à celles des modalités anaérobies (i2-VRa, i2-VIa et i2-VRaCl, i2-VIaCl)

Enfin, les positions des énergies des modalités avec ajout de $Cl_{in}$ (i2-VRCl, i2-VRaCl, i2-VICl, i2-VIaCl) sont plus proches de celles des standards $Cl_{in}$ que les modalités sans ajout de $Cl_{in}$ (i2-VR, i2-VRa, i2-VI, i2-VIa).

### 5.3.3 Spéciation du chlore dans les sols de Meuse

#### 5.3.3.1 Sols initiaux et stérilisés

Les positions en énergie de E0 et X1 relevées sur les spectres obtenus par l'analyse les différentes prises d'essai des échantillons du sol de Meuse (initial sans traitement), MA (sol autoclavé) et des standards sont reportées sur le graphe de la Figure 5. 10.

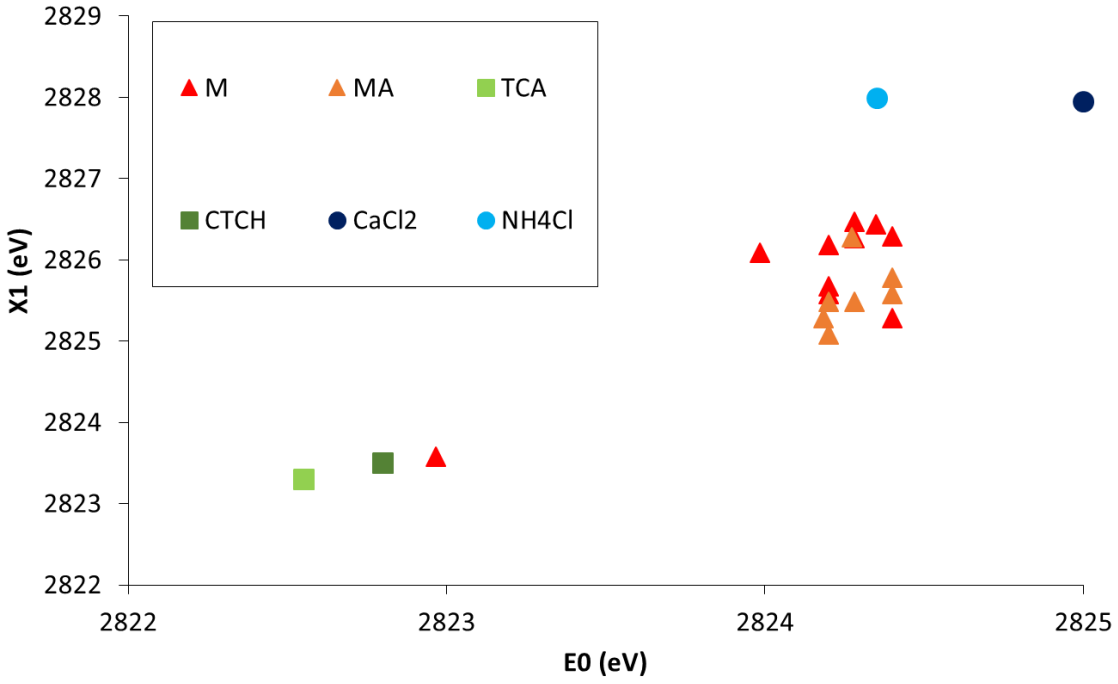



Figure 5.10. Comparaison des énergies maximales X1 du premier pic en fonction des énergies d'ionisation E0 des standards par rapport aux échantillons M et MA. Echantillons M (MF2013 initial sans traitement), MA (MF2013 stérilisé par autoclave), TCA (acide trichloroacétique), CTCH (chlorotétracycline), $CaCl_2$ (chlorure de calcium), $NH_4Cl$ (chlorure d'ammonium).

Les spectres issus de l'analyse des échantillons de sol initial (M) présentent des positions d'énergie plus groupées que celles du sol VF. Ces valeurs sont plus proches de celles des standards du $Cl_{in}$ ($CaCl_2$, $NH_4Cl$) que du $Cl_O$ (TCA, CTCH). Les échantillons de sol autoclavé (MA), quant à eux, ont une répartition globalement similaire à celle du sol initial non autoclavé.

#### 5.3.3.2 Sols après incubation

Les positions en énergie du maximum d'absorption X1 en fonction de l'énergie d'ionisation E0 obtenues à partir des spectres des échantillons i1-MR, i1-MRCl, i1-MACl ainsi que de celles des standards en $Cl_{in}$ et $Cl_O$ sont représentées sur la Figure 5. 11. Pour comparaison, les positions des échantillons initiaux (M) ont également été placées sur ce graphe.

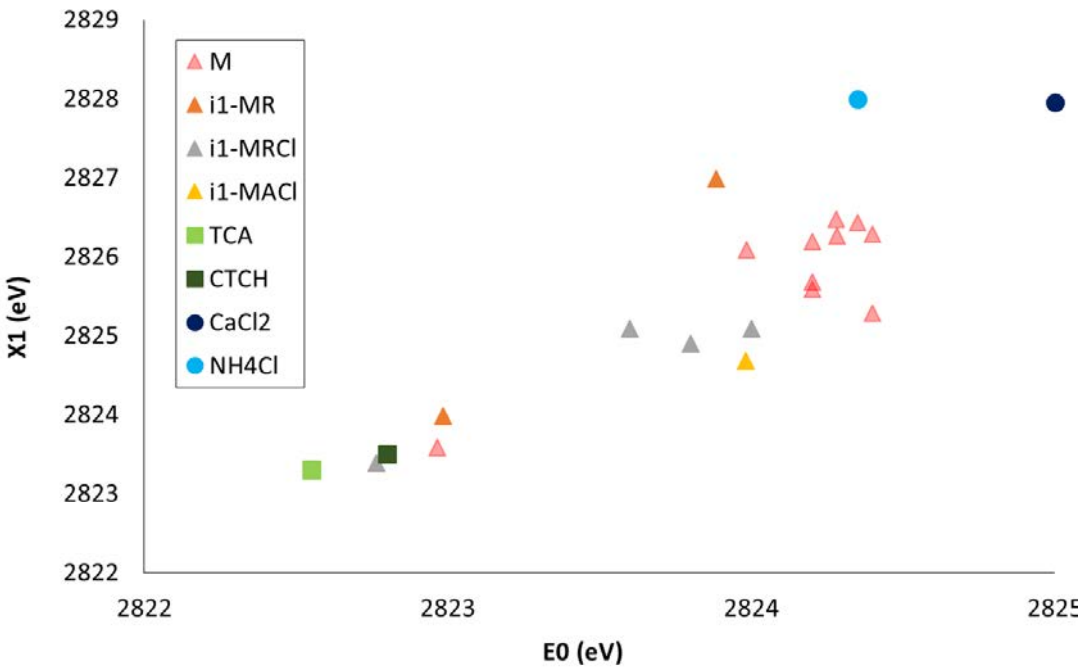



Figure 5.11. Position du maximum de l'absorption (X1) en fonction de l'énergie d'ionisation ($E_0$) obtenues sur les spectres des échantillons de sol de Meuse par rapport aux standards : MF2013 initial avant incubation (M), MF2014 incubé autoclavé après ajout de chlore (i1-MACl), incubé et ré-inoculé (i1-MR), incubé et ré-inoculé après ajout de chlore (i1-MRCl). Les standards sont : acide trichloroacétique (TCA), chlorotétracycline (CTCH), chlorure de calcium ($CaCl_2$) et chlorure d'ammonium ($NH_4Cl$).

Les échantillons de sol i1-MR et i1-MACl présentent des positions d'énergie plus proches de celles des standards du $Cl_{in}$ ($CaCl_2$, $NH_4Cl$) que du $Cl_O$ (TCA, CTCH). A l'inverse, les positions d'énergie des échantillons i1-MRCl sont plus proches de celles des standards en $Cl_O$ (TCA, CTCH) qu'en $Cl_{in}$ ($CaCl_2$, $NH_4Cl$).

### 5.3.4 Détermination du caractère aliphatique ou aromatique des composés organochlorés.

Les standards organochlorés CTCH et TCA correspondent respectivement à un composé aromatique et un composé aliphatique. Les spectres de ces standards se distinguent par l'énergie d'ionisation, la position du maximum de l'absorption (X1) et les structures après seuil (structure obtenue après avoir atteint l'énergie d'ionisation E0). Les structures après seuil sont dépendantes de la structure moléculaire du composé organique et pas uniquement du caractère aliphatique ou aromatique du radical organique. La comparaison des spectres des échantillons de sols M (initiaux sans traitement) aux spectres obtenus pour les standards

CTCH et TCA (Figure 5. 12), suggère que les composés organo-chlorés présents dans ces sols sont aromatiques.

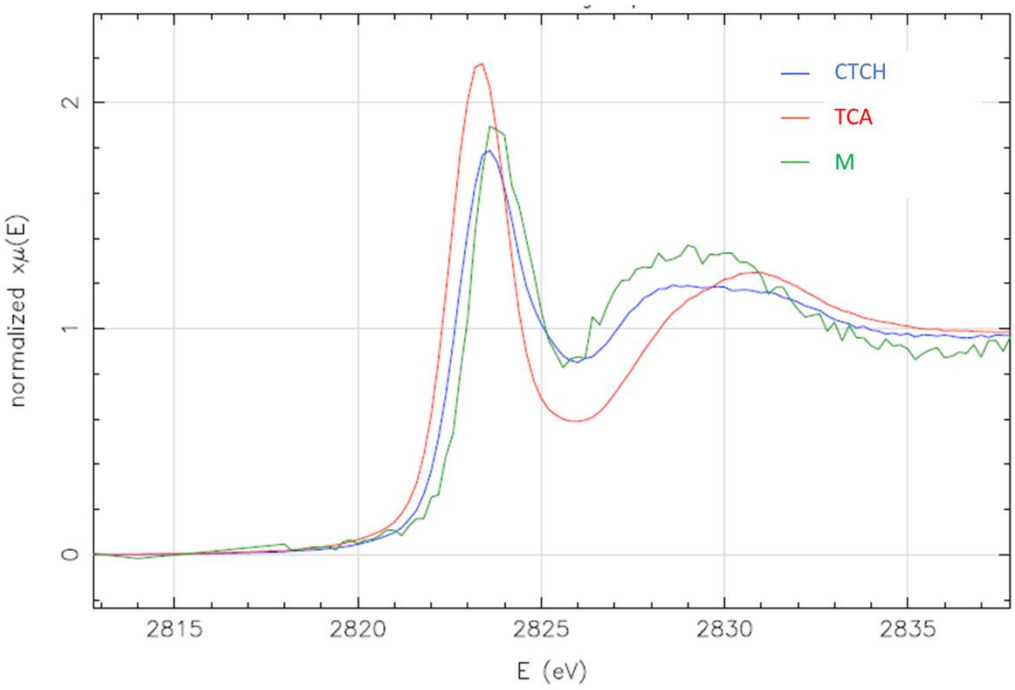



Figure 5.12. Exemple de spectre obtenu pour un échantillon M (MF2013 initial sans traitement) comparé aux spectres des standards CTCH (chlorotétracycline ; $Cl_O$ aromatique) et TCA (acide trichloroacétique ; $Cl_O$ aliphatique).

Une telle comparaison a été effectuée pour les autres échantillons de sols et suggère également que les composés organo-chlorés présents dans les sols sont majoritairement aromatiques.

## 5.4 Discussion : évolution des formes de chlore dans les sols lors des incubations en conditions stériles ou ré-inoculées, aérobies ou anaérobies, et avec ou sans ajout de chlore.

### 5.4.1 Répartition des teneurs en chlore dans les sols incubés

La teneur en $Cl_{TOT}$ des échantillons VF2013 (incubation 1) mesurée par activation neutronique pour les modalités sans ajout de $Cl_{in}$ (environ 80 mg.Kg$^{-1}$) est cohérente avec la teneur en $Cl_{TOT}$ mesurée avant incubation, juste après prélèvement (environ 97 mg.kg$^{-1}$). A

l'inverse, dans le cas de la seconde incubation, les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées par analyseur d'AOX dans les échantillons VF2014 sans ajout de $Cl_{in}$ (conditions aérobies et anaérobies), d'environ 80 $mg.kg^{-1}$, sont deux fois supérieures à celles rapportées dans le chapitre 4 (43 $mg.kg^{-1}$ de $Cl_{TOT}$ mesurée par analyseur d'AOX juste après prélèvement). Cette sur-estimation de la teneur en $Cl_{TOT}$ a pu être provoquée par une contamination en chlore des échantillons. Cependant, la teneur en $Cl_{TOT}$ rapportée dans le chapitre 4 mesurée par activation neutronique est d'environ 70 $mg.kg^{-1}$. Cette teneur en chlore est donc plus proche de la teneur mesurée dans la seconde incubation. Il semble donc que les teneurs mesurées par AOX sont sous-estimées, comme déjà démontrées dans le chapitre 4.

Concernant les échantillons MF2013 sans ajout de Clin (incubation 1), la teneur en $Cl_{TOT}$ mesurée par activation neutronique des modalités stérile et ré-inoculé en conditions d'apport limité en oxygène (environ 55 $mg.kg^{-1}$) est cohérente avec les valeurs présentées dans le chapitre 4.

Les teneurs en $Cl_{OE1}$ mesurées par analyseur d'AOX pour les échantillons VF2014 (deuxième incubation) sont identiques et très faibles quelle que soit la modalité considérée (< 2,5 $mg.kg^{-1,}$ conditions aérobies et anaérobies). Les teneurs mesurées sont en accord avec celle obtenues avant incubation, juste après le prélèvement. De la même façon, ces résultats sont cohérents avec les travaux de Redon et al. (2012), qui trouvent que la proportion de $Cl_{OE1}$ dans des sols issus de 51 sites français est inférieure à 1%, même si dans nos sols, la proportion est légèrement plus importante (< 3%).

Les teneurs en $Cl_{ONE}$ mesurées pour les échantillons de sol des Vosges (VF2014 ; seconde incubation) stériles (irradiés) sans ajout de $Cl_{in}$ sont presque toujours identiques aux teneurs en $Cl_{TOT.}$ La dominance de la forme $Cl_{ONE}$ a été également observée pour les échantillons juste après leur prélèvement, et est en accord avec les travaux de Redon et al. (2012) où le $Cl_{ONE}$ des sols représente toujours environ 80 % du $Cl_{TOT}$.

Pour les modalités avec ajout de $Cl_{in}$, les teneurs en $Cl_{TOT}$ mesurées après incubation sont supérieures à celles mesurées pour les modalités sans ajout de $Cl_{in}$, et sont de l'ordre de grandeur attendu suite à l'ajout de Clin quelles que soient l'incubation et la méthode de mesure considérée.

### 5.4.2 Apports de la spectrométrie XANES à l'étude de la spéciation du chlore dans les échantillons de sol incubés

Concernant les spectres obtenus pour les standards par spectrométrie XANES, comme observé par Leri et al. (2007), le spectre du composé organique aliphatique (TCA) présente l'énergie d'ionisation Eo la plus faible et les spectres des composés inorganiques ($CaCl_2$ et $NH_4Cl$) sont décalés de 2 eV vers les plus hautes énergies. D'après Leri et al. (2007), le maximum de l'absorption (X1) est décalé d'environ 0,6 eV vers les hautes énergies pour les composés aromatiques (tetra et mono chlorophénols) par rapport aux composés aliphatiques (chlorodécane). Dans le cas de nos deux spectres de référence en chlore organique (CTCH et TCA), la différence de position en énergie des maxima d'absorption est relativement plus faible (0.3 eV). Cela suggère que la nature du ligand organique ne joue pas seulement sur l'énergie d'ionisation mais aussi sur les structures après seuil (structure obtenue après avoir atteint l'énergie d'ionisation E0). C'est également ce qu'avaient montré Leri et al. (2007) en comparant un phénol mono substitué et un phénol tétra-substitué.

L'origine de l'hétérogénéité des spectres obtenus suite à différentes mesures faite sur différentes prises d'essai d'un même échantillon reste inconnue. L'hypothèse de dégâts radiatifs a été éliminée, puisque le signal de la Figure 5. 7b est différent de ce qu'on obtient lorsque le signal évolue avec le temps lors d'une acquisition à température ambiante.

L'analyse des spectres obtenus par spectrométrie XANES montre quelques tendances, avec notamment (i) des valeurs de X1 et E0 qui se rapprochent des standards minéraux pour les échantillons avec ajout de Clin, (ii) des valeurs qui semblent un peu plus proches des standards organiques pour les échantillons de sol irradiés et réinoculés, (iii) des spectres des sols autoclavés qui ne semblent pas différents de ceux du sol initial, et (iv) le caractère plutôt aromatique des composés organo-chlorés présents dans les échantillons. Cependant, ces observations préliminaires mériteraient d'être confirmées par des études et des analyses complémentaires.

### 5.4.3 Influence du mode de stérilisation sur l'obtention des témoins abiotiques

Afin d'obtenir des témoins abiotiques, les échantillons de sol ont été stérilisés par autoclavage ou par irradiation.

Dans la première incubation, une contamination des sols autoclavés a été rapidement observée, lors des mesures d'émission de $CO_2$, probablement en liaison avec la manipulation des flacons. Ainsi, en fin d'incubation la quantité de $CO_2$ émise avait rejoint celle des échantillons autoclaves réinoculés. Cependant, les positions des énergies E0 et X1 mesurées par spectrométrie XANES pour les échantillons initiaux brut et pour les échantillons autoclavés sont identiques, suggérant que la stérilisation par autoclave ne modifierait pas les formes de chlore des échantillons.

