



HAL
open science

Evolution temporelle de la disponibilité du cuivre dans les sols en viticulture biologique

Frédéric Ouédraogo

► **To cite this version:**

Frédéric Ouédraogo. Evolution temporelle de la disponibilité du cuivre dans les sols en viticulture biologique. Ecologie, Environnement. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0194 . tel-04433516

HAL Id: tel-04433516

<https://theses.hal.science/tel-04433516v1>

Submitted on 2 Feb 2024

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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

SPÉCIALITÉ : GÉOCHIMIE & ÉCOTOXICOLOGIE

Par Frédéric OUEDRAOGO

**Évolution temporelle de la disponibilité du cuivre dans les sols en
viticulture biologique**

Sous la direction de : Laurence DENAIX
Et de Edith PARLANTI

Soutenue le 17 Juin 2022 à Villenave d'Ornon

Membres du jury :

Mme Eva SCHRECK-SILVANO
Mme Céline GUEGUEN
M. Jörg SCHÄFER
M. Matthieu BRAVIN
M. Matthieu MASSON
Mme Laurence DENAIX
Mme Edith PARLANTI

Maître de conférences, Université Paul-Sabatier
Professeur, Université de Sherbrooke
Professeur, Université de Bordeaux
Chercheur, CIRAD
Ingénieur de recherche, INRAE, Villeurbanne
Directrice de recherche, INRAE, Bordeaux
Chargée de recherche, CNRS, Bordeaux

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité
Directrice
Co-Directrice

« Les illettrés du XXI^e siècle ne seront pas ceux qui ne savent pas lire ou écrire, mais ceux qui ne sauront pas apprendre, désapprendre et réapprendre. »

Alvin Toffler

Remerciements

Octobre 2018 - Juin 2022. Cela fait maintenant près de 4 ans que je me suis lancé dans cette aventure, qui vue d'aujourd'hui représente un sacré morceau de vie. Cette thèse n'aurait pas eu les mêmes résultats ni la même saveur, sans la participation de nombreuses personnes, qui de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser mon objectif.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma gratitude envers Laurence D. et Edith P., mes deux directrices de thèse. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir confié ce qui n'était encore qu'un projet en été 2018. Vous m'avez énormément appris scientifiquement, et humainement. De vous, j'ai bénéficié de patience et bienveillance et vous m'avez accordé une autonomie pour conduire mes travaux tout en les encadrant rigoureusement. La complémentarité de vos compétences a enrichi mes aptitudes, m'a très souvent poussé hors de ma zone de confort mais m'a permis d'affiner mon raisonnement scientifique. L'énergie positive dans laquelle on travaillait me boostait et me gardait motivé malgré les challenges. Vous vous êtes battues pour que j'ai le moins de pépins administratifs possibles, afin que je puisse me consacrer entièrement à mon travail. Travailler avec vous m'a fait développer des compétences qui me seront utiles pour la suite. D'ailleurs, je prophétise que si un jour j'ai l'occasion d'encadrer du personnel dans quelque métier que ce soit, on y retrouvera un peu de votre patte managériale.

Je remercie les membres du jury de ma thèse, qui se sont intéressés à ma thèse et pour l'honneur qu'ils me font de l'évaluer. Merci à Eva SCHRECK-SILVANO, Céline GUEGUEN, merci d'avoir investi votre temps et votre énergie à lire et à commenter mon manuscrit. Merci à Jörg SCHÄFER, Matthieu BRAVIN, Matthieu MASSON d'avoir accepté d'examiner mes travaux et de participer à ma soutenance.

Je remercie aussi les structures administratives, notamment Bordeaux Sciences Agro et l'initiative INSU-EC2CO pour avoir financé mes travaux de thèse. Je remercie l'école doctorale Sciences et Environnements de l'Université de Bordeaux pour leur accompagnement et pour les nombreuses formations doctorales dont j'ai bénéficié : le directeur Frédéric GARABETIAN, les gestionnaires Brigitte BORDES et Maëlle COUDRE, qui s'occupe de ma procédure de soutenance.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, qui année après année, m'ont conseillé et aidé à positionner ma méthodologie scientifique et à bien gérer mes plannings d'expérimentations et de rédaction. Merci à Nicolas FANIN, Soizic MORIN, Jean-Yves CORNU, Noémie JANOT, Arnaud HUGUET et Zuzana FEKIACOVA.

Merci à ces chercheurs du laboratoire ISPA, qui ont scientifiquement enrichi mes travaux de thèse. Merci Jean-Yves C. pour ta sympathie et pour t'être intéressé à mes travaux tout au long de ma thèse. J'ai apprécié nos conversations durant nos séances de footing du dimanche midi, j'espère qu'on en refera. Merci Noémie J. pour ton aide et tes nombreux conseils, d'avoir fait souvent évoluer ma réflexion sur les mécanismes chimiques et sur ma thèse en général. Merci Christophe N. de t'être intéressé à mes manipulations et de m'avoir aidé dans les modélisations sur R. Noémie, Jean-Yves et Christophe, votre participation dans mon article l'a fait considérablement gagner en qualité, je vous en remercie. Merci spécial à Nicolas F., tu m'as énormément apporté au cours de ma thèse. Grâce à toi, j'ai pu développer la dimension « biologique » de ma problématique de thèse. Merci de t'impliquer autant dans le bien-être des doctorants du laboratoire, insistant souvent pour qu'on prenne des jours de repos. Je me souviens du discours motivant que tu m'avais servi lors de nos sorties d'échantillonnage de sols après le (dé)confinement. Quelques mois plus tard, j'avais réussi à terminer et à publier mon article, je t'en remercie.

Je ne pourrai pas oublier de remercier toutes ces mains et ces énergies qui m'ont aidé à opérationnaliser ma thèse. Merci à Cécile C. pour avoir réalisé mes mesures d'ICP, et la mise en place de mes expériences d'incubation, tu es souvent restée tard au laboratoire, afin que j'aie mes résultats à temps. Merci à Sylvie B. pour mes mesures de COD. Notre machine étant tombée en panne, tu t'es très souvent déplacée pour analyser mes solutions dans un autre laboratoire, et j'ai pu ainsi obtenir des données. Merci à Mahaut S. qui a réalisé les mesures optiques de MOD au cours des incubations, ainsi que les traitements PARAFAC, ce qui m'a fait gagner beaucoup de temps que j'ai pu consacrer aux autres manipulations. Merci à Sylvie M. pour son aide précieuse dans les mesures de respiration

du sol et d'activités enzymatiques. Merci à Thierry R. qui après plusieurs prototypes, a mis en place le système bocal-trépied, qui a servi de contenants pour incuber mes sols. Cela mérite clairement d'être breveté. Merci à tous les viticulteurs du projet, qui nous ont toujours accueillis avec sourire lors de nos séances d'échantillonnage de sols et de litières. Merci aussi à Corinne S. et à Maylis S-H., pour votre gentillesse et pour m'avoir aidé dans les procédures administratives et les envois de colis. Merci à Éric M. pour m'avoir aidé dans mes soucis informatiques. Merci aussi au personnel de la cantine de l'INRAE-Grande Ferrade pour leur convivialité et les excellents mets qui faisaient qu'on était impatient que 11h45 sonnassent.

Je voudrais remercier les étudiants que j'ai eus comme stagiaires pendant ma thèse : Pierre B., qui a fait une analyse bibliographique sur la MOD et Camille F. qui a réalisé les analyses d'activités enzymatiques. Vos travaux de stage ont aussi contribué à édifier ce manuscrit. Au passage, merci d'avoir servi de « cobayes » pour tester mes capacités managériales.

Merci à Alain M. pour sa gentillesse. Je me rappelle que tu es la première personne que j'ai croisée au laboratoire quand je suis arrivé un matin d'Octobre 2018. Je te souhaite un bon mandat de directeur d'unité. Merci à Valérie S.D. pour m'avoir aidé à me repérer lors de mes premières manipulations ainsi que pour la rédaction de mon protocole d'extraction. Merci Marie L. pour m'avoir aidé dans la phase test au début de ma thèse. Merci aux autres chercheurs de l'unité ISPA pour leur sympathie. Merci Mark B. pour ta sympathie et ta simplicité, merci de concourir à cette ambiance bienveillante qui règne dans le laboratoire.

Je remercie aussi tous les doctorants du bâtiment C3 ISPA, pour la bonne humeur générale et l'esprit d'entraide. Les devanciers Manon P., Mohamed El M., David V., Arthur G., Marko K., Andreas A., Pietro B., Julian G., mes promotionnaires Tania M., Ulysse G., ainsi que mes successeurs Abraham P., Pierre E., Pierre V., Pierre B., Mounir S., Noélie B., Joséphine D., Nomena R., Agathe V., Nicolas M. et Lucie B., mes vœux de réussite dans vos thèses respectives. Merci à la Team Foot du Jeudi soir, qui m'a certainement permis de décompresser en cassant quelques jambes. Merci spécialement à mon ami Mohamed El Mazlouzi. J'ai apprécié nos conversations tantôt foot, tantôt rigolade, tantôt philosophie de vie. Je te souhaite un bon vent dans ta jeune carrière d'enseignant-chercheur.

Je souhaiterais aussi remercier tous les doctorants et le personnel du laboratoire LPTC/EPOC de l'Université de Bordeaux. Je n'ai pas souvent été là, le Covid-19 n'y a pas aidé non-plus, mais j'ai pu constater votre sympathie et votre hospitalité à chaque fois que je venais.

Je remercie mes enseignants du CEREGE (Aix-en-Provence) : Sophie CORNU, Jean-Dominique MEUNIER, Catherine KELLER et Blanche COLLIN, qui à travers mes années de master et mon stage de recherche, m'ont encouragé à continuer en thèse. Je détiens encore les lettres de recommandation que vous m'aviez rédigées pour que je postule aux offres de thèse. Je dois aussi un remerciement aux chercheurs avec qui j'avais candidaté pour des offres de thèse, qui n'ont finalement pas abouti : Émilie BEAULIEU (Université de Strasbourg), Laure BARTHES (Université Paris Saclay), Jérôme CORTET et Christophe JOURDAN (Université de Montpellier). Ces candidatures m'ont entraîné et m'auront été utiles pour décrocher cette présente thèse, qui finalement correspondait le mieux à mes aspirations. Merci aussi à mes professeurs de l'Université de Sétif (Algérie) qui m'ont encouragé à aller loin dans mes études.

Un énorme merci à tous mes amis qui me soutiennent depuis le début, Zéphirin K., Franck Z., Marina K., Karel K., Miguel K., en particulier ceux avec qui j'ai fait mes études en Algérie : spécialement à mon frère Mahamadi S. et à sa dulcinée Sanatou S. T. pour leur fraternité qui perdure depuis des années (merci de votre aide précieuse pour la mise en page de mon manuscrit, je sais que je pourrai toujours compter sur vous), à mes colocataires du Djazair Aboubacar T., Mohamed S., Ahmeda O. et tous les autres amis en France, au Burkina et en Algérie, qui me sont chers.

Merci à mes deux parents, Vincent O. et Cécile O. K. Vos prières et vos bénédictions m'ont toujours accompagné dans mes choix et dans mes décisions. Cette thèse est aussi le fruit de votre acharnement pour la réussite de vos enfants. Merci à mes 3 frères et sœurs, Appolinaire O., Laurencia O. et Linda O. pour leur soutien inconditionnel et pour l'amitié que nous avons les uns pour les autres. Je remercie aussi ma belle-famille, chaleureusement ma belle-mère Françoise Z. pour ses prières et ses

encouragements. Merci à ma grande famille pour le soutien. Merci à ma tante Emilienne K. et à mes deux « koros » Toussaint P. et Claver O., qui représentent pour moi des modèles de réussite.

Bien évidemment, je ne saurai terminer sans remercier cette petite araignée taciturne, qui sur le rebord de ma fenêtre, tissait sa toile en me regardant travailler aux heures tardives des derniers soirs de ma rédaction. J'avais l'impression d'avoir de la compagnie pendant que je déversais ma pensée sur Word.

Enfin, je te remercie toi ma fiancée Wend-Yam L. Z. Mes travaux ont fait que j'ai très souvent été rare, ce que tu as accepté sans broncher. Il est clair, cette thèse t'appartient aussi. Nous y avons tous les deux investi des sacrifices et je compte bien les amortir. Merci pour ce beau chemin que nous avons décidé de partager ensemble.

A vous tous qui, de près ou de loin, m'avez soutenu dans ce travail,

A handwritten signature in blue ink that reads "Merci". The word "Merci" is written in a cursive, flowing style. The "M" is large and loops around, with the "erci" following in a similar cursive script.

Frédéric O.

Résumé

L'usage des fongicides cupriques depuis le XIX^{ème} siècle a causé une accumulation de cuivre (Cu) dans les sols viticoles. De la phytotoxicité a ainsi été observée dans certaines parcelles. La disponibilité du Cu dépend de sa spéciation et des échanges sol-solution, donc de sa concentration totale en solution et de celle de sa fraction ionique Cu^{2+} . Le cuivre présente une forte affinité pour la matière organique du sol (MO), et particulièrement pour la matière organique dissoute (MOD). La minéralisation de la MO et la dynamique de la MOD dépendent de la gestion agronomique des sols via les apports organiques et des facteurs climatiques tels que la température. La dynamique de la MOD, via sa quantité et sa qualité, pourrait affecter la disponibilité du Cu. Cependant, le lien entre la dynamique de la MOD et la disponibilité du cuivre est mal connu.

Cette thèse étudie les effets de la qualité et de la dynamique temporelle de la MOD sur la disponibilité du cuivre, en s'appuyant sur des sols en viticulture biologique de la région de Bordeaux. Il s'est agi d'étudier si la quantité ou la qualité de la MOD, analysée via ses propriétés de fluorescence et d'absorbance, expliquait les concentrations du cuivre total ou du Cu^{2+} en solution, considérés ici comme des indicateurs de disponibilité du cuivre.

Dans des sols représentant une gamme de teneur en Cu (28 - 238 mg kg^{-1}), de teneur en carbone organique (5 - 31 g kg^{-1}) et de pH (6.3 - 8.2), les solutions de sol à l'équilibre extraites présentent des concentrations en Cu total variant de 0.1 à 2.6 μM et en Cu^{2+} variant de $2 \cdot 10^{-4}$ à 1 μM . Les sols étudiés ont une plus forte variabilité des propriétés optiques de la MOD que des concentrations en carbone organique dissout. L'analyse statistique des relations entre les concentrations en Cu total en solution et les paramètres de la MOD ou les propriétés du sol souligne l'importance de certains paramètres qualitatifs de la MOD tels que le degré d'humification (HIX). La variabilité des concentrations en Cu^{2+} s'explique à 88 % par le pH.

En jouant sur la température, il est possible de stimuler la minéralisation de la MO qui pourrait libérer du Cu initialement sorbé sur la MO. En incubant des sols, la minéralisation de la MO du sol a effectivement été plus importante à 30°C qu'à 20°C. Cependant, la température a peu impacté la désorption du Cu et n'a pas significativement affecté la concentration du Cu^{2+} . Dans le sol au ratio C:N le plus faible, la concentration de cuivre total dans les extraits augmentait au fil de l'incubation, du fait de l'activité biologique plus prononcée. Le Cu^{2+} s'est avéré fortement lié au pH, indiquant une décorrélation avec le Cu total dans les extraits de sol.

L'apport de matières organiques au sol stimule aussi l'activité biologique et peut augmenter la minéralisation de la MO initiale et ainsi modifier la dynamique du Cu. Lors de l'incubation de sols amendés avec des résidus végétaux (feuilles de vigne, d'avoine ou de féverole), les activités enzymatiques et la minéralisation de la MO se sont intensifiées. Aux premiers jours, un pic de concentration en MOD et Cu (total et libre) indique une solubilisation de MO labile et du Cu, concomitante avec une baisse de pH. La MOD est rapidement consommée entraînant une baisse de sa concentration et une augmentation de son degré d'humification. La dynamique du Cu total dans les

extraits a été significativement impactée par celle de la MOD tandis que celle du Cu^{2+} dépendait majoritairement des variations de pH. Ceci confirme la décorrélation entre le Cu total et le Cu^{2+} dans les extraits de sol étudiés.

Les résultats de ce travail indiquent que les variations de température pourraient avoir un effet limité sur la disponibilité du Cu. Par contre, des apports organiques induisent des changements importants sur la dynamique du Cu et variables selon les sols. La gestion agronomique des matières organiques pourrait permettre de mieux contrôler la disponibilité du cuivre dans les sols viticoles.

Mots-clés : Sol - Matière organique - Cuivre - Disponibilité - Vigne

Abstract

The use of cupric fungicides since the 19th century has caused an accumulation of copper (Cu) in vineyard soils. Hence, phytotoxicity has been observed in some vineyard plots. The availability of Cu depends on its speciation and soil-solution exchanges, therefore on its total concentration in solution and that of its ionic fraction Cu²⁺. Cu has a strong affinity for soil organic matter (OM), and particularly for dissolved organic matter (DOM). OM mineralization and DOM dynamics depend on the agronomic management of soils via organic inputs and on climatic factors such as temperature. The dynamics of DOM, via its quantity and quality, are likely to affect the availability of Cu. However, the link between DOM dynamics and Cu availability is poorly understood.

This thesis focuses on the effects of the quality and temporal dynamics of DOM on the availability of Cu, based on soils in organic viticulture in the Bordeaux region. The aim was to study whether the quantity or quality of DOM, analyzed via its fluorescence and absorbance properties, could explain the concentrations of total Cu or Cu²⁺ in solution, considered here as indicators of Cu availability.

In soils representing a range of Cu content (28 - 238 mg kg⁻¹), organic carbon content (5 - 31 g kg⁻¹) and pH (6.3 - 8.2), stabilized soil extracts show concentrations in total Cu varying from 0.1 to 2.6 μM and in Cu²⁺ varying from 2.10⁻⁴ to 1 μM. The soils studied have a higher variability of the optical properties of the DOM than of the concentrations of dissolved organic carbon. Statistical analysis of the relationships between total Cu concentrations in solution and DOM parameters or soil properties highlights the importance of some qualitative DOM parameters such as the degree of humification (HIX). The variability of Cu²⁺ concentrations is explained by pH at 88%.

By modifying the temperature, it is possible to stimulate the mineralization of the OM which could thus release some Cu initially sorbed on the OM. By incubating soils, the mineralization of soil OM was indeed greater at 30°C than at 20°C. However, temperature did not significantly affect the concentration of Cu²⁺, and had only a slight impact on Cu desorption. In the soil with the lowest C:N ratio, the concentration of total Cu in the extracts increased over incubation, due to the more important biological activity. Cu²⁺ was found to be strongly linked to pH, indicating a decorrelation with total Cu in the soil extracts.

The supply of organic matters to the soil also stimulates biological activity and can increase the mineralization of the initial OM and thus modify the dynamics of Cu. During the incubation of soils amended with plant residues (vine, oat or faba bean leaves), the enzymatic activities and the mineralization of OM intensified. During the first days, a peak in the concentration of MOD and Cu (total and free) indicates a solubilization of labile MO and Cu, concomitant with a drop in pH. DOM is quickly consumed, causing a decrease in its concentration and an increase in its degree of humification. The dynamics of total Cu in the extracts was significantly impacted by that of DOM while Cu²⁺ depended mainly on pH variations. This confirms the decorrelation between total Cu and Cu²⁺ in the soil extracts of our work.

The results of this thesis indicate that temperature variations could have a limited effect on Cu availability. On the other hand, organic inputs induce significant changes in the dynamics of Cu and depending on the soil. The agronomic management of organic matter could make it possible to better control the availability of copper in vineyard soils.

Keywords: Soil - Organic matter - Copper - Availability - Vineyard

Tables des matières

Introduction générale.....	16
----------------------------	----

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE - DEMARCHE SCIENTIFIQUE - MATERIELS ET METHODES GENERAUX.....20

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique 20

1	Les sols, matrices dynamiques et diverses	21
1.1	Composition des sols	21
1.1.1	La phase gazeuse.....	21
1.1.2	La solution du sol	21
1.1.2	La phase solide du sol.....	21
2	La matière organique dissoute (MOD)	33
2.1	Composition de la MOD	33
2.2	Origines et flux de la MOD dans les sols.....	34
2.3	Facteurs influençant la dynamique de la MOD dans les sols.....	35
2.4	Techniques de caractérisation de la MOD.....	37
2.4.1	Analyses par spectrophotométrie UV-Visible	37
2.4.2	Analyses par spectroscopie de fluorescence.....	39
2.4.3	Parallel factor Analysis (PARAFAC).....	42
2.5	Impact de l'apport de litières fraîches sur la dynamique de la MO et le fonctionnement du sol	42
3	Le cuivre : dynamique dans le sol.....	43
3.1	Spéciation du cuivre dans la phase solide du sol	43
3.2	Spéciation du cuivre en solution	44
3.3	Les mécanismes affectant les échanges sol-solution des métaux.....	45
3.3.1	L'adsorption sur les phases solides.....	46
3.3.2	La complexation en solution	47
3.3.3	La précipitation et la dissolution	47
3.3.4	Cas particulier de l'interaction chimique du Cu avec la MO	48
3.4	Le phénomène d'aging.....	48
3.5	Disponibilité et biodisponibilité	49
3.6	Dynamique du Cu disponible dans les sols.....	50
3.6.1	Interactions entre MOD et cuivre dans la solution de sol et exploitation des propriétés optiques de la MOD.....	50
3.6.2	Impact de la température sur la disponibilité du cuivre.....	52
3.6.3	Impact de la minéralisation de MO exogène sur la disponibilité du cuivre	53
3.7	Le cuivre dans les sols viticoles	54

Chapitre 2 : Démarche scientifique de la thèse.....	56
1 Cadre conceptuel.....	57
2 Objectif et questionnement scientifique.....	58
3 Stratégie globale d'expérimentations.....	59
Chapitre 3 : Matériels et méthodes généraux.....	62
Rappel des expériences.....	63
1 Site et matériaux de l'étude.....	63
1.1 Echantillonnage des sols.....	64
1.2 Choix des sols.....	64
1.3 Echantillonnage des litières.....	65
2 Incubations.....	66
3 Protocole d'extraction de la solution de sol.....	67
4 Dosages analytiques.....	68
4.1 pH et activité du cuivre libre.....	68
4.2 Eléments totaux en solution.....	68
4.3 Concentration de COD.....	69
4.3.1 Mesures des propriétés optiques de la MOD.....	69
4.3.2 Parallel factor Analysis (PARAFAC).....	70
4.4 Mesures de l'activité biologique des sols.....	71
4.4.1 Taux de minéralisation du carbone.....	71
4.4.2 Activités enzymatiques.....	71
5 Traitement des données et analyses statistiques.....	72
Références.....	74

PARTIE 2 : CHAPITRES DES RESULTATS D'EXPERIMENTATIONS..... 83

Chapitre 4 : Prédiction de la disponibilité du cuivre dans des sols viticoles via l'exploitation des paramètres optiques de la MOD.....	83
Prélude.....	84
Abstract.....	85
1 Introduction.....	86
2 Material and methods.....	88
2.1 Soil sampling and analyses.....	88
2.2 Extraction of soil solutions.....	88
2.3 Analyses of soil extracts.....	89
2.3.1 Total dissolved metals and Cu ²⁺ concentrations.....	89
2.3.2 Dissolved organic matter parameters.....	89
2.4 Statistical analyses.....	90
2.5 Modelling Cu ²⁺ activity.....	91
3 Results and discussion.....	92
3.1 Soil properties.....	92
3.2 Elemental composition of the soil extracts and Cu availability.....	93
3.3 Diversity of soils in terms of DOM properties.....	94

3.4	Relationships between the variables	96
3.5	Prediction of Cu availability using the properties of the soils and the extracts.....	100
3.5.1	Prediction of total Cu in extracts Cu_{KCl}	101
3.5.2	Prediction of free ionic Cu^{2+}	102
3.6	Influence of DOC composition on Cu speciation.....	103
4	Conclusions.....	106
	References	108
	Supplementary information	116
	Synthèse du chapitre	121

Chapitre 5 : Impact de la température de deux sols viticoles sur la dynamique de la MOD et la disponibilité du cuivre..... 122

	Prélude	123
	Résumé	124
1	Introduction.....	125
2	Matériels et méthodes.....	126
2.1	Design expérimental	126
2.1.1	Choix et description des sols.....	126
2.1.2	Incubation des sols	126
2.2	Mesures	127
2.2.1	Mesures sur les sols.....	127
2.2.2	Extractions et mesures sur les solutions de sol	128
2.3	Analyse et traitement statistique des données.....	129
3	Résultats.....	129
3.1	Impact de la température sur les indicateurs de l'activité biologique	129
3.1.1	Minéralisation du carbone.....	130
3.1.2	Activités enzymatiques	130
3.2	Paramètres de la matière organique dissoute.....	131
3.2.1	Concentrations et indices spectroscopiques.....	131
3.2.2	Distribution des composants PARAFAC de la MOD	133
3.3	Impact de la température sur la chimie du sol.....	134
3.3.1	Concentrations de Cu total et pCu dans les extraits.....	134
3.3.2	pH et concentrations des cations en solution.....	135
4	Discussion.....	136
4.1	La nature des sols affecte davantage l'activité biologique des sols que la température..	136
4.2	Les sols étudiés se différencient par l'évolution et la qualité de la MOD	137
4.3	La température affecte t-elle disponibilité du cuivre ?.....	139
5	Conclusions.....	143
	Références.....	145
	Informations supplémentaires	150
	Synthèse du chapitre	158

Chapitre 6 : Effets de l'apport de résidus végétaux sur la dynamique de la MOD et du Cu disponible dans le sol..... 160

Prélude	161
Sous-Chapitre 6.1: Changements de la dynamique de la MOD et du cuivre suite à l'incubation de deux sols viticoles amendés de résidus de feuilles de vigne	162
Résumé	162
1 Introduction.....	163
2 Matériels et méthodes.....	164
2.1 Design expérimental	164
2.1.1 Echantillonnage des sols et des litières.....	164
2.1.2 Analyses des poudres de vigne	164
2.1.3 Incubation des sols	165
2.2 Mesures	166
2.2.1 Mesures sur les sols.....	166
2.2.2 Extractions et mesures sur les solutions de sol	167
2.3 Traitement statistique des données.....	168
3 Résultats.....	169
3.1 Minéralisation de la matière organique.....	169
3.2 Evolution des propriétés de la matière organique dissoute	170
3.2.1 Concentration en COD et propriétés optiques	170
3.2.2 Evolution des composants PARAFAC	172
3.3 Changements dans la solution du sol.....	174
3.3.1 Variations du pH.....	174
3.3.2 Variations des concentrations du Cu et des autres métaux dans les extraits.....	174
4 Discussion.....	176
4.1 L'apport des résidus de feuilles de vigne ravive l'activité biologique des sols.....	176
4.2 Impact de l'apport des résidus sur la dynamique et la composition de la MOD.....	177
4.2.1 Forte augmentation puis diminution de la quantité de MOD dans les extraits.....	177
4.2.2 Evolution de la taille moléculaire, de l'aromaticité et de la composition de la MOD au cours du temps	178
4.3 La minéralisation des résidus affecte la disponibilité du cuivre via des changements dans la solution de sol.....	180
5 Conclusions.....	184
Références.....	186
Informations supplémentaires	191

Sous-Chapitre 6.2: A short-term incubation with cover-crop residues affected OM dynamics and Cu availability in an organic vineyard soil

Abstract	198
1 Introduction.....	199
2 Material and methods	200
2.1 Experimental design	200
2.1.1 Soil and litter sampling.....	200
2.1.2 Plant residues analyses.....	200
2.1.3 Microcosm incubation.....	201
2.2 Measurements.....	202
2.2.1 Measurements on incubated soils	202
2.2.2 Soil solution extraction and analyses.....	203

2.3	Statistical treatment.....	204
3	Results.....	204
3.1	Organic matter mineralization.....	204
3.2	Dissolved organic matter parameters.....	206
3.2.1	Concentration and optical indices.....	206
3.2.2	PARAFAC components distribution.....	207
3.3	pH of soil extracts and Cu dynamics.....	211
4	Discussion.....	212
4.1	The cover crop residues brought soluble materials that boosted soil biological activity..	212
4.1.1	Changes in DOC concentrations and optical parameters.....	212
4.1.2	Changes in DOM composition.....	214
4.1.3	Effects of residue supply on the soil biological activity.....	215
4.2	Explaining the changes in Cu availability during cover crop residue mineralization.....	217
5	Conclusions.....	221
	References.....	223
	Supplementary information.....	229
	Synthèse du chapitre.....	238

Chapitre 7 : Synthèse générale des résultats obtenus et perspectives.....240

	Rappel du contexte, des objectifs et des hypothèses.....	241
1	Analyse du lien entre dynamique temporelle de la MOD et dynamique du Cu.....	242
1.1	Liens entre dynamique de la MOD et Cu disponible dans des sols à l'équilibre.....	242
1.2	Liens entre dynamique de la MOD et Cu disponible dans des sols perturbés.....	243
2	Evaluation globale de la pertinence des propriétés optiques de la MOD dans cette étude...	246
3	Indicateurs de disponibilité et potentiels effets écotoxiques.....	248
4	Perspectives scientifiques.....	250
5	Implications agronomiques et environnementales des résultats obtenus.....	252
6	Conclusions finales.....	253
	Références.....	255

Introduction générale

Les rendements agricoles sont souvent hypothéqués à cause d'attaques de bioagresseurs qui attaquent les végétaux. C'est le cas du mildiou, maladie provoquée par le champignon *Plasmopara viticola* qui prolifère sur les feuilles et les grappes des vignes à certaines périodes de la saison viticole, en conditions humides. Pour pallier à ce problème, depuis la fin du 19^{ème} siècle, des fongicides à base de cuivre (Cu) ont été massivement pulvérisés dans les exploitations viticoles. Aujourd'hui la mise en place d'une réglementation en la matière a permis de circonscrire cette pratique et de réduire les taux d'application. Cependant, les fortes quantités auparavant pulvérisées ont provoqué une accumulation importante de Cu dans les sols de certaines régions viticoles. En Europe, des concentrations de Cu à hauteur de plusieurs centaines de mg kg⁻¹ ont été retrouvées dans des sols viticoles. La conséquence est l'apparition de phénomènes d'écotoxicité. En effet, le Cu présent à des concentrations excessives peut provoquer des dérèglements physiologiques chez de jeunes plantes et chez certains organismes du sol (collemboles, vers de terre, etc.).

La capacité du Cu à interagir avec les organismes est liée à sa disponibilité environnementale. La disponibilité du Cu est définie comme la fraction de Cu mesurée à travers certaines méthodes chimiques telles que les extractions salines. Ainsi, la disponibilité du Cu peut être évaluée à travers sa concentration totale en solution, et celle de sa fraction ionique Cu²⁺. La disponibilité du Cu dépend des propriétés du sol tels que le pH et la matière organique (MO). Le pH affecte les mécanismes de mise en solution du Cu et aussi sa spéciation. Le Cu présente une forte affinité avec la matière organique. De ce fait, les complexes Cu-MO représentent les formes de Cu les plus retrouvées dans le sol. Plus spécifiquement, la matière organique dissoute (MOD) est la fraction de MO qui influencerait le plus le Cu disponible. En effet, la MOD peut désorber le Cu de la phase solide et l'entraîner en solution, elle peut aussi complexer le Cu²⁺, diminuant ainsi sa concentration.

La capacité de la MOD à interagir avec le Cu dépend des propriétés du sol, mais aussi de la qualité intrinsèque de la MOD. La qualité de la MOD peut être évaluée à travers ses propriétés spectroscopiques de fluorescence et d'absorbance. En effet, ces techniques permettent de produire des indicateurs, qui décrivent la MOD en termes de composition, d'aromaticité, de taille moléculaire, de source etc... Ces caractéristiques sont importantes pour comprendre la réactivité de la MOD vis-à-vis du Cu. D'ailleurs, il a été démontré qu'une MOD de plus en plus aromatique et humifiée a plus de capacités à mobiliser le Cu en solution. La qualité et la concentration de la MOD dans les sols dépendent des processus microbiens de dégradation de la MO. Dans les sols agricoles, la MO subit des changements dû aux facteurs environnementaux tels que la température, et aux facteurs agronomiques tels que l'apport de résidus organiques. Ces changements subis par la MO a des répercussions sur la dynamique de la MOD et donc possiblement sur la disponibilité du Cu, posant ainsi des enjeux réels d'écotoxicité.

La compréhension des interactions entre dynamique de la MOD et disponibilité du Cu, dans un cadre de perturbation de la minéralisation de la MO, est peu décrite dans la littérature.

L'objectif général de cette thèse est ainsi d'étudier l'impact de la dynamique de la MOD sur la disponibilité du cuivre dans les sols viticoles. Pour répondre à cet objectif, nous avons utilisé une approche statique en étudiant des sols à l'équilibre, et une approche cinétique en suivant des sols soumis à des variations de température ou à des apports de MO fraîche. Les objectifs spécifiques de ce travail ont consisté à :

- Évaluer la contribution des propriétés optiques de la MOD pour expliquer et prédire la disponibilité du Cu
- Étudier l'effet des variations de température sur la dynamique de la MOD et la disponibilité du Cu
- Analyser les effets d'apports de MO fraîches sur la dynamique de la MOD et la disponibilité du Cu.

Ce présent manuscrit est organisé en 7 chapitres qui condensent les différents axes de travail de cette thèse. 3 chapitres de résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques et répondent aux 3 questions et objectifs spécifiques de cette thèse. Le Chapitre 4 a déjà été publié et les autres sont en cours de préparation pour soumission à des journaux. Le Chapitre 6 est divisé en deux sous-chapitres.

Le Chapitre 1 est une synthèse bibliographique sur l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes affectant la disponibilité du Cu et la dynamique de la MOD. Une première partie rappelle des notions fondamentales sur le sol et son fonctionnement, et les constituants qui interagissent potentiellement avec le Cu. Une deuxième partie aborde la dynamique de la MO et de la MOD dans le sol, et les techniques de mesures spectroscopiques de la MOD. La troisième partie passe en revue le comportement du Cu disponible dans les sols en lien avec les changements environnementaux et agronomiques. Le Chapitre 2 décrit la conceptualisation et démarche scientifique déployées dans cette thèse, il présente également les hypothèses de travail et justifie les choix expérimentaux. Le Chapitre 3 traite des matériels et méthodes généraux de la thèse. Dans ce chapitre, la conduite des expériences ainsi que les matériaux utilisés (sols, résidus etc...) sont décrits dans leur globalité. Le Chapitre 4 présente les résultats sur la caractérisation de la collection de sols de cette thèse, ainsi que sur la contribution des indices de qualité de la MOD pour la prédiction du Cu disponible. Dans le Chapitre 5, il est question de l'effet de la température sur la disponibilité du Cu. Deux températures (20°C et 30°C) ont été appliquées à deux sols viticoles différents. Le Chapitre 6 concerne l'effet de l'apport des résidus sur la disponibilité du Cu. Il est divisé en deux sous-chapitres. Le sous-chapitre 6.1 traite de l'effet d'apport d'un résidu végétal sur le Cu disponible dans sols viticoles de caractéristiques différentes, et fait écho au sous-chapitre 6.2, qui lui porte sur l'effet d'apport de deux résidus contrastés sur la disponibilité du Cu dans un même sol. Enfin, ce document se termine par une synthèse générale des différents chapitres d'expérimentations (Chapitre 7) et qui met en perspective les principaux résultats obtenus dans un contexte plus large.

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE - DEMARCHE SCIENTIFIQUE - MATERIELS ET METHODES GENERAUX

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1 Les sols, matrices dynamiques et diverses

L'AFES (Association Française de l'Étude des Sols) a proposé en 2018 une définition étendue et complète des sols :

« Le sol est un volume qui s'étend depuis la surface de la Terre jusqu'à une profondeur marquée par l'apparition d'une roche dure ou meuble [...]. Il comporte le plus souvent plusieurs horizons correspondant à une organisation des constituants organiques et/ou minéraux (la terre). Cette organisation est le résultat de la pédogenèse et de l'altération du matériau parental. »

Le sol est le résultat final des effets concomitants de la topographie, du climat et des organismes sur le matériau géologique au cours du temps.

Les sols représentent donc des entités vivantes, dynamiques et diverses. Le sol est le mélange de plusieurs constituants dont la nature et la quantité vont différencier un sol d'un autre. Un sol est un milieu triphasique avec des proportions variables de phase solide, gazeuse et liquide.

1.1 Composition des sols

1.1.1 La phase gazeuse

La phase gazeuse du sol est aussi appelée atmosphère du sol. L'atmosphère du sol est composée des mêmes gaz que l'air atmosphérique mais avec des proportions différentes dépendamment de plusieurs facteurs : profondeur du sol, biomasse, microclimat. Ces gaz proviennent majoritairement de l'activité biologique. De nombreux échanges se font régulièrement entre les gaz du sol et l'air atmosphérique. L'importance volumique des gaz du sol dépendent de la taille et de l'abondance des pores, cela impacte directement la densité des sols. Une bonne aération du sol est essentielle pour l'activité biologique et racinaire.

Comparée à l'air ambiant, l'atmosphère du sol est généralement plus enrichie en CO_2 et moins abondante en oxygène. Cette quantité en oxygène est néanmoins suffisante pour la respiration des bactéries et de la faune du sol. L'air du sol comprend également d'autres gaz tels que NO , N_2O , NH_3 , CH_4 , H_2S et parfois des composés organiques volatils, produits par les microorganismes en conditions anaérobies (faible quantité d'oxygène) (Calvet 2003).

1.1.2 La solution du sol

L'eau du sol provient essentiellement des pluies et contient des éléments minéraux, molécules organiques à l'état dissout et des particules colloïdales. La phase liquide et la matrice solide du sol sont en échange permanent. La composition de la solution du sol dépend du contexte géochimique, de la composition des eaux de pluie et des apports exogènes (ex : apports agronomiques). De même,

les processus biologiques tels que et la respiration microbienne influencent significativement la composition de la solution du sol.

L'altération des roches et minéraux provoque la mise en solution de cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , $\text{K}^{+...}$) et d'anions (HCO_3^- , NO_3^-) (Sigg et al. 2000). L'intensité de ce phénomène est d'autant plus importante que les pluies sont acides, les carbonates se transforment alors en bicarbonates solubles. Par conséquent, la composition de la solution du sol évolue au cours du temps. Le pH est l'une des propriétés essentielles pour caractériser la solution du sol et qui affecte considérablement les mécanismes biologiques et physico-chimiques qui se déroulent dans le sol. L'eau du sol est une solution d'électrolytes dont la molarité totale est relativement faible et varie entre 10^{-3} et 10^{-5} mol L^{-1} (Calvet 2003).

La solution de sol représente un média important pour l'étude des pollutions car elle est le compartiment vecteur entre la matrice solide et le biote.

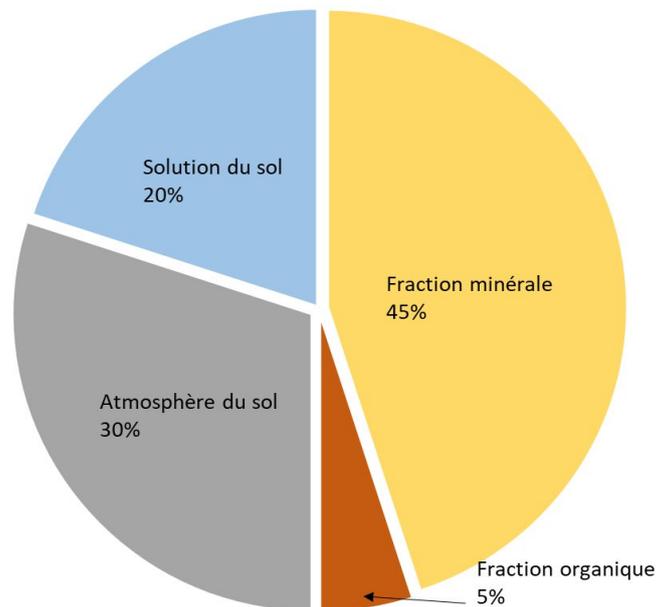


Fig. 1 : Composition volumique d'un sol agricole standard, d'après le Laboratoire d'Analyses Microbiologiques des Sols (LAMS).

1.1.3 La phase solide

C'est la phase majoritaire avec 50 à 60% du volume total du sol. Elle comprend 3 parties : minérale, organique et biotique.

1.1.3.1 Les constituants minéraux

a. Les minéraux primaires

Les minéraux primaires sont les minéraux issus de la roche par fragmentation physique de celle-ci, sans modification chimique ou minéralogique. Les minéraux silicatés sont les plus présents dans les

sols acides (quartz, feldspaths, silicates ferromagnésiens, micas). Les carbonates sont les minéraux les plus présents dans les sols carbonatés. Ces minéraux se transforment et disparaissent très lentement sous l'effet des processus pédogénétiques d'altération. La proportion de minéraux primaires altérables est en relation avec l'âge du sol.

b. Les minéraux secondaires

Les minéraux secondaires proviennent de l'altération physico-chimique et biologique des minéraux primaires suite à la pédogénèse. Ils peuvent aussi résulter de néogénèse minérale. Les minéraux secondaires sont de plus petite taille que les minéraux primaires. Ce sont principalement les phyllosilicates, les (oxyhydr)oxydes de fer (Fe), d'aluminium (Al) et de manganèse (Mn), des carbonates, des sulfates et des phosphates.

- Les phyllosilicates

Ce sont les constituants majoritaires des sols. Appelés aussi argiles minéralogiques, les phyllosilicates sont majoritairement composés de silicium et aluminium et organisés sous forme de feuillets superposés composés de couches de tétraèdres de silicium (T) et de couches d'octaèdres d'aluminium (O). Les tétraèdres sont liés entre eux par des atomes d'oxygène. La succession des couches et l'espace interfoliaire (espace entre deux feuillets) permettent de caractériser trois familles d'argiles minéralogiques : les argiles de type 1 : 1 (T-O), les argiles de type 2 : 1 (T-O-T) et les argiles de type 2 : 1 : 1 (T-O-T-O).

Les argiles de type 1 : 1 sont constituées de l'empilement d'un feuillet tétraédrique et d'un feuillet octaédrique, l'équidistance est d'environ 0.7 nm (kaolinites). Les argiles de type 2 : 1 sont constituées de l'empilement d'une couche octaédrique entre 2 couches tétraédriques, avec une équidistance variable entre 1 et 1,5 nm suivant la saturation ou non de l'espace interfoliaire (illites, smectites, vermiculites). Les argiles de type 2 : 1 : 1 sont similaires aux précédentes, mais avec un espace interfoliaire occupé par une couche d'octaèdres. L'équidistance est voisine de 1,4 nm (chlorites, vermiculites hydroxyalumineuses).

Les minéraux argileux sont caractérisés par une surface portant des charges électriques. Les charges sont de deux types : les charges structurales (permanentes) qui sont négatives et liées aux substitutions ioniques (Si par Al par exemple) et les charges de surfaces (variables) dépendantes du pH du milieu et relatives aux réactions chimiques se produisant à la surface des minéraux.

La structuration en feuillets donne aux argiles des propriétés colloïdales et leur confère des surfaces spécifiques variées en fonction du nombre de couches de tétraèdres/octaèdres (Fig. 2).

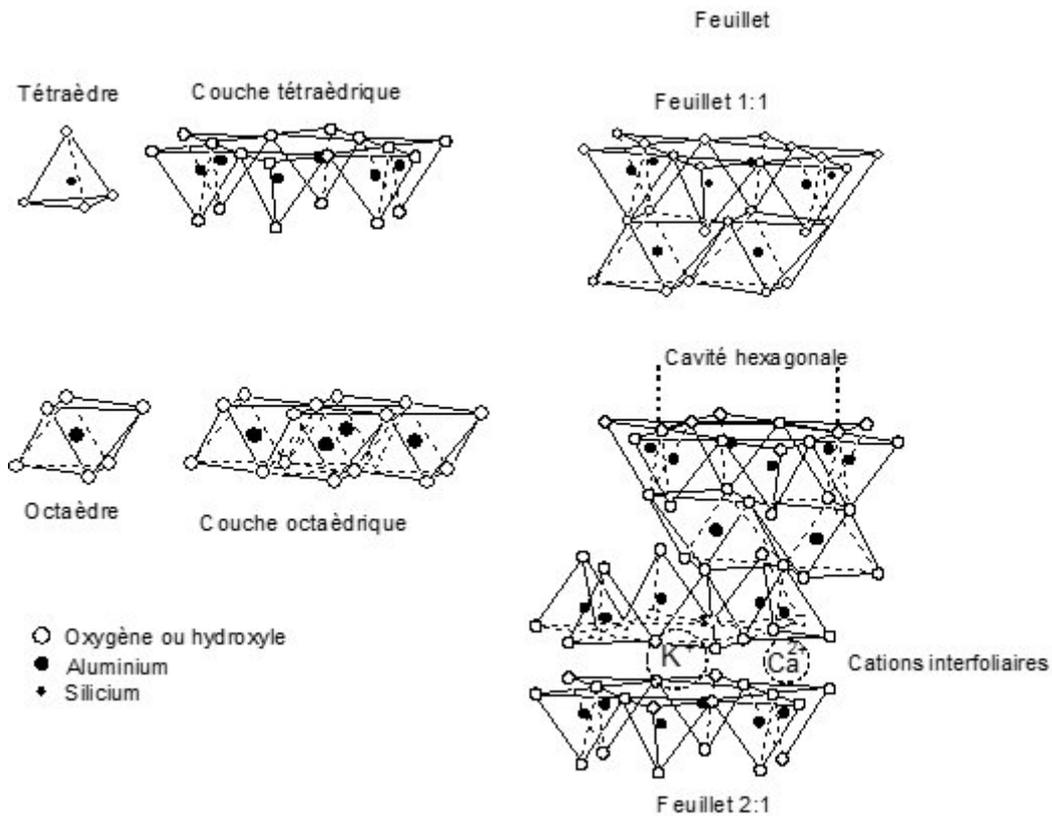


Fig. 2 : Couches de tétraèdres et d'octaèdres constitutifs des phyllosilicates, structure d'un feuillet 1 :1 de type kaolinite et d'un feuillet 2 :1 type smectite.

- Les oxydes et oxyhydroxydes

Certains oxydes sont d'origine géologique et sont donc des minéraux primaires. Les oxydes et oxyhydroxydes secondaires sont formés par transformation ou néogénèse. L'altération des minéraux primaires (ferromagnésiens et phyllosilicatés) entraîne la solubilisation de cations et d'anions qui peuvent précipiter pour former des nouveaux minéraux. Les cations Al, Fe et Mn s'organisent en hydroxydes, en oxyhydroxydes et en oxydes hydratés, à l'état cristallisé ou amorphe. Les oxydes de Fe, d'Al et de Mn sont les plus fréquents dans les sols.

• Les oxydes de Fe

Les oxydes de Fe sont les plus présents dans les sols sous climat tempéré. Le Fe dans les sols est présent à l'état d'oxydes quand le pH est compris entre 4 et 12. En dessous de pH=4, on peut retrouver le Fe sous forme Fe^{3+} . Les oxydes de Fe participent considérablement à la coloration du sol. L'oxyde de Fe est une agrégation d'octaèdres, chaque atome de Fe étant entouré de 6 ions d' O^{2-} ou OH^- (Sparks 2003). Les oxydes de Fe les plus récurrents dans les sols sont : la goethite ($\alpha FeOOH$), l'hématite (αFe_2O_3), la lépidocrocite ($\gamma FeOOH$), la maghémite (γFe_2O_3) et la ferrihydrite ($Fe_{10}O_{15}, 9H_2O$). Les différences entre ces oxydes se basent sur les arrangements et les liaisons des octaèdres entre eux. Les structures α sont basées sur un arrangement hexagonal compact et les structures γ correspondent

à un arrangement cubique. Les structures α sont les plus stables thermodynamiquement alors que pour les structures γ , le Fe^{3+} peut être remplacé par Al^{3+} , Mn^{3+} , ou Cr^{3+} .

Lorsque le sol est enrichi en MO, le Fe sera majoritairement complexé, formant des complexes organominéraux amorphes ce qui va diminuer la présence en oxydes. Dans les sols aérés et peu saturés, les oxydes de Fe les plus abondants sont la goethite et l'hématite, responsables de la couleur jaunâtre à rougeâtre des sols. Dans les sols saturés en eau, les Fe^{3+} seront réduits en Fe^{2+} puis transportés en profondeur. Sous les conditions d'oxydoréduction, les ions Fe^{2+} s'oxydent et aboutissent à la formation de lépidocrocite et de ferrihydrite (forme amorphe). Les oxydes de fer amorphes possèdent une CEC et une réactivité plus importante (pour les métaux) que les oxydes cristallisés (Scott and Pain 2009).

- **Les hydroxydes et oxydes d'Al**

Les hydroxydes d'Al sont constitués de deux groupes : les trihydroxydes $\text{Al}(\text{OH})_3$ et les oxyhydroxydes AlOOH . Pour les trihydroxydes tels que la gibbsite, les atomes de Al sont compris entre deux couches d'ions de OH^- . Chaque ion Al^{3+} est au centre d'un octaèdre et les octaèdres voisins ont deux ions OH^- en commun. Les gibbsites sont des minéraux généralement très peu solubles dans l'eau. La bayérite et la nordstrandite sont d'autres exemples de trihydroxydes.

Dans les hydroxydes AlOOH tels que la diaspore, l'aluminium occupe des positions octaédriques avec des ions oxygène ou hydroxyl aux sommets. La boehmite est l'oxyhydroxyde la plus observée dans les sols, surtout dans les sols associés à des calcaires.

Le coridon (Al_2O_3) est un oxyde d'Al généralement observé dans les sols issus de roches ultrabasiques et métamorphiques au contact de milieux acides.

- **Les oxydes de Mn**

Les oxydes de Mn se présentent le plus souvent sous forme de petits cristaux dans le sol ou d'enveloppes recouvrant les autres minéraux. Comparés aux oxydes de Fe, les oxydes de Mn sont peu abondants dans le sol et lui donnent une couleur noirâtre. Il existe deux types de structures :

- Les structures lamellaires avec une succession de feuillets (phyllomanganates), les feuillets ont pour bases des octaèdres MnO_6 liés entre eux par leurs arêtes. C'est la structure d'oxyde de Mn la plus courante dans les sols. La birnessite $(\text{Na,Ca})\text{Mn}_7\text{O}_{14} \cdot 2.8\text{H}_2\text{O}$ et la vernadite $(\text{Mn}(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O})$ sont les plus fréquemment rencontrées.

- Les structures tunnelaires qui sont un empilement d'octaèdres MnO_6 ayant en commun des arêtes. Cette structuration entraîne la formation de « tunnels » pouvant contenir des cations ou des molécules d'eau. La pyrolusite $\beta\text{-MnO}_2$ et la manganite $\gamma\text{-MnOOH}$ sont des exemples de polymorphes d'oxyhydroxydes à structure en tunnel.

Grâce à leur petite taille et leur grande surface spécifique, les oxyhydroxydes de Mn présentent une forte réactivité vis-à-vis des éléments traces dans les sols.

- Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures

Les sols issus de roches sédimentaires peuvent être enrichis en carbonates (calcite CaCO_3 , dolomite $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$, sidérite FeCO_3 et magnésite MgCO_3) (Duchaufour 1997). La calcite et la dolomie sont les formes de carbonate les plus abondantes dans les sols. Les carbonates peuvent souvent être associés à des impuretés de Pb, Zn, Cu et produire des minéraux tels que l'hydrozincite ($\text{Zn}_5(\text{OH})_6(\text{CO}_3)_2$) ou la malachite ($\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$). Les carbonates ont une forte influence sur le pH des sols et donc sur la dynamique des éléments traces.

Les phosphates sont des minéraux à groupement PO_4^{3-} . Ils sont peu abondants dans les sols. Dans les sols alcalins, les cations métalliques peuvent réagir avec les minéraux phosphatés par substitution avec le phosphore.

Le soufre minéral se présente le plus souvent sous forme de sulfates (groupement $-\text{SO}_4^{2-}$) dans les sols bien aérés. Mais dans les environnements anoxiques, tels que des sols hydromorphes, le soufre peut se trouver sous forme de sulfures, formes pouvant affecter la solubilité des éléments traces. Le gypse (CaSO_4) est le minéral sulfaté le plus fréquent dans les sols.

1.1.3.2 La matière organique

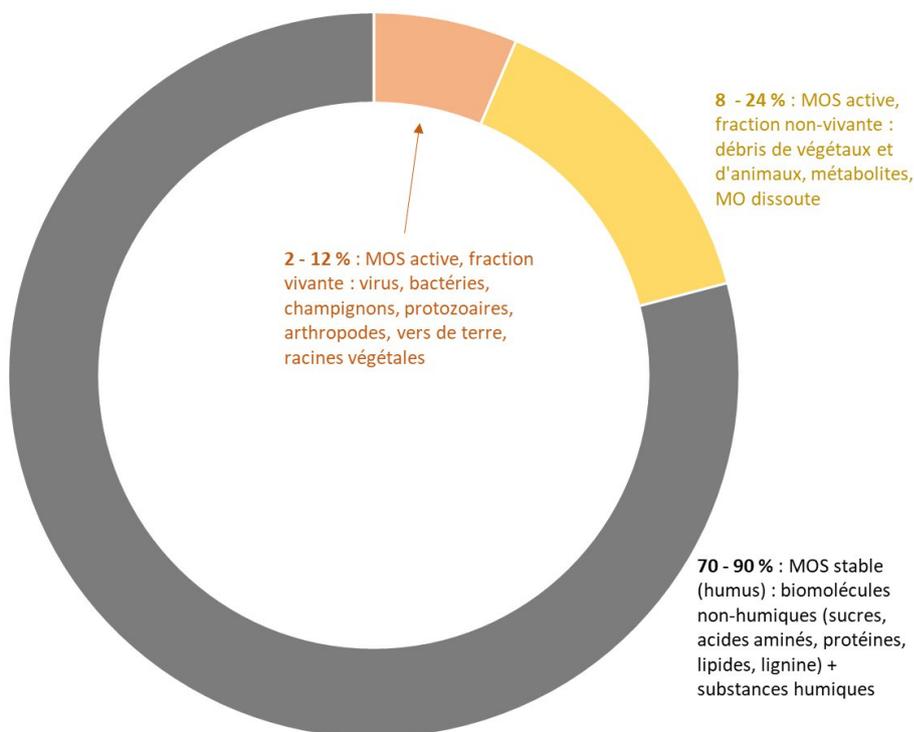


Fig. 3 : Les constituants de la matière organique du sol, MOS (adapté de Schwenke 2004)

a. Composition

La matière organique des sols (MOS) a pour origine l'accumulation et la décomposition des matériaux végétaux et animaux (Duchaufour 1997). En masse, elle varie entre 0.5% pour les sols minéraux et 80% pour les sols organiques. La MOS est majoritairement composée de carbone et d'oxygène et constitue une fraction dynamique du sol subissant des perpétuels changements. La MOS est composée d'une partie vivante et d'une partie non vivante (Fig. 3).