Dans la deuxième incubation, où le sol a été irradié, la mesure de $CO_2$ montre une différence très significative dans l'émission de $CO_2$ entre les échantillons irradiés et les non irradiés. La faible émission de $CO_2$ pour les échantillons irradiés peut correspondre à du gaz piégé dans la porosité du sol et à la décarboxylation de la matière organique (Mc Namara et al.,, 2003). L'activité FDA mesurée pour les modalités ré-inoculées aérobies (6U), témoigne de la forte activité microbienne globale des sols. L'activité enzymatique FDA faible mesurée pour les modalités stériles (2U) pourrait être due à une activité enzymatique résiduelle après irradiation (Mc Namara et al.,., 2003), les enzymes pouvant rester actives pendant plusieurs semaines après stérilisation. Les autres activités enzymatiques mesurées (phosphatase, amino-peptidase, laccase), globalement toujours très faibles (<0,7 U), n'apportent pas d'information supplémentaire. Les activités enzymatiques mesurées à la fin de l'incubation 2 sont sensiblement différentes de celles mesurées sur les sols non inoculés, juste après prélèvements (chapitre 4). En effet, l'activité enzymatique FDA mesurée pour les échantillons VF est en moyenne sur les 3 années de prélèvement d'environ 1U, soit deux fois plus faible que celle mesurée sur les sols incubés en conditions stériles. A l'inverse, les autres activités sont beaucoup plus élevées lorsqu'elles sont mesurées juste après les prélèvements (en moyenne 0,5 U pour l'amino-peptidase ; 0,8U pour la phosphatase et 0,4 U pour la laccase). Cependant, les mesures des activités enzymatiques réalisées juste après prélèvement ont été

effectuées sur les sols frais. A l'inverse, avant la mise en place du dispositif d'incubation, les sols ont été préalablement séchés, ré-activés puis irradiés, ce qui peut contribuer à expliquer ces différences. D'après les mesures réalisées par spectrométrie XANES, les positions des énergies E0 et X1 pourraient être plus proches en moyenne des standards organiques que le sol initial. Cette observation serait à vérifier, mais Bank et al (2008) ont montré que l'irradiation modifiait la fraction organique du sol.

Ainsi la méthode de stérilisation des sols par irradiation a permis d'obtenir le sol stérile et de maintenir cette stérilité au cours de l'incubation, ce qui n'a pas été le cas avec l'autoclavage.

### 5.4.4 Effet de l'inoculation microbienne des sols sur l'évolution des formes de chlore

Dans la première incubation, comme les témoins abiotiques ont été contaminés, il n'est pas possible de conclure quant à un effet possible des l'activité microbienne sur la formation de chlore organique.

Dans la deuxième incubation, avec le sol VF2014 en absence de chlore ajouté, les résultats ne montrent pas de différence significative de teneurs en $Cl_{ONE}$ entre la modalité stérile et la modalité inoculée. Ceci suggère que l'inoculation microbienne n'a pas contribué à la formation significative de $Cl_{ONE}$ au cours de l'incubation, ou du moins pas de formation mesurable par les méthodes d'analyses utilisées. Pourtant, lors de cette seconde incubation, l'émission importante de $CO_2$ au cours du temps pour les modalités ré-inoculées confirme le développement et l'activité des microorganismes dans le sol. Les mesures réalisées par spectrométrie XANES sur ces échantillons, bien qu'à conforter, ne montrent pas de différences claires entre les positions des énergies E0 et X1 pour les échantillons irradiés ré-inoculés et irradiés.

En revanche, l'ajout de Clin a permis de mettre en évidence la formation d'une quantité de $Cl_{ONE}$ significativement plus élevée dans le sol réinoculé par rapport au sol stérile, témoin

abiotique. Ce résultat montre un rôle significatif de l'activité microbienne sur la formation de chlore organique.

Les émissions de $CO_2$ sont plus importantes pour les modalités avec ajout de $Cl_{in}$ que pour les modalités sans ajout pour les échantillons des Vosges de la seconde incubation. L'activité de respiration des microorganismes semble donc plus importante pour les sols ayant subi un ajout de $Cl_{in,}$ ce qui pourrait contribuer à expliquer en partie l'augmentation de la teneur en $Cl_{ONE}$. Cependant, l'activité enzymatique, elle, n'est pas augmentée en présence de Clin, et l'activité d'hydrolyse de la FDA est même significativement plus faible en présence de Clin ajouté. Bastviken et al. (2007) ont montré la formation de 20 % $Cl_{ONE}$ en un temps encore plus court (15 jours) mais dans une expérience utilisant un traçage à l'aide de $^{36}Cl$, ce qui augmente la résolution des mesures de chlore. Cependant, cette expérience ne comportait pas de témoins abiotiques. Bastviken et al. (2009) trouvent que 7% du $^{36}Cl$ ajouté initialement sous forme inorganique dans une experience de traçage est retrouvé sous forme de $Cl_{FA-HA}$ après 15 jours. Dans un sol non sterile, Rohlenova et al. (2009) ont montré la formation de 3 à 4 % de chlore associé au fractions humiques après la mise en place d'un traçage au $^{36}Cl$.

La comparaison des résultats obtenus sur ces échantillons par spectrométrie XANES semble confirmer le maintien d'une grande partie du $Cl_{in}$ ajouté sous une forme inorganique. En effet, les positions des énergies E0 et X1 des échantillons avec ajout de $Cl_{in}$ sont plus proches des énergies des standards en $Cl_{in}$ que les échantillons sans ajout de $Cl_{in}$.

### 5.4.5 Effet de l'anaérobiose sur l'évolution des formes de chlore

L'incubation des sols en conditions anaérobies n'influence pas significativement les teneurs en chlore mesurées. En effet, pour la seconde incubation, les teneurs en $Cl_{ONE}$ mesurées par analyseur d'AOX sont identiques entre les différentes modalités. La différence significative observée entre les modalités stériles et les modalités ré-inoculées avec ajout de Clin en conditions aérobies n'est donc pas obtenue en conditions anaérobies. Bastviken et al. (2009) précisent que la formation de $Cl_O$ a principalement lieu en conditions aérobies. Par ailleurs, Sohn et al. (2016), montrent la déhalogénation de composés organochlorés de sédiments de rivière par les microorganismes en conditions anaérobies. Si le processus de

déhalogénation a lieu principalement en conditions anaérobies, alors aucune formation de $Cl_O$ ne peut être observée. A l'inverse, les quantités de $Cl_O$ diminuent.

## 5.5 Conclusion

Ces expériences d'incubation ont permis de mettre au point un protocole d'incubation des sols, permettant de comparer des témoins abiotiques et des modalités biotiques, dans des conditions similaires (en évitant de limiter le biais de la stérilisation aux seuls témoins abiotiques) pour suivre les teneurs en chlore organique. La stérilisation par irradiation s'est révélée plus efficace pour maintenir stériles les échantillons témoins tout au long de l'expérience. Les mesures des teneurs en chlore (par activation neutronique et par analyseur d'AOX) n'ont pas permis de montrer une évolution des formes de $Cl_O$ au cours du temps, quelles que soient les modalités et l'incubation considérées, excepté dans la seconde incubation en conditions aérobies, où la teneur en $Cl_{ONE}$ des modalités ré-inoculées avec ajout de Clin est significativement supérieure à celle des modalités stériles. Pour le sol des Vosges, l'action de l'inoculation microbienne sur la formation de $Cl_O$ n'a pu être mise en évidence qu'avec l'ajout de $Cl_{in}$ . En revanche, l'ajout de $Cl_{in}$ ainsi que la mise en incubation des sols en conditions anaérobies ne semble pas avoir d'influence sur la formation de $Cl_O$ au cours du temps. Les analyses réalisées par spectrométrie XANES sont à poursuivre, car elles ont à ce stade indiqué quelques tendances, mais ont surtout montré une certaine hétérogénéité dans les échantillons et n'ont pas mis en évidence de modification significative des formes de chlore après incubation des sols sous différentes conditions.

Afin d'atteindre une meilleure précision dans l'analyse du chlore, et comme d'autres auteurs l'ont fait précédemment, l'utilisation d'un traçage peut être envisagé (Hoekstra et al. 1998, Bastviken et al, 2007). C'est pourquoi une nouvelle expérience d'incubation a été envisagée, dans les conditions utilisées au cours de la seconde incubation (présentée précédemment), en couplant un enrichissement du sol avec un traceur isotopique naturel ($^{37}$Clin) avec des mesures par ICP MS HR. Cette expérience fait l'objet du chapitre suivant (chapitre 6).

# Chapitre 6

## Contribution de l'activité microbienne a la formation de chlore organique dans un sol forestier lors d'une incubation avec du $^{37}Cl$ comme traceur.

# 6 Contribution de l'activité microbienne a la formation de chlore organique dans un sol forestier lors d'une incubation avec du $^{37}Cl$ comme traceur.

Dans les incubations réalisées dans le chapitre précédent, nous avons montré une augmentation de la teneur en $Cl_{one}$ dans le sol VF réinoculé après irradiation et incubé avec un ajout de Clin par rapport au sol irradié. Cependant l'analyse par AOX ne permettait pas de détecter spécifiquement la formation de Clone à partir du Clin ajouté. D'autres auteurs avaient montré que la chloruration pouvait être liée à l'activité microbienne en utilisant un marquage avec du $^{36}Cl$. Dans l'expérience présentée dans ce sixième chapitre, une incubation a été réalisée avec un marquage au $^{37}Cl$ des échantillons du sol stérilisé et ré-inoculé ou non et les analyses de chlore ont été réalisées par ICP MS HR (chapitre 2.5).

Cette expérience avait pour objectif de préciser les contributions biotiques et abiotiques au processus de chloruration, et plus précisément : (a) de préciser le rôle des microorganismes dans le processus de formation du $Cl_O$, et (b) secondairement de tester une nouvelle méthode faisant intervenir du $^{37}Cl$ pour suivre la dynamique du chlore dans les sols.

Pour la mise en place de cette expérience, les échantillons de sol MF2014 ont été préalablement stérilisés par irradiation aux rayonnements gamma puis enrichis en $Na^{37}Cl$ (61mg $^{37}Cl.kg^{-1}$). L'avantage de l'utilisation du traceur non radioactif $^{37}Cl$ réside principalement dans le fait qu'il ne nécessite pas de précautions de manipulations particulières. Cette expérience a été menée en deux parties.

Pour la première partie de l'expérience, les échantillons de sols ont été soit directement prélevés après l'ajout (T0), soit mis en incubations en conditions stériles et en conditions aérobies pendant 15 jours à 28°C (T1). Le but de cette première étape était de déterminer la répartition des formes de chlore dans le sol stérilisé juste après l'ajout de $^{37}Cl$ et leur évolution lors d'une incubation en conditions abiotiques.

Pour la deuxième partie, les échantillons de sol ont été mis en incubation selon deux modalités : stérile (non ré-inoculé) ou ré-inoculé avec les bactéries autochtones (Binet et al., 2003, chapitre 2.2). L'ensemble des flacons a été mis en incubation en conditions aérobies. La moitié des flacons a été arrêtée après 15 jours d'incubation (T1) et l'autre moitié après 3 mois (T2). Cette deuxième étape avait pour objectif de mettre en évidence une évolution de la

répartition des teneurs en chlore dans le sol en présence d'activité microbienne au cours du temps.

Pour les deux parties de l'expérience, l'émission de $CO_2$ a été mesurée tous les deux jours au cours de l'incubation. Après incubation, les teneurs en chlore traceur et en chlore naturel ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{E1}$, $Cl_{E2}$ et $Cl_{FA-HA}$) obtenues après application du protocole de Bastviken et al. (2007) ont été mesurées par ICP MS HR après minéralisation à l'aide d'une solution de TMAH (chapitre 2.3). Par ailleurs, l'activité microbienne des sols a été quantifiée à la fin de l'incubation grâce à la mesure de l'activité enzymatique FDA (chapitre 2.3).

Les résultats montrent après incubation des sols (T1 et T2) que les teneurs en $Cl_{ONE}$ naturel sont significativement plus élevées pour les modalités ré-inoculées que pour les modalités stériles. Ces résultats permettent de mettre en évidence que les microorganismes des sols contribuent à la formation de $Cl_O$ (processus de chloruration). Concernant le chlore traceur, des tendances similaires ont été observées, bien que les différences ne soient pas significatives.

En revanche, les teneurs en $Cl_{ONE}$ naturel sont identiques entre T1 (15 jours) et T2 (90 jours). L'émission de $CO_2$ ainsi que l'activité enzymatique FDA, qui sont plus faibles après 90 jours qu'après 15 jours d'incubation, et qui suggèrent une baisse de l'activité microbienne, probablement due à la diminution de la disponibilité des nutriments au cours du temps, pourraient contribuer à expliquer ce résultat. Une autre hypothèse serait un recyclage rapide du $Cl_O$ formé.

Par ailleurs, les résultats ont également permis de mettre en évidence la formation de $Cl_{ONE}$ traceur d'environ 6% immédiatement après ajout de $^{37}Cl$ (modalités stériles). L'émission de $CO_2$ ainsi que l'activité enzymatique FDA mesurées pour ces sols stérilisés confirment le maintien des conditions stériles. Ces résultats suggèrent ainsi la formation rapide de $Cl_O$ par des processus abiotiques.

En conclusion, l'étude permet de mettre en évidence la formation de $Cl_O$ au cours du temps, en relation avec les activités microbiennes des sols, mais indique aussi la formation de

$Cl_O$ en conditions abiotiques, qui mériterait d'être précisée. En revanche, cette expérience n'a pas permis de discriminer les taux de chloruration et de déhalogénation dans ces deux conditions.

**Contribution of microbial activity to formation of organically bound chlorine during batch incubation of forest soil using $^{37}Cl$ as a tracer**

Aurélie Osswald, Anne Poszwa, Maïté Bueno, Carine Arnaudguilhem, David Billet, Yves Thiry, Corinne Leyval

## 6.1 Introduction

Chloride ($Cl^-$) has long been considered as the main chlorine form in soils. This inorganic form of chlorine was supposed to have low affinity for soil solid phases and was then used as a tracer of water movements (Herczeg et al., 1997). The major chlorine fluxes in the environment corresponded to inorganic chlorine (Öberg et al, 2005) but organic chlorine forms, mainly of high molecular weight (Hjelm and Asplund, 1995), are also present in the environment. Anthropogenic activities release various organic chlorine molecules (aliphatic/aromatic) that pose an environmental issue. Industrial by-products, such as persistent organic pollutants extensively used in agriculture, are a possible source of chlorinated compounds in soils (Meijer et al., 2003).

Anthropogenic organic chlorine forms have been considered as the only source of organic chlorine for a long time. However, some studies show that organohalogens are naturally produced in the environment (Asplund and Grimvall., 1991; Clarke et al., 2009). More precisely, organically-bound chlorine pools are as abundant as, or even larger, than the inorganic chlorine pools in natural soils (Bastviken et al., 2007; Svensson et al., 2010). The non-extractable organic chlorine pool can range between 11 and 100% of total chlorine across a whole soil profile (Redon et al., 2011). But in general, the highest proportions of non-extractable organic chlorine (more than 80% of the total chlorine pool) are found in the organo-mineral surface layers of soils (Redon et al., 2012).

Natural chlorination is a widespread process observed by different authors in various contexts. For example, Redon et al. (2011) showed organically bound chlorine in 51 sites representative of major soils under temperate climate. Nevertheless, higher total and organic

chlorine contents have been estimated in forest soils, with lower pH, as compared to cultivated and grassland soils (Öberg et al., 1997; Redon et al., 2011, 2012). In fact, organic chlorine concentrations seem to be correlated with organic carbon contents, and linked to organic matter turnover in soils (Johansson et al., 2003; Lovett et al., 2005).

Chlorination can be measured after the action of many soil organisms (Johansson et al., 2000) like white-rot fungi (Öberg et al., 1997) or basidiomycetes (Verhagen et al., 1998), for example during lignin biodegradation or tree leaf decay (Leri and Myneni, 2010). The formation of organically bound chlorine in soils seems optimal at 20°C and is reduced in anoxic conditions (Bastviken et al., 2009). Chlorination is therefore reported as primarily mediated by microbial activity, and more precisely mainly by haloperoxidase (Bastviken et al., 2009; Bengtson et al., 2009), and also by halogenase and methyltransferase enzymes (Van Pee and Unversucht, 2003).

Chlorination dynamics is also linked to plant activity (Winterton, 2000) and related to vegetation species through biomass type, content and turnover (Montelius et al., 2015): chloride is an essential nutrient for plants, which acts as a cofactor of enzymes involved in photosynthesis. Chlorination through other processes, including possible abiotic reactions, also occurs. For example, the addition of $Fe^{3+}$ to humic substances under abiotic conditions increased production of chloroacetates (Keppler et al., 2000). Besides, formation of organically bound chlorine in the soil may be counterbalanced by a mineralization process, causing organic chlorine degradation back into inorganic chlorine (Öberg et al., 2005; Montelius et al., 2016). Both chlorination and dechlorination processes seem to occur concomitantly in soils (Asplund and Grimvall, 1991).

Chloride contents are usually measured by ion chromatography when in liquid samples (Putschew et al., 2003b). In solid matrices, contents are often determined by AOX (Öberg et al., 1997) or by neutron activation (Redon et al., 2011) although other methods are also used like microwave combustion (Pereira et al., 2011), ion chromatography after combustion (Putschew et al., 2003a) or XANES spectroscopy (Myneni, 2002). Spiking with $^{36}Cl$ or $^{37}Cl$ and isotope monitoring by Liquid Scintillation Counting or GC-MS analysis, respectively (Bastviken

et al., 2007; Hoekstra et al, 1999), were used to obtain details about the chlorine transformation process over time.

Many studies have investigated organically bound chlorine formation in soils, showing that it is primarily of biotic origin. These studies indirectly controlled microbial activity by temperature effect and had no real abiotic control (e.g. Bastviken et al., 2007, 2009) or compared sterilized to non sterilized soil (e.g. Rohlenova et al., 2009) with possible side effect of sterilization (McNamara et al., 2003). There is still a need to improve our understanding of the relative importance of the biotic and abiotic chlorination processes in soils, and of chlorination rates. The aim of this study was to highlight the role of microorganisms in the formation of organically bound chlorine in soils by comparing sterile to microbiologically active soil, and measuring the formation of organically bound chlorine and microbial activity. We tested a new method using inorganic $^{37}Cl$ enrichment combined with HR-ICP-MS to monitor the fate of inorganic chlorine in the soil and the formation of organically bound chlorine. A $^{37}Cl$ -spiking batch experiment was performed with a forest soil incubated for two time periods in abiotic (irradiated) and biotic (irradiated and then inoculated with the soil microflora) conditions. The non-radioactive $^{37}Cl$ tracer requires no special handling care, and $^{37}Cl$ is expected to have the same behavior as natural inorganic chlorine in soils. Chlorine contents in the different chlorine fractions (total, inorganic, organic) as well as microbiological parameters were measured in soil.

## 6.2 Materials and methods

### 6.2.1 Soil sampling and characterization

The experiment was carried out with sample from a forest soil (calcic cambisol in World Reference Base) collected in March 2014 at Bure (Meuse, France). The soil had a mull-type humus with a thin litter layer. The litter was removed, and a composite sample of the organo-mineral layer (A1, 0-20 cm) was collected, homogenized, air-dried for two weeks, sieved to 2 mm, and then stored before further analysis and experiments. The soil horizon had a slightly acidic pH (5.1), a cation exchange capacity of 11.4 $cmol^{+}\ kg^{-1}$ determined by the Metson method (NF X 31-130). Carbon and nitrogen contents measured after dry combustion by CHNS

(CE Instruments) were 3.21 % and 0.28 %, respectively, hence a C/N ratio of 11.3. Phosphorus content determined by the Olsen method (NF ISO 11263) was 0.009 g $kg^{-1}$, and soil base cation saturation ratio was 23%. The soil texture was clay-loam, with 25 % of fine silt (particle size of 2-20 µm) and 41.5 % of clay (< 2 µm).

### 6.2.2 Incubation experiments

The air-dried soil samples were sterilized by irradiation (45-55 kgray, Gamma rays - Ionisos laboratoty, Dagneux, France) prior to the experiments. The amount of soil needed for each replicate was enclosed in double plastic bags before irradiation to prevent soil contamination during the experimental set up.

A first experiment was performed to estimate the initial distribution of chlorine (inorganic and organic forms) and its evolution in abiotic conditions. Twenty-five grams of sterilized soil samples were placed in 500-mL vials (6 replicates) and spiked with 2 mL of 1.25 g $L^{-1}$ $Na^{37}Cl$ solution (98% $^{37}Cl_{in}$) corresponding to a concentration of about 61 mg $^{37}Cl_{in}$ $kg^{-1}$ of dry soil. The soil samples were homogenized by stirring with a sterile syringe needle and were incubated at 28° C. After 2 hours (T0) or 15 days (T1), 3 replicate soil samples were dried, ground, and stored before further extractions and analyses.

The fate of added $Cl_{in}$ in the soil under abiotic and biotic conditions was studied in a second experiment. This experiment consisted of two treatments with 4 replicates: (i) sterilized soils and (ii) sterilized soils inoculated with indigenous bacteria. Twenty-five-gram of sterilized soil samples were placed in 500-mL vials. Half of the vials were inoculated with a bacterial suspension extracted from the non-sterilized soil sample. The bacterial suspension was obtained by stirring 10 g of non-sterilized soil with 90 mL of distilled water for one hour, then sieving through a 5 µm filter (Leyval and Binet, 1998). The resulting solution was centrifuged at 1,000 x g for 1 min to break down the remaining soil particles, then centrifuged at 10,000 x g for 10 min to collect bacterial cells in the vial bottom, and finally diluted to reach a final concentration of $1.10^8$ bacterial cells per gram of soil. All vials (containing sterilized or inoculated soil) were then enriched with 2 mL of 1.25 g $L^{-1}$ $Na^{37}Cl$ solution (98% $^{37}Cl_{in}$) and homogenized as in the first experiment. The soil vials were incubated at 28 °C for 15 (T1) and

90 (T2) days. Aliquots of fresh soil samples from each vial were analyzed for microbial activity (see next paragraph). The remaining soil in each vial was air-dried and ground before analysis.

### 6.2.3 Microbial activity analyses

A small proportion of irradiated soil (without $^{37}Cl$) was spread on a nutrient medium (Plate Count Agar, Sigma-Aldrich) and incubated for 48h at 28 °C to check that the soil was sterile.

The $CO_2$ released from each soil vial in both incubation experiments was measured every two or three days throughout the incubation periods using an infrared spectrophotometer gas analyzer (BINOS 1004), and was expressed as µg C-$CO_2$ $g^{-1}$ of dry soil (Quantin et al. 2005). These measurements were followed by vial aeration for 15 min under a sterile hood. Fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis was measured at the end of the second experiment (T15 and T90) for all samples as described in Green et al. (2006) and Stauffer et al. (2014). Fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis involves ubiquitous esterase, lipase and protease activity and therefore reflects global soil microbial activity. Briefly, 2 grams of fresh soil were stirred with 40 mL of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.6) using an orbital shaker (Stuart Scientific SI50) for 10 min (250 rpm) and sonicated. The analysis was performed in black 96-well microplates (Greiner bio-one, Ref 655076) by mixing 25 µL of soil suspension with 195 µL of potassium phosphate buffer solution and 30 µL of fluorescein diacetate solution (Sigma-Aldrich Co.Ltd, 400 µg $mL^{-1}$). The measurements were performed with a spectrophotometer (Xenious FLX, Safas, Monaco). The concentration of fluorescein released was determined by external calibration (0 to 6 µg $mL^{-1}$ range).

### 6.2.4 Chlorine pool extraction

Extraction was performed according to Bastviken et al. (2007) on 3 g dry soil samples to separate inorganic from organic chlorine forms (Figure 6. 1). Briefly, several agitation and centrifugation steps were performed with water and $KNO_3$ solution. The supernatants (extracts) were pooled together ($Cl_{E1}$: extract 1). The chlorine fraction remaining in the residual soil corresponded to the non-extractable organic chlorine ($Cl_{NEO}$). Extract 1 ($Cl_{E1}$) was

separated into inorganic ($Cl_{in}$) and extractable organic chlorine ($Cl_{EO1}$) using activated carbon filtration. Extractable organic chlorine ($Cl_{EO1}$) was retained in the activated carbon, while inorganic chlorine ($Cl_{in}$) remained in the filtrate solution. To separate the non-extractable chlorine linked to humic and fulvic acids ($Cl_{FA-HA}$) from microbial chlorine ($Cl_M$), a sonication and water extraction step was carried out. The chlorine contents measured in the extracts ($Cl_{E2}$) were assumed to represent chlorine in microbial cells ($Cl_M$) and a second part of extractable organic chlorine ($Cl_{EO2}$), that was separated on activated charcoal. The chlorine in residual soil corresponded to chlorine associated to humic and fulvic acids ($Cl_{FA-HA}$). Detailed procedures are described in Bastviken et al.(2007).

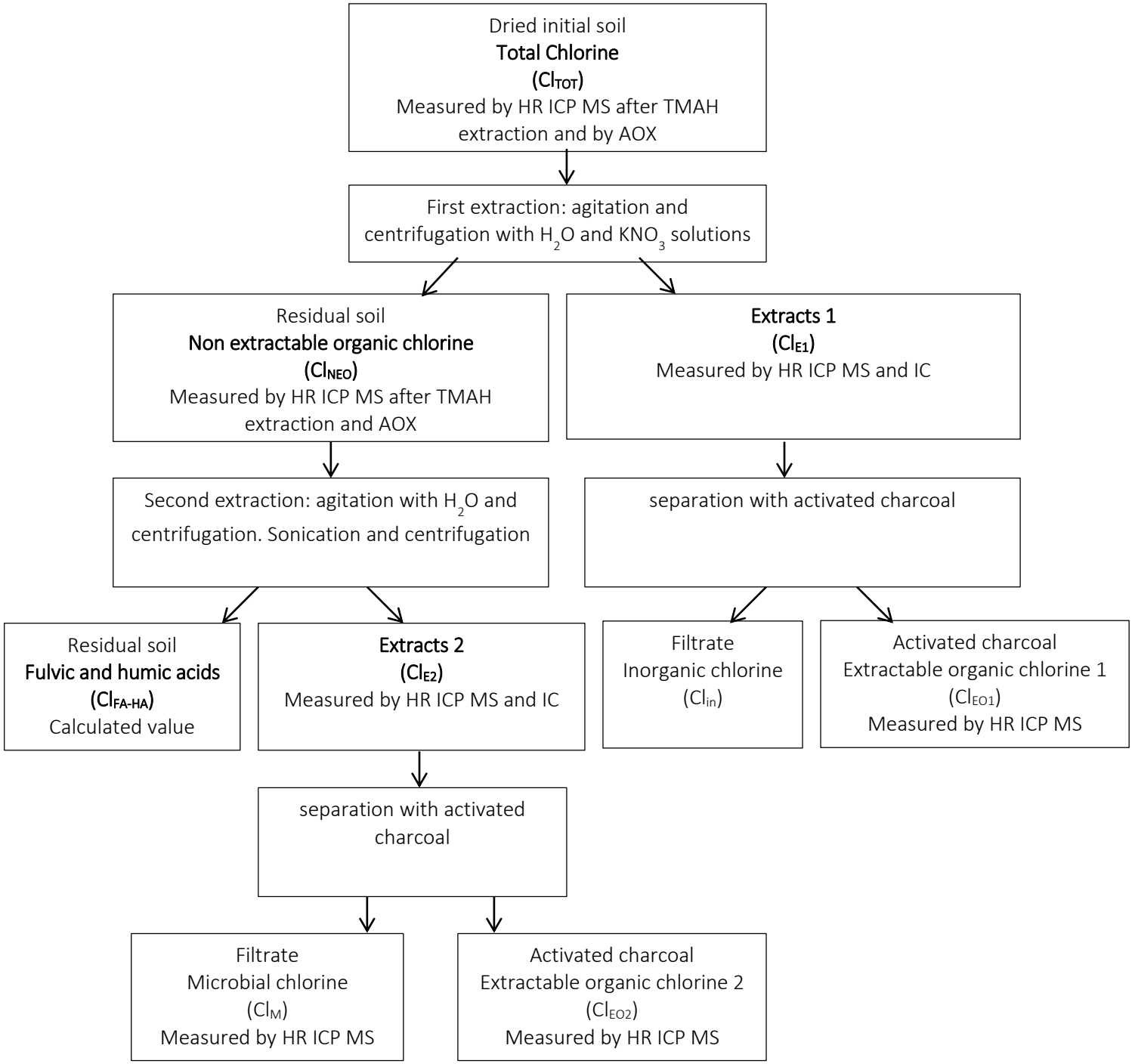



Figure 6.1. Chlorine fraction extraction steps applied in our study based on Bastviken et al. (2007). TMAH extraction transforms solid phases into liquids. Analysis by AOX and by IC (ionic chromatography) provided access to the sum of natural chlorine and tracer chlorine. HR-ICP-MS analysis allowed us to evaluate tracer chlorine contents and natural chlorine contents separately. The $Cl_{FA-HA}$ fraction was obtained by applying the following formula: $Cl_{NEO}$ - $Cl_{E2}$. The chlorine fractions measured and shown in this study are indicated in bold letters.

For HR ICP MS analysis of total chlorine ($Cl_{TOT}$), non-extractable organic chlorine ($Cl_{NEO}$) and extractable organic chlorine ($Cl_{EO1}$, $Cl_{EO2}$), 200 mg of dried and ground solid samples were firstly extracted with 1 mL tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solution (25% in $H_2O$, TraceSELECT, Fluka) and 4 mL of milli-Q water (Watts and Mitchell, 2009), heated at 80°C for 180 min, filtered at 0.45 µm through an acetate filter and then diluted 50 times with milli-Q water. Total chlorine contents in the liquid samples ($Cl_{E1}$ and $Cl_{E2}$) were determined by HR-ICP-MS after a five-fold dilution.

## 6.2.5 Chlorine analyses

### 6.2.5.1 Natural and tracer chlorine analyses by HR-ICP-MS.

Tracer chlorine refers to $^{37}$Clin added to the soil, while natural chlorine refers to naturally occurring chlorine in the soil. A Thermo Scientific Element XR double focusing sector field inductively coupled plasma mass spectrometer (Thermo Scientific, Germany) was used at a high resolution ($m/\Delta m$> 10,000) to resolve the spectral interferences of the $^{35}$Cl and $^{37}$Cl chlorine isotopes. Liquid samples were introduced into the plasma through a Scott spray chamber cooled at 2°C and a Micromist quartz concentric nebulizer (Glass Expansion, Hawthorn, Australia). The typical instrument conditions and acquisition parameters are listed in the Supplemental Material 1. The instrumental detection limit for isotope dilution (calculated from Yu et al., 2002) with the $^{37}$Cl tracer was 0.7 µg $L^{-1}$, that is 0.9 mg $kg^{-1}$ in solid fractions ($Cl_{TOT}$, $Cl_{EO1}$, $Cl_{EO2}$ and $Cl_{NEO}$), and 0.07-0.09 mg $kg^{-1}$ in liquid fractions ($Cl_{E1}$ and $Cl_{E2}$), taking into account sample dilution, and the solid mass and volume used for extraction.
Natural chlorine and $^{37}$Cl tracer (98 % of $^{37}$Cl and 2 % of $^{35}$Cl) concentrations were determined by reverse isotope dilution (RID), with a certified natural abundance chlorine standard used as a spike, using equations 1 to 3 according to Hintelmann and Evans (1997):

$$C = \frac{C' \times w' \times W_{at} \times \left(R \times {}^{37}A_{natural} - {}^{35}A_{natural}\right)}{w \times W'_{at} \times \left({}^{35}A_{sample} - R \times {}^{37}A_{sample}\right)} \quad (1)$$

With:

- *C:* chlorine concentration in the sample
- *C':* chlorine concentration of the standard (natural abundance) spiked into the sample
- *w, w':* sample and spike masses
- $W_{at}, W_{at}'$: atomic masses of chlorine in the sample and in the spike
- *R :* $^{35}Cl/^{37}Cl$ ratio measured after spiking
- $^{37;35}A_{sample}$ : abundance of 37 or 35 isotopes in the sample before spiking
- $^{37;35}A_{natural}$: abundance of 37 or 35 isotopes in the certified natural standard used for the spike (74.75% of $^{35}Cl$ and 25.25% of $^{37}Cl$)

$$[\mathrm{Cl}_{\mathrm{natural}}] = \frac{\mathrm{C} \times {}^{35}\mathrm{A}_{\mathrm{sample}}}{{}^{35}\mathrm{A}_{\mathrm{natural}}} \qquad (2)$$

$$[\mathrm{Cl}_{\mathrm{tracer}}] = \frac{\mathrm{C} \times {}^{35}\mathrm{A}_{\mathrm{sample}} - \left[\left(\frac{{}^{35}\mathrm{A}_{\mathrm{natural}}}{{}^{37}\mathrm{A}_{\mathrm{natural}}}\right) \times \mathrm{C} \times {}^{37}\mathrm{A}_{\mathrm{sample}}\right]}{\left(\frac{{}^{35}\mathrm{A}_{\mathrm{tracer}}}{{}^{37}\mathrm{A}_{\mathrm{tracer}}}\right) - \left(\frac{{}^{35}\mathrm{A}_{\mathrm{natural}}}{{}^{37}\mathrm{A}_{\mathrm{natural}}}\right)} \qquad (3)$$

With:

- $^{37;35}A_{tracer}$: abundance of isotopes 37 or 35 in the tracer solution (2% of $^{35}Cl$ and 98% of $^{37}Cl$)

The optimal spike-to-sample ratio was calculated for each sample to obtain minor error propagation during isotope dilution calculation (Hoelzl et al., 1998). All isotope ratios were further corrected for mass bias using a linear model after determining the mass bias factor based on the natural chlorine abundance in standard (Heumann et al., 1998). Total uncertainties associated to chlorine concentrations were defined by combining analytical uncertainties to those related to the means and standard deviations of the values of the

incubation replicates (n=3). Analytical uncertainties were calculated according to the random error propagation method at each calculation step (details in Supplemental Material 2).
The $Cl_{NEO}$ fractions contained the $Cl_{FA-HA}$ and $Cl_{E2}$ fractions. $Cl_{FA-HA}$ contents were therefore calculated as $Cl_{FA-HA}$= $Cl_{NEO}$ – $Cl_{E2}$ for natural chlorine and $^{37}Cl$ tracer.

#### 6.2.5.2 Total (natural and tracer) chlorine analyses by AOX and ion chromatography

Chlorine contents in solid samples (without distinguishing between natural and tracer chlorine) were also measured directly by AOX (Xplorer TE Instruments) (Bastviken et al., 2007). Chloride contents in the liquid samples ($Cl_{in}$, $Cl_{E1}$ and $Cl_{E2}$) (without distinguishing between natural and tracer chloride) were also measured by ion chromatography (Dionex ICS 3000) using polymeric AS11-HC analytical column with isocratic separation.

### 6.2.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using XLSTAT in Microsoft Excel© software. Mean data were compared using two-way ANOVAs followed by Tukey's post hoc test.

## 6.3 Results

Natural and tracer $Cl_{EO1}$, $Cl_{EO2}$ and $Cl_M$ contents were measured by HR-ICP-MS, but they were below the detection limit (0.9 mg kg for $Cl_{EO}$ and 0.09 mg kg for $Cl_M$) and are therefore not shown in the study. No microbial colonies were observed on the agar plates indicating that the irradiated soil was sterile.