La fraction vivante (édaphon) comprend la pédofaune (acariens, nématodes, insectes, vers de terre, etc...), les microorganismes (bactéries, champignons, algues etc...) et les racines de végétaux. Cette fraction vivante représente moins de 15% de la MOS (Olah et al. 1978). L'activité de cette fraction vivante affecte considérablement les propriétés du sol. La faune du sol fragmente les particules de la MOS et les remélange avec les constituants minéraux, aboutissant ainsi à la formation d'agrégats et de pores dans le sol. Les bactéries dégradent et transforment les MOS. Elles sont les principales actrices des cycles biogéochimiques (carbone, azote, soufre etc.). Leur abondance se chiffre entre 10^6 et 10^{10} bactéries par g de sol (Stengel and Gelin 1998). Les champignons participent à la dégradation des débris végétaux complexes et dans la rétention des substances minérales (eau + minéraux) dans le sol. Une forte présence de biomasse microbienne dans un sol témoigne d'une activité biologique importante.

La fraction non-vivante comprend les débris morts d'origine animale ou végétale à des stades différents de décomposition. A travers l'activité biologique et chimique dans le sol, ces débris se transforment en molécules simples de type lipides, protéines, acides organiques, ou encore acides aminés etc. puis se réorganisent en macromolécules. Trois familles de macromolécules ont longtemps été distinguées dans le sol : les acides fulviques, acides humiques et l'humine. Cette distinction opérationnelle est le résultat d'un fractionnement acido-basique. Les substances humiques seraient des complexes hétérogènes enrichis en groupements fonctionnels qui leur confère une affinité forte avec les éléments traces (groupements carboxyliques $-COOH$, phénoliques $\phi-OH$, amine $-NH_2$ et sulfhydriles $-SH$) (Manceau and Matynia 2010). Ce concept d'humification et l'existence de ces macromolécules dans l'environnement sont aujourd'hui remis en question (cf. ci-dessous)

b. Dégradation de la MO : concept classique

La MOS est une entité complexe enclin à une perpétuelle dynamique. La dynamique de la MO dans les sols est tributaire de son apport dans les sols (quantité et qualité) et de sa transformation. Il est traditionnellement admis que les litières une fois au sol, vont être soumises à deux mécanismes de transformation : la minéralisation et l'humification.

La minéralisation de la MO est le résultat de la fragmentation et de la consommation de la MO par les organismes décomposeurs du sol (bactéries, champignons, arthropodes) dont les produits finaux sont des composés dissouts (minéraux, métabolites) et des gaz (CO_2). La fraction de MO minéralisée sert à l'assimilation par la biocénose et au retour au sol des éléments minéraux qui avaient été puisés au

début du cycle. Les débris animaux et de micro-organismes sont rapidement minéralisés dans les sols du fait de leur richesse en azote.

L'humification est présentée par de nombreux auteurs comme un processus physico-chimique et biologique par lequel MO fraîche et dégradée se transforment graduellement en molécules complexes condensées et constituantes des substances humiques (Calvet 2003). Ces molécules sont relativement « stables » et récalcitrantes à la dégradation microbienne. L'humification est tributaire du climat, du régime hydrique et aussi de la composition de la biocénose.

c. Evolution des concepts de dégradation de la MOS

Depuis longtemps, il a été avancé que la structure chimique de la MOS renseignait sur son niveau de stabilisation dans les sols, en considérant que les structures aromatiques polycondensées étaient résistantes à la dégradation. Cependant, il a été montré que des molécules ligniniques avaient un turn-over plus rapide que la MOS alors que des composés simples (sucres) pouvaient perdurer sur des dizaines d'années dans le sol (Amelung et al. 2008 ; Schmidt et al. 2011). Les études précédentes remettent donc en question le lien entre la structure chimique intrinsèque des composés organiques et leur dégradabilité à long terme. En plus de cela, la dernière décennie a connu un développement de nouvelles techniques d'analyse de la MOS : spectroscopies par résonance magnétique nucléaire (RMN), infrarouge (IR) ou d'absorption des rayons X (NEXAFS). L'exploitation fine de ces techniques a permis de remettre en question les notions de « substances humiques » et d'« humification » (Kleber and Lehmann 2019).

L'ensemble de ces constats suscite aujourd'hui un débat sur le processus de transformation de la MOS. De même, l'adsorption sur les surfaces argileuses et l'intercalation entre les feuillets de phyllosilicates devraient être prises en compte pour avoir une vision globale de la dégradation de la MOS.

Lehmann and Kleber (2015) ont formulé une critique substantielle du traditionnel concept de l'humification de la MOS. Pour ces auteurs, l'hypothèse de la synthèse de substances humiques (à partir de biopolymères organiques) n'est pas pertinente dans les écosystèmes naturels. Les substances humiques ne seraient donc pas des macromolécules stables mais plutôt des agrégats de petites molécules et protégées de la dégradation par les constituants minéraux. Dans le même sens, le concept traditionnel de l'humification est d'autant plus flou qu'il n'existe pas de définition consensuelle de la notion de « substances humiques ». Les auteurs plaident donc pour un modèle de dégradation continue basé sur l'accessibilité des organismes à la MOS et son niveau de protection par rapport à la dégradation. Dans ce nouveau modèle, la MOS serait en transformation de façon continue et sans une phase distincte de stabilisation.

Contrairement au concept classique d'humification dont les produits finaux sont des substances humiques avec des tailles importantes, Lehmann and Kleber (2015) avancent que la MOS se décomposerait graduellement en produisant *in fine* des composés de plus en plus petits (Fig. 4). Dans ce sens, la MO du sol à un moment t représente le mélange hétérogène de plusieurs composés

organiques de différentes tailles et à différents états de transformation, selon qu'ils soient protégés ou non dans des agrégats minéraux. Plus le processus de dégradation avance, plus les monomères produits sont susceptibles de s'agréger et de s'adsorber sur les surfaces minérales.

Quelques autres études soutiennent cette vision actualisée de la dégradation de la MOS et avancent que ce qui est appelé « substances humiques » est en réalité une combinaison fragile de molécules de petite taille et stabilisées via des ponts hydrogène et des interactions hydrophobes (Sutton and Sposito 2005; Lehmann et al. 2008). Ces associations moléculaires ont dans le sol des propriétés similaires à des macromolécules, avec une forte abondance en groupements fonctionnels et une capacité d'absorption sur les surfaces minérales. D'ailleurs dès 2002, Piccolo (2002) avançait que les substances humiques conventionnelles seraient les produits d'un assemblage supramoléculaire de petites molécules hétérogènes provenant de la dégradation de la MOS.

Cette nouvelle conceptualisation apporte des éléments innovants de discussion sur la relation entre dégradation de la MO et disponibilité des éléments traces, tel qu'abordé dans ce travail.

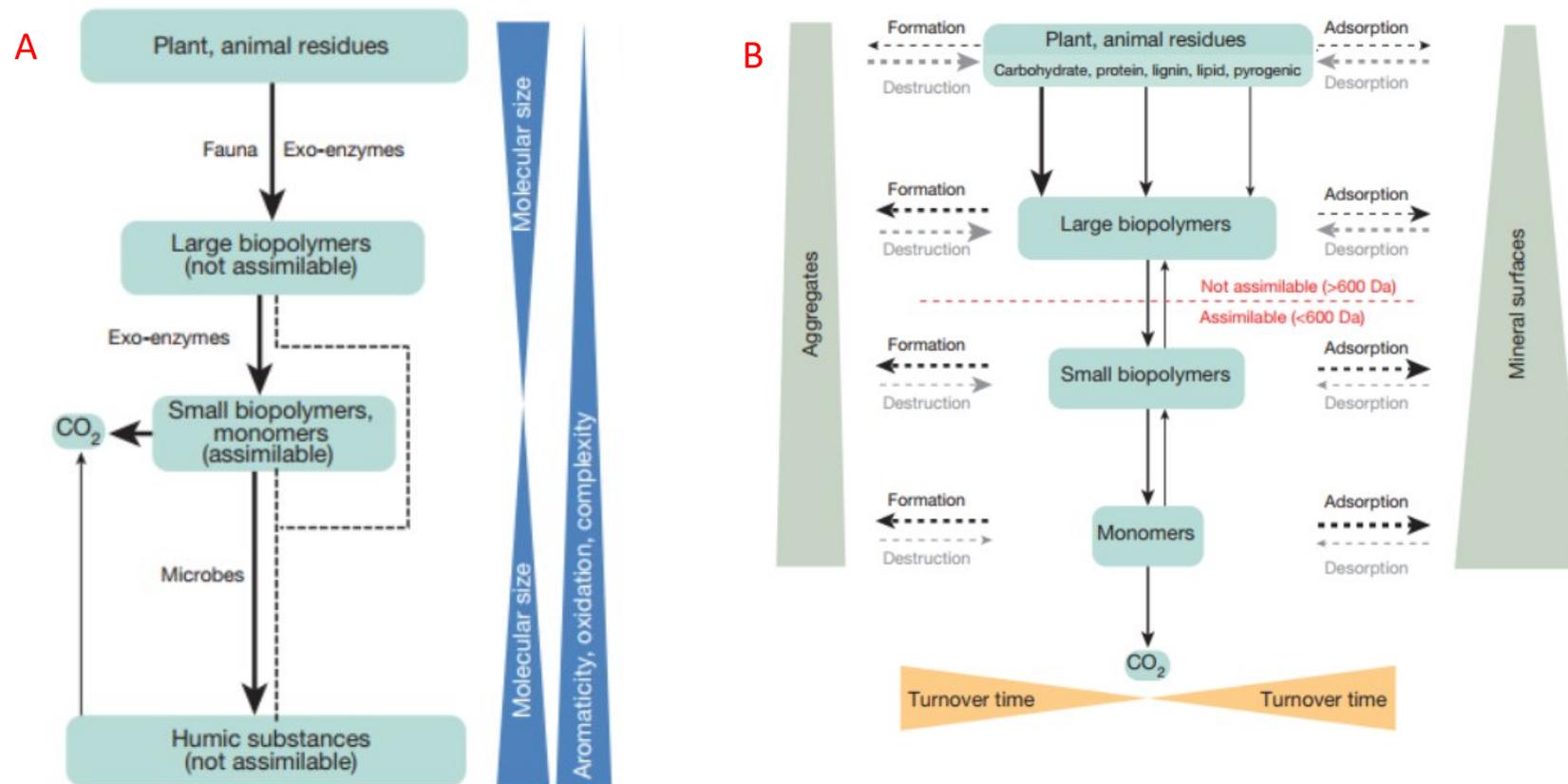


Fig. 4 : Rafraîchissement des modèles conceptuels sur le devenir des débris organiques dans le sol et leur transformation progressive (Lehmann and Kleber 2015), avec le modèle d’humification classique (A) et le modèle d’évolution continue (B). Le traditionnel concept d’humification (Fig. 4-A) implique une production de grandes molécules de substances humiques stables et non assimilables par l’activité biologique. Dans le modèle le plus récemment proposé (Fig. 4-B), les résidus organiques se transforment continuellement pour donner des molécules de plus en plus petites, capables de s’agréger entre elles et de se sorber sur les surfaces minérales, ce qui les « protège » de l’activité biologique.

d. Activités enzymatiques et dégradation de la MOS

La mesure des activités enzymatiques extracellulaires permet d'évaluer la décomposition de la MO dans les sols. Les enzymes extracellulaires sont produites par les microorganismes du sol et représentent un maillon central du turnover de la MOS (Burns et al. 2013). Les enzymes produites décomposent la matière organique complexe en de petites molécules assimilables par les organismes vivants. La production d'enzymes extracellulaires est considérée comme une stratégie d'exploration par les microorganismes pour « chercher de la nourriture ». L'abondance des enzymes extracellulaires dans les sols est corrélée à la biomasse microbienne, la composition de la communauté microbienne, la disponibilité des nutriments et aux facteurs climatiques / environnementaux (Bell et al. 2013). Les activités enzymatiques extracellulaires résultent d'un processus de dégradation dans lequel l'approvisionnement est aligné avec la demande (Jian et al. 2016). Les enzymes extracellulaires hydrolytiques incluent généralement les hydrolases et les oxydases, qui décomposent des substrats suivant leur degré de complexité. Les cellulases décomposent les polysaccharides (carbone). Il s'agit du α -1,4-glucosidase (AG), β -1,4-glucosidase (BG), β -d-cellobiosidase (CBH) et de la β -1,4-xylosidase (XYL). Les enzymes associées à la nutrition azotée sont : β -1,4-N-acetyl-glucosaminidase (NAG), leucine-amino peptidase (LAP) et l'uréase (UREA). Elles ciblent respectivement la chitine, les protéines et l'urée. Les enzymes associées au cycle du phosphore incluent la phosphatase acide (AP) et la phosphatase alcaline. Elles libèrent les ions PO_4^{3-} contenus dans les composés organiques phosphatés.

Les ratios stœchiométriques des activités enzymatiques donnent des indications sur les éventuels changements de nutrition microbienne et renseignent sur les demandes en nutriments en réponse à des perturbations environnementales. Lorsqu'un nutriment est en limitation dans le sol, les microorganismes allouent plus d'énergie pour produire les enzymes correspondant à la disponibilisation de ce nutriment. En l'occurrence, le ratio C:N enzymatique est l'un des plus utilisés dans la littérature. C'est le ratio de la somme des enzymes liées au carbone sur la somme de celles liées à l'azote (Bell et al. 2013). Un ratio C:N décroissant dénote d'une augmentation relative des enzymes N par rapport aux enzymes C, montrant que les micro-organismes investissent plus d'énergie pour dégrader les composés azotés. Un ratio enzymatique C :N de 1 signifie une activité de dégradation pour l'azote fortement prépondérante à celle du carbone, puisque habituellement, la biomasse C'est 7 à 8 fois plus importante dans le sol que la biomasse N (Bell et al. 2013).

e. Fonctions et propriétés de la MOS

La MOS assure des fonctions essentielles au bon fonctionnement des sols, d'ordre physique, chimique et biologique.

Rôle physique : La MOS intervient dans la structure du sol et la stabilité des agrégats. Il a été montré que l'ajout de MO au sol augmentait la capacité au champ¹ ainsi que la stabilité structurale du sol

¹ La capacité au champ est un indicateur de la capacité du sol à stocker l'eau. Elle correspond à la quantité maximale d'eau qu'un sol peut stocker

(Emerson and McGarry 2003). Une bonne agrégation empêche l'érosion du sol et la perte des éléments nutritifs pour les cultures.

Rôle biologique : La MOS est un pool énergétique pour le métabolisme bactérien et influence significativement l'approvisionnement en micro et macronutriments qui interviennent dans les processus biologiques. La minéralisation de la MOS par les organismes du sol permet de libérer des nutriments solubles qui seront assimilés par les végétaux (Huang et al. 2012). La présence de MOS participe à l'équilibre de la vie biologique dans le sol. La dégradation du C de la MOS est une étape essentielle du cycle du carbone et participe à la régulation du climat.

Rôle chimique : La MOS est riche en sites qui peuvent porter des charges de surfaces. Suivant le pH des sols, ces charges peuvent être soit positives soit négatives. La présence de charges négatives lui confère une affinité particulière avec les cations. Grâce à cette propriété, la MOS stocke des cations nutritifs (Ca, Mg, K, NH_4^+ , etc.) et constitue un puits d'approvisionnement pour les plantes. Grâce à l'abondance en groupements fonctionnels réactifs (SH, OH, COOH, ...), la MOS a aussi la capacité de complexer les éléments métalliques (Cu, Zn etc ...) et de limiter leur transfert vers la solution et vers les plantes.

f. Culture de plantes de couverture dans les vignes

L'apport régulier de MO fraîche dans les sols fait partie intégrante de la gestion agronomique en viticulture. Généralement dans les parcelles en viticulture biologique, diverses plantes poussent en inter-rang soit de façon spontanée soit parce qu'elles ont été semées. Les plus rencontrées sont les fabacées (légumineuses) et les poacées (céréales) (Abad et al. 2021). Les plantes inter-rang à leur stade de maturité sont récoltées, broyées et les résidus sont mélangés au sol comme source de matière organique et de nutriments. Les plantes inter-rang sont souvent cultivées pour enrichir le sol en azote. Les effets sur les paramètres biochimiques du sol peuvent s'observer sur plusieurs années (Abad et al. 2021). D'après l'Institut français de la vigne et du vin (IFV), les plantes de couverture les plus utilisées dans les vignes en France sont la féverolle (Fig. 5), l'avoine, la moutarde, la navette, l'orge, la vesce commune et le trèfle incarnat (IFV 2018). Chaque plante de couverture présente un mode de dégradation spécifique dans le sol et généralement des associations entre plusieurs espèces sont réalisées dans les parcelles. La féverolle par exemple permet une forte fixation de l'azote atmosphérique et est facile à détruire par roulage. Cependant, son développement est lent (6 mois jusqu'à floraison) et elle est vulnérable aux maladies. L'orge permettrait une couverture rapide du sol mais supporterait mal la forte humidité et l'hydromorphie.



Fig. 5 : Pousses de féverolle en inter-rang d'une parcelle viticole à Marcillac (Pierdet 2020)

2 La matière organique dissoute (MOD)

La MOD des sols a été surtout étudiée dans le milieu forestier et peu dans les sols agricoles (Wang et al. 2016). La MOD est la fraction solubilisée de la MOS dans la solution du sol et dont la taille est inférieure au seuil de coupure du filtre utilisé pour séparer les phases. Habituellement, les seuils de coupures utilisés sont compris entre 0.22 μm et 0.70 μm (Petitjean et al. 2004). La filtration permet ainsi de séparer la phase dissoute de la phase particulaire. Le seuil de coupure utilisé influence significativement la qualité et la quantité de la MOD récupérée (Kalbitz et al. 2000). La différence de seuils de coupure entre les études rend parfois difficile la comparaison des résultats. La MOD représente une infime partie de la MOS mais constitue sa part la plus réactive qui contrôle plusieurs processus physiques, chimiques et biologiques dans les écosystèmes (Bolan et al. 2011).

2.1 Composition de la MOD

La MOD dans les sols peut être fractionnée en constituants selon leur nature, leur solubilité et leur poids moléculaire. Selon la solubilité des constituants, la MOD est séparée en deux grands groupes : la fraction hydrophile et la fraction hydrophobe (Bolan et al. 2011). La fraction labile ou hydrophile comprend notamment les sucres (glucose, fructose), les acides de faible poids moléculaire et les

acides aminés. La fraction hydrophobe (plus récalcitrante) est constituée entre autres de polysaccharides (dérivés de cellulose et de d'hémicellulose), composés végétaux, produits issus de la dégradation microbienne (Marschner and Kalbitz 2003). Selon Strobel et al. (2001), dans la solution de sol, les acides de faible poids moléculaire ne représenteraient que 10% de la MOD tandis que ceux de plus gros poids moléculaires identifiés comme « acides fulviques » constituent la majeure partie de la MOD.

La MOD est un mélange hétérogène de macromolécules et de molécules simples issues de l'activité de dégradation des microorganismes sur les débris végétaux et animaux. Les molécules simples de la MOD comprennent des sucres, lipides, acides aminés, acides aliphatiques, etc.

L'origine de la MOD influence sa composition élémentaire. Les principaux éléments entrant dans la composition de la MOD sont : C, O, H, N, P, S, et des cations et métalloïdes présents en trace (Ca, K, Mg, Al, Fe, Zn, Cu). Pour les macromolécules identifiées comme « acides fulviques », les ratios O/C et H/C sont généralement de 0.7 et 1.4 respectivement. Une augmentation du ratio O/C indique un enrichissement en groupements COOH (Bolan et al. 2011).

2.2 Origines et flux de la MOD dans les sols

L'absorption microbienne, la décomposition et la minéralisation sont les principaux mécanismes qui influencent la quantité et la qualité de la MOD. La quantité de la MOD est généralement évaluée via la concentration en COD et dépend des caractéristiques des sols, du mode d'usage du sol et du climat local (Gmach et al. 2020).

La MOD du sol provient-elle de la litière fraîche ou de la MOS ancienne du sol ? Il n'existe pas de consensus scientifique sur cette question. Dans les sols agricoles, les résidus végétaux sont la principale source de production de MOD. Selon certains auteurs, la MOD est principalement composée des produits issus de la dégradation microbienne sur les résidus organiques anciens. Cependant la litière fraîche, dépendamment de sa fraction soluble, contribuerait aussi significativement à la production de la MOD (Zsolnay 1996; Kalbitz et al. 2000). La biomasse microbienne du sol est aussi considérée comme une source non-négligeable de MOD car étant composée de constituants labiles (Bolan et al. 2011).

La MOD dans les premiers cm du sol provient de la dégradation de la litière tandis que les résidus racinaires produisent une MOD présente dans les horizons profonds du sol. Les flux de MOD sont particulièrement importants dans la rhizosphère du fait de l'exsudation et de la dégradation des racines végétales mortes qui représentent des composés directement accessibles pour le métabolisme microbien. L'apport de déchets organiques (fumiers, boues d'épuration, etc.) augmente systématiquement la quantité de MOD dans les sols soit en étant une source de MOD soit en favorisant la solubilisation de la MOS ancienne des sols (Figure 6). Dans la plupart des sols, la concentration de COD décroît de 50 à 90% entre l'horizon de surface et les couches minérales. Selon Zsolnay (1996), les sols forestiers (5 - 440 mg/L) sont plus enrichis en COD que les sols agricoles (0 - 70 mg/L). En

effet, l'accumulation importante de litières dans les forêts favorise une plus forte production de MOD à la surface des sols de ces écosystèmes.

La quantité de MOD peut varier sous l'influence de différents processus intrinsèques au sol : sorption sur le sol, dégradation photochimique et biologique, lixiviation (Fig. 6). La sorption sur le sol est plus importante pour la fraction hydrophobe de la MOD (Gmach et al. 2020). La fraction hydrophile de la MOD est la plus vulnérable à la dégradation microbienne. L'ensemble de ces processus contribue à une déplétion de la MOD en solution au cours du temps.

En définitive, la litière fraîche et la MOS ancienne du sol sont considérées comme étant les deux principales sources de MOD. Cependant, il est difficile d'évaluer clairement la contribution de chacune de ces deux sources à la production de MOD.

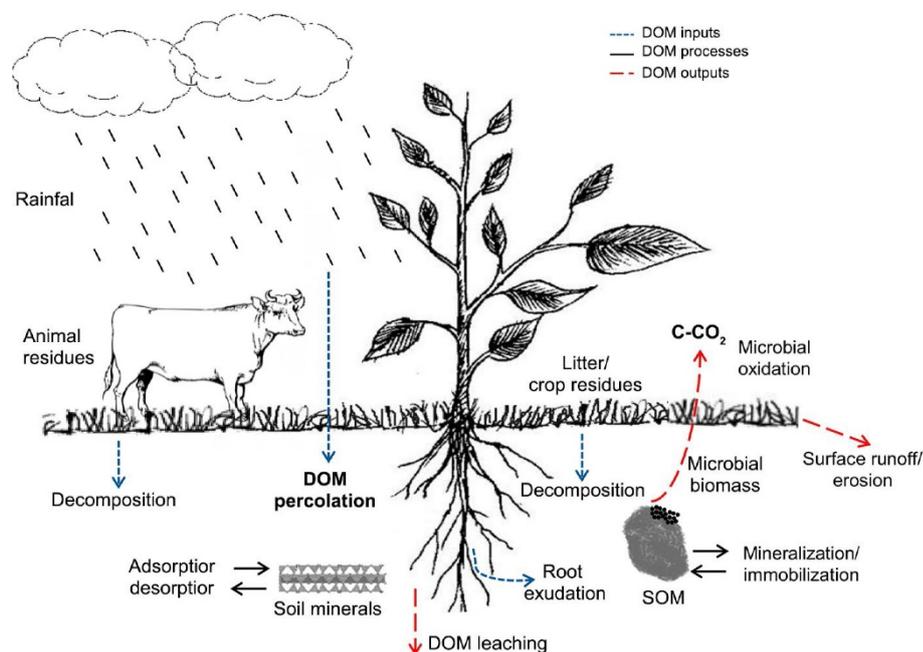


Fig. 6 : Dynamique (apports et pertes) de MOD dans les sols et les écosystèmes (Gmach et al. 2020)

2.3 Facteurs influençant la dynamique de la MOD dans les sols

La concentration de la MOD en solution du sol à un moment t est la résultante des apports organiques, des processus de production microbienne, de sorption / désorption et de lixiviation.

La dynamique de la MOD dépend en grande partie de la nature et de la quantité des apports organiques dans le milieu. Plus la MOS est faible en N et riche en C, plus sa décomposition produit une quantité importante de COD ; cela explique la corrélation positive entre flux de COD et ratio C : N (du sol ou des apports) (Kalbitz and Knappe 1997). La fertilisation organique des sols entraîne systématiquement

une augmentation immédiate et brève du COD, à cause de la richesse en composés solubles des produits organiques apportés (Zsolnay 1996). Ces composés sont ensuite rapidement consommés par les bactéries et cela entraîne une baisse du COD. Cependant, lorsque les apports organiques sont effectués de façon continue et sur le long terme, les différences de concentrations de COD sont plus distinctes. D'ailleurs, il a été montré que les sols issus d'agriculture biologique présentent des teneurs en COD plus importantes que ceux d'agriculture conventionnelle, dues aux différences d'apports organiques (Lundquist et al. 1999).

Les conditions climatiques affectent considérablement la dynamique de la MOD dans les écosystèmes. Dans les zones chaudes et humides (régions tropicales), les activités bactériennes de dégradation de la MOS sont importantes, ce qui aboutit à plus de production de MOD (Gmach et al. 2020). La ré-humidification du sol suite à une période de sécheresse provoque un fort apport de MOD dans le milieu (Kalbitz et al. 2000). Ce pic de MOD s'expliquerait par une accumulation des composés organiques dans le sol due à la faible activité de dégradation pendant la période de sécheresse. Certaines caractéristiques du sol (quantité d'argiles, granulométrie, taux d'oxydes) affectent la sorption de la MOD et réduisent sa concentration en solution. Les oxydes de Al et de Fe sont les constituants du sol qui sorbent le plus les molécules composant la MOD (Kaiser et al. 2001).

D'autre part, les pratiques culturales affectent la quantité de MOD à travers le changement des apports organiques, de la qualité des substrats et de l'activité microbienne *in situ*. Le labour des sols et le défrichage d'une forêt pour la mise en culture entraînent à long terme une déplétion de COD (Zsolnay 1996; Kalbitz et al. 2000). Le chaulage quant à lui des sols provoque une augmentation de COD du fait de la stimulation de l'activité microbienne et de la forte solubilisation de MOS aux pH alcalins (Andersson et al. 1994). Dans les horizons profonds du sol, les exsudats provenant des racines végétales enrichissent la MOD en sucres, acides aminés et acides organiques (Gmach et al. 2020).

Il est admis que la déplétion de la MOD dans les horizons minéraux du sol est plus liée à son adsorption sur les surfaces minérales qu'à sa décomposition biologique (Kalbitz et al. 2000), ce qui explique la diminution importante de la teneur en MOD avec la profondeur. Les molécules de MOD s'adsorbent naturellement sur les surfaces minérales du fait de processus physico-chimiques divers : échange d'ions, échange de ligands, ponts cationiques, forces de van der Waals et adsorption physique. Cette sorption est partiellement réversible et seule une partie de cette MOD est solubilisable de nouveau. Singh et al. (2016) ont relevé une corrélation positive entre capacité d'adsorption de la MOD et surface spécifique des argiles, ce qui souligne l'importance de la composition du sol pour la dynamique de la MOD. Les mêmes auteurs ont avancé que l'adsorption de la MOD augmentait avec la concentration en Ca^{2+} . Cependant, les anions tels que les phosphates et les sulfates peuvent entrer en compétition avec la MOD pour les sites d'adsorption et provoquent la lixiviation de la MOD (Kalbitz et al. 2000). La désorption de la MOD dépend de la nature des surfaces minérales : elle serait quasi-totale avec de la kaolinite et de 28 à 35% seulement avec les oxydes de Fe dans le sol (Gmach et al. 2020).