### 6.3.1 Chlorine distribution in the sterilized forest soil samples.

The natural $Cl_{TOT}$ content measured in the irradiated soil by HR-ICP-MS after spiking (T0) was about 40 mg $kg^{-1}$. The natural $Cl_{NEO}$ content was about 14 mg $kg^{-1}$, i.e. 34 $\pm$ 8 % of the natural $Cl_{TOT}$ content (Table 6. 1). The tracer $^{37}Cl_{NEO}$ concentration just after spiking (T0) was about 3 mg $kg^{-1}$, that is 6 $\pm$ 4% of tracer $^{37}Cl_{TOT}$. At T0, the tracer $^{37}Cl_{E1}$ chlorine content measured was about 40 mg $kg^{-1}$. The tracer $^{37}Cl_{E2}$ and $^{37}Cl_{FA-HA}$ contents were 0.9 mg $kg^{-1}$ (1.9

± 1.4 % of tracer $^{37}Cl_{TOT}$) and 2.0 mg kg$^{-1}$ (4.4 ± 4.2 % of tracer $^{37}Cl_{TOT}$), respectively, immediately after spiking (T0).

Table 6.1. Natural and tracer $^{37}$Cl chlorine contents measured by HR-ICP-MS in the irradiated soil after $^{37}$Clin spiking (T0) and after 15 days of incubation in abiotic conditions (T1) . Mean ± standard deviations (n = 3). Values with the same letter were not significantly different between T0 and T1 at P<0.05 (one-way ANOVA).

| | | $Cl_{TOT}$ (mg kg$^{-1}$) | $Cl_{NEO}$ (mg kg$^{-1}$) | $Cl_{E1}$ (mg kg$^{-1}$) | $Cl_{E2}$ (mg kg$^{-1}$) | $Cl_{FA-HA}$ (mg kg$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Natural chlorine** | **T0** | 41 ± 12 a | 14 ± 4 a | 20 ± 2 a | 3 ± 1 a | 11 ± 5 a |
| | **T1** | 36 ± 2 a | 14 ± 3 a | 19 ± 2 a | 4 ± 1 a | 10 ± 4 a |
| **Tracer chlorine** | **T0** | 48 ± 3 a | 3 ± 2 a | 37 ± 7 a | 0.9 ± 0.6 a | 2.0 ± 2 a |
| | **T1** | 56 ± 6 a | 3 ± 2 a | 46 ± 6 a | 1.1 ± 0.5 a | 2 ± 2 a |

The effect of irradiation on chlorine content was also checked by comparing the $Cl_{TOT}$ and $Cl_{NEO}$ contents obtained by AOX for irradiated and non-irradiated soil samples (without tracer chlorine). The $Cl_{TOT}$ content (63 ± 5 and 49 ± 4 mg kg$^{-1}$ in irradiated and non-irradiated soil, respectively) and $Cl_{NEO}$ content (63 ± 13 and 40 ± 6 mg kg$^{-1}$, respectively) were significantly higher when the soil was irradiated. However, irradiation did not seem to change natural chlorine distribution considering extractable ($Cl_{E1}$) and organic non extractable ($Cl_{NEO}$) proportions.

### 6.3.2 Chlorine distribution in the sterilized soil after two weeks of incubation in abiotic conditions

Fifteen days after soil $^{37}Cl_{in}$ spiking (T1) and incubation in abiotic conditions, the natural and tracer chlorine concentrations in the different fractions ($Cl_{TOT}$, $Cl_{NEO}$, $Cl_{E1}$, $Cl_{E2}$ and $Cl_{FA-HA}$) were not significantly different from the corresponding values at T0 (Table 6. 1). The measurement of $CO_2$ for the irradiated soil after two weeks showed no significant emission (data not shown).

### 6.3.3 Proportion of added $^{37}$Clin incorporated in organically bound chlorine after incubation with or without microbial inoculation

Measurements of $CO_2$ emissions during the incubation period of the second experiment showed a slight increase under abiotic conditions (Figure 6. 2). Between T0 to T1 in abiotic conditions results were similar to those obtained during the first experiment. In the inoculated treatments, $CO_2$ emission increased over time to reach high values of about 8000 µg C-$CO_2$ $g^{-1}$ soil (Figure 6. 2). The curve showed an exponential phase followed by a slower emission rate.

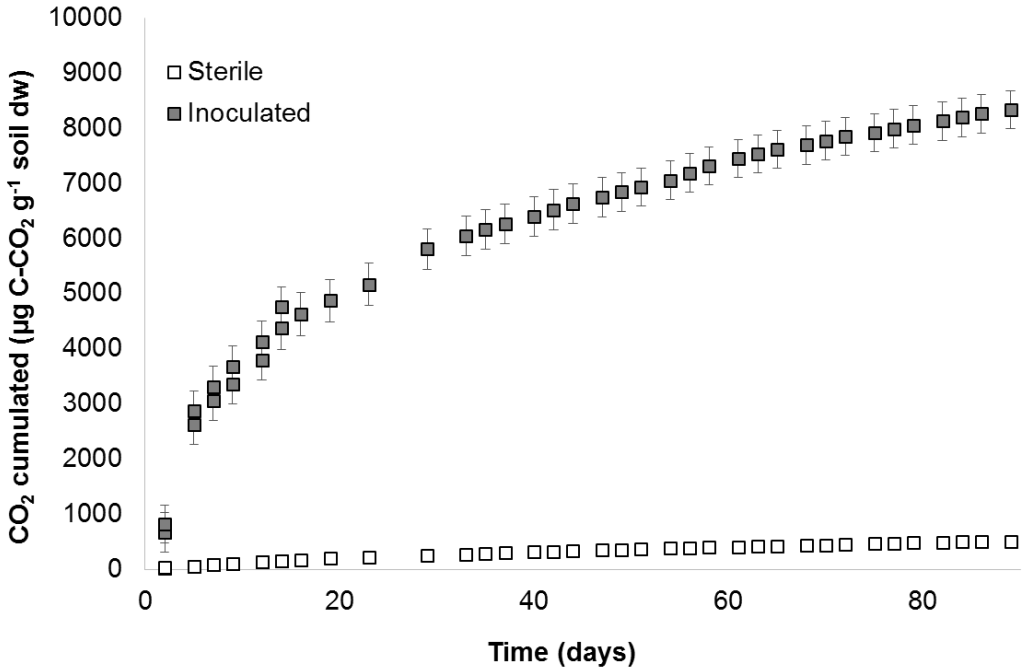



Figure 6.2. $CO_2$ emission over time during the incubation of microorganism-inoculated and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ (n = 4). Error bars represent standard deviations. From day 2 to day 15, the two series of measurements correspond to T1 and T2 samples.

FDA enzymatic activity was low (less than 1U) in sterile soil at T1 and T2 (Figure 6. 3). It was significantly higher in the inoculated soil than in sterile soil, and was significantly higher at T1 than at T2.

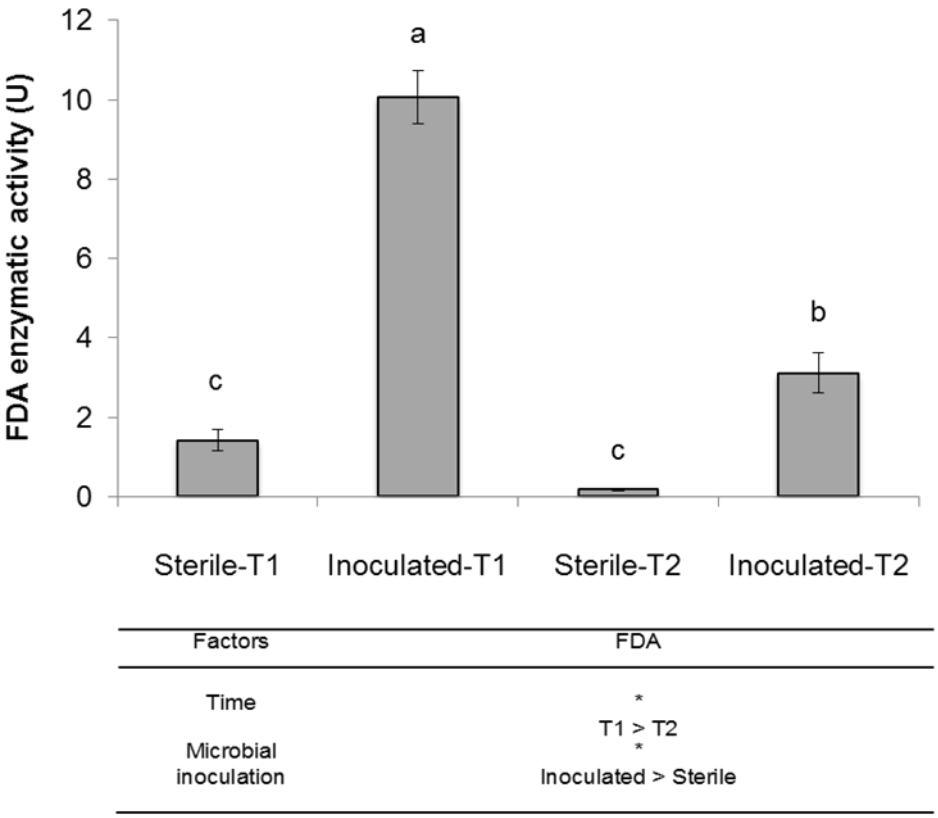
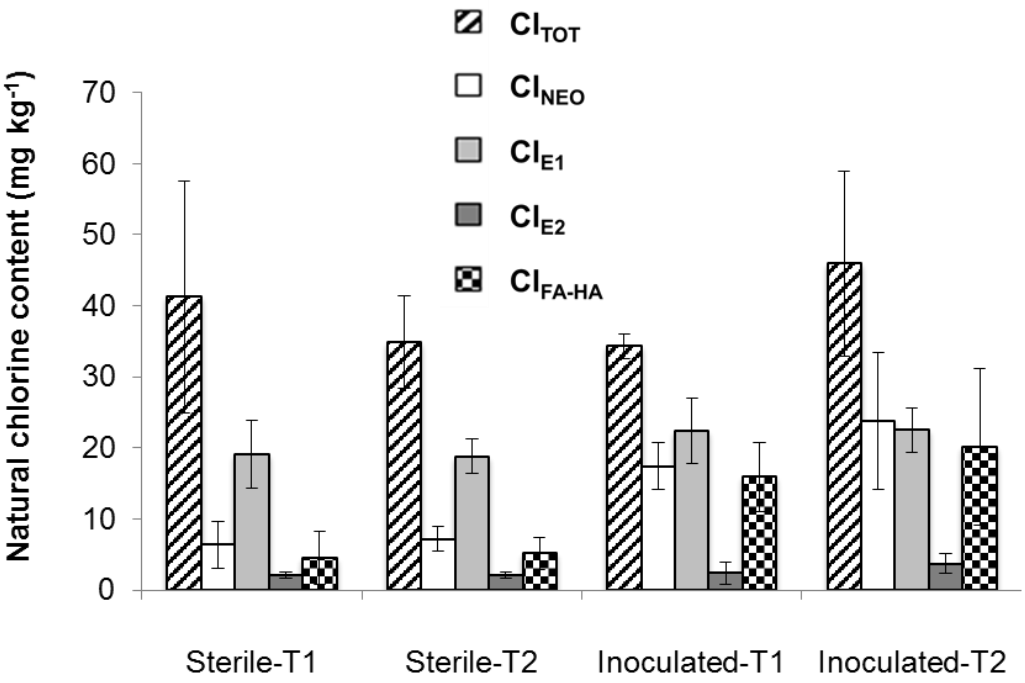



Figure 6.3. FDA enzymatic activity in microorganism-inoculated (inoculated) and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ after 15 (T1) and 90 days (T2) of incubation. Means ± standard deviations (n = 4). U = mol g dry soil $^{-1}$ min$^{-1}$. Asterisks represent significant effects. Bars with the same letter are not significantly different at P<0.05 (two-way ANOVA).

Natural $Cl_{TOT}$ contents were about 40 mg kg$^{-1}$ in all treatments, as in the first experiment (Figure 6. 4). The natural $Cl_{NEO}$ content was significantly higher in the inoculated soil than in the sterile soil, and so was the $Cl_{FA-HA}$ content. However, there was no significant effect of incubation time. Natural $Cl_{E1}$ and $Cl_{E2}$ contents were not significantly different, either between the sterile and inoculated treatments or between T1 and T2.




| Factors | $Cl_{TOT}$ | $Cl_{NEO}$ | $Cl_{E1}$ | $Cl_{E2}$ | $Cl_{FA-HA}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Time | ns | ns | ns | ns | ns |
| Microbial inoculation | ns | * Inoculated > Sterile | ns | ns | * Inoculated > Sterile |

Figure 6.4. Natural chlorine contents in microorganism-inoculated (inoculated) and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ after 15 (T1) and 90 days (T2) of incubation, analyzed by HR-ICP-MS. Means ± standard deviations (n = 3). The table shows the results of the two-way ANOVA: asterisks, significant effects; ns, non-significant effects.

Regarding tracer chlorine, there was no significant effect of inoculation or incubation time on the $^{37}Cl_{TOT}$, $^{37}Cl_{E1}$ and $^{37}Cl_{E2}$ contents (Figure 6.5a and 6.5b). Because spiked $^{37}Cl$ was added as inorganic chlorine, the tracer $^{37}Cl_{E1}$ content was much higher than the natural $Cl_{E1}$ content. Tracer $^{37}Cl_{NEO}$ and $^{37}Cl_{FA-HA}$ mean contents in the inoculated treatments were higher than in the sterile treatments, and showed a similar trend to natural $Cl_{NEO}$ and $Cl_{FA-HA}$ contents. However, high variations were noted among replicates, and the difference was not statistically significant (Figure 6.5b). Similarly, no significant difference was noted for tracer $Cl_{NEO}$ and $Cl_{FA-HA}$ contents between incubation times.

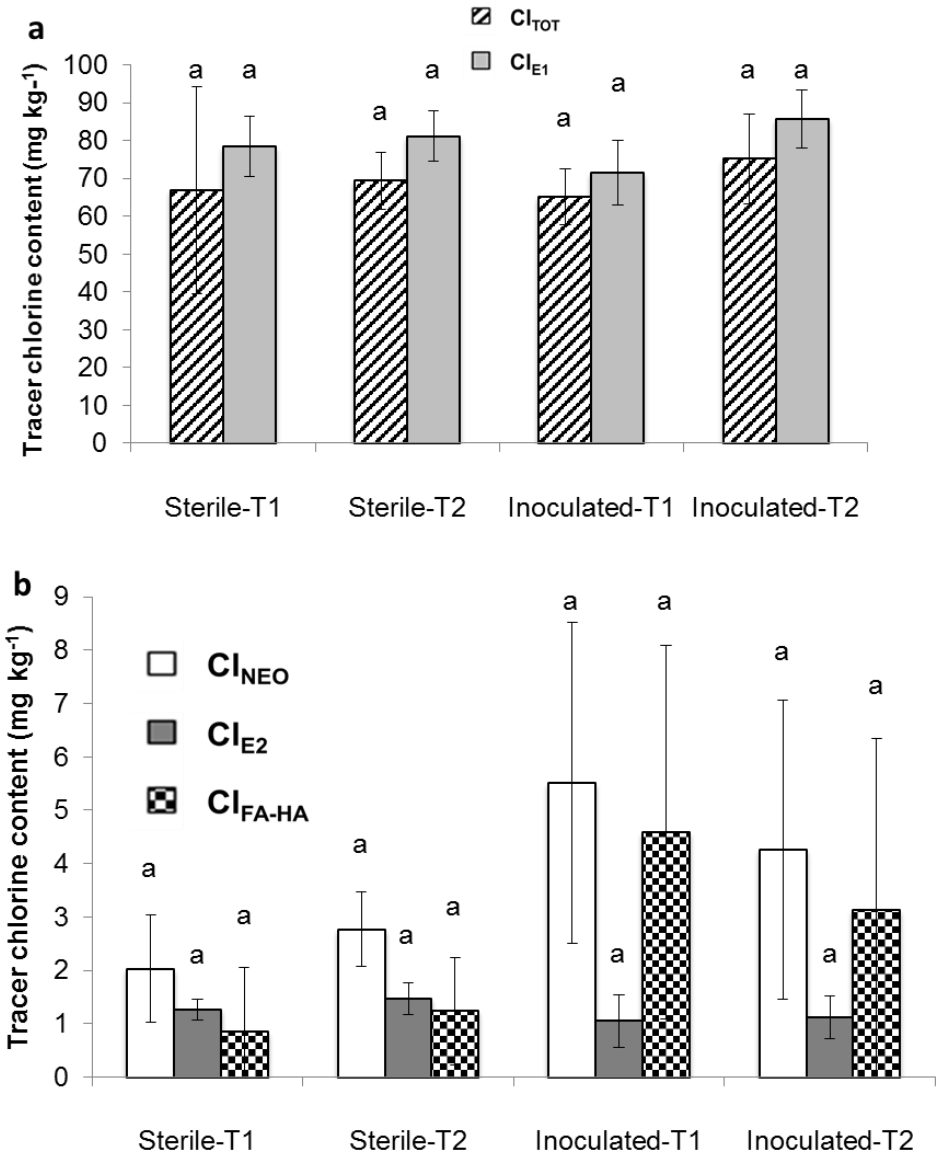



Figure 6.5. Tracer $^{37}Cl$ chlorine contents in microorganism-inoculated (inoculated) and non-inoculated (sterile) irradiated soils spiked with $^{37}Cl_{in}$ after 15 (T1) and 90 days (T2) of incubation, measured by ICP-MS-HR. a. $Cl_{TOT}$ and $Cl_{E1}$ fractions; b. $Cl_{NEO}$, $Cl_{E2}$, and $Cl_{FA-HA}$ fractions. Means ± standard deviations (n = 3). Values with the same letter were not significantly different at $P<0.05$ (two-way ANOVA).

## 6.4 Discussion

### 6.4.1 Chlorine content in soil before incubation

Chlorine content measured by AOX was higher after soil irradiation. Irradiation was used for soil sterilization since this method has been recommended over other sterilization techniques (McNamara et al., 2003). However, Bank et al. (2008) indicated that gamma-irradiation induced significant physico-chemical changes in a natural sediment and affected the inorganic and organic fractions. In our study, the increase of $Cl_{TOT}$ and $Cl_{NEO}$ contents after irradiation might be due to such changes affecting the efficiency of the chlorine extraction and analysis method. The soil was packed for irradiation in plastic bags possibly containing chlorine, but the amount of chlorine in plastic bags (1 to 4% of chlorine, Chiemchaisri et al. 2010) do not seem to explain the increase of chlorine content after irradiation.