Seule une faible partie de la MOD est soumise à la lixiviation. Dans les sols fortement dégradés et nus, il est possible d'observer une perte de MOD par ruissellement de surface après les épisodes pluvieux.

Les couvertures végétales permettent de diminuer cette déplétion en MOD et réduire le risque d'eutrophisation des cours d'eau avoisinants (Veum et al. 2009).

2.4 Techniques de caractérisation de la MOD

La MOD joue un rôle important dans les écosystèmes. La caractériser permet de mieux comprendre sa dynamique et son interaction avec les autres compartiments du biotope. Les précédentes parties ont relevé la complexité de la MOD, ce qui implique de nombreux défis pour caractériser la MOD des milieux naturels. Chaque technique d'analyse apporte une information supplémentaire à une meilleure compréhension de la composition de la MOD. La plupart des techniques d'étude de la MOD ont été développées et appliquées dans le milieu aquatique. Cependant, elles sont aussi de plus en plus pertinemment utilisées dans les études sur la MOD du sol. Il existe plusieurs moyens d'analyses de la MOD : les analyses élémentaires (pour avoir la composition en C, H, O, N, S), les analyses isotopiques, les analyses moléculaires, les analyses structurales et les analyses fonctionnelles optiques. Dans la suite, uniquement les techniques d'analyses fonctionnelles par spectroscopie optique seront présentées.

Les techniques d'analyses fonctionnelles permettent de mettre en évidence des types de structures ou de fonctions chimiques de la MOD. En plus de cela, les constituants de la MOD possèdent des propriétés optiques qui sont exploitées par des techniques permettant de mettre en lumière les sources et l'état d'évolution de la MOD. Ainsi, une partie de la MOD absorbe simultanément dans les ultraviolets et le visible (MOD chromophorique) et une partie de cette MOD chromophorique fluoresce (MOD fluorescente). Les deux principales techniques exploitant les propriétés optiques de la MOD sont la spectrophotométrie et la spectrofluorimétrie.

2.4.1 Analyses par spectrophotométrie UV-Visible

La MOD est pourvue de nombreuses structures atomiques appelées chromophores, capables d'absorber des photons qui peuvent les exciter et modifier leur état électronique. La spectroscopie d'absorption UV-Visible est une technique couramment utilisée pour caractériser la MOD. C'est une technique rapide et relativement simple à mettre en œuvre. Cette technique concerne la MOD chromophorique, qui absorbe dans les longueurs d'ondes comprises entre 200 et 800 nm. La limite est que dans cette large fourchette de longueurs d'onde, des espèces inorganiques (telles que les nitrates et les oxydes de Fe) peuvent aussi absorber la lumière et biaiser le ciblage de la MOD. Prise dans sa globalité, la spectroscopie d'absorption UV-Visible est donc un outil peu spécifique qui ne permet pas de distinguer finement les types de chromophores. Cependant, pour des longueurs d'ondes spécifiques, il est possible d'évaluer la source, l'aromaticité et la taille moléculaire de la MOD.

Dans la littérature, l'aromaticité de la MOD a abondamment été mesurée à partir de son absorbance à 254 nm (Weishaar et al. 2003; Amery et al. 2008; Kikuchi et al. 2017; Araújo et al. 2019a; Zhang et al. 2020) aussi bien dans les milieux aquatiques que terrestres. Plus précisément, l'indice SUVA est le plus communément utilisé pour évaluer l'aromaticité de la MOD. Le SUVA est la mesure de

l'absorbance spécifique à une longueur d'onde donnée (généralement à 254 nm) normalisée par la concentration en COD de l'échantillon. La formule de calcul du SUVA telle qu'abordée dans ce manuscrit est la suivante (exprimée en $L\ gC^{-1}\ cm^{-1}$) :

$$SUVA = \frac{A_{254} \cdot 1000}{l \cdot COD}$$

, où A_{254} est l'absorbance mesurée à 254 nm, l est la distance de parcours du faisceau (cm), et COD la concentration en carbone dissout en $mg\ L^{-1}$.

Cette manière de déterminer le SUVA est la plus utilisée dans la littérature « Sol », tandis que les études en milieu aquatique expriment généralement le SUVA en $L\ mgC^{-1}\ m^{-1}$. Dans les extraits (ou lixiviats) de sols agricoles, les valeurs de SUVA varient généralement entre 5 et 70 $L\ gC^{-1}\ cm^{-1}$ (Amery et al. 2007; Amery et al. 2008; Supriatin et al. 2015).

Les rapports d'absorbance, les pentes spectrales et le rapport de pentes spectrales sont d'autres indicateurs calculés à partir des spectres d'absorbance pour évaluer les variations de la taille moyenne et l'état d'évolution des macromolécules de la MOD. Pour les rapports d'absorbance, deux sont principalement utilisés. Le rapport E2/E3 est le rapport des absorbances à 254 nm et à 365 nm, et le rapport E4/E6 est le rapport des absorbances à 465 nm et à 665 nm (Helms et al. 2008). Ces indicateurs ont été exploités dans plusieurs travaux comme étant inversement proportionnels à la taille moléculaire de la MOD ((Helms et al. 2008; Hattab et al. 2014; Araújo et al. 2019a). Selon Chen et al. (1977), le ratio E4/E6 permettrait aussi de renseigner le degré d'humification de la MOD. Les pentes spectrales sont obtenues en ajustant une équation linéaire à la transformation logarithmique de l'équation suivante :

$$a_{\lambda} = a_{\lambda_{ref}} \cdot e^{-S(\lambda - \lambda_{ref})}$$

avec a le coefficient d'absorption népérien en nm^{-1} , λ la longueur d'onde en nm, λ_{ref} la longueur d'onde de référence. La pente spectrale $S_{275-295}$ est calculée entre les longueurs d'onde 275 et 295 nm, et $S_{350-400}$ est calculée entre les longueurs d'onde 350 et 400 nm (Fig. 7). Les pentes spectrales ont beaucoup été utilisées pour étudier la MOD chromophorique en milieu aquatique. Les valeurs de $S_{275-295}$ sont généralement plus faibles dans les zones côtières influencées par des apports terrestres ($S < 0.018\ nm^{-1}$), traduisant un enrichissement en molécules de tailles plus importantes, comparées aux environnements océaniques (Blough and Del Vecchio 2002). Le rapport de pentes spectrales (S_R) est le rapport entre les pentes spectrales $S_{275-295}$ et celle $S_{350-400}$ et est inversement corrélé au poids moléculaire moyen de la MOD (Helms et al. 2008). Dans la littérature, le ratio S_R des extraits de sols agricoles varie généralement entre 0.3 et 2 (Gao et al. 2017; Tang et al. 2019).

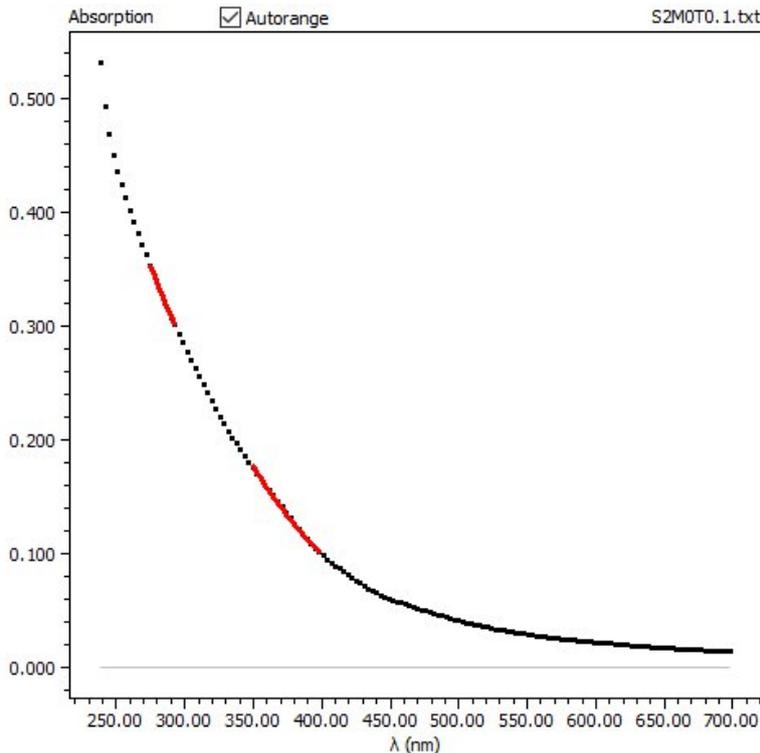


Fig. 7 : Exemple de spectre d'absorbance d'un extrait de sol viticole. Les segments en rouge sont les zones de calcul des pentes spectrales $S_{275-295}$ et $S_{350-400}$.

2.4.2 Analyses par spectroscopie de fluorescence

Parmi les chromophores de la MOD, certains, appelés fluorophores, ont la capacité de réémettre de la lumière après excitation par une source lumineuse. Les molécules fluorescentes se caractérisent par des cycles aromatiques condensés, avec souvent des chaînes aliphatiques fortement insaturées. L'absorption dans le domaine UV-Visible est une condition préalable à la fluorescence. Aujourd'hui, la spectroscopie de fluorescence 3D, ou matrice d'excitation-émission (EEM) de fluorescence, est la technique la plus utilisée. Elle génère des matrices qui intègrent à la fois les valeurs d'excitation, d'émission et d'intensité de fluorescence. Sur les spectres de fluorescence, sont observées des bandes étroites dues aux phénomènes de diffusion. Les principales sont les diffusions Rayleigh et Raman. La diffusion Rayleigh est causée par la présence des molécules de taille plus petite que la longueur d'onde du faisceau incident, ce qui provoque une diffusion élastique de la lumière. La diffusion Raman est inélastique et provient de la diffusion de la lumière par les molécules du solvant.

De façon comparative, la spectroscopie de fluorescence est plus sensible et offre une meilleure résolution des spectres par rapport à la spectrophotométrie UV-Visible. La discrimination entre échantillons se fait sur la base des bandes de fluorescence observées. Ces pics se caractérisent par un ou des couples de longueurs d'onde d'excitation et émission (Ex/Em) (au niveau desquels l'intensité de fluorescence est maximale) et correspondent aux principaux fluorophores présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Principaux composants fluorescents de la MOD, d'après Parlanti (2000)

Nom des fluorophores	Type de fluorophores	Longueurs d'ondes d'excitation (nm)	Longueurs d'ondes d'émission (nm)
α	Matériel aromatique/hydrophobe mature	330-370	420-480
α'	Matériel aromatique/hydrophobe + matériel plus récent	230-260	380-480
β	Matériel biologique et origine microbienne / matériel récent	310-320	360-410
γ	Protéines et activité bactérienne	270-280	300-350

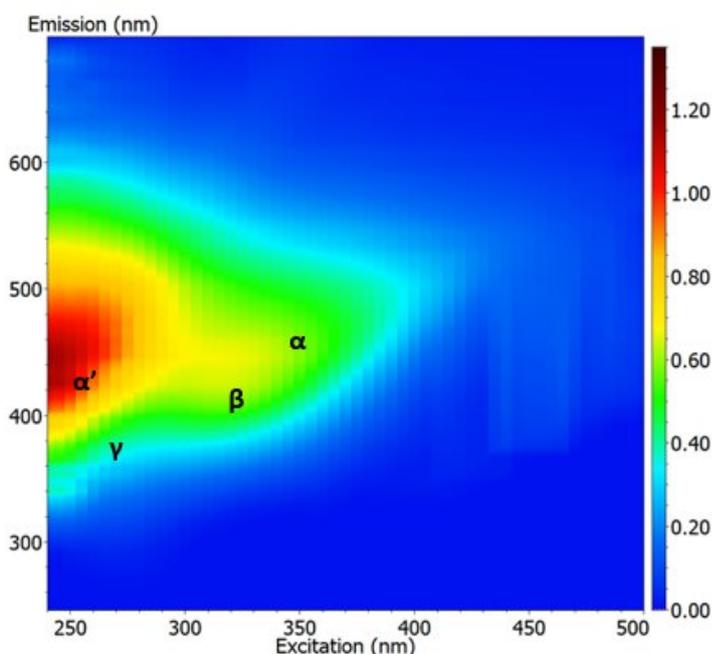


Fig. 8 : Projection dans le plan d'une matrice EEM d'extrait de sol viticole. Les lettres représentent le positionnement des bandes de fluorescence.

Les bandes α et α' (Tableau 1) sont quasi toujours présentes sur les spectres d'échantillons naturels (sols et eaux). Elles correspondent à des matériels matures aromatiques et/ou hydrophobes. La bande β est rarement observée de façon distincte mais plutôt sous forme d'épaule à la bande α (Fig. 8). Cette bande est associée à des substances néoformées suite à l'activité biologique dans le milieu (Parlanti 2000). La bande γ est associée aux composés de type protéinique souvent en lien avec l'activité biologique dans le milieu et est intense lorsque le matériel organique est fraîchement produit. Ses composants constituent une fraction hautement labile de la MOD.

A partir des spectres de fluorescence, des indices peuvent être déterminés afin d'obtenir une caractérisation supplémentaire de la MOD.

- L'indice humification HIX : il rend compte du degré d'humification / condensation de la MOD (Zsolnay et al. 1999) et aussi de son aromaticité (Ohno et al. 2007). Il est calculé comme étant le rapport des aires H (435-480 nm) et L (300-345 nm) du spectre d'émission pour une excitation à 254 nm (Fig. 9). Plus le HIX est élevé, plus la MOD est aromatique et humifiée. En effet, l'humification de la MOD augmente le ratio Carbone / Hydrogène et crée un décalage de la fluorescence vers les plus grandes longueurs d'ondes. Dans les sols, les valeurs de HIX sont généralement compris entre 2 et 30 (Kalbitz et al. 2003; Tang et al. 2019).
- L'indice de contribution autochtone BIX : il renseigne sur la contribution du fluorophore β , indicateur de production récente de composés en lien avec l'activité biologique. L'indice BIX est le rapport des intensités de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission de 380 et 430 nm, à une longueur d'onde d'excitation de 310 nm. BIX varie généralement entre 0.4 et 1 (Huguet et al. 2009). Des valeurs de BIX élevées (entre 0.8 et 1) relatent d'une prédominance de composants récemment produits par l'activité biologique.
- L'indice de fluorescence FI : il donne une indication sur la source de la MOD. Il est calculé comme étant le ratio entre l'intensité de fluorescence à 450 nm et celle à 500 nm d'émission lorsque l'excitation est à 370 nm (McKnight et al. 2001). Les valeurs faibles (autour de 1.3) correspondent à des composants dérivés des plantes supérieures tandis que des valeurs élevées (autour de 1.9) indiquent une MOD issue des processus microbiens.

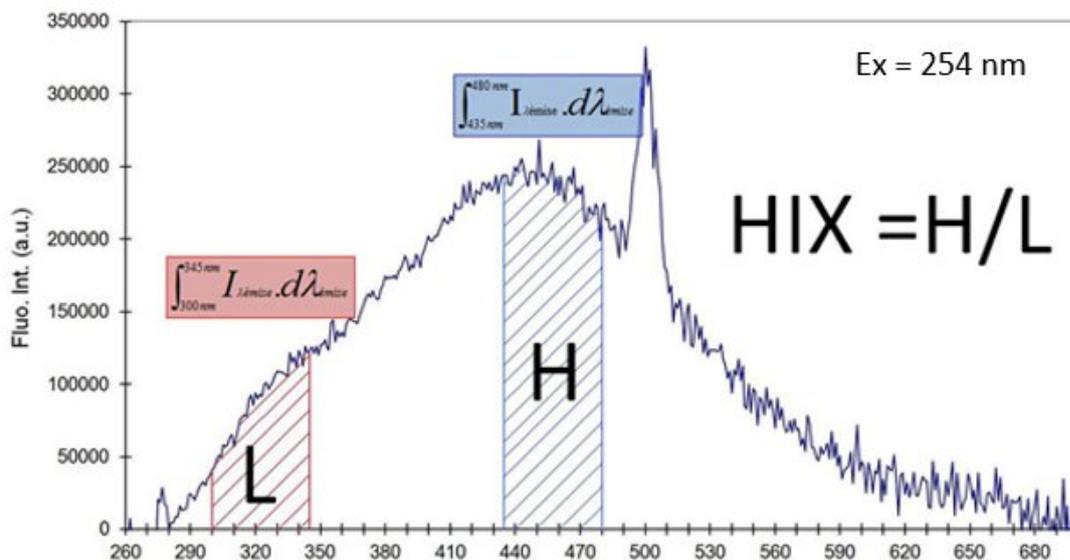


Fig. 9 : Méthode de calcul du HIX à partir d'un spectre de fluorescence

2.4.3 Parallel factor Analysis (PARAFAC)

Dans les spectres de fluorescence de la MOD, les pics se superposent les uns aux autres conduisant à des bandes larges résultant de la contribution simultanée des spectres discrets de plusieurs fluorophores. Afin d'extraire plus d'informations des spectres EEM, une méthode numérique de traitement de ces spectres, PARAFAC (PARALLEL FACTOR analyses), permet une séparation mathématique des différentes contributions spectrales (Stedmon et al, 2008) expliquant l'ensemble d'un jeu de données. L'analyse PARAFAC permet ainsi d'estimer le nombre de fluorophores contribuant au signal global de fluorescence et leurs concentrations relatives dans chacun des échantillons d'un jeu de données (Stedmon and Bro 2008). De nos jours, cet outil est quasi incontournable pour les études sur la MOD et se révèle efficace pour suivre les processus auxquels la MOD est soumise dans les milieux. Les composants déterminés par l'analyse PARAFAC peuvent ensuite être comparés à des fluorophores répertoriés dans une base de données issues de la littérature, « OpenFluor database » (Murphy et al. 2014) (<http://www.openfluor.org/>).

2.5 Impact de l'apport de litières fraîches sur la dynamique de la MO et le fonctionnement du sol

L'apport de MO fraîche provoque généralement une stimulation de l'activité biologique du sol. Le type de MO fraîche apportée doit être diligemment étudié afin de ne pas entraîner des changements extrêmes sur les propriétés du sol et les communautés microbiennes. Généralement, plus le rapport C:N de la litière est faible, plus importante est l'activité biologique dans le sol. Asghar and Kataoka (2021) ont montré que l'incorporation de résidus de légumineuses faisait augmenter significativement l'activité des enzymes (phosphatase et de la β -glucosidase). Ces enzymes sont importantes durant les premières étapes de la décomposition des composés P et C dans le sol. Pour une litière enrichie en azote (légumineuses par exemple, faible ratio C:N), l'azote est facilement accessible par les microorganismes et la minéralisation l'emporte sur les processus d'immobilisation et d'absorption du N. De ce fait, Maiksteniene and Arlauskiene (2004) ont montré que les résidus de luzerne et de trèfle (C :N allant de 10 à 12) provoquaient une minéralisation plus intense que les résidus d'avoine ou de tiges de blé (C :N allant de 31 à 55). En mesurant le flux cumulé de CO_2 dégagé du sol, Ghimire et al. (2017) ont montré que l'apport de résidus (avoine, colza et pois) provoque une forte stimulation de la minéralisation de la MO surtout durant les premiers jours d'incubation. L'augmentation rapide de la vitesse de minéralisation du carbone et de la biomasse microbienne est due à l'incorporation de composés facilement dégradables provenant de la MO fraîche (Tejada et al. 2008).

Błońska et al. (2021) ont relevé une corrélation positive entre les activités enzymatiques de sols amendés par des engrais verts et la concentration de COD produit par la décomposition microbienne. La dynamique et les propriétés du COD produit dépendent beaucoup des propriétés biochimiques des résidus organiques apportés au sol (Kalbitz et al. 2000). Selon De Troyer et al. (2011), la MOD produite

pendant les premiers jours d'incubation provient essentiellement de la litière fraîche et est constituée de composés hydrophiles. Par la suite, le marquage isotopique dans cette étude montre que la MOD s'enrichit de plus en plus en substances organiques originaires du sol même. La quantité importante de MOD suite à l'apport de litières est rapidement consommée par les microorganismes car étant facilement minéralisable. Au fil de la dégradation microbienne, la MOD diminue en quantité mais se complexifie de plus en plus, avec un enrichissement en composés hydrophobes et aromatiques. Cela se caractérise par une augmentation du SUVA et du HIX (Hunt and Ohno 2007; Chen et al. 2010; De Troyer et al. 2011a). De plus, le traitement PARAFAC a mis en évidence une dominance de composés type-protéinique dans les extraits de sol juste après l'apport de litières fraîches. Au fil de la dégradation de la litière, la proportion des composés type humique devient de plus en plus importante tandis que les substances type protéiniques tendent à disparaître (Hunt and Ohno 2007; Xie et al. 2019).

L'apport de litières fraîches au sol entraîne des modifications sur le pH du sol. L'ampleur de ces modifications dépend du pH initial des litières. Une litière acide aura tendance à diminuer le pH du sol suite à son apport. Au fur et à mesure que la litière se dégrade, les mécanismes de nitrification produisent des protons et contribuent à acidifier le sol. De même, dans les cas les plus classiques, le pH du sol augmente car la minéralisation des anions organiques contenus dans la litière produit des ions OH⁻ qui sont libérés dans la solution de sol (Ritchie and Dolling 1985; Cui et al. 2008).

3 Le cuivre : dynamique dans le sol

3.1 Spéciation du cuivre dans la phase solide du sol

Le cuivre se présente sous diverses formes présentes dans les phases solides et liquides du sol. D'un point de vue granulométrique, le cuivre s'accumule préférentiellement sur les matières organiques particulaires ou les fractions fines, inférieures à 2 µm (Flores-Vélez et al. 1996; Besnard et al. 2001).

Dans la phase solide du sol, le cuivre peut être adsorbé sur la matière organique, les oxydes et hydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium et aussi sur les argiles (Adriano, 1986). Les carbonates, les phosphates peuvent également précipiter avec le cuivre (Ponizovsky et al. 2007; Yruela 2009). Dans les sols viticoles carbonatés, il est ainsi possible de trouver des précipitations de cristaux verts de malachite (carbonate de cuivre) (Besnard et al., 2009). La matière organique et les hydroxydes de fer et d'aluminium sont les constituants qui retiennent le plus le cuivre dans le sol (Fernández-Calviño et al. 2009 ; Bortoluzzi et al. 2019) (Fig. 10). Mout études ont confirmé la forte complexation du cuivre par la matière organique du sol (Duplay et al. 2014 ; Brunetto et al. 2016). Pour expliquer ce fait, Croué et al. (2003) ont suggéré que cette affinité provient de la configuration électronique même du métal, qui lui permet d'être très réactif avec les groupes carboxyles et phénoliques de la matière organique.

Les oxydes et oxyhydroxydes dans le sol immobilisent le cuivre par des mécanismes de coprécipitation, d'adsorption par échange d'ions, de complexation de surface, de diffusion dans les micropores et d'inclusion dans les réseaux cristallins tandis que des réactions de nucléation s'observent avec la MO

(Ma et al. 2006 ; Zeng et al. 2017 ; Liu et al. 2018). La sorption du cuivre sur les sites réactifs du sol peut être réversible sur le long terme en fonction de la nature des sites mais la désorption resterait négligeable par rapport aux mécanismes d'immobilisation (Wang and Zhang 2010).

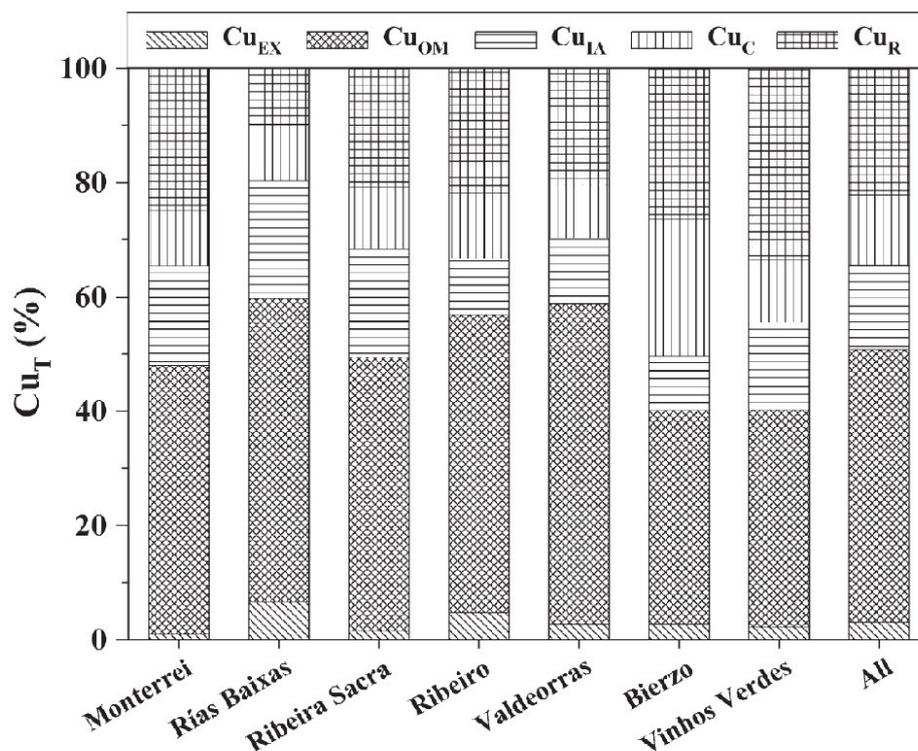


Fig. 10 : Répartition du cuivre dans les différentes fractions de sols viticoles espagnols (Cu_{EX} : cuivre échangeable, Cu_{OM} : cuivre lié à la matière organique, Cu_{IA} : cuivre lié aux constituants amorphes, Cu_C : cuivre lié aux oxydes de Fe et d'aluminium, Cu_R : cuivre résiduel (d'après Fernández-Calviño et al. (2009))

La fraction de cuivre en solution (libre et complexée) et de cuivre échangeable est dite labile, la fraction spécifiquement adsorbée sur la MO et les oxydes est semi-labile et la fraction résiduelle est non-labile (Adriano, 1986).

3.2 Spéciation du cuivre en solution

Le cuivre en solution représente généralement entre 1 et 2% du cuivre total dans le sol (Chaignon et al, 2003 ; Sauvé et al, 1998).

La spéciation d'un élément chimique est la caractérisation et la quantification des différentes formes chimiques de cet élément (Tessier et al. 1979). Connaitre la spéciation d'un élément permet d'identifier ses formes potentiellement mobiles ou toxiques et de prédire leur devenir dans l'environnement. Le cuivre une fois en solution peut se présenter sous différentes formes géochimiques :

-La forme libre Cu^{2+} , qui généralement représente moins de 2% du cuivre total en solution (Adriano 1986). Cette proportion peut augmenter jusqu'à 20% en conditions de forte acidité du sol et de faible quantité de MO (Behel et al. 1983).

-La forme associée aux ligands inorganiques par des complexes de sphères externes avec des liaisons instables (Carrillo-González et al. 2006). En considérant uniquement l'hydrolyse du Cu, il a été suggéré que lorsque le pH du sol est supérieur à 7, le complexe $\text{Cu}(\text{OH})_2$ serait la forme inorganique majoritaire en solution (Lindsay 1979). Une augmentation des anions (par exemple les carbonates ou les phosphates) peut conduire à la précipitation du cuivre et à la baisse de sa concentration en solution.