Before starting the incubation, the natural $Cl_{TOT}$ content measured in irradiated samples by HR-ICP-MS was lower than the content measured by AOX (respectively 41 and 63 mg $kg^{-1}$), due to the TMAH extraction rate. However, for direct measurements of chlorine content in liquid samples, no significant differences were observed between HR-ICP-MS and ionic chromatography (data not shown).

Natural $Cl_{TOT}$ content values measured by HR-ICP-MS or AOX were in the low range of the values found by Redon et al. (2012) in highly variable forest soils, measured by neutron activation and ranging between 34 and 340 mg $kg^{-1}$, with a mean value of 90 mg $kg^{-1}$. The chlorine to carbon ratio was between 1.3 and 1.9 mg $Cl_{tot}$ $g^{-1}$ C, while Öberg et al. (2003) reported a ratio of 1 mg ClO $g^{-1}$ C in the top 15 centimeters of the soil, and Redon et al. (2012) a larger range of values. In the study of Redon et al. (2012), the highest $Cl_{TOT}$ contents were found in the regions under marine influence and were correlated with organic carbon content. So the quite low $Cl_{TOT}$ content measured in the soil sample used in this study was consistent with its location (the north east of France, far from the sea), and its total carbon content (3.2 %).

The natural $Cl_{NEO}$ content measured by HR-ICP-MS in irradiated soil before starting the incubation was also lower than that measured by AOX (respectively 14 and 63 mg $kg^{-1}$). Natural $Cl_{NEO}$ represented then 34 % of natural $Cl_{TOT}$ in the soil sample when measured by HR-ICP-MS. Redon et al. (2011) showed a higher percentage of $Cl_{NEO}$ as compared to $Cl_{TOT}$ (89% average value) in various French mineral soil layers, but the values were obtained by neutron activation. Öberg et al. (2003) also found that the $Cl_{NEO}$ stock in soils generally represented 80% of $Cl_{TOT}$.

In our study, the $Cl_{TOT}$ and $Cl_{NEO}$ contents measured by HR-ICP-MS before the beginning of the experiment represented then 65 and 22 % of the $Cl_{TOT}$ and $Cl_{NEO}$ contents measured by AOX, respectively. The lower natural chlorine contents found by HR-ICP-MS compared to AOX technique, especially in the $Cl_{NEO}$ fraction, suggest that part of chlorine was recalcitrant to TMAH extraction generally applied for iodine extraction from soil (Watts and Mitchell, 2009). The determination of chlorine contents by HR-ICP-MS after TMAH extraction could have been revised by a correction factor (based on reference soil materials). But natural and tracer chlorine behaviors can be different with respect to TMAH extraction, so we decided not to apply any correction to the measured values. We thus assumed that the $Cl_{NEO}$ fraction extracted by TMAH and analyzed by HR-ICP-MS was representative of the easily extractable part of the $Cl_{NEO}$ fraction and could be compared among our experiments.

### 6.4.2 Abiotic formation of organically bound chlorine

In sterilized soil spiked with $^{37}Cl_{in}$, two hours after spiking, 6 % of the added $^{37}Cl$ was quantified in $Cl_{NEO}$ fraction. Although data vary largely, they suggest the rapid formation of organic chlorine via abiotic processes. When the soil was incubated under abiotic conditions for 15 days, no further evolution of the $Cl_{NEO}$ content was noted. The slight $CO_2$ emission detected during the incubation under abiotic conditions could result from the emission of a gas trapped in the soil pores. Indeed, no bacterial growth was observed when the sterilized soil sample was plated on nutrient agar. According to McNamara et al. (2003), in irradiated soil, the initial $CO_2$ flush is caused by radiolytic decarboxylation of organic matter and by the action of radio-resistant enzymes. The low FDA enzyme activity we measured in the irradiated samples could then be due to soil enzymes remaining active for several weeks after irradiation

(McNamara et al., 2003). Part of the organically bound chlorine in the irradiated soil could also be due to the activity of residual enzymes although there was no alive microorganisms. However, these radio-resistant enzymes should decrease with time.

In soils, chlorides could be alkylated during the oxidation of organic matter with an electron acceptor such as Iron III. Iron III is then reduced to Iron II, and the resulting products correspond to organic volatile chlorinated compounds. Therefore organic chlorine can be produced in the absence of microbial activity (Keppler et al., 2000). Abiotic processes, such as adsorption, would occur rapidly after Clin addition and be stabilized after adsorption site saturation. Moreover, tracer chloride addition can induce the formation of about 2% additional total organic chlorine immediately after spiking (Bastviken et al., 2009), and 0.5% of $Cl_{FA-HA}$ can form after 80 days of incubation under abiotic conditions (Rohlenová et al., 2009). In our experiment, 4% of tracer chlorine was found in the $Cl_{FA-HA}$ fraction under abiotic conditions after adding the tracer under an inorganic form, but error bars were large.

### 6.4.3 Organically bound chlorine formed during biotic incubation

Fifteen and ninety days after microbial inoculation, the natural $Cl_{NEO}$ content in the inoculated soil was significantly higher than in the sterile soil (Figure 6. 4), showing that microbial activity contributed to formation of organically bound chlorine. As regards tracer chlorine after incubation (T1 and T2), no significant difference was noted between the two conditions (Figure 6. 5), but the same trend as for natural chlorine was noted with $^{37}Cl_{NEO}$ and $^{37}Cl_{FA-HA}$ tending to be higher in inoculated soil. The presence of microorganisms in the inoculated soils therefore increased formation of organically bound chlorine ($Cl_{NEO}$ and $Cl_{FA-HA}$ fractions).

Several studies show that chlorination is primarily mediated by microbial activity (Öberg et al., 1997; Johansson et al., 2000; Bastviken et al., 2009). Bastviken et al. (2007, 2009) compared oxic and anoxic conditions and temperature effect in a non sterile soil to estimate the relative contribution of biotic and abiotic chlorination. Chlorination rate at 50°C was considered as representative of abiotic process, but microbial activity was not quantified in the experiments. More specifically, Bastviken et al. (2007), using an experimental setup

including $^{36}Cl^{-}$ enrichment, retrieved about 20% of $^{36}Cl$ tracer in the $Cl_M$ fraction after 15 days of forest soil incubation in oxic conditions and a much lower rate in anoxic conditions. Furthermore, Bastviken et al. (2009) found that 7% of added tracer chlorine was retrieved in the $Cl_{FA-HA}$ fraction after 15 days in the same soil. In the present study, after 15 days of incubation, 7 % of added $^{37}Cl$ was associated to the $Cl_{NEO}$ fraction of inoculated soils, and 7 % in the $Cl_{FA-HA}$ fraction. Stable $^{37}Cl$ tracing thus brings consistent results in comparison with those obtained using $^{36}Cl$. However, our data for $Cl_{NEO}$ were lower than the values obtained by Bastviken et al. (2007) and would be even lower if we deducted the abiotic part from the results obtained in biotic conditions.

Rohlenová et al. (2009) sterilized a soil by irradiation and by autoclave and compared the results to those obtained with the same non-sterile soil. These authors found 3 to 4 % of added $^{36}Cl$ recovered as bound to humic substances in non sterile soil and around 0.3 to 1% in sterilized soils. However, irradiation and soil heating can affect some physicochemical properties of the soil (Egli et al., 2006), especially ammonium and nitrate contents (Mc Namara et al., 2003). Alteration of the aggregate state of the soil leading to a greater surface area, changes in soil organic matter structure and increase of dissolved organic matter due to microbial cell lysis and degradation of organic matter were also reported for gamma irradiated and autoclaved soils (Berns et al., 2008). All these parameters can affect degradation or sorption processes, and therefore abiotic reference obtained by soil sterilization to distinguish between abiotic and biotic processes such as chlorination may be questionnable. In our study, gamma-sterilization was used since the soil is physically and chemically less altered by this process of sterilization than with autoclaving (Berns et al., 2008), and irradiated soil was used for both abiotic and biotic conditions. Comparing inoculated to non-inoculated irradiated soil allowed us to confirm the microbial contribution to formation of organically bound chlorine. However, soil irradiation lead to cell death and lysis, and to the release of dissolved organic matter which represents a readily biodegradable carbon source for microorganisms. Therefore microbial activity was boosted at the beginning of the incubation due to the available carbon released (priming effect). In the present study carbon mineralization and FDA enzyme assay were used to show microbial activity in soil. More specific activity involved in organic matter chlorination, such as chloroperoxidase (Manoj and Hager, 2006), or dechlorination, could be further investigated.

Microbial inoculation increased the organic chlorine fraction after 15 days, but there was no significant difference in natural $Cl_{NEO}$ contents between 15 and 90 days. The $CO_2$ emission rate and FDA enzyme activity were lower after 90 days than after 15 days, suggesting decreased microbial activity, possibly due to available nutrient limitation with time. To confirm such hypothesis, easily accessible carbon sources could be added at certain time points to maintain microbial activity throughout the experiment. A rapid turnover of organic chlorine can also occur (Öberg et al., 2005) and a dynamic equilibrium between chlorination and dechlorination processes was shown (Montelius et al. (2016). Bastviken et al. (2007) showed decreased percentage of added chlorine associated to microbial cells ($Cl_M$) between 15 days (20% of added $^{36}Cl$) and 90 days (10%), and 5% of $Cl_{FA-HA}$ formation after 90 days. Conversely, in the present study, $Cl_M$, contained in $Cl_{E2}$, was below the analytical detection limit and was not quantified. Therefore the potential formation of microbial chlorine in the $^{37}Cl_{in}$-spiked soil samples was not quantifiable.

## 6.5 Conclusion

To our knowledge, stable $^{37}Cl_{in}$ tracing has only been used once (Hoekstra et al. 1998) to investigate the fate of chlorine and formation of organically bound chlorine in soils. In the present study, the use of $^{37}Cl$ spiking combined with HR-ICP-MS measurements did not allow to analyze some of the chlorine fractions. So, the use of $^{36}Cl$ seems to be more appropriate for such spiking laboratory experiments. However, natural and tracer chlorine behaviors in soil samples during incubation highlighted $Cl_{NEO}$ and $Cl_{FA-HA}$ formation following soil microbial inoculation. Our results, using an experiment conducted in biotic conditions compared to an abiotic control, show that chlorination is mediated by microbial activity as previously concluded by other authors (Öberg et al., 1997; Johansson et al., 2000; Bastviken et al., 2009). Our results also highlight that when microbial activity was reduced with time, no more organically bound chlorine was formed. Indeed, the organically bound chlorine content could be due to chlorination but we measured a net content resulting from chlorination and dechlorination processes, that were not discriminated in this study. As previously shown by other studies, there were also clues indicating abiotic formation of organic chlorine in sterile soil rapidly after $^{37}Cl_{in}$ spiking, which remains to be confirmed.

# Chapitre 7

## Discussion Générale et Perspectives

# 7 Discussion Générale et Perspectives

Ce dernier chapitre est une synthèse et une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude. Plusieurs études antérieures sur le cycle du chlore démontrent que les flux d'entrée et de sortie de chlore au sol se font majoritairement sous une forme inorganique (Svensson et al., 2007 ; figure 7. 1). Alors que les stocks de chlore sont majoritairement représentés par le chlore inorganique à l'échelle des profils de sols (Öberg, 2003), les stocks de chlore dans l'horizon de sol organo-minéral de surface, quant à eux, sont principalement sous une forme organique (Svensson et al., 2007). La formation de ce chlore organique naturel dans les sols serait le résultat du processus de chloruration de la matière organique, essentiellement provoqué par les activités des microorganismes des sols (Bastviken et al., 2007). La teneur à un instant donné en chlore organique serait liée au processus de chloruration et à la déhalogénation, qui correspond au processus inverse, et permet le passage des formes organiques de chlore vers une forme inorganique (Clarke et al., 2009). Cependant, ces processus sont encore peu documentés, notamment en termes de cinétique et de mise en évidence du rôle des microorganismes.

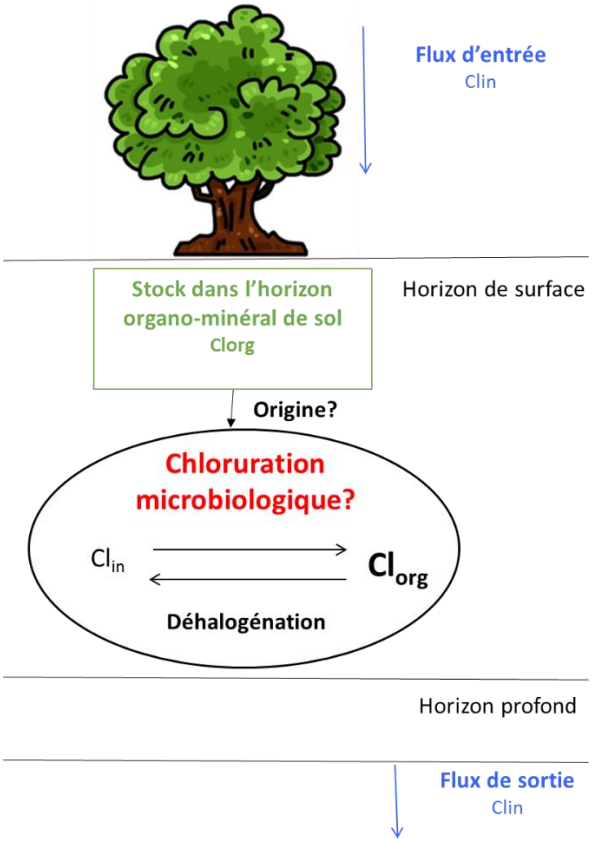



Figure 7.1. Bilan de l'état de connaissance du cycle du chlore des sols

Pour mettre en évidence une origine biotique ou abiotique à la présence de chlore organique dans les sols, deux approches ont été menées : (a) l'étude d'une relation *in situ* entre les teneurs en chlore et les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des sols, (b) des incubations de sols en laboratoire, permettant de comparer un témoin abiotique avec du sol réinoculé, et avec des ajouts de Clin pour mettre en évidence la chloruration.

Dans les deux approches, les teneurs en chlore (inorganique et organique) ont essentiellement été mesurées dans les sols par un analyseur d'AOX. L'analyse des teneurs en chlore a été réalisée par ICP MS HR lorsqu'un marquage par un isotope stable $^{37}Cl$ a été utilisé, et une étude de la spéciation des formes de chlore par XANES a aussi été menée. Toutes ces techniques ont nécessité des développements méthodologiques préalables importants.

## 7.1 Mesure des teneurs en chlore dans les sols

### 7.1.1 Mesures par analyseur d'AOX

L'analyse des teneurs en chlore par analyseur d'AOX, initialement dédié à l'analyse des halogènes en solutions mais déjà utilisé pour analyser des matrices de type sol (Bastviken et al., 2007 ; Öberg et al., 1997), a soulevé un certain nombre de questions.

L'utilisation d'un sol à teneur certifiée en chlore total ($Cl_{TOT}$) a permis la comparaison des teneurs en chlore des sols mesurées par analyseur d'AOX à celles obtenues avec d'autres méthodes. Il est principalement apparu que les teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX sont souvent inférieures à celles obtenues par activation neutronique alors que les teneurs en chlore total du sol certifié, obtenues par activation neutronique, sont proches de la valeur certifiée. La méthode de mesure par analyseur d'AOX semble donc conduire à une sous-estimation des teneurs en chlore réellement présentes dans les sols. Cet appareil permet en réalité de déterminer les teneurs en halogènes totaux d'un échantillon, soit la somme des concentrations en brome, en iode et en chlore. Selon Brady et al (2002) les teneurs en iode et en brome ne dépassent pas 1%, tandis que d'après Pereira et al., (2011) et Putschew et al., (2003) les teneurs en iode et en brome pourraient dépasser les 10%. Donc, comme

l'approximation a été faite que les teneurs mesurées par analyseur d'AOX sont égales uniquement aux teneurs en chlore, les concentrations en chlore sont plutôt déjà légèrement surestimées.

Cependant, la comparaison des deux méthodes a été faite avec un seul sol à teneur en chlore total certifiée. A notre connaissance, il n'existe aucun matériel « sol » de référence pour le chlore, ce qui rend donc toute conclusion difficile, et une étude comparative plus approfondie mériterait d'être menée.

Il faut cependant noter que les résultats obtenus par analyseur d'AOX dans notre étude sont reproductibles et conduisent aux mêmes interprétations que celles faites en considérant les mesures réalisées par activation neutronique.

### 7.1.2 Mesures par ICP MS HR

Dans le cadre de la dernière expérience d'incubation où du $^{37}$Clin a été ajouté et a été quantifié par ICP MS HR dans les différentes fractions de chlore après incubation, il est apparu que les fractions de chlore organique extractible et de chlore microbien étaient en dessous de la limite de détection. La méthode de détermination des teneurs en chlore naturel et $^{37}$Cl ajouté (traceur) ne semble donc pas suffisamment précise pour mesurer de faibles teneurs en chlore dans les sols.

Les teneurs dans les fractions de chlore total et de chlore organique non extractible mesurées par ICP MS HR, quant à elles, représentent respectivement 65 et 22 % du chlore mesuré dans les mêmes échantillons par AOX. Ces résultats suggèrent qu'une partie du chlore, certainement du chlore organique non extractible, est récalcitrante à la dissolution au TMAH (extraction nécessaire avant la mesure des teneurs en chlore par ICP MS HR). Les teneurs en $Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$ obtenues par ICP MS HR ont été utilisées au cours de l'étude, tout en considérant (i) que le chlore issu des échantillons solides, dissout au TMAH et mesuré par ICP MS HR, représente la part la plus facilement extractible du chlore, et (ii) que l'extraction de ce chlore est identique dans les différents échantillons étudiés.

### 7.1.3 Etude exploratoire de la spéciation des molécules organo-chlorées dans les sols par spectrométrie XANES

La technique de spectrométrie XANES a été utilisée pour estimer les différentes formes de chlore dans les sols étudiés et préciser la spéciation de ces formes de chlore organique (aromatique, aliphatique).

Les mesures réalisées par spectrométrie XANES révèlent des résultats très hétérogènes. Les analyses répétées sur un même échantillon de sol, directement issu du prélèvement (non traité) ou stérilisé et incubé ont fourni des spectres aux caractéristiques différentes, typiques parfois de formes plutôt organiques, parfois de formes inorganiques (selon les énergies d'ionisation Eo et les énergies maximales des pics X1 et X2). Nos analyses ont porté sur un grand nombre d'échantillons de sols soumis à différentes modalités d'incubation, mais la grande variabilité intra-échantillons a rendu difficile les interprétations et mises en évidence de formes de chlore différentes selon ces modalités. Les analyses ne permettent pas de mettre en évidence la modification significative des formes de chlore après incubation des sols sous différentes conditions.

Le nombre important de constituants et de molécules chlorées présentes présentes dans les sols pourrait expliquer les nombreux spectres obtenus pour un même échantillon de sol.

Cependant, la majorité des spectres de chlore organique présente une allure semblable à celle observée sur des échantillons contenant du chlore organique aromatique (Leri et al., 2007). Les analyses ont donc permis de mettre en évidence que les composés organo-chlorés présents dans les sols sont majoritairement aromatiques.

## 7.2 Relation entre la teneur en chlore et les paramètres microbiologiques dans les sols

La première approche de l'étude devait tester l'éventuelle relation qui existe entre teneurs en chlore et paramètres microbiologiques dans des sols contrastés prélevés à différentes saisons.

Il a été observé que les saisons, et plus particulièrement la température (voir la Figure 4. 15 pour 2013 et 2014), pouvait influencer la répartition des teneurs en chlore dans les sols. En effet, les teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$ et $Cl_{ONE}$) mesurées dans les échantillons VF et VP, sont plus faibles en 2014 qu'en 2013 et sont maximales en 2012. Les échantillonnages ont été réalisés lors de saisons contrastées : hiver très froid en mars 2012, printemps doux en juin 2013 et hiver doux en mars 2014. Les activités microbiennes ainsi que les quantités de microorganismes présents dans les sols peuvent avoir été influencés par ces saisons et agir sur les réactions de chloruration /déhalogénation. Les précipitations, quant à elles, semblent avoir moins d'influence sur les activités microbiologiques et les teneurs en chlore dans les sols étudiés.

Une corrélation a été mise en évidence entre les teneurs en chlore organique et l'abondance des microorganismes (essentiellement des champignons dans les sols prélevés en 2013 et 2014). Ainsi, plus la quantité de microorganismes (essentiellement de champignons) des sols est importante, plus les teneurs en chlore sont élevées. De nombreux auteurs ont en effet déjà auparavant montré la formation de chlore organique par les champignons. Harper et al. (1995) montrent la formation de chlorométhane par des champignons qui méthylent les chlorures. Verhagen et al., 1998 trouvent que les Basidiomycètes sont les principaux champignons à être impliqués dans la synthèse de composés organiques chlorés et mettent en évidence 20 familles et 68 genres de Basidiomycètes produisant des composés halogénés de faible poids moléculaire.

La répartition des teneurs en chlore dans les sols est aussi corrélée à d'autres paramètres, notamment le couvert végétal, le pH et la teneur en carbone organique. Or, ces paramètres influencent l'activité microbiologique des sols, en lien avec la production de chlore organique. Cependant, aucune corrélation entre les teneurs en chlore et les activités enzymatiques étudiées n'a pu être observée dans cette étude. Van Pee et al., 2001 et Van Pee et Unversucht, 2003 trouvent que les enzymes impliquées dans le processus de chloruration correspondent essentiellement à des halogénases, perhydrolases et à des haloperoxidases. Les activités enzymatiques ciblées dans cette étude (FDA, Amino-peptidase, Phosphatase, Laccase) reflètent des activités globales liées aux cycles du carbone, de l'azote et du phosphore, mais ne ciblaient pas spécifiquement ces activités.

Les sols à faibles pH présentent un turn-over de la matière organique lent, du fait de la faible activité microbienne pour dégrader la matière organique, qui conduit à une accumulation de matière organique, et plus généralement de carbone organique. Ainsi, l'activité de déhalogénation, liée à la dégradation de la matière organique, est faible. En effet, d'après Pries et al., 1994, le processus de déhalogénation a lieu naturellement dans les sols et est le résultat de la dégradation de la matière organique chlorée ou de l'utilisation de molécules organiques chlorées comme accepteur d'électrons par les microorganismes.

La matière organique accumulée, et plus précisément le carbone organique, représente un substrat d'intérêt pour les microorganismes responsables du processus de chloruration. De cette façon, même si le turn-over est lent, les microorganismes capables de chloruration produisent du chlore organique qui s'accumule si le processus de déhalogénation est plus lent. Cependant, d'après Montelius et al., (2016), le processus de chloruration est plus lent que celui de la déhalogénation. Les teneurs en chlore inorganique des sols devraient donc être prédominantes. Or, le chlore organique représente généralement 80 % du chlore total des sols. Il semble en réalité qu'une partie du chlore organique soit résistante à la déhalogénation et s'accumule dans le sol. Ainsi, plus la teneur en carbone organique des sols est élevée, plus la teneur en chlore organique est importante.

A l'inverse, pour les sols à pH plus élevé, le rapide turn-over de la matière organique conduit à une faible accumulation de carbone organique, du fait d'une forte activité microbienne de dégradation de la matière organique. Cette forte activité de dégradation de la matière organique, doit conduire à une forte activité de déhalogénation. Par ailleurs, même si l'activité globale des microorganismes des sols est importante, il y a peu de substrat disponible (carbone organique) pour les microorganismes capables de chloruration. L'activité microbienne de chloruration de ces sols serait donc plus faible et conduirait à des teneurs en chlore organique moins importantes. De cette façon, quand la teneur en carbone organique des sols est plus faible, la déhalogénation devrait être relativement plus importante, en lien avec la dégradation de la MO, et la teneur en chlore organique devrait être plus faible.

## 7.3 Mise en évidence expérimentale de la formation de chlore organique par des activités microbiennes dans des sols

Bien que la relation entre les teneurs en chlore et la quantité de microorganismes dans les sols ait pu être mise en évidence *in situ*, l'origine supposée microbienne du chlore organique n'a pas été clairement démontrée par cette approche. La deuxième partie de l'étude menée en parallèle visait à mettre en évidence expérimentalement la formation de chlore organique au cours du temps, en lien avec une activité microbienne. Pour cela, des sols ont été incubés au laboratoire selon différentes modalités et les teneurs en chlore ont été mesurées par analyseur d'AOX et par activation neutronique.

Cependant, dans les premières incubations mises en place, quelles que soient les modalités testées, aucune formation significative de chlore organique n'a pu être mise en évidence entre le début et la fin des incubations, excepté pour la seconde incubation en conditions aérobies, dans laquelle la teneur en $Cl_{ONE}$ des modalités stériles est significativement inférieure à celle des modalités ré-inoculées avec ajout de $Cl_{in}$ (sol des Vosges). D'après cette expérience, environ 14% du Clin ajouté a été transformé en $Cl_{ONE}$ (Figure 5. 4). Ces résultats suggèrent que les mesures des teneurs en chlore naturel (par activation neutronique et par analyseur d'AOX) ne permettent pas aisément de montrer une évolution des formes de $Cl_O$ au cours du temps, notamment un effet de l'inoculation microbienne, et que ceci n'a été observé qu'avec un ajout de $Cl_{in}$ . Ces derniers résultats sont en accord avec ceux des travaux de Bastviken et al. (2007 ; 2009) qui démontrent la formation de $Cl_O$ suite à une expérience d'incubation de sols après ajout de $^{36}Cl$ sous forme inorganique dans des sols non stériles.

Pour les autres modalités étudiées, les résultats suggèrent (i) que les taux de chloruration sont faibles et ne sont pas quantifiables par les méthodes ou (ii) que parallèlement à la chloruration, un processus de déhalogénation se produit. Le bilan net (chloruration – déhalogénation) de chlore organique formé par ce processus de chloruration est sans doute faible dans les conditions d'incubation et les appareils de mesure utilisés (analyseur d'AOX / activation neutronique) n'ont pas permis de détecter les changements éventuels de formes de chlore durant ces incubations dans ces modalités.

La spectrométrie XANES a permis de préciser la spéciation des formes organiques de chlore présentes : les molécules orgno-chlorées aromatiques sont majoritaires dans les sols étudiés. Cependant cette technique n'a pas permis de mettre en évidence clairement la formation ou l'évolution de la spéciation de chlore organique dans les modalités biotiques au cours des incubations réalisées.

## 7.4 Suivi de la formation de chlore organique des sols par marquage et traçage au $^{37}Cl$ : processus biotique ou abiotique ?

Afin de préciser les résultats obtenus dans le chapitre 5 avec des mesures en AOX et un ajout de Clin, nous avons réalisé dans le chapitre 6 une incubation avec un traçage au $^{37}Cl$ en enrichissant le sol en $Na^{37}Cl$ marqué isotopiquement. Les mesures ont alors été réalisées par ICP MS HR afin de comparer la distribution de $^{37}Cl$ après incubation des sols selon différentes modalités dans les pools organiques et inorganiques de chlore. L'enrichissement avec ce type de traceur a, à notre connaissance, très peu été utilisé (Hoekstra et al., 1998),contrairement au $^{36}Cl$ radioactif et les méthodes de mesure de ces isotopes naturels de chlore sont très peu courantes. Cette dernière expérience avait ainsi comme objectif secondaire de tester l'intérêt de l'utilisation du $^{37}Cl$ pour suivre la dynamique du chlore au cours du temps.

Les mesures réalisées par ICP MS HR après extraction du chlore au TMAH ont permis de mettre en évidence une formation de chlore organique non extractible au cours du temps, en relation avec l'activité microbienne des sols. Plus précisément, il est apparu qu'environ 7 % du $^{37}Cl$ ajouté initialement sous forme inorganique est retrouvé sous forme de chlore organique non extractible après 15 jours d'incubations. Après 90 jours, les résultats sont identiques, suggérant soit une diminution de l'activité microbienne suite à la diminution des ressources carbonées, soit un équilibre entre les processus de chloruration et déhalogénation. Comme souligné précédemment, Bastviken et al. (2007, 2009) montrent, grâce à une expérience de traçage au $^{36}Cl$, une formation de chlore organique dès 15 jours. La contribution des microorganismes au processus de chloruration a donc été mise en évidence par traçage isotopique avec du $^{37}Cl$ stable.

Les mesures réalisées par ICP MS HR ont également permis de mettre en évidence la formation d'environ 6 % de chlore organique non extractible en seulement 2h après ajout du chlore sous forme inorganique en conditions abiotiques. Selon Keppler et al. (2000), la formation de chlore organique peut avoir lieu en l'absence d'activité microbienne dans les sols, par alkylation des chlorures pendant l'oxydation de la matière organique par un accepteur d'électron comme le $Fer^{3+}$, formation des composés organiques chlorés volatils. La formation de ce chlore organique en conditions abiotiques peut également être le résultat d'activités enzymatiques résiduelles restant actives dans le sol pendant quelques semaines dans le sol, bien qu'il n'y ait pas de microorganismes vivants dans le sol (Mc Namara et al., 2003). Le phénomène d'adsorption du chlore sur ces composés organiques peut également expliquer cette formation en conditions abiotiques.

La formation de 7% de chlore organique en conditions biotiques et de 6% de chlore en conditions abiotiques à partir de chlore inorganique, comme la formation de $Cl_{ONE}$ dans l'incubation avec ajout de Clin (chapitre 5), est en réalité le résultat d'un processus de formation et de dégradation de chlore organique. D'après Asplund et Grimvall (1991), Grimvall et deLeer (1995) et Clarke et al. (2009), les processus de chloruration et de déhalogénation se produisent parallèlement dans les sols et dans les calculs de bilan de masse, les taux de chloruration et de déhalogénation sont considérés comme étant du même ordre de grandeur (Öberg et al., 2005).

## 7.5 Conclusion

La Figure 7. 2 permet de faire un bilan sur la dynamique du chlore dans les horizons de surface des sols étudiés dans la thèse en fonction de l'écosystème considéré (conditions climatiques équivalentes)

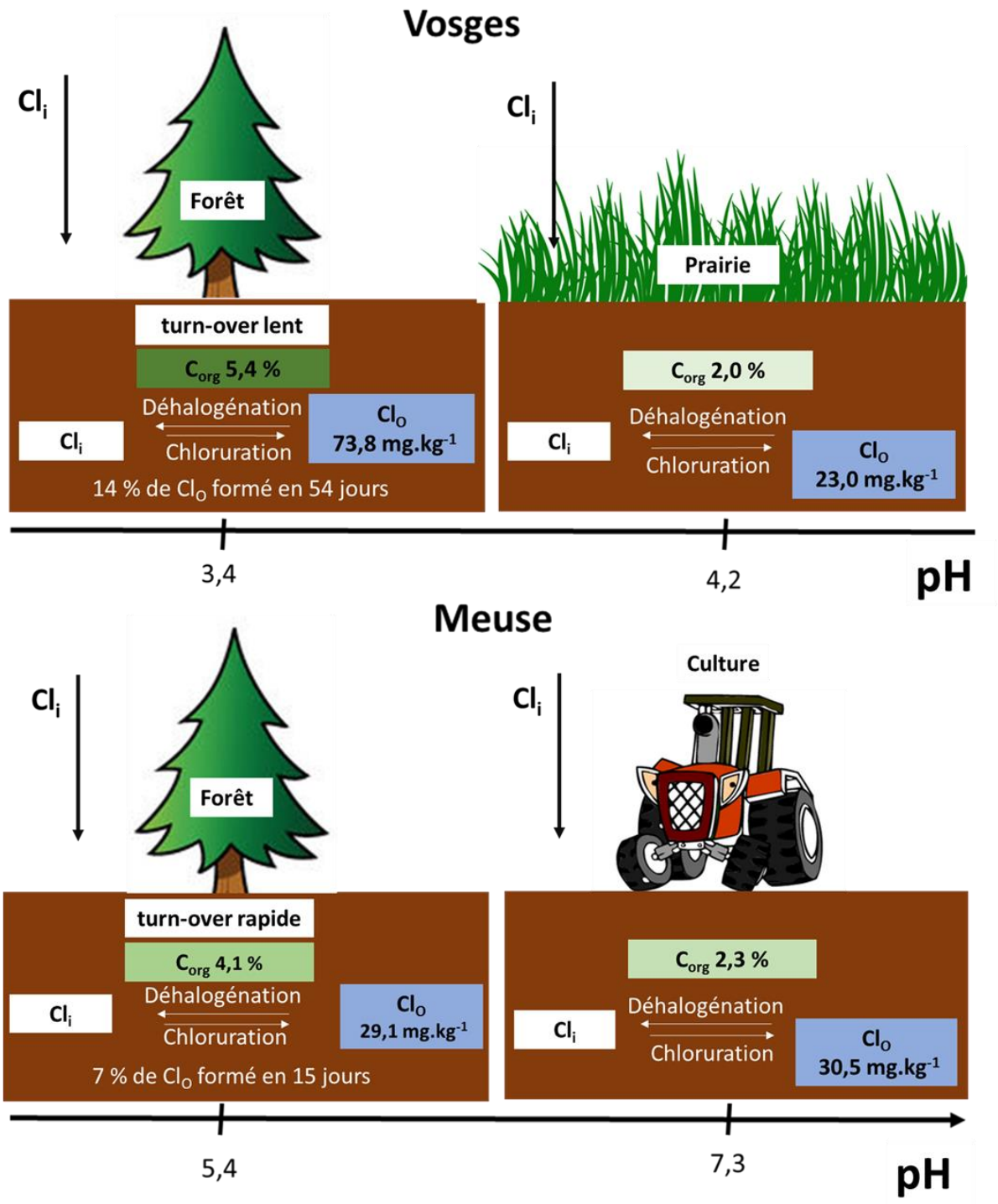



Figure 7.2. Dynamique du chlore en fonction de l'écosystème considéré. L'ensemble des données a été moyenné sur les 3 saisons de prélèvements.

Pour les sols forestiers (VF et MF), les apports en matière organique sont importants à la surface des sols (litière).

Dans le cas du sol acide VF, cette matière organique s'accumule du fait d'un turn-over plutôt lent, provoqué par une faible activité de dégradation de la matière organique Cette accumulation de matière organique conduit à de fortes concentrations en carbone organique dans l'horizon organo-minéral (environ 5,4 %). Ce carbone organique accumulé correspond à une potentielle source de nutriments pour les microorganismes capables de chloruration. Par ailleurs, parallèlement à la faible dégradation de la matière organique, les processus de déhalogénation doivent être faibles. Les fortes teneurs en chlore organique (73,8 $mg.kg^{-1}$) qui s'accumule dans l'horizon organo-minéral sont donc le résultat d'une activité de chloruration (biotique et abiotique) et d'une faible déhalogénation.

L'incubation menée sur ce sol développé sur substrat acide (VF) a permis de mettre en évidence une formation de 14 % de $Cl_O$ en 54 jours en conditions ré-inoculées avec ajout ce chlore, soit 19 $mg.kg^{-1}$. Cette teneur représenterait 47,5 kg/ha formés en 54 jours (en considérant une densité de sol d'environ 1250 $kg/m^3$). D'après Öberg, (2003), le taux de chloruration est compris entre 2 et 125 kg/ha/an, mais il s'agit sans doute dans notre étude d'un bilan entre chloruration et déhalogénation.

A l'inverse, dans le sol calcaire MF, le rapide turn-over et la rapide dégradation de la matière organique à la surface des sols sont provoqués par une forte activité des microorganismes. De ce fait, les concentrations en carbone organique sont plus faibles dans l'horizon organo-minéral (4,1 %) de ce sol que dans celui du sol acide. L'activité de dégradation de la matière organique est élevée et se traduit par plus de déhalogénation dans ces sols. Par ailleurs, il y a peu de substrat disponible pour les microorganismes responsables de l'activité de chloruration, qui produisent de plus faibles teneurs en chlore organique (29, 1 $mg.kg^{-1}$).