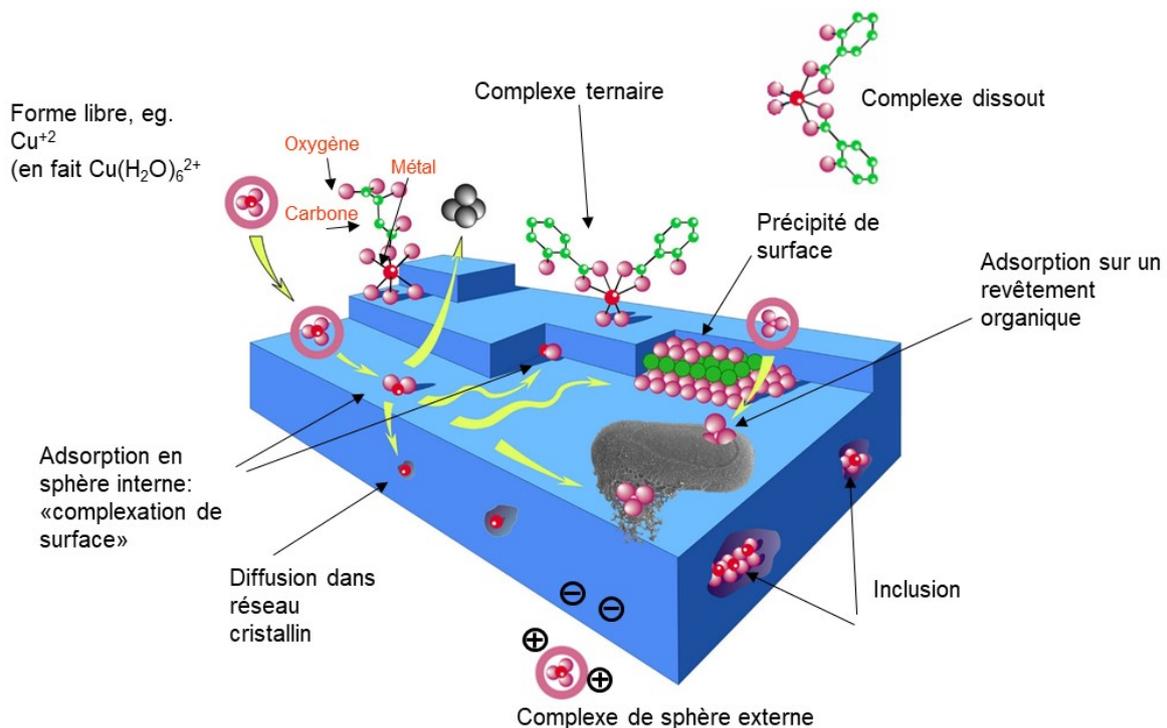
-La forme complexée par la matière organique dissoute, par des complexes en sphères internes et des liaisons chimiques stables (Carrillo-González et al. 2006). Le cuivre a une très forte affinité pour la MOD, par conséquent, les complexes MOD-Cu sont généralement très majoritaires en solution. Le pourcentage de cuivre complexé à la MOD peut atteindre 99% (Temminghoff et al. 1997).

La spéciation du cuivre en solution dépend fortement du pH. Lorsque le pH augmente (à partir de 6), les complexes MO-Cu sont de plus en plus abondants en solution. En effet, l'augmentation du pH favorise la déprotonation de la MOD, favorisant ainsi la complexation du cuivre et la diminution de sa fraction libre Cu^{2+} (Tyler and Olsson 2001).

3.3 Les mécanismes affectant les échanges sol-solution des métaux

Plusieurs mécanismes permettent d'établir et de maintenir un équilibre des métaux entre la phase solide et la solution de sol (Fig. 11). Cela aboutit soit à une fixation des métaux en solution, soit un approvisionnement de la solution. Le Cu dans la solution de sol (libre et complexé) et échangeable est considéré comme labile, le Cu semi-labile est celui adsorbé sur la MO et les oxydes (Adriano 1986).

Ainsi, les principaux mécanismes qui conditionnent la disponibilité des métaux dans le sol sont : l'adsorption (physisorption et chimisorption), la précipitation et la coprécipitation, et la complexation (Adriano 1986; Alloway 1995; Manceau 2002, Sposito 2008; Kabata-Pendias 2011).



D'après Manceau et al. 2002

Fig. 11 : Mécanismes d'absorption du cuivre sur les surfaces organo-minérales - D'après Manceau et al. 2002

3.3.1 L'adsorption sur les phases solides

Ce mécanisme consiste en l'accumulation de métaux à l'interface solide-solution avec un arrangement moléculaire en deux dimensions. L'adsorption peut se produire sur les carbonates, les phyllosilicates, les oxydes et hydroxydes de Fe et de Mn, les phosphates et la matière organique. Il existe deux types d'adsorption :

La physisorption ou adsorption non spécifique, qui consiste en la formation de complexes de sphère externe avec une ou plusieurs molécules d'eau interposées entre le métal et le ligand. Ce mécanisme se définit par un échange d'ions de nature uniquement électrostatique avec des forces de type Van der Waals. L'échange ionique est une adsorption non spécifique dans laquelle les cations métalliques adsorbés se situent dans une couche diffuse où une neutralisation s'effectue avec les charges électriques de surface du minéral. La matière organique et les argiles sont les principaux compartiments du sol qui représentent les échangeurs d'ions. L'adsorption non spécifique est faible et instable.

La chimisorption ou complexation ou adsorption spécifique, qui consiste en la formation de complexes de sphère interne impliquant un contact direct entre le métal et le ligand. Ce mécanisme se définit par une réaction chimique avec la mise en jeu de liaisons covalentes de forte affinité notamment

avec le Cu. La complexation de surface résulte de liaisons entre les solutés (métaux) accepteurs d'électrons et les atomes donneurs d'électrons de la surface. Ces complexes ainsi formés dépendent des variations de certains paramètres du sol tels que le pH, ou la température. Les oxydes hydratés (de Fe, de Mn, et d'Al) et la matière organique sont les principaux éléments du sol qui interagissent avec les métaux via la complexation de surface. En effet, les oxydes du sol ont une surface spécifique très élevée et généralement chargée négativement ; et la MO est riche en groupements fonctionnels ayant une affinité avec les métaux (carboxyliques, phénoliques, hydroxyliques etc...). Dans ce sens, les oxydes de Mn seraient plus efficaces que les oxydes de Fe pour la complexation de surface des métaux. L'adsorption spécifique est difficilement réversible car elles engagent des liaisons fortes et stables.

3.3.2 La complexation en solution

Ce mécanisme favorise la mobilité des métaux dans les sols et affecte considérablement leur biodisponibilité et leur toxicité. Les complexes en solution résultent de liaisons de coordination entre une entité donneuse d'électrons (ligands) et les ions métalliques qui jouent le rôle d'accepteur. Les ions métalliques peuvent former des complexes en solution avec des ligands organiques ou inorganiques. Les ligands inorganiques sont généralement monodentés car ils ne forment qu'une seule liaison de complexation. Cependant, la complexation en solution avec les ligands inorganiques aboutit à une chélation, avec ils sont multidentés du fait des groupements carboxyliques.

3.3.3 La précipitation et la dissolution

Ces mécanismes sont relativement lents dans les sols mais peuvent influencer la mobilité des métaux dans le sol en les retenant (précipitation) ou les libérant (dissolution). La précipitation se traduit soit par la formation d'une nouvelle surface solide, soit par une augmentation de la surface solide initiale. La précipitation est contrôlée par certains facteurs tels que le pH, la concentration en métaux, la température et le potentiel redox; et peut se produire à la surface des particules de sol ou dans l'eau porale. La précipitation des métaux a généralement lieu lorsque la solution de sol est saturée et le pH élevé. On parle de coprécipitation lorsqu'une espèce chimique précipite simultanément avec d'autres (Zn, Pb, Cu, Ni, Cd). Dans les sols naturels, les métaux précipitent généralement sous forme de carbonates et rarement sous forme de sulfures et de phosphates. Les phosphates seraient les éléments du sol les plus réactifs pour précipiter les métaux, avec une séquence de stabilité $Pb > Cu > Zn$. L'équilibre entre la précipitation et la dissolution est tributaire des constantes de solubilité des espèces en jeu. Ce sont ainsi deux phénomènes réversibles. Certains changements de conditions dans le sol entraînent une dissolution des précipités de métaux. En effet, lorsque le sol s'acidifie, les carbonates et les hydroxydes se dissolvent, ce qui entraîne le passage en solution des métaux associés.

De même, il a été reporté que des conditions réductrices (absence d'oxygène) et une augmentation de la force ionique du sol exacerbent la dissolution des précipités de métaux.

D'autres mécanismes plus rares symbolisent les interactions entre les métaux et les constituants du sol. La substitution dans le réseau cristallin se produit lorsqu'un métal en remplace un autre dans le réseau cristallin. Les deux éléments qui se permutent doivent ainsi être de charges et de tailles similaires. L'occlusion est un mécanisme par lequel les métaux peuvent être piégés mécaniquement dans des pores lors de la formation des minéraux.

3.3.4 Cas particulier de l'interaction chimique du Cu avec la MO

Le Cu a une affinité particulière avec la MO. Ainsi, la MO est l'un des constituants du sol qui influence le plus la mobilité et la disponibilité du cuivre. Strawn et Baker (2009) ont montré que le Cu était principalement présent sous forme de complexes Cu-MO dans plusieurs sols viticoles d'une gamme de pH allant de 5 à 7. De même, les complexes Cu-MOD compteraient jusqu'à 93 % du Cu total en solution de sol (Rutkowska et al. 2013).

L'effet de la MO sur le Cu présente une dualité. La MO particulaire du sol limite la mobilité du Cu à travers les mécanismes d'adsorption alors que la MO dissoute l'exacerbe via la complexation en solution. Les sites de la MO contiennent des groupements fonctionnels tels que les carboxyles (-COOH), les hydroxyles (-OH), les amines (-NH₂), ce qui leur confère un fort potentiel d'interaction avec le Cu via les mécanismes d'échange ionique, de chélation ou de complexation. Les protons et les autres cations tels que le Ca²⁺ peuvent aussi interagir avec ces sites réactifs et entraîner une compétition avec les ions Cu²⁺. Du fait de la nature et de la diversité de ses groupements fonctionnels, la MO du sol a des capacités d'adsorption sur un panel large de pH (pH = 3 - 5 pour les carboxyles, pH=9 pour les amines, pH=10 pour les hydroxyles). Cette propriété entraîne une plus forte capacité d'adsorption de la MO pour les Cu²⁺, par comparaison aux oxydes de Fe et de Mn.

La disponibilité du Cu peut être modifiée lors de la dégradation de la MO ayant complexé du Cu. La litière du sol représente la première fraction de MO avec laquelle interagit le Cu apporté en surface. Lorsque cette litière se dégrade, le Cu contenu est relâché avec des petits acides organiques (Bergkvist et al. 1989). En même temps, la dégradation de la litière produit une MOD de petite taille moléculaire et qui est susceptible de mobiliser le Cu en solution en formant des complexes Cu-MOD (Cuske et al. 2017). Les mécanismes de mobilisation / immobilisation de métaux lors de la décomposition dépend de la qualité de la litière, à travers leur composition (Yue et al. 2019).

3.4 Le phénomène d'aging

Lorsque l'on apporte du cuivre à un sol, celui-ci va se redistribuer sur les phases sorbantes suite aux processus physico-chimiques et biologiques opérés dans le sol. Cela entraîne une stabilisation progressive du cuivre disponible. Le vieillissement du cuivre est plus intense et plus rapide lorsque le sol est riche en matière organique, en minéraux argileux et en oxydes de manganèse et de fer (Liu et al. 2020a). En effet, le cuivre apporté est lentement fixé sur les sites de sorption via l'incorporation

dans les réseaux cristallins, la diffusion dans les micropores ou la formation de précipités métalliques à la surface des minéraux (Martínez et al. 2003 ; Zeng et al. 2017 ; Shi et al. 2018). La réduction de la disponibilité du cuivre est plus intense pendant les 10-20 premiers jours après l'apport puis le processus se ralentit substantiellement (Zheng et al. 2013). Li et al. (2018) ont noté que la matière organique participe activement au vieillissement du Cu en l'immobilisant (par complexation) dans les agrégats de sol de taille comprise entre 20 et 63 μm . Le phénomène d'aging peut être affecté par les facteurs environnementaux. L'augmentation de la température peut accélérer la diffusion de Cu dans les micropores et ainsi intensifier l'immobilisation du Cu dans le sol (Ma et al. 2006). Il a aussi été reporté qu'une augmentation de la salinité de la solution de sol peut retarder le vieillissement du cuivre (Chu et al. 2015).

L'ensemble de ces observations montre que le phénomène d'aging doit être pris en compte dans les études impliquant un apport exogène de Cu dans les sols.

3.5 Disponibilité et biodisponibilité

Il est bien connu de nos jours que la toxicité des polluants n'est pas directement liée à leur quantité totale dans le sol.

Les concepts de disponibilité et de biodisponibilité sont souvent confondus, pourtant ils désignent des situations différentes. Il est important de bien les définir afin de mieux cerner le comportement du cuivre et sa potentielle dangerosité pour les organismes. La disponibilité environnementale d'un métal est la fraction de la teneur totale de ce métal dans le sol, capable de passer d'un compartiment à un autre du sol, notamment dans la solution du sol (Harmsen et al, 2005). Selon l'ISO, la biodisponibilité d'un contaminant dans le sol est le degré avec lequel il peut être absorbé ou métabolisé par un humain ou un récepteur écologique ou est disponible pour une interaction avec des systèmes biologiques (ISO 2006). Le concept de biodisponibilité est directement relié à l'impact sur les organismes et l'évaluation se réalise via des mesures biologiques (Fig. 12).

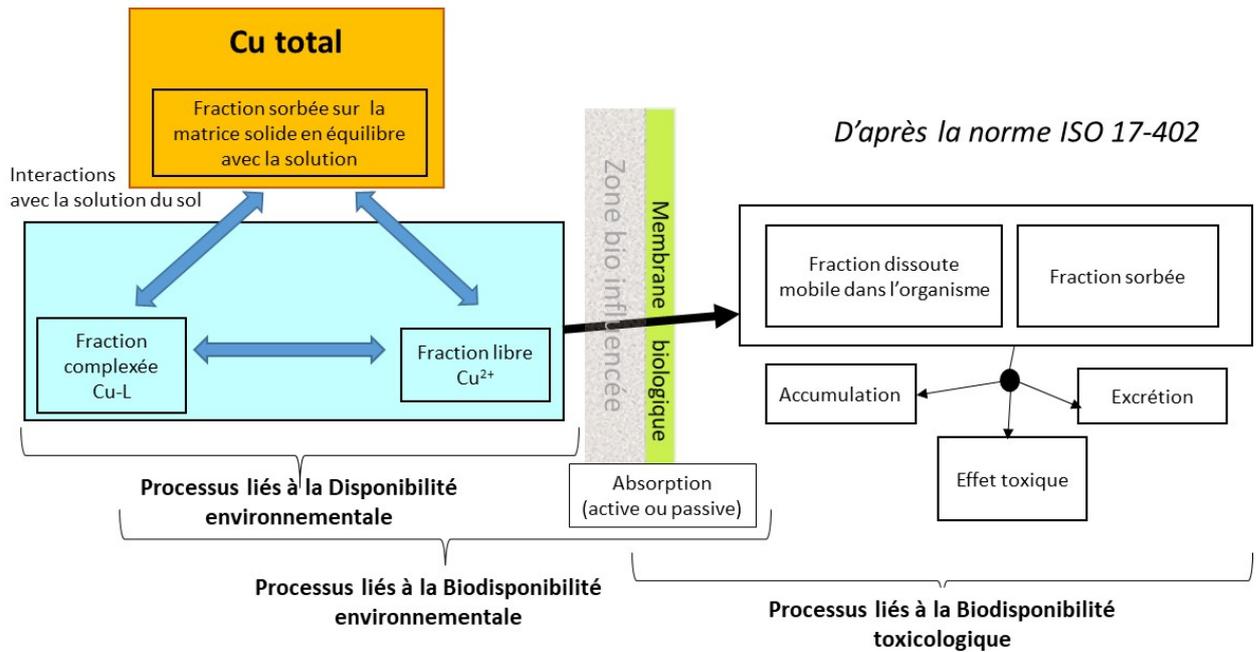


Fig. 12 : Illustration des mécanismes chimiques et biologiques impliqués pour expliquer les notions de disponibilités et biodisponibilité, d'après la norme ISO 17-402

La biodisponibilité environnementale est la fraction qui peut être prélevée par un organisme grâce à des processus physiologiques. La troisième notion est la biodisponibilité toxicologique, qui est relative à l'accumulation du métal dans les tissus des organismes, par exemple de symptômes de phytotoxicités mesurables (Bravin 2007). Pour qu'un contaminant soit biodisponible, il doit d'abord être « environnementalement disponible ». Il n'est pas aisé aujourd'hui d'évaluer de façon fine la disponibilité du cuivre dans les sols.

Dans ce travail, nous nous intéresserons à la disponibilité en tant que disponibilité environnementale du cuivre et nous faisons l'hypothèse que le cuivre disponible est le cuivre présent en solution.

3.6 Dynamique du Cu disponible dans les sols

3.6.1 Interactions entre MOD et cuivre dans la solution de sol et exploitation des propriétés optiques de la MOD

La MOD est le constituant du sol qui interagit le plus fortement avec le cuivre. De ce fait, la MOD est un déterminant majeur de la disponibilité du cuivre dans les sols. La MOD est capable de complexer le Cu et de former des complexes MOD-Cu, impactant ainsi la concentration et la spéciation du Cu en solution (Alloway 1995). Le cuivre s'associe à la MOD en créant des complexes en sphère interne très stables (Carrillo-González et al. 2006). La complexation du cuivre par les MOD se fait via des liaisons électrostatiques ou covalentes, dépendamment des sites de complexation (groupements carboxyliques, phénoliques, sulfhydriles ou amines) (McBride 1989). Parmi les différents métaux

divalents, le Cu est celui qui présente les constantes de stabilité les plus fortes avec la MOD (Xu et al. 2013 ; Guo et al. 2020). La charge nette de surface des MOD devient de plus en plus négative quand le pH de la solution de sol augmente. Cela va entraîner une sorption plus importante des ions Cu^{2+} et la diminution de leur activité en solution. La mobilité de la MOD est pH dépendante et a tendance à augmenter quand le pH augmente (Tyler and Olsson 2001). La quantité (concentration) et la qualité (composition) de la MOD impactent la concentration du Cu en solution du sol. Pour les pH faibles (inférieurs à 5), la MOD s'adsorbe sur les particules minérales et cela peut exacerber la rétention des métaux sur la phase solide (McBride 1989). Le pH influence donc significativement la réactivité de la MOD pour le cuivre.

La réactivité de la MOD pour le cuivre peut être reliée au poids moléculaire, à l'hydrophobicité, aux propriétés optiques (fluorescence et absorbance), et évaluée par la densité de sites, et la constante de stabilité du Cu pour la MOD. Les propriétés optiques de la MOD, d'abord utilisées en milieu aquatique, sont de nos jours courantes pour caractériser les interactions MOD-Cu dans les sols.

Amery et al. (2007 ; 2008) ont montré pour des sols agricoles que la capacité de mobilisation du cuivre en solution par la MOD augmentait avec l'aromaticité de la MOD estimée par le calcul du SUVA_{254} (Fig. 13). Les auteurs ont relevé l'importance de la qualité de la MOD pour discuter la solubilité du cuivre, la quantité de la MOD étant un indicateur insuffisant. Araújo et al. (2019) ont aussi exploité les propriétés d'absorbance de la MOD pour expliquer la concentration du cuivre en solution. Ils ont trouvé une relation positive entre les indices de qualité de la MOD (aromaticité et poids moléculaire) et la concentration du Cu en solution. L'aromaticité et le poids moléculaire ont été évalués à travers les indices SUVA_{254} et E2/E3. Laurent et al. (2020) ont souligné l'importance des propriétés optiques de la MOD pour expliquer le cuivre en solution dans des sols ayant subi des apports organiques. Les auteurs ont cependant avancé que ces propriétés ne s'avéraient pas efficaces lorsqu'il s'agissait d'étudier la spéciation du cuivre en solution.

Les propriétés de la fluorescence de la MOD ont surtout été exploitées en milieu aquatique pour mieux comprendre la dynamique du cuivre dissout. Dans une étude faite pour des sédiments marins, He et al. (2016) ont trouvé une relation positive entre les indices BIX et FI et la concentration du cuivre dissout dans les extraits de sédiment. Cependant, aucune relation significative n'avait été trouvée entre le Cu et l'indice HIX. De même, les auteurs ont associé la concentration du cuivre à l'abondance des composés type-tryptophane, identifiés à travers la décomposition PARAFAC. Les conclusions de cette étude étaient que la concentration du cuivre en solution augmentait avec l'enrichissement en composés peu humifiés provenant de l'activité microbienne. De même, toujours sur la complexation du cuivre par la MOD, Kong et al. (2019) ont trouvé des constantes de stabilité plus élevées (de 5.65 à 5.95) pour les composés protéiniques d'échantillons d'eau douce que pour les autres composants PARAFAC. Ces études montrent l'intérêt qui émerge des propriétés optiques de la MOD pour l'étude de la disponibilité du cuivre dans les sols.

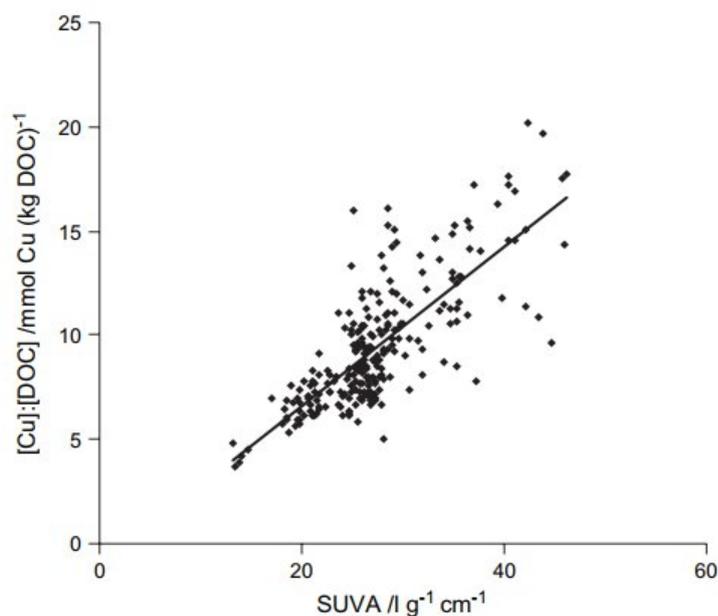


Fig. 13 : Relation entre le ratio Cu :DOC et l'absorbance spécifique à 254 nm ($SUVA_{254}$) pour des extraits de sols agricoles (Amery et al. 2008)

3.6.2 Impact de la température sur la disponibilité du cuivre

Les effets de la température sur la disponibilité du cuivre dans les sols ont été peu étudiés avec des résultats souvent contrastés. Serpaud et al. (1994) ont montré que des températures comprises entre 10°C et 30°C n'auraient pas d'effet significatif sur la mobilité des métaux (Cu, Zn, Cd and Pb) dans des environnements pauvres en MO. Cependant, il a été démontré que la labilité du cuivre dans les sols diminuerait lorsque la température augmente (Ma et al. 2006). Dans le même sens, dans une étude réalisée sur un sol agricole calcaire, Brennan et al. (1984) ont trouvé que le cuivre en solution extrait par oxalate d'ammonium diminuait avec la température au fil des jours d'incubation. Les auteurs ont introduit la variable degré.jour qui associe à la fois les effets durée et température d'incubation. Une incubation de 60 jours à 10°C produisait une diminution de Cu disponible similaire à une incubation de 30 jours à 20°C. Cornu et al. (2016) ont montré que le transfert sol-plante de Cd et de Zn diminuait entre 10°C et 30°C pour des plants de laitue. Les auteurs ont expliqué que lorsque la température augmente, la MOD devient de plus en plus aromatique et capable de complexer les métaux, diminuant ainsi leur biodisponibilité. Cependant, Antoniadis and Alloway (2000) ont noté des concentrations supérieures en métaux dans les tiges d'ivraie lorsque la température passait de 15°C à 25°C dans des sols amendés de boues. Selon les auteurs, la MO s'est minéralisée plus rapidement à 25°C, ce qui libérerait les métaux sous forme biodisponible. Ces observations contraires posent de véritables questions sur le lien entre dynamique de la MO et disponibilité du Cu sous l'effet de la température.

Lorsque le cuivre est fraîchement apporté à un sol stérilisé, l'incubation sous une température donnée entraîne généralement une immobilisation du cuivre vers des formes moins disponibles, à travers une fixation lente sur les particules solides (Brennan et al. 1983). Harry and Alston (1981) ont comparé l'évolution du cuivre en solution en fonction de différentes températures d'un sol contrôle et du même sol irradié (pour inhiber l'activité biologique). Ils ont trouvé que les changements opérés sur le cuivre en solution avec l'application de la température étaient plus liés à des équilibres chimiques qu'à l'activité microbienne de dégradation de la MO. En plus de cela, les auteurs ont reporté que les effets d'une température fluctuante sont plus exacerbés sur la concentration du cuivre en solution que si une température constante était maintenue.

L'effet de la température sur la disponibilité du cuivre est souvent associé au phénomène de « aging ». La spéciation du cuivre en phase solide et l'abondance des sites de fixation sont donc importantes pour évaluer l'effet de la température sur le cuivre (Liu et al. 2020b). Plus la température appliquée est élevée, plus les transformations opérées sur le cuivre disponible seraient importantes.

3.6.3 Impact de la minéralisation de MO exogène sur la disponibilité du cuivre

La minéralisation de la MO suite à l'apport de litière fraîche modifie le pH du sol et libère des molécules organiques solubles complexantes. Ces processus vont influencer la dynamique du cuivre disponible en solution. Hattab et al. (2014) ont montré que l'apport d'amendements organiques au sol sous forme de bois raméal fragmenté exacerbait la mobilité des métaux (Cu, Zn, Pb). Les composantes les plus mobiles de la MOD désorbent le Cu de la phase solide du sol et l'entraînent en solution (Amery et al. 2007). Cependant, la dégradation de la litière produit progressivement une MOD de plus en plus humifiée (augmentation du HIX) et capable de sorber le cuivre sur les particules minérales, diminuant ainsi sa concentration en solution (Cui et al. 2008). Dans une étude comparative, Hu et al. (2016) ont relevé que la MOD issue de litière en décomposition avait plus de capacité de sorber le cuivre sur le sol que la MOD provenant de la même litière fraîche. Il semble donc que la MOD en fonction de ses caractéristiques chimiques, va former des complexes avec le Cu, qui soit passent en solution, soit se sorbent sur la phase solide du sol. Quoique nous ayons trouvé très peu d'études sur l'effet de la minéralisation de la MO sur le cuivre libre (Cui et al. 2008), il semble que sa dynamique soit différente de celle du cuivre total en solution. Avec les apports de composts organiques (composts de lisiers de porc ou de fumier de volailles) dans le sol, la dynamique du cuivre libre serait plus liée à l'évolution du pH qu'aux changements des propriétés de la MOD (Laurent et al. 2020). L'effet de la minéralisation de la MO sur la spéciation du Cu pourrait s'avérer indirect. La matière organique se minéralisant, elle modifierait le pH en solution et finalement affecterait la spéciation des métaux en solution, comme cela a été montré dans le cas d'apport de pailles de riz au sol (Cui et al. 2008).

3.7 Le cuivre dans les sols viticoles

Le cuivre est un élément trace métallique naturellement présent dans les roches et les sols. A l'échelle mondiale, la teneur moyenne de cuivre total dans les sols non contaminés par apports anthropiques est de 30 mg kg^{-1} , fluctuant entre 2 et 250 mg kg^{-1} (Adriano 1986). Ces concentrations d'origine pédogéochimique dépendent de la roche mère des sols : les sols développés sur des roches d'origine sédimentaire contiennent généralement plus de cuivre que les sols développés sur des roches de type schistes ou granites, les roches les plus concentrées en cuivre sont les roches d'origine volcanique. En Europe, les teneurs en cuivre dans les sols recensés par le réseau LUCAS fluctuent de quelques mg kg^{-1} à 496 mg kg^{-1} avec une médiane à 12 mg kg^{-1} . En France, le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) qui a analysé à l'échelle de la France les teneurs en éléments traces recense des teneurs allant jusqu'à 508 mg kg^{-1} avec une médiane à 13 mg kg^{-1} . Pour les sols dans la région de Bordeaux, Saby et al. (2011) ont trouvé des concentrations de Cu total allant jusqu'à près 100 mg kg^{-1} (Fig. 14).

En France, les concentrations totales de cuivre les plus élevées se retrouvent majoritairement dans les sols viticoles. En effet, l'utilisation massive de bouillie bordelaise dans les vignes a provoqué l'accumulation de cuivre dans les sols. Ce constat est plus tangible dans les régions où le climat est favorable au développement du mildiou comme la Champagne et le Bordelais (Brun et al. 1998). Ainsi, les variables clés qui expliquent la teneur en cuivre des sols européens sont l'aridité, les précipitations et la teneur en carbone organique des sols. L'âge viticole des parcelles doit aussi être considéré pour comparer les teneurs en Cu dans une même région viticole. Généralement, plus longtemps la parcelle a été cultivée en vigne, plus élevée est la concentration totale en Cu. Dans les sols viticoles français, certaines teneurs en Cu reportées sont parfois au moins 10 fois supérieures aux teneurs naturelles : Beaujolais 1500 mg kg^{-1} , Languedoc-Roussillon 400 mg kg^{-1} , Bordeaux 500 mg kg^{-1} , Champagne 500 mg kg^{-1} (Flores-Vélez et al. 1996; Besnard et al. 2001; Chaignon et al. 2003; El Hadri et al. 2012).

Teneurs moyennes en Cu Total

mg/kg

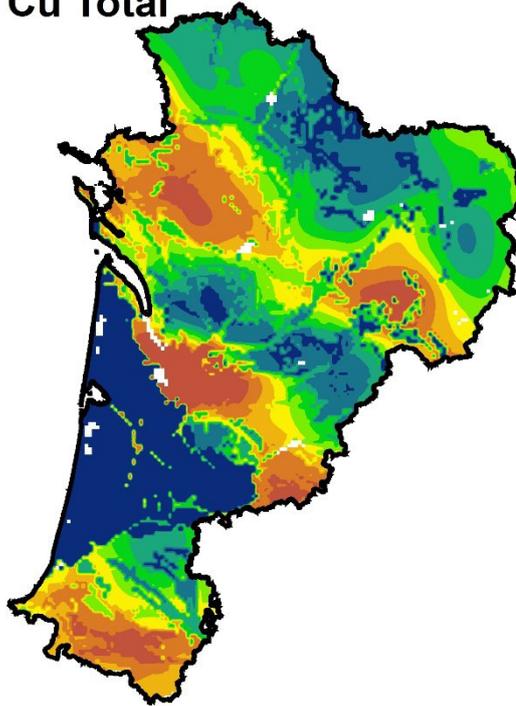
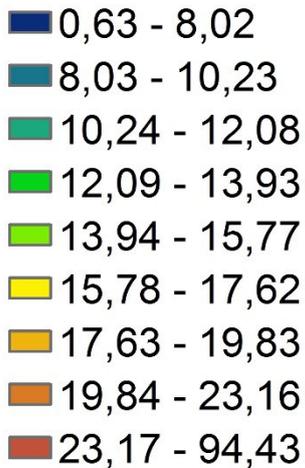


Fig. 14 : Teneurs en cuivre dans les sols de la région Nouvelle Aquitaine, d'après (Saby et al. 2011)

De même, dans les autres pays du monde, les endroits où l'accumulation du cuivre se constate sont les régions viticoles. Dans une étude réalisée sur les vignes de la péninsule ibérique, Fernández-Calviño et al (2009) ont relevé des concentrations en cuivre allant jusqu'à 600 mg kg^{-1} . Au Brésil, les niveaux de concentrations en cuivre dans les sols viticoles peuvent atteindre les 3000 mg kg^{-1} du fait de la forte humidité favorable aux maladies végétales (Mirlean et al. 2007). Dans les autres régions (viticoles) du monde, la problématique du cuivre semble être moins alarmante, probablement du fait de leur climat. En Nouvelle-Zélande, des concentrations maximales de 300 mg kg^{-1} ont été relevées par Morgan and Taylor (2004) dans une étude réalisée sur 124 viticulteurs à travers tout le pays. Dans une étude ayant balayé le statut du cuivre dans les sols agricoles chinois depuis 1985 (plus de 1700 sites étudiés incluant les vignes), il ressort que les concentrations maximales en cuivre n'excédaient pas les 300 mg kg^{-1} (Li et al. 2020).

L'ensemble des références bibliographiques de ce Chapitre 1 est à retrouver en fin de Chapitre 3.

Chapitre 2 : Démarche scientifique de la thèse

L'accumulation de cuivre dans les sols viticoles pourrait provoquer des épisodes d'écotoxicité. L'enjeu actuel réside donc dans la compréhension et la prédiction du comportement du cuivre disponible dans les sols viticoles.

1 Cadre conceptuel

Notre démarche scientifique se construit sur un cadre conceptuel, découlant de quelques postulats évoqués dans des études antérieures.

- La disponibilité du cuivre peut être évaluée à travers sa concentration totale en solution et la concentration de sa fraction ionique Cu^{2+} . En effet, des liens probants ont été établis entre ces deux indicateurs et l'écotoxicité du cuivre. Il était donc pertinent de s'intéresser à ces indicateurs dans le cadre de cette thèse.
- Le cuivre en solution est majoritairement sous forme complexée à la MOD et minoritairement sous forme libre Cu^{2+} .
- Le Cu a une forte affinité pour la MOD, qui peut contrôler sa concentration totale en solution et celle de sa fraction libre. La MOD est donc l'un des facteurs principaux qui influencent la disponibilité du cuivre et sa spéciation en solution. La MOD peut ainsi complexer le Cu et réduire la fraction ionique en solution. La MOD contribue aussi à désorber le Cu présent sur différentes phases solides du sol et à le solubiliser, favorisant ainsi l'augmentation de complexes Cu-MOD en solution. Cependant, l'influence de la MOD sur le cuivre dépend de sa concentration mais aussi de sa qualité.
- La quantité de la MOD est insuffisante pour évaluer sa capacité de complexation pour le Cu. En effet, la MOD est constituée de différentes molécules de capacité complexante vis-à-vis du Cu disponible. Il ressort de notre revue bibliographique que plus la MOD est aromatique et enrichie en molécules de taille importante, plus elle a de capacités chimiques à complexer le Cu. Il y aurait donc un lien entre la capacité de complexation de la MO et sa qualité, qui peut être évaluée à travers ses propriétés spectroscopiques de fluorescence et d'absorbance. Sa composition et les indices calculés à partir de spectres de fluorescence et d'absorbance permettent d'apprécier les sources, l'aromaticité, la taille moléculaire ou encore le degré d'humification de la MOD.
- La dynamique de la MOD est fortement influencée par la minéralisation et l'humification de la MO. Lors de la dégradation de la MO, des molécules organiques sont produites et solubilisées dans la solution de sol. En plus, il est connu que des apports organiques ou les variations de température modifient la dégradation de la MO et donc la dynamique de la MOD.

2 Objectif et questionnement scientifique

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la relation entre la dynamique temporelle de la MOD et la disponibilité du cuivre dans les sols. Cet objectif principal se décline en 3 questions scientifiques (Fig. 1) :

- **Q1** : Quelles sont les contributions des paramètres physico-chimiques du sol et spectroscopiques de la MOD pour expliquer la disponibilité du cuivre ?
- **Q2** : Quel est l'effet de la température sur la disponibilité du cuivre ?
- **Q3** : Quel est l'effet d'apport de MO fraîches sur la disponibilité du cuivre ?

Il s'agira : a) soit d'établir directement des liens entre MOD et Cu en étudiant des sols à l'équilibre (**Q1**), b) soit d'étudier les dynamiques conjointes de MOD et de Cu en perturbant le sol pour exacerber la minéralisation de la MO (**Q2**, **Q3**).

Question 1 : Dans la littérature, il a été montré que certains facteurs tels que le pH et la MO, mais aussi la MOD affectent la concentration de cuivre total et de cuivre libre dans les solutions de sol. Dans des sols viticoles contrastés, quelle serait la contribution des paramètres de qualité de la MOD pour expliquer la disponibilité du cuivre ? Est-il possible de mieux prédire la concentration de cuivre dans les extraits de sol en prenant en compte des indicateurs de la qualité de la MOD ?

Hypothèse : Vu l'influence démontrée de la MOD sur la dynamique du Cu, nous pensons que la prise en compte des paramètres décrivant qualitativement les propriétés de la MOD (taille, aromaticité) permettra de mieux prédire la concentration du Cu total et du Cu libre dans les solutions de sol analysées.

Question 2 : La température est connue pour être l'un des facteurs principaux qui influencent la minéralisation de la MO et donc la dynamique de la MOD. Dans les sols viticoles, la température varie à l'échelle d'une saison et les écarts de température risquent de devenir plus importants avec le réchauffement climatique. Dans la littérature, il est connu que lorsque la température augmente, la minéralisation de la MO devient plus importante et cela peut aboutir à une production plus forte de MOD. De ce fait, les variations de la température du sol pourraient-elles modifier la disponibilité du cuivre ? Les effets sont-ils différents selon les caractéristiques initiales des sols ?

Hypothèse : Nous pensons qu'une augmentation de la température exacerberait la dégradation de la MO. Cela entraînerait soit une déstabilisation des complexes MO-Cu initialement présents dans les sols libérant ainsi le cuivre en solution, soit une production de MOD de plus en plus humifiée qui désorberait le Cu initialement sorbé sur différentes phases dans les sols et augmenterait la concentration de Cu en solution, ces deux phénomènes pouvant se produire conjointement. Nous nous attendons donc à une augmentation de la concentration totale de cuivre en solution. La MOD complexante libérée pourrait aussi complexer le Cu^{2+} et diminuerait sa concentration en solution.

Nous pensons aussi que les effets seront d'autant plus importants que le sol a une activité biologique élevée.

Question 3 : Il est connu que l'apport de MO fraîche à des sols pauvres en MO tels que les sols viticoles intensifie l'activité biologique. Le type de MO fraîches apportées conditionne la qualité de la MOD produite dans le sol. Dans les exploitations viticoles, certains résidus végétaux arrivent (naturellement) au sol et s'y dégradent. Ils peuvent être caractérisés par leur ratio C:N, plus ce ratio est faible, plus facilement ils se minéralisent dans le sol. Nous savons aussi que la dégradation de ces résidus frais dépend des caractéristiques initiales du sol telles que son activité biologique et sa teneur en MO. Nous imaginons que la MO était en équilibre avec le Cu, avec notamment des complexes MO-Cu formés dans le sol. De ce fait, quel serait l'effet d'apports organiques sur la disponibilité du cuivre ?

Hypothèse : Nous pensons que la minéralisation des matières organiques nouvelles apportées au sol va produire de la MOD qui, suivant sa capacité complexante, peut libérer en solution du cuivre initialement sorbé dans le sol mais aussi produire de la MOD de plus en plus humifiée qui va complexer le Cu^{2+} . Les réponses dans le sol seront d'autant plus importantes que les amendements apportés sont facilement minéralisables, et intensifiées dans le sol avec l'activité biologique la plus importante. Il est également probable que cet apport de MO fraîche stimule l'activité biologique et favorise la minéralisation de la matière organique stable du sol par « priming-effect », déstabilisant les complexes MO-Cu et libérant potentiellement du Cu en solution.

3 Stratégie globale d'expérimentations

Il s'agira de réaliser des expérimentations *ex situ* et sous conditions contrôlées en laboratoire, afin de mettre en évidence l'impact de la dynamique temporelle de la MOD sur la disponibilité du Cu dans des sols viticoles.

La Question 1 sera étudiée à partir d'un lot de sols viticoles à l'équilibre et analysés tels quels sans modification (analyse ponctuelle). Les sols choisis proviennent d'exploitations viticoles conduites en agriculture biologique afin d'éviter des perturbations de l'activité biologique des sols par la présence de pesticides de synthèse. Ils seront prélevés en hiver, afin de ne pas avoir de cuivre récemment apporté. Ils seront choisis (1) sur des substrats géologiques différents (carbonatés et non carbonatés) afin de présenter une gamme de pH et (2) avec une gestion agronomique de la MO diversifiée (inter-rang resté nu, sol enherbé, sol amendé avec des MO exogènes) afin de présenter des teneurs en MO variables.

Les Questions 2 et 3 seront étudiées à partir d'expériences d'incubation avec un suivi cinétique réalisées sur 2 sols sélectionnés dans le lot initial de sols.

Pour la Question 2, nous avons choisi deux températures modérées, 20 °C, qui correspond à la température moyenne des sols bordelais entre mai et septembre (d'après Pierdet 2020), température mesurée à 10 cm de profondeur) et 30 °C pour simuler sur le long terme des pics de chaleur aujourd'hui exceptionnels.

Pour la Question 3, nous avons choisi de nous focaliser sur les matières organiques végétales qui arrivent au sol naturellement dans les situations de parcelles viticoles enherbées : feuilles de vigne, plantes utilisées en engrais vert (une légumineuse, la féverole, une graminée, l'avoine) plutôt que sur des apports de MO exogène.

Les sols seront caractérisés par les paramètres suivants :

pH : C'est l'un des principaux facteurs de disponibilité du cuivre. Les variations de pH affectent certains mécanismes impliquant le Cu tels que la sorption et la désorption. Le pH modifie aussi les propriétés de complexation de la MOD.

Teneur en MO : Dans le sol, une grande partie du Cu est complexée par la MO. La teneur en MO pourrait donc influencer la disponibilité du Cu.

Ratio C:N : Ce paramètre permettra d'évaluer globalement la dégradabilité de la MO du sol.

Cuivre total : C'est le premier indicateur de la contamination du Cu. Il peut impacter indirectement la concentration de Cu mobilisée en solution.

Concentration de COD : C'est l'indicateur de quantité de la MOD dans cette thèse.

Paramètres d'absorbance et de fluorescence de la MOD : Ce sont les indicateurs de qualité de la MOD dans cette thèse.

Cu en solution et Cu²⁺ : Ce sont les indicateurs de disponibilité du Cu dans cette thèse.

Autres éléments en solution (Ca, Zn, Mn, Fe) : Ils permettront d'étudier si certains éléments en solution sont soumis à des dynamiques similaires à celles du Cu.

Les éléments en solution, le pH, le COD, les paramètres de qualité de la MOD, les indicateurs de disponibilité du Cu seront suivis continuellement pendant les expériences d'incubation.

Le détail de la conduite des expérimentations est traité dans le Chapitre 3 Matériels et méthodes.

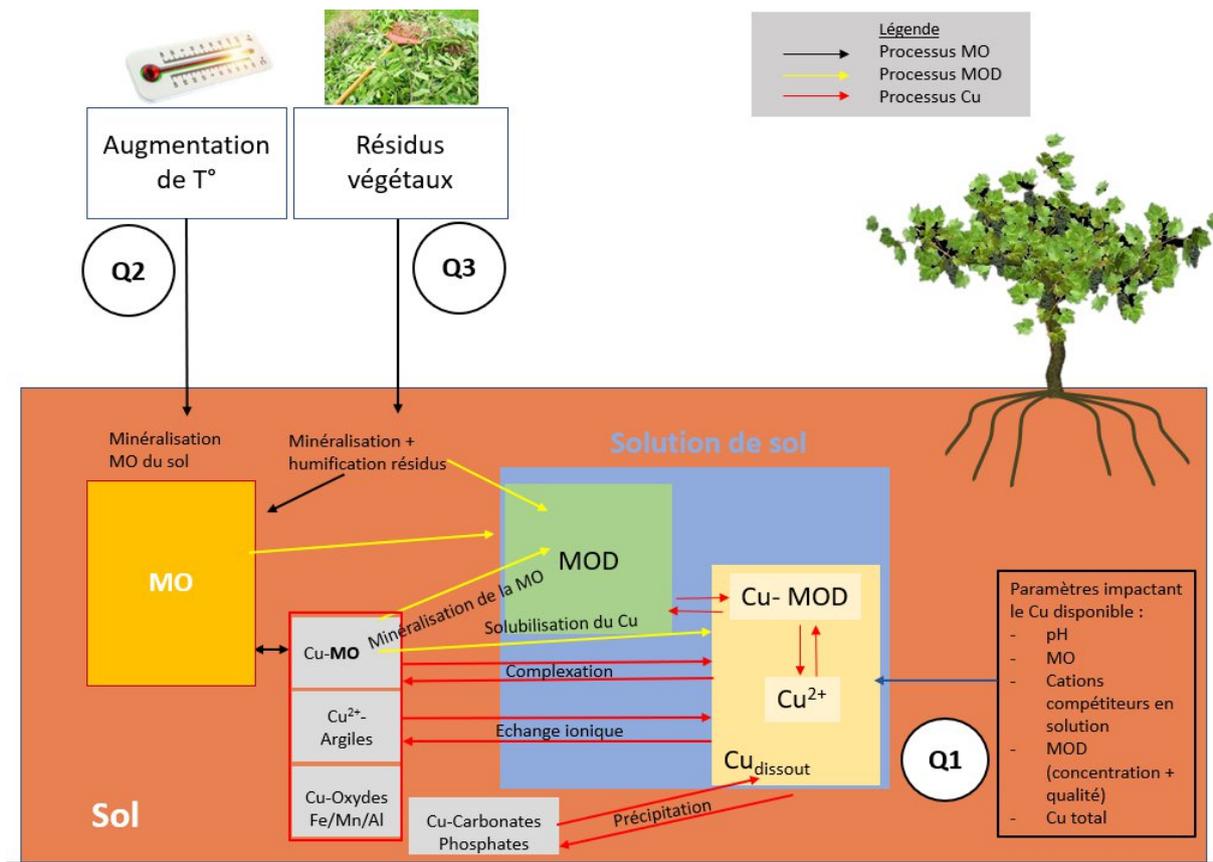


Fig. 1 : Stratégie de recherche et questions scientifiques de la thèse (Q1, Q2, Q3)

Chapitre 3 : Matériels et méthodes généraux

Pour répondre à nos questions de recherche, quatre expérimentations ont été réalisées au cours de la thèse à l'UMR ISPA du Centre INRAE Bordeaux Aquitaine. Ce chapitre traite des matériels et méthodes généraux de l'ensemble de la thèse. Les matériels et méthodes spécifiques à chaque expérience seront présentés dans les chapitres correspondants.

Rappel des expériences

4 expériences au total (Fig. 1) seront réalisées pour répondre aux 3 grandes Questions de la thèse, détaillées dans le chapitre Démarche scientifique.

L'expérience 1 consistera à évaluer la contribution des paramètres du sol et de ceux de la MOD pour expliquer la disponibilité du Cu (Question 1 → Chapitre 4). Il s'agira de travailler sur un lot de sols avec des propriétés contrastées.

L'expérience 2 consistera à étudier l'effet des variations de température sur la disponibilité du Cu (Question 2 → Chapitre 5). Cette expérience portera sur deux des sols de l'expérience précédente.

Les expériences 3 et 4 consisteront sur les effets d'apports de MO fraîche sur la disponibilité du Cu (Question 3 → Chapitre 6). L'expérience 3 portera sur les deux sols de l'expérience précédente, amendés d'une seule MO fraîche, tandis que l'expérience 4 portera sur l'un de ces deux sols et amendés avec deux autres MO fraîches différentes.

Les expériences 2, 3 et 4 porteront sur des incubations en laboratoire en conditions contrôlées (température et humidité) avec des mesures cinétiques.

1 Site et matériaux de l'étude

L'étude a porté sur des sites dans la région bordelaise, du fait de la forte activité viticole dans cette région. Les sites d'études ont été sélectionnés de sorte à avoir une diversité en termes de nature pédologique des sols et de type de gestion organique (apports et amendements). Pour chaque site étudié, un entretien préalable était mené avec le viticulteur afin de relater l'historique du site et les pratiques culturales appliquées depuis la mise en exploitation. Ces pratiques comprennent les doses de cuivre appliquées, les types de matières organiques apportées, les cultures inter-rangs réalisées et le mode de travail du sol (labour ou non...).

Dans le cadre de cette étude, les sols échantillonnés provenaient de 3 zones d'appellation d'origine contrôlée (AOC) de différentes communes de la région de Bordeaux :

- Bordeaux supérieur (Lapouyade)
- Blaye Côtes de Bordeaux (Saint-Christoly de Blaye, Braud-et-Saint-Louis)

- Graves (La Brède).

Ces zones d'échantillonnage diffèrent par rapport à leurs conditions météorologiques ainsi que la couverture pédologique. Les sols de Graves par exemple sont particulièrement caillouteux du fait des gravats apportés par la Garonne lors des épisodes antérieures de crues.

1.1 Echantillonnage des sols

Les exploitations viticoles où les sols sont échantillonnés sont conduites en agriculture biologique. Ce critère est essentiel à l'étude car l'objectif est de se focaliser sur le cuivre comme principal fongicide utilisé et potentiellement accumulé dans les sols. Nous voulions nous prémunir contre d'éventuelles interactions entre le cuivre et les pesticides organiques observables dans le cas de la viticulture conventionnelle.

L'échantillonnage global du projet a été réalisé en plusieurs campagnes entre 2019 et 2020. Les sols ont été échantillonnés à l'état frais sur la couche 0-15 cm à l'aide de tarière dans les inter-rangs des vignes. La quantité prélevée était calculée de sorte à satisfaire l'ensemble des mesures prévues : granulométrie, pH, taux de MO, carbonates, extraction de solution de sols et incubation.

Après l'échantillonnage, les sols sont tamisés à l'état frais à 4 mm afin d'éliminer les particules grossières (cailloux, racines etc...) et de garder une terre homogène. Les échantillons sont ensuite stockés en chambre froide à 4°C avant les manipulations. Ce mode de conservation est nécessaire afin de réduire l'activité microbienne susceptible de modifier considérablement le statut de la MO et du cuivre par rapport au sol *in situ*.

1.2 Choix des sols

18 sols ont été considérés pour l'expérience 1. Ils ont été choisis afin d'avoir un gradient relativement large en variables d'entrée pour l'étude de la géochimie du cuivre : pH, Cu total, C:N, C_{org}. Pour les expériences 2 et 3, il a été choisi de travailler sur deux sols avec des concentrations similaires en cuivre total mais des gestions organiques différentes (C:N). Ainsi, la collection d'échantillons comportait des sols provenant de parcelles enherbées ou non, labourées ou non, avec pour certains des plantes cultivées entre les rangs de vigne. Les sols F et G ont ainsi été choisis (Tableau 1). Pour l'expérience 4, seul le sol F a été choisi car étant le plus réactif dans l'expérience 3.

Tableau 1 : Caractéristiques des sols étudiés dans la thèse

Sol	Zone AOC	Classification des sols (WRB)	Cu _T	pH _{eau}	CaCO ₃	C _{org}	C:N
			mg kg ⁻¹		g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	
A	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	28	8.1	< 1	9.9	10.6
B	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	35	8.3	27.6	13.7	10.9
C	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvic Cambisol	35	6.9	< 1	10.2	11.4
D	Bordeaux supérieur	Luvisol	73	6.3	< 1	10.5	11.5
E	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	80	7.9	< 1	8.3	10.7
F	Graves	Podzosol	84	6.5	< 1	16.9	15.3
G	Bordeaux supérieur	Luvisol	89	6.9	< 1	19.2	11.7
H	Bordeaux supérieur	Luvisol	103	7.9	3.2	12.6	10.6
I	Graves	Cambisol	104	8.3	19.5	7.5	11.5
J	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	110	8	1.1	11.3	11.6
K	Blaye Côtes de Bordeaux	Podzosol	121	6.5	< 1	11.8	13.0
L	Graves	Leptosol	155	7.1	< 1	14.6	15.5
M	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	175	6.5	< 1	9.3	11.9
N	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	176	7.8	< 1	5.4	11.7
O	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	181	7.3	< 1	15.6	12.6
P	Graves	Leptosol	193	7.5	< 1	30.8	17.4
Q	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	195	6.3	< 1	13.3	12.6
R	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	238	8.2	30.4	10.6	10.3

1.3 Echantillonnage des litières

Trois matières végétales différentes (feuilles de vigne, parties aériennes de féverolle ou avoine) ont été échantillonnées pour constituer les litières des expériences 3 et 4. Ces 3 végétaux ont été choisis car ils sont présents et se dégradent dans les sols viticoles. Les 3 litières sont également diversifiées de par leur nature et leur ratio C:N. Les caractéristiques des litières sont répertoriées dans le Tableau 2.

Les feuilles de vignes ont été récoltées au cours de l'été 2019 dans une des parcelles viticoles expérimentales de l'Unité Expérimentale Viticole sur le Centre INRAE Nouvelle Aquitaine Bordeaux. Les vignes sur lesquelles ont porté la récolte sont issues d'un croisement « Cabernet sauvignon X

Riparia Gloire de Montpellier ». Il s'agit d'une variété résistante au mildiou et n'ayant jamais reçu de traitement cuprique depuis sa plantation en 2001.

Deux plantes d'inter-rang (féverolle et avoine) ont été récoltées pendant l'hiver 2020 dans une parcelle viticole de la région de Bordeaux. La parcelle est conduite en agriculture biologique et les plantes inter-rang cultivées sont réincorporées au sol en tant que source de matière organique pour le sol. Ces plantes, semées à l'automne, n'ont jamais reçu de traitement cuprique aérien. La récolte a porté sur les parties aériennes de la féverolle et de l'avoine.

Au laboratoire, les trois matrices végétales sont lavées et séchées dans une étuve à 30°C pendant 3 jours. Puis, elles sont broyées finement (<0.5 mm) à l'aide d'un broyeur planétaire à bols et billes de zirconium et stockées au sec dans des boîtes en plastique avant les manipulations. Les feuilles de vigne ont été utilisées pour l'expérience 3, la féverolle et l'avoine ont été utilisés dans l'expérience 4.

Tableau 2 : Caractéristiques des litières apportées dans les expériences 3 et 4

	C _{org} (%)	C:N
Feuilles de vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	46.3	17.1
Parties aériennes de Féverolle (<i>Vicia Faba</i>)	45.1	10.5
Parties aériennes d'Avoine (<i>Avena sativa</i>)	42.5	14.9

2 Incubations

Notre étude s'intéresse aux liens entre dynamique de la matière organique et disponibilité du cuivre. Les incubations en conditions contrôlées sont généralement réalisées pour étudier la dynamique de la MO dans les sols. L'incubation permet d'évaluer les indicateurs de dégradation de la MO et de l'activité microbienne.

Avant l'incubation, certains paramètres des sols ont d'abord été déterminés. La capacité au champ des sols a été calculée à partir des sols frais dont les humidités résiduelles ont préalablement été mesurée. Puis, les sols ont été réhumectés jusqu'à 60% de leur capacité au champ avec de l'eau distillée.