L'expérience de suivi de la dynamique du chlore par un marquage au $^{37}Cl$ menées sur ce sol développé sur substrat carbonaté (MF) a par ailleurs permis de mettre en évidence que en conditions biotiques, 7% du chlore inorganique est transformé en chlore organique non extractible en 15 jours, quantité qui n'évolue pas significativement entre 15 et 90 jours. L'origine microbienne de la formation de chlore organique dans les sols, jusque-là montrée de manière plus indirecte, a donc pu être mise en évidence dans cette étude et intervient sur le pool de chlore organique non extractible.

Par ailleurs, un processus abiotique rapide semble également responsable de la formation de 6% de chlore organique non extractible, même si une partie pourrait être liée de manière indirecte à une activité biotique (enzymes résiduelles).

Pour les sols anthropisés (VP et MC), les apports de matière organique sont limités et conduisent à de faibles teneurs en carbone organique (respectivement 2 et 2,3 %) dans les sols en surface. Ces faibles teneurs en carbone organique conduisent à un processus de chloruration faible et de ce fait à des teneurs en chlore organique peu élevées (respectivement 23 $mg.kg^{-1}$ et 30,5 $mg.kg^{-1}$).

## 7.6 Perspectives

Beaucoup de questions restent à préciser pour mieux comprendre le cycle biogéochimique du chlore. Notre étude met en évidence certains points à éclaircir.

Une amélioration des méthodes de mesure des teneurs en chlore par analyseur d'AOX, par spectrométrie XANES et par ICP MS HR doit être envisagée afin de réduire les écarts entre les analyses et augmenter la précision des mesures.

Concernant la mesure des teneurs en chlore des sols par analyseur d'AOX, les essais de calibration de la méthode de mesure ont été réalisés avec un seul sol de référence à teneur en chlore total certifiée. Il serait nécessaire de trouver d'autres échantillons de référence avec teneur en Cltot mais aussi Clone certifiées et/ou de réaliser des intercalibrations sur des mêmes sols avec d'autres laboratoires utilisant un analyseur d'AOX ou d'autres appareils, afin de conclure avec robustesse sur la justesse de cette méthode.

Différents tests doivent être réalisés pour calibrer la mesure de la spéciation du chlore dans les sols par spectrométrie XANES. Dans notre étude, les analyses par spectrométrie XANES ont été réalisées sur un nombre important d'échantillons. Pour calibrer la méthode, il serait utile de choisir moins d'échantillon mais de réaliser un nombre plus important de mesures sur ces échantillons.

Il serait ensuite nécessaire de tester la méthode de préparation des échantillons avant analyse. L'influence de l'hétérogénéité des échantillons pourra être déterminée. Pour cela, il serait intéressant de travailler avec une prise d'essai (pastille) plus grosse afin de pouvoir acquérir plusieurs spectres à différents endroits. Les spectres ainsi obtenus seraient ensuite comparés entre-eux.

Il est apparu que la méthode de suivi au $^{37}Cl$ présente certaines limites car les fractions de chlore organique extractible et de chlore microbien sont en dessous de la limite de détection. Pour améliorer ces résultats, le rendement de solubilisation du chlore des échantillons à l'aide d'une solution de TMAH doit être augmenté. La méthode de traçage au $^{36}Cl$ pourrait par ailleurs être envisagée car elle est bien connue et relativement simple. Elle présente une limite de détection beaucoup plus faible. Cependant, du fait du caractère radioactif du $^{36}Cl$, la méthode nécessite par contre la réalisation de toutes les expérimentations et mesures dans une salle contrôlée avec du matériel dédié pour la mesure des différents paramètres notamment microbiologiques.

La mise en évidence de l'origine microbienne du processus de chloruration peut également être améliorée. Afin de préciser davantage la relation entre teneurs en chlore et activités microbiologiques des sols, les activités de peroxydases pourraient être ciblées. Le test enzymatique de monochlorodimedone (Manoj et al., 2006) qui permet de quantifier l'activité de chloroperoxidase pourrait être utile pour quantifier l'activité de chloruration de la matière organique des microorganismes.

In situ, l'influence des saisons n'a pas non plus été clairement démontrée. Il faudrait pour cela choisir des périodes d'échantillonnage à des saisons très contrastées (hivers très froids, étés très chauds, en automne, pendant la période de dégradation de la litière). Par ailleurs, l'utilisation de lysimètres (dispositif permettant de récupérer les eaux gravitaires) pourrait permettre de réaliser le suivi des entrées et des sorties de chlore au cours du temps.

Les perspectives à envisager peuvent également concerner le matériel et la méthode choisie dans les expérimentations. Dans l'expérience de suivi par marquage au $^{37}Cl$, la vitesse de formation et de dégradation du chlore organique n'a pas été pas ciblée précisément (la déhalogénation n'a pas été prise en compte). Une étude sur du plus long terme, qui inclurait

de nombreux temps de prélèvements et de mesure des teneurs en chlore des sols permettrait de définir plus précisément la vitesse de formation du chlore organique. L'ajour d'une source de carbone, permettant d'amplifier l'activité des microorganismes et également à envisager. Concernant le processus de déhalogénation, une expérimentation, inspirée des travaux de Montellius et al., 2016, pourrait être envisagée. L'expérience consiste à la mise en place d'un suivi par traçage au $^{36}Cl$ (inorganique), après élimination du chlore inorganique par rinçage.

Une étude permettant d'estimer le transfert de chlore dans le système sol-plante-rhizosphère est à envisager. En effet, La végétation est également impliquée dans la rétention et la restitution de chlore dans le sol. Les végétaux peuvent absorber des quantités parfois très importantes de chlore (Kashparov et al., 2007). Le chlore se retrouve alors plus ou moins rapidement restitué à la surface des sols par les chutes de litières et dans le sol via le turn-over des racines fines. Ainsi, le rôle de la végétation et du système racinaire sur les formes de chlore dans les sols et leur évolution au cours du temps, pourrait être étudié par exemple à l'aide de microcosmes en conditions contrôlées avec ajout d'un traceur isotopique ($^{36}Cl$).

# Bibliographie

# Bibliographie

Albers, C., Jacobsen, O., Flores, E. M., Pereira, J., and Laier, T., 2011. Spatial variation in natural formation of chloroform in the soils of four coniferous forests. Biogeochemistry 103, 317–334.

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55, 373-99.

Asplund, G., Grimvall, A., 1991. Organohalogens in nature. Environmental Science and Technology 25, 1346-1350.

Asplund, G., Grimvall, A., and Jonsson, S., 1994. Determination of the total and leachable amounts of organohalogens in soil. Chemosphere 28,1467–1475.

Balcone-Boissard, H., Michel, A., Villemant, B., 2009. Simultaneous determination of fluorine, chlorine, bromine and iodine in six geochemical reference materials using pyrohydrolysis, ion chormatogrphy and inductively coupled plasma-mass spectrometry. Geostandards et Geoanalytical research 33, 477-485

Bank, T.L., Kukkadapu, R.K., Madden, A.S., Ginder-Vogel, M.A., Baldwin, M.E., Jardine, P.M., 2008. Effects of gamma-sterilization on the physic-chemical properties of natural sediments. Chemical Geology. 251, 1-7.

Bastviken, D., Sanden, P., Svensson, T., Stahlberg,C., Magounakis, M., Öberg, G., 2006. Chloride retention and release in a boreal forest soil : effects of soil water residence time and nitrogen and chloride loads. Environmental science and technology 40, 2977–2982.

Bastviken, D., Thomsen, F., Svensson, T., Karlsson, S., Sandén, P., Shaw, G., Matucha, M., Öberg, G., 2007. Chloride retention in forest soil by microbial uptake and by natural chlorination of organic matter. Geochemica et Cosmochemica Acta 71, 3182-3192.

Bastviken, D., Svensson, T., Karlsson, S., Sandén, P., Öberg, G., 2009. Temperature sensitivity indicates that chlorination of organic matter in forest soils is primary biotic. Environmental Science and Technology 43, 3569-3573.

Bastviken, D., Svensson, T., Sanden, P., and Kylin, H., 2013. Chlorine cycling and fates of $^{36}Cl$ in terrestrial environments. Technical Report TR-13-26, Department of Thematic Studies - Water and Environmental Studies, Linkoping Univeristy.

Bengston, P., Bastviken, D., de Boer, W., Öberg, G., 2009. Possible role of reactive chlorine in microbial antagonism and organic matter chlorination in terrestrial environments. Environmental Microbiology 11, 1330-1339.

Bengston, P., Bastviken, D., Öberg, G., 2012. Possible roles of reactive chlorine II : assessing biotic chlorination as a way for organisms to handle oxygen stress. Environmental microbiology 11, 1330-1339

Bergbauer, M., Eggert, C., Kraepelin, G., 1991. Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus Trametes versicolor. Application microbiology biotechnology 35, 105-109

Berns, A.E., Philipp, H., Narres, H.D., Burauel, P., Vereecken, H., Tappe, W., 2008. Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure ac studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectrometry. European Journal of Soil Science 59, 540-550.

Binet, P., 1999. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans la rhizosphere et la mycorhizosphere des plantes : étude de la toxicite et du devenir des polluants. PhD, Université Henri-Poincaré, Nancy, France.

Bing-Xian, P., Dai-She, WY., 2013. Simultaneous rapid determination of halogens in clay using pyrohydrolysis combined with ion chromatography. Chinese journal of analytical chemistry 41: 1400-1504.

Bottenheim, J. W., Netcheva, S., Morin, S., Nghiem, S.V., 2009. Ozone in the boundary layer air over the Arctic Ocean: measurements during the TARA transpolar drift 2006–2008. Atmospheric Chemistry and Physics 9 : 4545-4557

Brady, N., R. Weil., 2002. The Nature and Properties of Soils, 13th Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. 960 p.

Burns, R.G., Dick, R.P., 2002. Enzymes in the Environment, Activity, Ecology and Applications. Marcel, Dekker, New York. 640 p.

Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M.P., Mas-faraud, J.F., and Leyval, C., 2009. Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. Applied and Environmental Microbiology 75, 6322–6330

Chiemchaisri, C., Charnnok, B., Visvanathan, C., 2010. Recovery of plastic wastes from dumpsite as refuse-derives fuel and its utilization in small gasification system. Bioresource Technology. 101, 1522-1527.

Clarke, N., Fuksová, K., Gryndler, M., Lachmanová, Z., Liste, H.H., Rohlenová, J., Schroll, R., Schröder, P., Matucha, M., 2009. The formation and fate of chlorinated organic substances in temperate and boreal forest soils. Environmental Science and Pollution Research 16, 127-143.

Clutterbuck, P. W., Mukhopahyay, S. L., Oxford, A. E., 1940. Studies in biochemistry of microorganisms. Biochemistry 34, 664-677

Conway, E. J., 1942. The chemical evolution of the ocean. In Proceedings of the Royal Irish Academy. Biological, Geological, and Chemical Science, 48, 161–212

deJong, E., Field, J.A., 1997. Sulfur tuft and turkey tail : biosynthesis and biodegradation of organohalogens by basidomycetes. Annual Review Microbiology 51, 375-414

Derendorp, L., Wishkerman, A., Keppler, F., McRoberts, C., Holzinger, R., Rockmann, T., 2012. Methyl chloride emissions from halophyte leaf litter : dependence on temperature and chlorine content. Chemosphere 87, 483-489

Dimmer, C. H., Simmonds, P. G., Nickless, G., and Bassford, M. R., 2001. Biogenic fluxes of halomethanes from irish peatland ecosystems. Atmospheric Environment 35, 321–330.

Draaijers, G.P.J., Erisman, J.W., Spranger, T., Wyers, G.P., 1996. The application of throughfall measurements for atmospheric deposition monitoring. Atmospheric Environment 30, 3349–3361.

Egli, M., Mirabella, A., Kägi, B., Tomasone, R., Coloio, G., 2006. Influence of stream sterilisation on soil chemical characteristics, trace metals and clay mineralogy. Geoderma 131, 123-142.

Enell, M., Wennberg, L., 1991. Distribution of halogenated organic-compounds (AOX) – Swedish transport to surrounding sea areas and mass balance studies in 5 drainage systems. Water Science & Technology 24, 385–395.

Ericksson, E., 1960. The yearly circulation of chloride and sulfur in nature; meteorological, geochemical and pedological implications. Tellus 12, 63-109

Fahimi, I., Keppler, F., and Schöler, H., 2003. Formation of chloroacetic acids from soil, humic acid and phenolic moieties. Chemosphere 52, 513–520.

Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., Akkermans, A.D.L., 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). Applied and Environmental Microbiology 64, 871–879.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques

Graedel, T.E., Crutzen, P.J., 1993. Atmospheric change : an Earth system perspective. International Journal of Climatology 15, 585-586.

Green, V.S., Stott, D.E., Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. Soil Biology and Biochemistry 38, 693-701.

Gribble, G. W., 1992. Naturally occurring organohalogen compounds–a survey. Journal of natural products 55, 1353–1395.

Gribble, G. W., 2003. The diversity of naturally produced organohalogens. Chemosphere 52, 289–297.

Grimvall, A., Boren, H., Jonsson, S., Karlsson, S., Savenhed, R., 1991. Organohalogens of natural and industrial origin in large recipients of bleach-plant effluents. Water Sciences and Technology 24, 73-383

Grimvall, A., De Leer, E. W., 1995. Naturally-produced organohalogens, volume 1. Springer Science & Business Media.

Gustavsson, M., Karlsson, S., Öberg, G., Sanden, P., Svensson, T., Valinia, S., Thiry, Y., Bastviken, D., 2012. Organic matter chlorination rates in different boreal soils : the role of soil organic matter content. Environmental science and technology 46, 1504–1510.

Haselmann, K.F., Laturnus, F., Groen, C., 2002. Formation of chloroform in soil. A year-round study at Danish spruce forest site. Water, Air and Soil Pollution 139, 35-41.

Harper, D. B., 1995. The contribution of natural halogenation processes to the atmospheric halomethane burden. Naturally-produced organohalogens, 1, 21–33

Herczeg, A.L., Leaney, F.W.J., Stadter, MF., Allan, G.L., Fifield, LK., 1997. Chemical and isotopic indicators of point-source recharge to a karst aquifer, South Australia. Journal of Hydrology 192, 271-299.

Heuer, C., Schukken, Y.H, Dobbelaar, P., 1999. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. Journal of Dairy Science 82, 295–304.

Heumann, K.G., Gallus, S.M., Rädlinger, G., Vogl, J., 1998. Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 13, 1001–1008.

Hintelmann, H., Evans, R.D., 1997. Application of stable isotopes in environmental tracer studies – Measurement of monomethylmercury ($CH_3Hg^+$) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. Frenesius Journal of Analytical Chemistry 358, 378–385.

Hjelm, O., Asplund, G., 1995. Chemical characterization of organohalogens in a coniferous forest soil. Environmental Chemistry 1, 105-111.

Hjelm, O., Borén, H., Öberg, G., 1996. Analysis of halogenated organic compounds in coniferous forest soil from a lepista nuda (wood blewitt) fairy ring. Chemosphere 32, 1719-1728.

Hoekstra, E.J., De Leer, E. D. W. B., Brinkman, U, A, Th., 1998. Natural formation of chloroform and brominated trihalomethanes in soil. Environmental Science and Technology. 32, 3724-3729.

Hoekstra, E.J., De Weerd, H., De Leer, E. D. W. B., Brinkman, U, A, Th., 1999. Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a douglas fir forest. Environmental Science and Technology. 33, 2543-2549.

Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science 6, 431–438

Hoelzl, R., Hoelzl, C., Kotz, L., Fabry, L., 1998. The optimal amount of isotopic spike solution for ultratrace analysis by isotope dilution mass spectrometry. Accreditation and Quality Assurance 3, 185–188.

Hunter, R. A., Siebert, B. D., 1987. The effect of supplements of rumen-degradable protein and formaldehyde-treated casein on the intake of low-nitrogen roughages by Bos taurus and Bos indicus steers at different stages of maturity. Australian Journal of agricultural research 38, 209-218

Johansson, E., Krantz-Rülcker, C., Zhang, B.X., Öberg, G., 2000. Chlorination biodegradation of lignin. Soil Biology and Biochemistry 32, 1029-1032.

Johansson, E., Sandén, P., Öberg, G., 2003. Organic chlorine in deciduous and coniferous forest soils in southern Sweden. Soil Science 168, 347-355.

Johansson, E., Sanden, P., Öberg, G., 2003. Spatial patterns of organic chlorine and chloride in Swedish forest soil. Chemosphere 52-391-397

Johansson, E., Xin, Z. B., Zhengyi, H., Sanden, P., and Öberg, G., 2004. Organic chlorine and chloride in submerged paddy soil : a case study in anhui province, southeast china. Soil use and management 20, 144–149.

Kashparov, V., Colle, C., Levchuk, S., Yoschenko, V., Zvarich, S., 2007. Radiochlorine concentration ratios for agricultural plants in various soil conditions. Journal of environmental radioactivity 95, 10-22

Keppler, F., Eiden, R., NIedan, V., Pracht, V., Schöler, H.F., 2000. Halocarbons produced by natural oxidation processes during degradation of organic matter. Nature. 403, 298-301.

Kirchner, J.W., Feng, X., Neal, C., 2000. Fractal stream chemistry and its implications for contaminant transport in catchments. Nature 403, 524–527.

Laniewski, K., Boren, H., Grimvall, A., Jonsson, S., and von Sydow, L., 1995. Chemical characterisation of adsorbable organic halogens (aox) in precipitation. Naturally-Produced Organohalogens, 1, 113–129.