Pour l'incubation, nous avons utilisé des bocaux de marque Le Parfait (1 L) comme contenants. 100g équivalent sec de sol étaient mis dans chaque bocal (quatre répliques par date et par modalité) et l'ensemble est déposé dans un incubateur réglé à une température de 20°C ou 30°C pour une durée de 2 à 3 mois selon les expériences. La température de 20°C a été appliquée car étant la température classique utilisée dans la littérature pour étudier la dégradation de la MO (De Troyer et al. 2011 ; Ohm et al. 2011 ; Fanin and Bertrand 2016). Les bocaux sont détruits progressivement au fil de l'incubation pour les différentes mesures.

Pour l'expérience 2, les sols ont été incubés pendant 60 jours (2 mois) pour étudier l'effet de la température sur la MO et sur le cuivre.

Pour les expériences 3 et 4, l'incubation a été réalisée pendant 92 jours (3 mois) pour suivre l'effet de l'apport de litières sur la MO et sur le cuivre. Les poudres végétales sont mélangées au taux de 1 g de carbone apporté pour 100 g de sol. Ainsi, la masse de poudre apportée est différente suivant la composition en carbone de chaque matrice végétale (Tableau 2).

Des mesures destructives et extractions de solution de sol sur les sols ont été réalisées (aux dates 0, 1, 3, 7, 14, 23, 38 et 60 pour l'expérience 2 et aux dates et 0, 1, 3, 7, 14, 23, 38, 60 et 92 pour les expériences 3 et 4.

3 Protocole d'extraction de la solution de sol

Des tests préliminaires ont été réalisés afin de choisir la méthode d'extraction de solution de sol optimale compte tenu de nos objectifs.

3 méthodes d'extraction de la solution de sol ont été investiguées :

- Extraction par bougie microporeuse de type Rhizon (Eijkelkamp)
- Extraction par centrifugation directe sur des sols à 100% de la capacité au champ
- Extraction avec des solutions d'électrolytes (5 mM CaCl_2 et 10 mM KCl)

Les extractions par bougie microporeuse et par centrifugation directe se rapportent plus aux conditions réelles sur le terrain. Cependant, il s'est avéré qu'elles nécessitent d'importantes masses de sol pour récupérer suffisamment de solution pour les différentes analyses. Elles ont aussi l'inconvénient de présenter des forces ioniques instables, ce qui perturbe significativement la mesure de l'activité du Cu^{2+} par électrode spécifique. L'extraction par des solutions électrolytes a pour avantage de collecter suffisamment de volume de solution pour les analyses. Cette méthode d'extraction via l'apport de cations permet aussi de stabiliser la force ionique de la solution et de faciliter la mesure du Cu^{2+} par électrochimie. Cependant, les ions Ca^{2+} sont connus pour provoquer la coagulation de la MOD, perturber ses paramètres photochimiques et impacter ses interactions avec le cuivre (Gao et al. 2015). Etant donné la place importante de la MOD dans ce projet, il était préférable de réduire les éventuels biais de mesure, nous avons donc choisi l'extraction au KCl (10 mM de KCl correspondant à une force ionique équivalente à 5 mM de CaCl_2).

Dans la littérature, les ratios d'extraction (solution :sol) diffèrent d'une étude à une autre. L'objectif était de collecter suffisamment de volume de solution mais aussi assez de matière pour avoir des concentrations en COD et en métaux supérieures aux limites de quantification des appareils. Jones and Willett (2006) ont montré que le pourcentage de récupération du COD était instable pour des ratios d'extraction inférieurs à 0.3 g mL^{-1} . Nous avons choisi le ratio d'extraction de 0.5 g mL^{-1} pour

nos travaux. Ce ratio a été utilisé dans une étude précédente dans l'équipe BIOGET du laboratoire ISPA et qui s'intéressait à des questions similaires à celles de ce travail (Cornu et al. 2019).

Pour toutes les expériences, l'extraction des solutions de sols s'est déroulée comme suit : 15 g équivalent sec de sol frais sont mélangés à 30 mL de KCl 10 mM dans un tube de 40 mL. Quatre réplicats par modalité sont détruits pour l'extraction. Les tubes sont ensuite mis en agitation sur un agitateur à rouleaux pendant 2h à 37 rev min⁻¹. Après agitation, les tubes sont centrifugés à 7500 rpm pendant 10 min à 20°C. Les suspensions de sols sont ensuite filtrées à 0.2 µm à l'aide de filtres en acétate de cellulose. Les extraits de sols récupérés sont répartis comme suit :

- 5 mL pour la mesure du pH et de l'activité du Cu²⁺
- 5 mL pour les mesures des métaux en solution
- 10 mL pour la détermination de la concentration en COD
- 5 mL pour la mesure des propriétés optiques de la MOD.

Chaque fraction est transférée dans un tube correspondant et conservée au frais (4°C) en attendant les analyses.

4 Dosages analytiques

Les analyses suivantes ont été réalisées au maximum une semaine après l'extraction pour prévenir le développement bactérien (aucun biocide n'ayant été ajouté).

4.1 pH et activité du cuivre libre

Le pH des extraits KCl a été mesuré à l'aide d'une microélectrode E16M331, Radiometer Analytical®. Avant chaque série de mesure, une calibration préalable était réalisée à des pH allant de 4 à 11. L'activité du cuivre libre a été déterminée via une électrode Cu-sélective (ISE, 9629BNWP, Thermo Scientific Orion®). Les échantillons sont analysés dans le sens décroissant du pH. La calibration de l'électrode est faite avant chaque mesure avec du phtalate de potassium et de l'acide iminodiacétique tel que détaillé dans Bravin et al. (2009). La courbe de calibration permet le passage des différences de potentiel aux valeurs de pCu (= -log₁₀ activité Cu²⁺), puis les concentrations de Cu²⁺ sont calculées à partir des pCu et du coefficient d'activité du Cu²⁺ (Ritsema 1993). Globalement, plus la pCu est élevée, plus faible est la concentration en Cu²⁺ (Rachou et al. 2007).

4.2 Eléments totaux en solution

Avant cette mesure, les aliquotes de 5 mL sont acidifiées à 2 % HNO₃ (Aristar® for trace analysis purity 69%, VWR Chemicals®). Les concentrations totales en solution de Ca, Cu, Fe, Mn et Zn sont déterminées par ICP-AES (Agilent®) dans les aliquotes acidifiées. Des blancs (≈ 1µg L⁻¹ Cu) et des

échantillons de contrôle (contrôle qualité multiélémentaire, VWR) sont insérés pour vérifier la qualité des résultats.

4.3 Concentration de COD

La concentration de COD est l'indicateur classique de la quantité de MOD dans un échantillon. La concentration de COD dans les extraits a été déterminée avec un analyseur TOC (TOC V-CPH, Shimadzu®, Japan). Le COD a été déterminée selon la méthode TC - IC (différence entre le carbone total et le carbone inorganique) (Petitjean et al. 2004). Les calibrations et les préparations sont faites à partir d'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore). Toute l'eau utilisée pour les préparations a d'abord été décarbonatée afin d'éviter une contamination des échantillons. Les échantillons de calibration et les contrôles sont préparés avec du carbonate de sodium, du bicarbonate du sodium et de l'hydrogène-phtalate de potassium.

Pour évaluer la quantité de matière organique dissoute dans les extraits, le COD a été mesuré dans les expériences 1, 3 et 4. Du fait de raisons opérationnelles (disponibilité des machines), nous avons mesuré le CONP (carbone organique non-purgeable) dans l'expérience 2. Cependant, les mêmes dispositions techniques ont été appliquées dans les deux cas (blancs de mesure, étalonnage, échantillons de référence).

4.3.1 Mesures des propriétés optiques de la MOD

La mesure des propriétés optiques de la MOD des extraits de sols est l'un des points originaux de ce projet. Les propriétés optiques de la MOD ont été évaluées par absorbance et par fluorescence

4.3.1.1 Absorbance

Les spectres d'absorbance des extraits de sols sont acquis à partir d'un spectrophotomètre Jasco® V-560 (expérience 1) ou Aqualog (Horiba Scientific®) (expériences 2, 3 et 4), avec une plage de scan allant de 210 à 700 nm. Des indices sont déterminés à partir des spectres obtenus. Le $SUVA_{254}$, indicateur d'aromaticité de la MOD, est exprimé en $L\ mgC^{-1}\ m^{-1}$ et calculé comme suit :

$SUVA_{254} = \frac{A_{254} \cdot 1000}{l \cdot COD}$ avec A_{254} l'absorbance mesurée à 254 nm, l le trajet optique et égal à la longueur en cm de la cuve dans laquelle est contenue l'échantillon et COD (ou CONP) la concentration en $mg\ L^{-1}$ du carbone organique en solution.

Le SR est le ratio des pentes spectrales des plages 275-295 nm et 350-400 nm. Les pentes spectrales et le SR sont calculés à partir du logiciel Asfit (Omanović et al. 2019).

4.3.1.2 Fluorescence

Les matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence sont acquises à partir d'un spectrofluorimètre Aqualog (Horiba Scientific®) équipé d'un double monochromateur d'excitation, d'une lampe au xénon de 150 watts, avec une bande passante de 5 nm, et d'un temps d'intégration de

2 s à des longueurs d'onde de 240-800 nm à des intervalles de 5 nm. Les spectres d'émission sont enregistrés avec un gain élevé du détecteur CCD pour des longueurs d'onde comprises entre 240 et 830 nm à des intervalles d'environ 0,58 nm (1 pixel). Un blanc de solution de 10 mM KCl est enregistré quotidiennement dans les mêmes conditions que celles des échantillons analysés et soustrait de la fluorescence des échantillons. Les échantillons dont le maximum d'absorbance est supérieur à 0.1 étaient dilués pour éviter les effets de filtre interne lors de l'analyse par fluorescence. Les intensités de fluorescence sont normalisées par rapport à l'aire sous le pic Raman d'un blanc d'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore) enregistré quotidiennement à une longueur d'onde d'excitation de 350 nm, et sont exprimées en unités Raman (R.U.). Le traitement des données des matrices EEM obtenues est effectué avec le logiciel TreatEEM (<https://sites.google.com/site/daromasoft/home/treateem>, développé par Dario Omanović (Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatie). L'intensité et la position des maxima de fluorescence sont considérées pour caractériser les bandes de fluorescence observées et les indices suivants sont calculés :

- L'indice d'humification HIX, qui est le ratio des intensités de fluorescence des régions d'émission 435-480 nm et 300-345 nm du spectre lorsque l'excitation est à 254 nm.
- L'indice de contribution autochtone récente BIX, qui est le rapport entre les intensités de fluorescence aux émissions 380 nm et 430 nm lorsque l'excitation est à 310 nm.
- L'indice de fluorescence FI, qui est le ratio des intensités de fluorescence aux émissions 450 nm et 500 nm pour une longueur d'onde d'excitation fixée à 370 nm.

L'ensemble de ces indices permettent une caractérisation plus informative de la MOD des échantillons.

4.3.2 Parallel factor Analysis (PARAFAC)

L'analyse PARAFAC a été appliquée afin de séparer mathématiquement les différentes contributions spectrales qui expliquent le jeu de données.

Le traitement a été réalisé sur le logiciel Matlab 201 avec le package DOMFluor 1.7. Le nombre optimal de composants déterminés pour chaque série d'échantillons (expérience II A, II B et III) a été déterminé après validation de plusieurs étapes (Stedmon and Bro 2008) et contrôle des résidus résultant de la différence entre les spectres modélisés et les spectres enregistrés pour chacun des échantillons.. Les étapes de la décomposition PARAFAC comprennent : le pré-traitement des données (corrections des biais, suppression des pics de diffusion, normalisation), l'exploration du jeu de données (suppression des échantillons aberrants, élaboration des premiers modèles), la validation des modèles (détermination du nombre de composants, évaluation de la qualité des modèles) et enfin l'interprétation des résultats finaux.

Chaque échantillon peut ainsi être caractérisé par l'intensité maximale F_{max} de chacun des composants déterminés par PARAFAC ou leur proportion par rapport à l'intensité de fluorescence totale de l'échantillon (% F_{max}). Il est ainsi possible d'évaluer la distribution des composants contribuant au signal global de fluorescence des sols incubés au fil du temps et par traitement (température, apport de MO fraîche).

Les composants déterminés par l'analyse PARAFAC peuvent ensuite être comparés à des fluorophores répertoriés dans une base de données issues de la littérature, « OpenFluor database » (Murphy et al. 2014)(<http://www.openfluor.org/>).

4.4 Mesures de l'activité biologique des sols

4.4.1 Taux de minéralisation du carbone

Le taux de minéralisation du carbone (R) a été mesuré via la capture du CO_2 dégagé par l'activité de dégradation de la MO par les microorganismes (Expériences 2, 3 et 4). Le CO_2 est capté par de la soude concentrée placée au-dessus du sol dans le bocal d'incubation. La soude est changée régulièrement avant saturation et est soumise à une titration inverse avec de l'acide chlorhydrique à 0.5 M. La mesure R est faite sur les bocaux de sols ainsi que sur les bocaux de référence (sans sol). Pour l'expérience 2, la mesure R a été réalisée aux jours 1, 2, 3, 4, 9, 11, 15, 18, 22, 29, 37, 43, 50, 57 et 60 de l'incubation. Pour les expériences 3 et 4, elle a été faite aux jours 2, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 30, 37, 44, 51, 65, 79 et 92.

Le taux de minéralisation journalier du carbone ($mg\ C\ kg^{-1}\ sol\ jour^{-1}$) se calcule comme suit :

$$R = \frac{0.5 (V_0 - V_x) * C * \left(\frac{V_t}{V_s}\right) * 12 * 1000}{Masse\ sol * n\ jours}$$

Où V_0 est la moyenne du volume de HCl titrant la soude des bocaux témoin, V_x le volume de HCl titrant la soude de l'échantillon, C la concentration molaire de HCl (0.5), V_t le volume total de soude placée dans le bocal, V_s le volume de soude échantillonné pour la titration et n jours le nombre de jours pendant lesquels la soude est restée dans le bocal. La minéralisation cumulée du carbone ($mg\ C\ kg^{-1}\ sol$) est calculée en rapportant le taux de minéralisation rapporté au temps et en cumulant le résultats jour après jour de mesure.

4.4.2 Activités enzymatiques

Les activités de 7 enzymes hydrolytiques ont été mesurées dans les expériences 2, 3 et 4 pour évaluer l'intensité de la dégradation de la MO. Les 7 enzymes concernées sont : B-1,4-glucosidase (BG), 1,4-B-D-cellobiohydrolase (CBH), α -1,4-glucosidase (AG), B-xylosidase (XYL) qui dégradent les composés carbonés, la N-acétyl glucosaminidase (NAG) et la leucine aminopeptidase (LAP) qui coupent les liaisons azotées, la phosphatase acide (AP) qui hydrolyse les liaisons phosphates organiques.

2.75 g de sol sont mixés avec 91 mL d'acétate de sodium à 50 mM (solution tampon). Les boues de sol sont ainsi ajoutées à des plaques Deepwell puis complétées soit par des réactifs standards (échantillons de calibration), soit par des substrats fluorophoriques correspondant aux enzymes mesurées. Les mélanges obtenus sont incubés pendant 3h à 25°C. Puis, les boues de sol incubées sont transférées dans des plaques de lecture puis scannées à une excitation de 365 nm et une émission de 450 nm avec un lecteur de microplaques (Synergy H1 microplate reader, Biotek, Winooski, USA). Les activités enzymatiques sont calculées à partir des valeurs de fluorescence et sont exprimées en nmol g⁻¹ sol sec h⁻¹. Elles sont cumulées date après date de mesure puis additionnées par groupe de nutriment (C, N, P) et exprimées en μmol kg⁻¹ ou en nmol kg⁻¹ de sol.

5 Traitement des données et analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R version 4.0.2 (R core Team 2020).

Pour l'expérience 1, le traitement des données a consisté à établir des régressions linéaires multiples pour prédire la disponibilité du cuivre à partir des paramètres physico-chimiques du sol et des paramètres de la MOD. Les packages « car » et « FactomineR » ont été utilisés. Les meilleurs modèles ont été choisis de façon à avoir le minimum de prédicteurs et la plus grande efficacité de prédiction. Une analyse en composante principale (ACP) et une matrice de corrélation ont aussi préalablement été réalisées pour analyser les covariations et interactions entre les facteurs et distinguer des groupes de sols similaires. Pour les expériences 2, 3 et 4 (suivi cinétique), l'analyse statistique a essentiellement porté sur des modèles mixtes pour évaluer l'effet des différents traitements. Des tests post-hoc (Tests de Tukey HSD) ont ensuite été appliqués pour évaluer les différences significatives des variables à différentes dates de mesure et entre traitements. Pour l'expérience 2, nous avons ainsi évalué le poids des facteurs Sol, Température sur les variables de réponse (minéralisation de la MO, paramètres du sol et de la MOD, disponibilité du Cu). Pour les expériences 3 et 4, il s'agissait d'étudier l'effet des facteurs « Sol » et « Type de résidu végétal ». Le package « lme » a été utilisé.

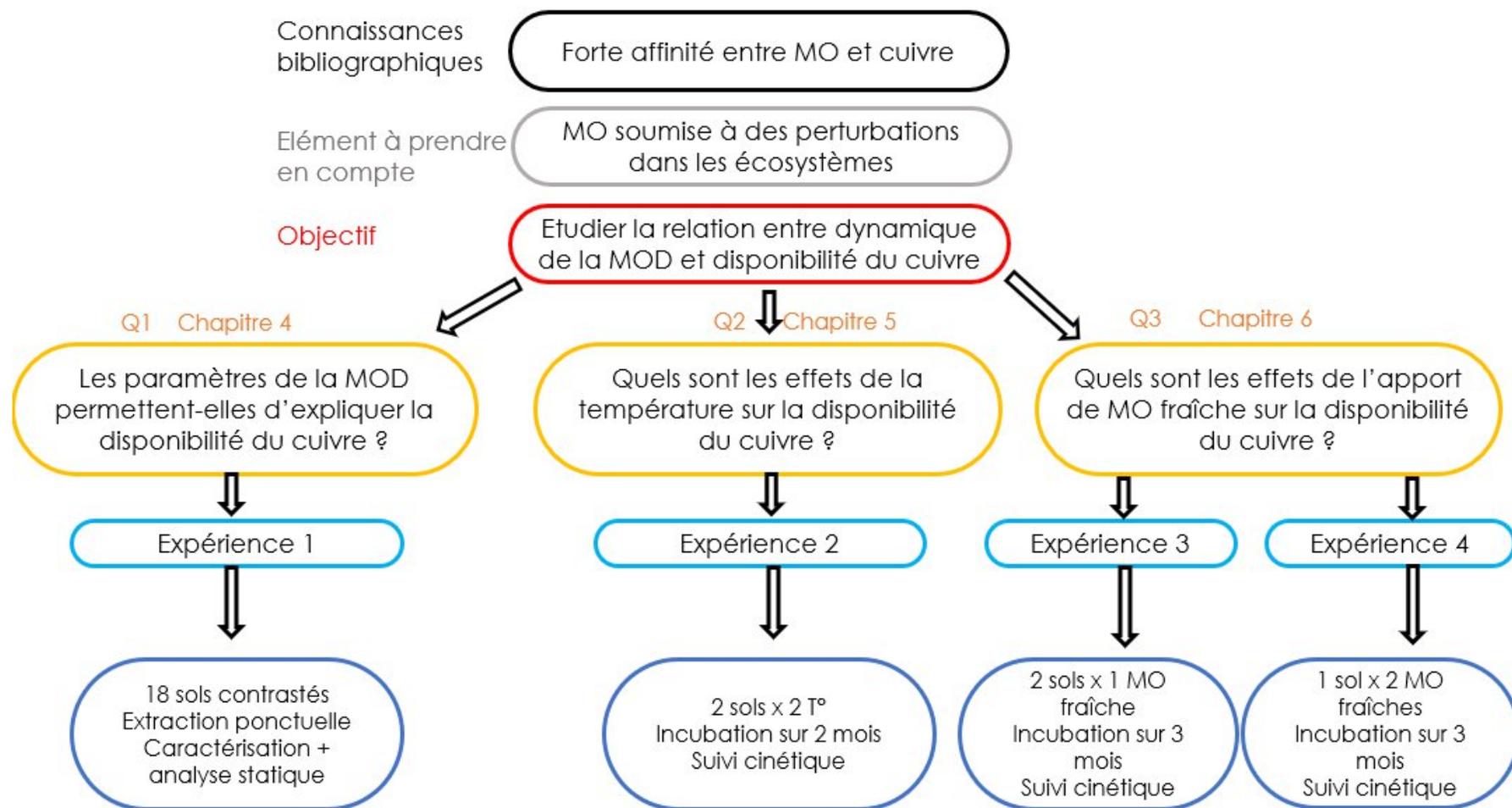


Fig. 1 : Résumé de la stratégie scientifique et expérimentale de la thèse

Références

- Abad J, Hermoso de Mendoza I, Marin D, Orcaray L, Gonzaga Santesteban L (2021) Cover crops in viticulture. A systematic review (1): Implications on soil characteristics and biodiversity in vineyard. *OENE One* 55(1):295-312. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.1.3599>
- Adriano DC (1986) Copper. In: Adriano DC (ed) *Trace Elements in the Terrestrial Environment*. Springer New York, New York, NY, pp 181-218
- Alloway BJ (ed) (1995) *Heavy metals in soils*, 2. ed. Blackie Academic & Professional, London
- Amelung W, Brodowski S, Sandhage-Hofmann A, Bol R (2008) Chapter 6 Combining Biomarker with Stable Isotope Analyses for Assessing the Transformation and Turnover of Soil Organic Matter. In: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 155-250
- Amery F, Degryse F, Cheyns K, De Troyer I, Mertens J, Merckx R, Smolders E (2008) The UV-absorbance of dissolved organic matter predicts the fivefold variation in its affinity for mobilizing Cu in an agricultural soil horizon. *European Journal of Soil Science* 59(6):1087-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01078.x>
- Amery F, Degryse F, Degeling W, Smolders E, Merckx R (2007) The Copper-Mobilizing-Potential of Dissolved Organic Matter in Soils Varies 10-Fold Depending on Soil Incubation and Extraction Procedures. *Environmental Science & Technology* 41(7):2277-2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
- Andersson S, Valeur I, Nilsson I (1994) Influence of lime on soil respiration, leaching of DOC, and C/S relationships in the mor humus of a haplic podsol. *Environment International* 20(1):81-88. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0160-4120(94)90070-1)
- Antoniadis V, Alloway BJ (2000) Availability of Cd, Ni and Zn to ryegrass in sewage sludge-treated soils at different temperatures. *Water, Air, and Soil Pollution* :14. <https://doi.org/10.1007/s10643-000-0214-0>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferracciú Alleoni LR (2019a) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferracciú Alleoni LR (2019b) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Asghar W, Kataoka R (2021) Green manure incorporation accelerates enzyme activity, plant growth, and changes in the fungal community of soil. *Arch Microbiol* 204(1):7. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02614-x>
- Behel DJ, Nelson DW, Sommers LE (1983) Assessment of heavy metal equilibria in sewage sludge-treated soil. *J Environ Qual; (United States)* 12:2
- Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahon SK, Wallenstein MD (2013) High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (81):e50961. <https://doi.org/10.3791/50961>
- Bergkvist B, Folkesson L, Berggren D (1989) Fluxes of Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, and Ni in temperate forest ecosystems. *Water Air Soil Pollut* 47(3):217-286. <https://doi.org/10.1007/BF00279328>
- Besnard E, Chenu C, Robert M (2001) Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environ Pollut* 112(3):329-337. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(00\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(00)00151-2)
- Błońska E, Piaszczyk W, Staszek K, Lasota J (2021) Enzymatic activity of soils and soil organic matter stabilization as an effect of components released from the decomposition of litter. *Applied Soil Ecology* 157:103723. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103723>

- Bolan NS, Adriano DC, Kunhikrishnan A, James T, McDowell R, Senesi N (2011) Dissolved Organic Matter: Biogeochemistry, Dynamics, and Environmental Significance in Soils. *Advances in agronomy*
- Bortoluzzi EC, Korchagin J, Moterle DF, dos Santos DR, Caner L (2019) Accumulation and Precipitation of Cu and Zn in a Centenarian Vineyard. *Soil Science Society of America Journal* 0(0):0. <https://doi.org/10.2136/sssaj2018.09.0328>
- Bravin M (2007) Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. Thèse :1-237
- Bravin MN, Martí AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalisation – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318(1):257-268. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9835-6>
- Brennan RF, Gartrell JW, Robson AD (1984) Reactions of copper with soil affecting its availability to plants. III. Effect of incubation temperature. *Soil Res* 22(2):165-172. <https://doi.org/10.1071/sr9840165>
- Brennan RF, Robson AD, Gartrell JW (1983) Reactions of copper with soil affecting its availability to plants. II. Effect of soil pH, soil sterilization and organic matter on the availability of applied copper. *Soil Res* 21(2):155-163. <https://doi.org/10.1071/sr9830155>
- Brun LA, Maillet J, Richarte J, Herrmann P, Remy JC (1998) Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* 102(2-3):151-161. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00120-1)
- Brunetto G, Bastos de Melo GW, Terzano R, Del Buono D, Astolfi S, Tomasi N, Pii Y, Mimmo T, Cesco S (2016) Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. *Chemosphere* 162:293-307. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.104>
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A (2013) Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58:216-234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
- Calvet R (2003) Le sol : propriétés et fonctions. Tome 1: Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Editions France Agricole, Dunod
- Carrillo-González R, Šimůnek J, Sauvé S, Adriano D (2006) Mechanisms and Pathways of Trace Element Mobility in Soils. In: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp 111-178
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B, Hinsinger P (2003) Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123(2):229-238. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00374-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00374-3)
- Chen H-L, Zhou J-M, Xiao B-H (2010) Characterization of dissolved organic matter derived from rice straw at different stages of decay. *J Soils Sediments* 10(5):915-922. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0210-x>
- Chen Y, Senesi N, Schnitzer M (1977) Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Science Society of America Journal* 41(2):352-358. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x>
- Chu B, Chen X, Li Q, Yang Y, Mei X, He B, Li H, Tan L (2015) Effects of salinity on the transformation of heavy metals in tropical estuary wetland soil. *Chemistry and Ecology* 31(2):186-198. <https://doi.org/10.1080/02757540.2014.917174>
- Cornu J-Y, Denaix L, Lacoste J, Sappin-Didier V, Nguyen C, Schneider A (2016) Impact of temperature on the dynamics of organic matter and on the soil-to-plant transfer of Cd, Zn and Pb in a contaminated agricultural soil. *Environmental Science and Pollution Research* 23(4):2997-3007. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5432-4>
- Cornu JY, Randriamamonjy S, Gutierrez M, Rocco K, Gaudin P, Ouerdane L, Lebeau T (2019) Copper phytoavailability in vineyard topsoils as affected by pyoverdine supply. *Chemosphere* 236:124347. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124347>