Laniewski, K., Dahlén, J., Borén, H., Grimvall, A., 1999. Determination of group parameters for organically bound chlorine, bromine and iodine in precipitations. Chemosphere 38, 771-782

Lee, W., Batchelor, B., 2004. Abiotic reductive dechlorination of chlorinated ethylenes by soil. Chemosphere 55, 705-713

Leri, A.C., Marcus, M.A., Myneni, S.C.B., 2007. X-ray spectromicroscopy investigation of natural organochlorine distribution in weathering plant material. Geochimica et Cosmochimica Acta 71, 5834-5846

Leri, A.C., Myneni, S.C.B., 2011. Organochlorine turnover in forest ecosystems: The missing link in the terrestrial chlorine cycle. Global Biogeochemical Cycles. Vol 24, GB4021, doi: 10. 1029/2010GB003882

Leyval, C., Binet, P., 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in soil on arbuscular mycorrhizal colonization of plants. Journal of Environmental Quality 29, 402-407.

Lovett, G.M., Likens, G.E., Buso, D.C., Driscoll, C.T., Bailey, S.W., 2005. The biogeochemistry of chlorine at Hubbard Brook, New Hampshire, USA. Biogeochemistry. 72, 191-232.

Manoj, K.M., Hager, L.P., 2006. A colorimetric method for detection and quantification of chlorinated activity of hemeperoxidases. Analytical Biochemistry. 348, 84-86.

Marx, M.D., Thomas, W., Jax, M.D., Malte Kelm, M.D., Frank, C., Schoebel, M.D., Bodo, E., Strauer, M.D., 2001. Vineberg Graft: Flow Reserve of Bilateral Implantation After 27 Years. The annals of thoracic surgery 71, 341-3

Matucha, M., Gryndler, M., Forczek, S.T., Schroder, P., Bastviken, D., Rohlenova, J., Uhlirova, H., Fuksova, K., 2007. A chlorine-36 and carbon-14 study of the role of chlorine in the forest ecosystem. Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals 50, 437-439

Marx, M., Rutishauser, U., Bastmeyer, M., 2001. Dual function of polysialic acid during zebrafish central nervous system development. Development 128, 4949–4958.

Mc Namara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A., Parekh, N.R., 2003. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. Applied Soil Ecology 24, 117-132.

Mead, M.I., Khan, M.A.H., Nickless, G., Greally, B.R., Tainton, D., Pitman, T., Shallcross, D.E., 2008. Leaf cutter ants: a possible missing source of biogenic halocarbons. Environmental Chemistry 5, 5–10.

Melkerud, P.A., Olsson, M.T., Rosén, K., 1992. Geochemical atlas of Swedish forest soils. Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) Report 65.

Meijer, S.N., Ockenden, W.A., Sweetman, A., Breivi K.K., Grimalt, J.O., Jones, K.C., 2003. Global distribution and budget of PCBs and HCB in background surface soils: implications for sources and environmental processes. Environmental Science and Technology 37, 667-672.

Montelius, M., Thiry, Y., Marang, L., Ranger, J., Cornelis, J-T., Svensson, T. and Bastviken, D., 2015. Experimental evidence of large changes in terrestrial chlorine cycling following altered tree species composition. Environmental Science & Technology 49, 4921-4928

Montelius, M., Svensson, T., Lourino-Cabana, B.L., Thiry, Y., Bastviken, D., 2016. Chlorination and Dechlorination rates in a forest soil - A combined modelling and experimental approach. Science of the total Environment 554, 203-210.

Müller, G., Nkusi, G., and Schöler, H. F., 1996. Natural organohalogens in sediments. Journal fur Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung 338 :23–29.

Myneni, S.C.B., 2002. Formation of stable chlorinated hydrocarbons on wheathering plant material. Science 295 : 1039-1042.

Neidleman, S. L., Geigert, J., 1986. Biohalogenation : principles, basic roles, and applications. Acta Biotechnologica 47, 126-1987

Nyberg, L., Rodhe, A., and Bishop, K., 1999. Water transit times and flow paths from two line injections of 3h and $^{36}$cl in a microcatchment at gardsjon, sweden. Hydrological processes 13, 1557–1575.

Öberg, G., Brunberg, H., Hjelm, O., 1996. Production of organically bound chlorine during degradation of birch wood by common white-rot fungi. Soil Biology and Biochemistry 29, 191-197

Öberg, G., Brunberg, H., Hjelm, O., 1997. Production of organically-bound chlorine during degradation of birch wood by common white-rot fungi. Soil Biology and Biochemistry 29, 191-197

Öberg, G., 1998. Chloride and organic chlorine in soil. Acta hydrochimica et hydrobiologica 26, 137-144.

Öberg, G., Gron, C., 1998. Sources of Organic Halogens in Spruce Forest Soil. Environmental Sciences and Technology 32, 1573 – 1579

Öberg, G., 2002. The natural chlorine cycle – fitting the scattered pieces. Applied Microbiology and Technology 58, 565-581

Öberg, G., 2003. The biogeochemistry of chlorine in soil, Natural Production of Organohalogen Compounds. The Handbook of Environmental Chemistry 3, 43-62.

Öberg, G., Holm, M., Sandén, P., Svensson, T., Parikka, M., 2005. The role of organic-matter-bound chlorine in the chlorine cycle: a case study of the Stubbetorp catchment, Sweden. Biogeochemistry. 75, 241-269.

Pereira, J.S.F., Moreira, C.M., Albers, C.N., Jacobsen, O.S., Flores, E.M.M., 2011. Determination of total organic halogen (TOX) in humic acids after microwave-induces combustion. Chemosphere. 83, 281-286.

Potts, M.J., 1978. The pattern of deposition of air-borne salt of marine origin under a forest canopy. Plant and Soil 50, 233-236

Pries, F., van der Ploeg, J.R., Dolfing, J., Janssen, D.B., 1994. Degradation of halogenated aliphatic compounds: the role of adaptation. FEMS Microbiology Reviews 15, 279–295.

Pupier, J., Benedetti, L., Bourlès, D., Leclerc, E., Thiry, Y., Guillou, V., Team, A., 2015. Monthly record of the Cl and 36Cl fallout rates in a decideous forest ecosystem in NE france in 2012 and 2013. Quaternary Geochronology, in press

Putschew, A., Mania, M., Jekel, M., 2003. Occurrence and source of brominated organic compounds in surface waters. Chemosphere. 52, 399-407.

Quantin, C., Joner, E.J., Portal, J.M., Berthelin, J., 2005. PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. Environmental Pollution. 134, 315-322.

Ramakrishna, D.M., Viraraghavan, T., 2005. Environmental impact of chemical deicers-a review. Water ail soil pollution 166, 49-63

Ravel, B., Newville, M., 2005. "ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT." Journal of Synchrotron Radiation 12, 537-541.

Redon, P.O., Abdelouas, A., Bastviken, D., Cecchini Sn Nicolas, M., Thiry, Y., 2011. Chloride and organic chlorine in forest soils: storage, residence times, and influence of ecological conditions. Environmental Science and Technology 45, 7202-7208.

Redon, P.O., Jolivet, C., Saby, N.P.A., Abdelouas, A., Thiry, Y., 2012. Occurrence of natural organic chlorine in soils for different land uses. Biogeochemistry 114, 413-419.

Rengasamy, P., 2010. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. Australian Journal of Soil Research 37, 613–620.

Rhew, R. C., Miller B. R., Bill, M., Goldstein, A.H., Weiss, R.F., 2002. Environmental and biological controls on methyl halide emissions from southern California coastal salt marshes. Biogeochemistry 60, 141–161

Rhew, R. C., Miller, B. R., Weiss, R.F., 2008. Chloroform, carbon tetrachloride and methyl chloroform fluxes in southern California ecosystems. Atmospheric Environment 42, 7135–7140

Rodstedth, M., Ståhlberg, C., Sandén, P., Öberg, G., 2003. Chloride imbalances in soil lysimeters. Chemosphere 52, 381-389

Rohlenová, J., Gryndler, M., Forczek, S.T., Fuksová, K., Handová, V., Matucha, M., 2009. Microbial chlorination of organic matter in forest soil: investigation using $^{36}$Cl-chloride and its methodology. Environmental Science and Technology 43, 3652-3655.

Simpson, W.R., von Glasow Riedel, K., Anderson, P., Ariya, A., Bottenheim, J., Burrows, J., Carpenter ,L.J., Frieß, U., Goodsite, M.E., Heard, D ;, Hutterli, M., Jacobi, H.W., Kaleschke, L., Neff, B., Plane, J., Platt, U., Richter, A., Roscoe, H., Sander, R., Shepson, P., Sodeau, J., Steffen, A., Wagner, T., Wolff, E., 2007. Halogens and their role in polar boundary-layer ozone depletion. Atmospheric Chemistry and Physics 7, 4375-4418

Sohn, J., Amy, G., Cho, J., Lee, Y., Yoon, Y., 2016. Disinfectant decay and disinfection by-products formation model development: chlorination and ozonation by-products. Water Research 38, 2461–2478

Stauffer, M., Leyval, C., Brun, J.J., Leportier, P., Berthelin, J., 2014. Effect of willow short rotation coppice on soil properties after three years of growth as compared to forest, grassland and arable land uses. Plant Soil. 377, 423-438

Stringer, R., Johnston, P., 2001. Chlorine and the environment: an overview of the chlorine industry. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Svensson, T., Sanden, P., Bastviken, D., and Öberg, G., 2007. Chlorine transport in a small catchment in southeast sweden during two years. Biogeochemistry 82, 181–199.

Svensson, T., Lovett, G.M., Lokens, G.E., 2010. Is chlorine a conservative ion in forest ecosystems? Biogeochemistry 107, 125-134.

Thion, C., Cébron, A., Beguiristain, T., Leyval, C., 2012. PAH biotransformation and sorption by Fusarium solani and Arthrobacter oxydans isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. International Biodeterioration & Biodegradation 68, 28–35.

Tröjbom, M., Söderbäck, B., Kalinowski, B., 2008. Hydrochemistry of surface water and shallow groundwater. Site descriptive modeling, SDM-Site Laxemar. SKB R-08-46, Svensk Kärnbränslehantering AB.

Van den Hoof, C., Thiry, Y., 2012. Modelling of the natural chlorine cycling in a coniferous stand : implications for chlorine-36 behaviour in a contaminated orest environment. Journal of Environmental Radioactivity 107, 56-67

van Pée, K.H., 2001. Microbial synthesis of halometabolites. Archieves of Microbiology 175, 250–258.

Van Pee, K.H., Unversucht, S., 2003. Biological dehalogenation and halogenation reactions. Chemosphere. 53, 299-312.

Verhagen, F.J.M., Swarts, H.J., Wijnberg, J.B.P.A., Field, J.A., 1998. Organohalogen production in a ubiquitous capacity among basidomycetes. Chemosphere. 37, 2091-2104.

Wang, J., Qin, P., Sun, S., 2007,. The flux of chloroform and tetrachloromethane along an elevational gradient of a coastal salt marsh, East China. Environmental Pollution 148, 10–20

Watts, M.J., Mitchell, C.J., 2009. A pilot study on iodine in soils of Greater Kabul and Nangarhar provinces of Afghanistan. Environmental Geochemistry and Health 31, 503-509.

White, P.J., Broadley, M.R., 2001. Chlorine in soils and its uptake and movement within the plant : a review. Annals of Botany 88, 967-988

Winder, C., 2001. The toxicology of chlorine. Environmental Research 85, 105-114

Winterton, N., 2000. Chlorine: the only green element – towards a wider acceptance of its role in natural cycles. Green Chemistry 2, 173-225.

Xu, C., Zhang, S., Ho, Y,F., Miller, E.J., Roberts, K.A., Li, H.P., Schwehr, K.A., Otosaka, S., Kaplan, D.I., Brinkmeyer, R., Yeager, C.M., Santschi, P.H., 2000. Is soil natural organic matter a sink or source for mobile radioiodine ($^{129}I$) at the Savannah River Site? Geochimica et Cosmochimica Acta 75, 5716-5735

Yokouchi, Y., Ikeda, M., Inuzuka, Y., Yukawa, T., 2002a. Strong emission of methyl chloride from tropical plants. Nature 416, 163–165.

Yu, L.L., Fassett, J.D., Guthrie, W.F., 2002. Detection limit of isotope dilution mass spectrometry. Analytical Chemistry 74, 3887-3891.

Yunos, N., Bellomo, R., Story, D., and Kellum, J., 2010. Bench-to-bedside review : chloride in critical illness. Critical Care 14, 224-226

# Annexes

# Annexes

*Annexe 1 : Teneurs en chlore ($Cl_{TOT}$, $Cl_{ONE}$, $Cl_{OE1}$) mesurées par analyseur d'AOX pour l'ensemble des échantillons étudiés (VF, VP, MF et MC) aux 3 années de prélèvements (2012, 2013 et 2014). n = nombre d'échantillons composites prélevés chaque année (soit n = 3 en 2012 et n = 4 en 2013 et 2014)*

| Sols | TOT ($mg.kg^{-1}$) | OE 1($mg.kg^{-1}$) | $O_{NE}$ ($mg.kg^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| VF | | | |
| 2012 | 136,0 ± 13,9 | 0,7 ± 0,26 | 123,8 ± 7,6 |
| 2013 | 70,5 ± 6,5 | 0,4 ± 0,03 | 57,6 ± 7,8 |
| 2014 | 42,6 ± 3,4 | 0,2 ± 0,03 | 39,9 ± 4,5 |
| VP | | | |
| 2013 | 32,8 ± 1,4 | 0,2 ± 0,03 | 25,7 ± 3,3 |
| 2014 | 21,3 ± 1,9 | 0,2 ± 0,04 | 20,3 ± 1,4 |
| MF | | | |
| 2012 | 38,6 ± 2,3 | 0,5 ± 0,29 | 30,7 ± 0,8 |
| 2013 | 42,0 ± 4,0 | 0,4 ± 0,27 | 33,7 ± 3,3 |
| 2014 | 25,8 ± 2,7 | 0,2 ± 0,01 | 23,0 ± 2,7 |
| MC | | | |
| 2012 | 25,1 ± 3,7 | 0,2 ± 0,05 | 21,8 ± 1,3 |
| 2013 | 34,1 ± 4,4 | 0,2 ± 0,06 | 34,5 ± 6,8 |
| 2014 | 29,1 ± 7,5 | 0,2 ± 0,03 | 35,3 ± 14,1 |

**Résumé**

Le chlore a longtemps été considéré comme la forme de chlore majoritairement présente dans l'environnement. Cependant, de récentes études ont démontré que des quantités de chlore sont retenues dans les sols sous une forme organique et seraient formées par un processus naturel de chloruration peu documenté et issus de l'activité microbienne des sols. Le but de cette étude est d'estimer les formes organique et inorganique de chlore dans des sols contrastés et de mettre en évidence l'évolution de ces formes de chlore selon certains paramètres environnementaux ou modalités d'incubations en fonction de l'activité des microorganismes.

Pour cela, les horizons organo-minéraux de sols contrastés ont été étudiés (i) *in situ :* Les quantités de chlore ainsi que les paramètres physico-chimiques et microbiologiques de sols ont été mesuré ; (ii) dans deux dispositifs expérimentaux d'incubations sous différentes modalités. Les mesures des teneurs en chlore entre le début et la fin de la première expérience ont été mesurées par analyseur d'AOX. Pour la deuxième expérience, les sols ont été préalablement enrichis en $Na^{37}Cl$ et les teneurs en $^{37}Cl$ ont été mesurées par ICP MS HR. Des échantillons de sols provenant de ces incubations ont été analysés par spectrométrie Xanes pour préciser la spéciation du chlore dans les sols. Les teneurs en chlore organique non extractibles des sols représentent presque la totalité du chlore. Les paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols correspondent au couvert végétal, au pH, à la teneur en carbone organique et aux quantités de microorganismes. Les teneurs en chlore mesurées par analyseur d'AOX et par ICP MS HR ont permis de mettre en évidence une formation de chlore organique au cours du temps, en relation avec les paramètres microbiologiques des sols. Les mesures réalisées par ICP MS HR ont montré également une formation de chlore organique en conditions abiotiques. A l'inverse, les analyses réalisées par spectrométrie XANES n'ont pas permis de mettre en évidence une formation de chlore organique.

En conclusion, les paramètres qui influencent la répartition des teneurs en chlore dans les sols ont pu être ciblés. De la même façon, l'origine microbienne du processus de chloruration a été mise en évidence, bien qu'une part de ce processus soit également attribuée à un phénomène abiotique.

**Abstract**

Chlorine has long been considered as the predominantly chlorine form present in the environment. However, recent studies have shown that chlorine is retained in the soil as an organic form and is formed by a natural process of chlorination mainly from the microbial activity of the soi still poorly documented. The aim of this study is to estimate the organic and inorganic forms of chlorine in contrasting soil and highlight the evolution of these forms according to certain environmental parameters or terms of incubations and to the activity of microorganisms.

For this, the organo-mineral horizons of contrasting soil were studied (i) in situ: The amounts of chlorine and physico-chemical and microbiological parameters of soil were measured; (ii) in two experimental devices incubations under different conditions. Measurements of chlorine levels between the beginning and the end of the first experiment were measured by AOX analyzer. For the second experiment, the soil was previously enriched with $Na^{37}Cl$ and $^{37}Cl$ levels were measured by HR ICP MS. Soil samples from these incubations were analyzed by Xanes spectrometry to identify the speciation of chlorine forms in soils.Soil non-extractable organic chlorine contents represent almost all of the chlorine. The parameters that influence the distribution of chlorine contents in soils correspond to vegetation cover, pH, organic carbon content and quantities of microorganisms. The chlorine contents measured by AOX analyzer and by HR ICP MS highlight an organic chlorine formation over time in relation to the microorganims in the soil. The measures carried out by HR ICP MS show also an organic chlorine formation in abiotic conditions. Conversely, XANES spectrometry measurements have show any organic chlorine formation.

In conclusion, the parameters that influence the distribution of chlorine contents in soils have been targeted. Similarly, the microbial origin of the chlorination process has been demonstrated, although a part of this process is also assigned to an abiotic phenomenon.