- Cui YS, Du X, Weng LP, Zhu YG (2008) Effects of rice straw on the speciation of cadmium (Cd) and copper (Cu) in soils. *Geoderma* 146(1):370-377. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.06.010>
- Cuske M, Karczewska A, Gałka B, Matyja K (2017) Would Forest Litter Cause a Risk of Increased Copper Solubility and Toxicity in Polluted Soils Remediated via Phytostabilization? *Pol J Environ Stud* 26(1):419-423. <https://doi.org/10.15244/pjoes/65211>
- De Troyer I, Amery F, Moorleghem C, Smolders E, Merckx R (2011a) Tracing the source and fate of dissolved organic matter in soil after incorporation of a ¹³C labelled residue: A batch incubation study. *Soil Biology & Biochemistry - SOIL BIOL BIOCHEM* 43:513-519. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.016>
- De Troyer I, Amery F, Van Moorleghem C, Smolders E, Merckx R (2011b) Tracing the source and fate of dissolved organic matter in soil after incorporation of a ¹³C labelled residue: A batch incubation study. *Soil Biology and Biochemistry* 43(3):513-519. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.016>
- Duchaufour P (1997) *Abrégé de Pédologie. Sol, végétation, environnement*, 5e édition. Elsevier Masson
- Duplay J, Semhi K, Errais E, Imfeld G, Babcsanyi I, Perrone T (2014) Copper, zinc, lead and cadmium bioavailability and retention in vineyard soils (Rouffach, France): The impact of cultural practices. *Geoderma* 230-231:318-328. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.04.022>
- El Hadri H, Chéry P, Jalabert S, Lee A, Potin-Gautier M, Lespes G (2012) Assessment of diffuse contamination of agricultural soil by copper in Aquitaine region by using French national databases. *Science of The Total Environment* 441:239-247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.070>
- Emerson W, McGarry D (2003) Organic carbon and soil porosity. *Australian Journal of Soil Research - AUST J SOIL RES* 41. <https://doi.org/10.1071/SR01064>
- Fanin N, Bertrand I (2016) Aboveground litter quality is a better predictor than belowground microbial communities when estimating carbon mineralization along a land-use gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 94:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.007>
- Fernández-Calviño D, Nóvoa-Muñoz JC, Díaz-Raviña M, Arias-Estévez M (2009) Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). *Geoderma* 153(1-2):119-129. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.07.024>
- Flores-Vélez LM, Ducaroir J, Jaunet AM, Robert M (1996) Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science* 47(4):523-532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1996.tb01852.x>
- Gao Y, Yan M, Korshin G (2015) Effects of calcium on the chromophores of dissolved organic matter and their interactions with copper. *Water Research* 81:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.038>
- Ghimire B, Ghimire R, VanLeeuwen D, Mesbah A (2017) Cover Crop Residue Amount and Quality Effects on Soil Organic Carbon Mineralization. *Sustainability* 9(12):2316. <https://doi.org/10.3390/su9122316>
- Gmach MR, Cherubin MR, Kaiser K, Cerri CEP (2020) Processes that influence dissolved organic matter in the soil: a review. *Sci agric (Piracicaba, Braz)* 77(3):e20180164. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0164>
- Guo X, Xie X, Liu Y, Wang C, Yang M, Huang Y (2020) Effects of digestate DOM on chemical behavior of soil heavy metals in an abandoned copper mining areas. *Journal of Hazardous Materials* 393:122436. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122436>
- Harry SP, Alston AM (1981) Effect of temperature on EDTA-extractable copper in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 12(7):661-668. <https://doi.org/10.1080/00103628109367182>
- Hattab N, Soubrand M, Guégan R, Motelica-Heino M, Bourrat X, Faure O, Bouchardon JL (2014) Effect of organic amendments on the mobility of trace elements in phytoremediated techno-soils: role of the humic substances. *Environmental Science and Pollution Research* 21(17):10470-10480. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2959-8>

- He W, Lee J-H, Hur J (2016) Anthropogenic signature of sediment organic matter probed by UV-Visible and fluorescence spectroscopy and the association with heavy metal enrichment. *Chemosphere* 150:184-193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.116>
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0955>
- Hu S, Lu C, Zhang C, Zhang Y, Yao H, Wu Y (2016) Effects of fresh and degraded dissolved organic matter derived from maize straw on copper sorption onto farmland loess. *Journal of Soils and Sediments* 16(2):327-338. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1226-z>
- Huang PM, Li Y, Sumner ME (eds) (2012) *Handbook of Soil Sciences: Properties and Processes*, Second Edition, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40(6):706-719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Hunt JF, Ohno T (2007) Characterization of fresh and decomposed dissolved organic matter using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multiway analysis. *J Agric Food Chem* 55(6):2121-2128. <https://doi.org/10.1021/jf063336m>
- Institut français de la vigne et du vin (IFV) (2018) *Engrais verts en viticulture*
- Jian S, Li J, Chen J, Wang G, Mayes MA, Dzantor KE, Hui D, Luo Y (2016) Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 101:32-43. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.003>
- Jones D, Willett V (2006) Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38(5):991-999. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.012>
- Kabata-Pendias A (2011) *Trace elements in soils and plants*, 4th ed. CRC Press, Boca Raton
- Kaiser K, Kaupenjohann M, Zech W (2001) Sorption of dissolved organic carbon in soils: effects of soil sample storage, soil-to-solution ratio, and temperature. *Geoderma* 99(3):317-328. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(00\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(00)00077-X)
- Kalbitz K, Knappe S (1997) Influence of soil properties on the release of dissolved organic matter (DOM) from the topsoil. *Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde (Germany)*
- Kalbitz K, Schmerwitz J, Schwesig D, Matzner E (2003) Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113(3):273-291. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00365-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00365-8)
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review
- Kikuchi T, Fujii M, Terao K, Jiwei R, Lee YP, Yoshimura C (2017) Correlations between aromaticity of dissolved organic matter and trace metal concentrations in natural and effluent waters: A case study in the Sagami River Basin, Japan. *Science of The Total Environment* 576:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.068>
- Kleber M, Lehmann J (2019) Humic Substances Extracted by Alkali Are Invalid Proxies for the Dynamics and Functions of Organic Matter in Terrestrial and Aquatic Ecosystems. *Journal of Environment Quality* 48(2):207. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0036>
- Kong Y, Wang J, Zhu X, Chen Y, Wang Z, Tao T, Zuo Y (2019) Characterization of Copper Complexation with Dissolved Organic Matter (DOM) in Urban Lakes of Wuhan, China. *Journal of Coastal Research* 93(sp1):241. <https://doi.org/10.2112/SI93-032.1>
- Laurent C, Bravin MN, Crouzet O, Pelosi C, Tillard E, Lecomte P, Lamy I (2020) Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc

- availability despite contamination. *Science of The Total Environment* 709:135927. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135927>
- Lehmann J, Kleber M (2015) The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528(7580):60-68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Lehmann J, Solomon D, Kinyangi J, Dathe L, Wirrick S, Jacobsen C (2008) Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. *Nature Geosci* 1(4):238-242. <https://doi.org/10.1038/ngeo155>
- Li Q, Du H, Chen W, Hao J, Huang Q, Cai P, Feng X (2018) Aging shapes the distribution of copper in soil aggregate size fractions. *Environmental Pollution* 233:569-576. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.091>
- Li X, Zhang J, Gong Y, Liu Q, Yang S, Ma J, Zhao L, Hou H (2020) Status of copper accumulation in agricultural soils across China (1985-2016). *Chemosphere* 244:125516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125516>
- Liu G, Wang J, Liu X, Liu X, Li X, Ren Y, Wang J, Dong L (2018) Partitioning and geochemical fractions of heavy metals from geogenic and anthropogenic sources in various soil particle size fractions. *Geoderma* 312:104-113. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.10.013>
- Liu G, Yu Z, Liu X, Xue W, Dong L, Liu Y (2020a) Aging Process of Cadmium, Copper, and Lead under Different Temperatures and Water Contents in Two Typical Soils of China. *Journal of Chemistry* 2020:e2583819. <https://doi.org/10.1155/2020/2583819>
- Liu G, Yu Z, Liu X, Xue W, Dong L, Liu Y (2020b) Aging Process of Cadmium, Copper, and Lead under Different Temperatures and Water Contents in Two Typical Soils of China. *Journal of Chemistry* 2020:e2583819. <https://doi.org/10.1155/2020/2583819>
- Lundquist EJ, Jackson LE, Scow KM (1999) Wet-dry cycles affect dissolved organic carbon in two California agricultural soils. *Soil biology & biochemistry*
- Ma YB, Lombi E, Nolan AL, McLaughlin MJ (2006) Short-term natural attenuation of copper in soils: Effects of time, temperature, and soil characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1897/04-601R.1>
- Maiksteniene S, Arlauskienė A (2004) Effect of preceding crops and green manure on the fertility of clay loam soil. *Agronomy Research* 2(1):87-97
- Manceau A, Matynia A (2010) The nature of Cu bonding to natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9):2556-2580. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.01.027>
- Martínez CE, Jacobson AR, McBride MB (2003) Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. *Environ Pollut* 122(1):135-143. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00276-2](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00276-2)
- McBride MB (1989) Reactions Controlling Heavy Metal Solubility in Soils. In: Stewart BA (ed) *Advances in Soil Science: Volume 10*. Springer, New York, NY, pp 1-56
- McKnight DM, Boyer EW, Westerhoff PK, Doran PT, Kulbe T, Andersen DT (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46(1):38-48. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.1.0038>
- Mirlean N, Roisenberg A, Chies JO (2007) Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environmental Pollution* 149(1):10-17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.12.024>
- Morgan RK, Taylor E (2004) Copper Accumulation in Vineyard Soils in New Zealand. *Environmental Sciences* 1(2):139-167. <https://doi.org/10.1080/15693430512331342602>
- Murphy KR, Stedmon CA, Wenig P, Bro R (2014) OpenFluor- an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Anal Methods* 6(3):658-661. <https://doi.org/10.1039/C3AY41935E>

- Ohm H, Marschner B, Broos K (2011) Respiration and priming effects after fructose and alanine additions in two copper- and zinc-contaminated Australian soils. *Biol Fertil Soils* 47(5):523-532. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0566-0>
- Ohno T, Fernandez IJ, Hiradate S, Sherman JF (2007) Effects of soil acidification and forest type on water soluble soil organic matter properties. *Geoderma* 140(1):176-187. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.04.004>
- Olah GM, Reisinger O, Kilbertus G, Olah GM (1978) Biodegradation et humification. Atlas ultrastructural. Vuibert, Paris
- Omanović D, Santinelli C, Marcinek S, Gonnelli M (2019) ASFit - An all-inclusive tool for analysis of UV-Vis spectra of colored dissolved organic matter (CDOM). *Computers & Geosciences* 133:104334. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2019.104334>
- Parlanti E (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* :17
- Petitjean P, Henin O, Gruau G (2004) Dosage du carbone organique dissous dans les eaux douces naturelles. Intérêt, Principe, Mise en Oeuvre et Précautions Opératoires. *Cahiers Techniques de Géosciences-Rennes* :65
- Piccolo A (2002) The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy* 75:57-134. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75003-7)
- Pierdet M (2020) Evolution spatiale et temporelle de la mobilité des contaminants organiques et inorganiques dans des sols viticoles contrastés. PhD Thesis, Université de Bordeaux
- Ponizovsky AA, Allen HE, Ackerman AJ (2007) Copper activity in soil solutions of calcareous soils. *Environmental Pollution* 145(1):1-6. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.010>
- R core Team (2020) R core Team,
- Rachou J, Gagnon C, Sauvé S (2007) Use of an ion-selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices. *Environmental Chemistry* 4(2):90. <https://doi.org/10.1071/EN06036>
- Ritchie G, Dolling P (1985) The Role of Organic Matter in Soil Acidification. *Australian Journal of Soil Research* 23(4):569-576. <https://doi.org/10.1071/SR9850569>
- Ritsema CJ (1993) Estimation of activity coefficients of individual ions in solutions with ionic strengths up to 0.3 mol dm⁻³. *Journal of Soil Science* 44(2):307-315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1993.tb00454.x>
- Rutkowska B, Szulc W, Bomze K (2013) Effects of soil properties on copper speciation in soil solution. *Journal of Elementology* 18(4)
- Saby N, Marchant BP, Lark RM, Jolivet C, Arrouays D (2011) Robust geostatistical prediction of trace elements across France. *Geoderma* 162(3-4):303. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.03.001>
- Schmidt MWI, Torn MS, Abiven S, Dittmar T, Guggenberger G, Janssens IA, Kleber M, Kögel-Knabner I, Lehmann J, Manning DAC, Nannipieri P, Rasse DP, Weiner S, Trumbore SE (2011) Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478(7367):49-56. <https://doi.org/10.1038/nature10386>
- Schwenke G (2004) Soil organic matter, biological activity, and productivity: myths and realities. In: *Soil biology in agriculture*, Ed Lines-Kelly R. Tamworth Sustainable Farming Training Centre, pp 31-35
- Scott K, Pain C (2009) *Regolith Science*, Springer Netherlands
- Serpaud B, Al-Shukry R, Casteignau M, Matejka G (1994) Adsorption des métaux lourds (Cu, Zn, Cd et Pb) par les sédiments superficiels d'un cours d'eau: rôle du pH, de la température et de la composition du sédiment. *rsseau* 7(4):343-365. <https://doi.org/10.7202/705205ar>

- Shi H, Li Q, Chen W, Cai P, Huang Q (2018) Distribution and mobility of exogenous copper as influenced by aging and components interactions in three Chinese soils. *Environ Sci Pollut Res* 25(11):10771-10781. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1288-8>
- Sigg L, Behra P, Stumm W, Ourisson G (2000) *Chimie des milieux aquatiques : Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, 3e édition, 3e éd. édition. Dunod
- Singh M, Sarkar B, Biswas B, Churchman J, Bolan NS (2016) Adsorption-desorption behavior of dissolved organic carbon by soil clay fractions of varying mineralogy. *Geoderma* 280:47-56. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.06.005>
- Sparks DL (2003) 2 - Inorganic Soil Components. In: Sparks DL (ed) *Environmental Soil Chemistry (Second Edition)*, Second Edition. Academic Press, Burlington, pp 43-73
- Sposito G (2008) *The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, USA
- Stedmon CA, Bro R (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography* :6
- Stengel P, Gelin S (1998) *Sol : interface fragile*. Editions Quae
- Strawn DG, Baker LL (2009) Molecular characterization of copper in soils using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental Pollution* 157(10):2813-2821. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.018>
- Strobel BW, Hansen HCB, Borggaard OK, Andersen MK, Raulund-Rasmussen K (2001) Composition and reactivity of DOC in forest floor soil solutions in relation to tree species and soil type. *Biogeochemistry* 56(1):1-26. <https://doi.org/10.1023/A:1011934929379>
- Supriatin S, Terrones CA, Bussink W, Weng L (2015) Drying effects on selenium and copper in 0.01M calcium chloride soil extractions. *Geoderma* 255-256:104-114. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.04.021>
- Sutton R, Sposito G (2005) Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environ Sci Technol* 39(23):9009-9015. <https://doi.org/10.1021/es050778q>
- Tang J, Wang W, Yang L, Cao C, Li X (2019) Variation in quantity and chemical composition of soil dissolved organic matter in a peri-urban critical zone observatory watershed in Eastern China. *Science of The Total Environment* 688:622-631. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.270>
- Tejada M, Gonzalez JL, García-Martínez AM, Parrado J (2008) Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresource Technology* 99(6):1758-1767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.052>
- Tyler G, Olsson T (2001) Concentrations of 60 elements in the soil solution as related to the soil acidity. *Eur J Soil Science* 52(1):151-165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2001.t01-1-00360.x>
- Veum KS, Goyne KW, Motavalli PP, Udawatta RP (2009) Runoff and dissolved organic carbon loss from a paired-watershed study of three adjacent agricultural Watersheds. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 130(3):115-122. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.12.006>
- Wang X, Li C, Luo Y, Hua K, Zhou M (2016) The impact of nitrogen amendment and crop growth on dissolved organic carbon in soil solution. *J Mt Sci* 13(1):95-103. <https://doi.org/10.1007/s11629-015-3556-0>
- Wang Y, Zhang X (2010) Effect of pH and Temperature on Absorption-Desorption of Cu²⁺ in Soil Nearby a Copper Tailings Yard. 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2010 :1-3. <https://doi.org/10.1109/ICBBE.2010.5516809>
- Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fujii R, Mopper K (2003) Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environ Sci Technol* 37(20):4702-4708. <https://doi.org/10.1021/es030360x>

- Xie J, Dong A, Liu J, Su J, Hu P, Xu C, Chen J, Wu Q (2019) Relevance of dissolved organic matter generated from green manuring of Chinese milk vetch in relation to water-soluble cadmium. *Environ Sci Pollut Res* 26(16):16409-16421. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05114-0>
- Xu H, Yu G, Yang L, Jiang H (2013) Combination of two-dimensional correlation spectroscopy and parallel factor analysis to characterize the binding of heavy metals with DOM in lake sediments. *Journal of Hazardous Materials* 263:412-421. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.042>
- Yrueala I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biol* 36(5):409. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Yue K, Yang W, Tan B, Peng Y, Huang C, Xu Z, Ni X, Yang Y, Zhou W, Zhang L, Wu F (2019) Immobilization of heavy metals during aquatic and terrestrial litter decomposition in an alpine forest. *Chemosphere* 216:419-427. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.169>
- Zeng S, Li J, Wei D, Ma Y (2017) A new model integrating short- and long-term aging of copper added to soils. *PLOS ONE* 12(8):e0182944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182944>
- Zhang S, Chen X-W, Ye Q, Zhang Z-T, Kong S-F, Cao C, Wang J-J (2020) Dissolved Metal(loid) Concentrations and Their Relations with Chromophoric and Fluorescent Dissolved Organic Matter in an Urban River in Shenzhen, South China. *Water* 12(1):281. <https://doi.org/10.3390/w12010281>
- Zheng SA, Zheng XQ, Chen C (2013) Transformation of metal speciation in purple soil as affected by waterlogging. *Int J Environ Sci Technol* 10(2):351-358. <https://doi.org/10.1007/s13762-012-0146-3>
- Zsolnay A (1996) Dissolved Humus in Soil Waters. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, pp 171-223
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0)

PARTIE 2 : CHAPITRES DES RESULTATS D'EXPERIMENTATIONS

Chapitre 4 : Prédiction de la disponibilité du cuivre dans des sols viticoles via l'exploitation des paramètres optiques de la MOD

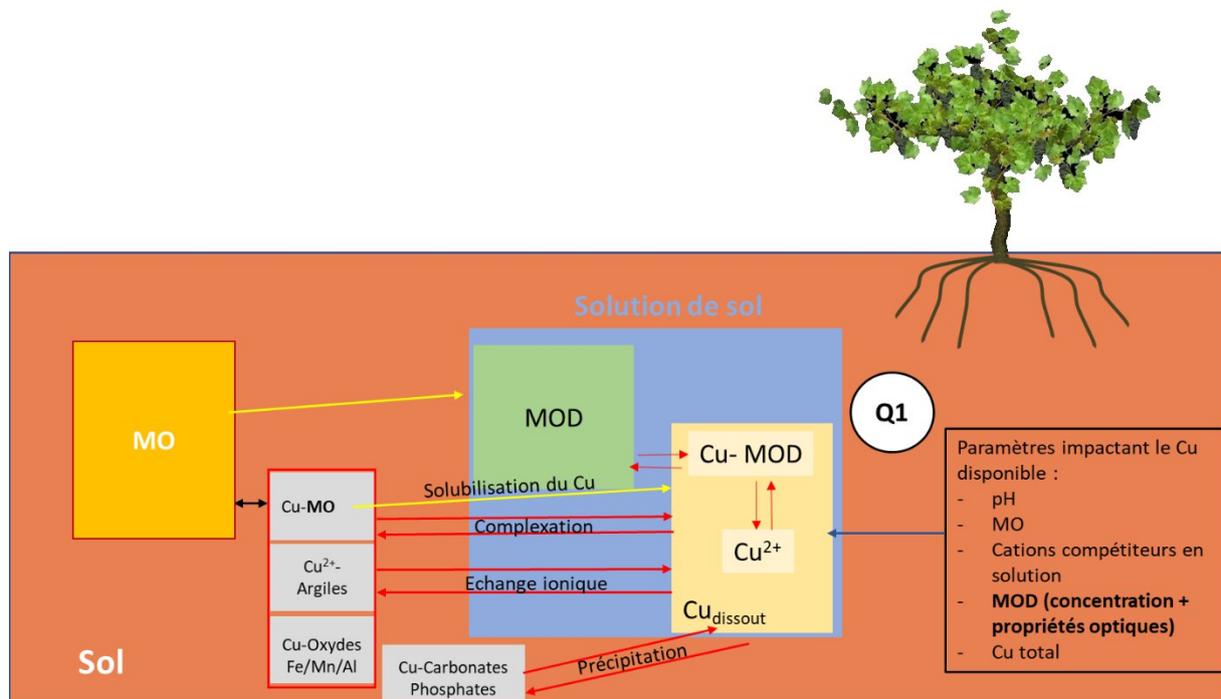
Article publié dans *Environmental Science and Pollution Research* sous la référence :

Ouedraogo F. Cornu J.Y., Janot N., Nguyen C., Sourzac M., Parlanti E., Denaix L. (2021) Do DOM optical parameters improve the prediction of copper availability in vineyard soils? *Environmental Science and Pollution Research*. doi 10.1007/s11356-021-16361-5

Prélude

Notre analyse bibliographique du Chapitre 1 a montré que la disponibilité du cuivre (Cu) dépendait de certaines variables du sol telles que le pH mais aussi de la matière organique dissoute (MOD). En effet, le Cu présente une forte affinité pour la MOD. Ainsi, la MOD à travers sa quantité et sa qualité, pourrait influencer la disponibilité du cuivre dans les sols. La qualité de la MOD influence sa capacité d'interagir avec le Cu, et peut être évaluée à travers ses propriétés optiques de fluorescence et d'absorbance. Par conséquent, en exploitant les propriétés du sol et celles de la MOD, il serait possible de prédire la disponibilité du Cu. Dans ce présent chapitre, l'objectif était d'étudier si les propriétés optiques de la MOD permettaient d'améliorer la prédiction du Cu dans une collection de sols contrastés à l'équilibre (Question 1 de la thèse). Les sols étudiés ont été choisis de manière à avoir des concentrations différentes en Cu total dans le sol, en pH et en teneur de MO. Les mesures ont porté sur des extraits de sol obtenus après extraction au 0.01 M KCl. Les indicateurs de disponibilité du Cu étaient la concentration totale de Cu et celle du Cu libre Cu^{2+} dans les extraits. Des régressions linéaires multiples ont été établies entre les indicateurs de disponibilité du Cu et les propriétés du sol et de la MOD.

La figure ci-dessous évoque les hypothèses et les relations probables entre variables dans les sols qui seront étudiés dans le chapitre.



Do DOM optical parameters improve the prediction of copper availability in vineyard soils?

Frédéric Ouédraogo^{1,2,*}, Jean-Yves Cornu¹, Noémie Janot¹, Christophe Nguyen¹, Mahaut Sourzac², Edith Parlanti², Laurence Denaix¹

¹ ISPA, INRAE, Bordeaux Sciences Agro, 33140, Villenave d'Ornon, France

² University of Bordeaux, UMR CNRS 5805, EPOC, 33400, Talence, France

Abstract

Accumulation of copper (Cu) in soils due to the application of fungicides may be toxic for organisms and hence affect winegrowing sustainability. Soil parameters such as pH and dissolved organic matter (DOM) are known to affect the availability of Cu. In this study, we investigated the contribution of chromophoric and fluorescent DOM properties to the prediction of Cu availability in 18 organic vineyard soils in the Bordeaux winegrowing area (France). The DOM parameters, assessed through absorbance and fluorescence analyses, and proxies for Cu availability (total soluble Cu and free ionic Cu²⁺) were measured in 0.01 M KCl extracts. Total soluble Cu (Cu_{KCl}) varied 23-fold while free ionic Cu²⁺ varied by a factor of 4,600 among the soils. DOC concentrations were similar among the soils, but the samples differed in the quality of DOM as assessed by optical spectroscopy. Multilinear regression models with and without DOM quality parameters were investigated to predict Cu availability. The best model for Cu_{KCl} successfully explained 83 % of variance and included pH, Cu_T and two DOM fluorescence quality indices, the FI fluorescence index, which distinguishes between microbial and higher plant origins, and the HIX humification index. For the prediction of Cu²⁺, pH alone explained 88 % of variance and adding DOM parameters did not improve modelling. The two Cu availability proxies were related to pH. This study confirms the prominent role of pH in Cu availability and underlines the importance of DOM quality to better predict Cu solubility.

Keywords

Copper, organic matter, fluorescence, absorbance, vineyard soils, availability, modelling.

1 Introduction

Copper-based fungicides like Bordeaux mixture have been repeatedly applied in vineyards since the end of the 19th century to control downy mildew of grapevine, sometimes causing Cu to accumulate in the soils (Brun et al. 2001; Ballabio et al. 2018). In European soils, the median of total Cu concentrations is 13 mg kg⁻¹. In vineyards soils, this value reaches 49 and 91 mg kg⁻¹ in Europe and France, respectively (Ballabio et al. 2018). In old vineyards, Cu concentrations in the topsoil can reach several hundred mg Cu kg⁻¹, as widely reported in several European countries including France, Italy, Spain, Greece, Portugal, Czech Republic (Fernández-Calviño et al. 2009; Komárek et al. 2010; Fernández-Calviño et al. 2010; Flores-Álvarez et al. 2011; Kelepertzis et al. 2017). Despite the reduction of the authorized application rate to 4 kg Cu ha⁻¹ year⁻¹ (EFSA et al. 2018), Cu-based fungicides continue to be used, particularly in organic viticulture for which there is currently no alternative that offers equally effective protection (Andrivon et al. 2018).

Cu is an essential micronutrient for all living organisms. Microorganisms need trace levels of Cu for their growth because it is a cofactor in enzymatic reactions (Trevors and Cotter 1990). In plants, copper plays key roles in cell wall metabolism and in photosynthetic electron transport (Yruela 2009). A Cu deficiency can affect vital functions in plant metabolism. However, excess copper can cause phytotoxicity through the formation of oxygen radicals which damage cells and inactivate protein structure, or by disturbing photosynthetic activity due to the photoinhibition induced by excessive Cu (Yruela 2005). In calcareous soils, excess Cu can also lead to Fe deficiency in graminaceous species such as durum wheat (Michaud et al. 2007) since Cu(II) has sufficient affinity for *phytosiderophores* to divert them from their initial objective of mobilising Fe(III). All these problems may affect plant growth and reduce agricultural productivity. Cu phytotoxicity has been reported in durum wheat grown in former vineyard soils with total Cu concentrations beginning at 114 mg kg⁻¹ (Michaud et al. 2007). Exposure to Cu at soil concentrations above 16 mg Cu kg⁻¹ in the soil has also been shown to have a serious impact on earthworm *Eisenia fetida* reproduction by reducing the production of cocoons (Helling et al. 2000). Fernández-Calviño et al. (2010) reported that microbial enzymatic activity (phosphatase) in Portuguese vineyard soils decreased drastically above 250 mg Cu kg⁻¹. A recent meta-analysis of Cu in vineyard soils showed that microbial respiration was reduced by half above a stock of 200 kg Cu ha⁻¹ (Karimi et al. 2021). Excess copper may thus cause ecotoxicity in vineyard soils, although the ecotoxic thresholds vary widely depending on certain soil parameters like organic matter (OM) content or pH. Total Cu inducing 50 % of biomass decrease (EC₅₀) is a widely used indicator in ecotoxicity studies. It has been shown that EC₅₀ of lettuce and tomatoes increases with increasing OM content or decreasing pH (Recatalá et al. 2012; Sacristán et al. 2016). Cu toxicity may therefore be linked not only to total Cu amounts but also to certain bioavailable forms of Cu in the soils.

The bioavailability of metals is defined as the fraction of its environmentally available compound an organism takes up through physiologically driven processes (ISO 2006). Environmental availability is defined as the availability of metals in the soil measured using chemical methods (Harmsen 2007).

Sauvé et al. (1996) showed that Cu concentrations in the tissues of several plants were closely linked to Cu in solution, more specifically to free Cu^{2+} activity. The free ion Cu^{2+} is thought to be the bioavailable form, and this hypothesis is supported by other authors who reported that Cu toxicity for different organisms (algae, earthworms, zooplankton) in soils and aquatic systems depended strongly on free Cu^{2+} activity (Verweij et al. 1992; Qiu et al. 2013; Tait et al. 2016).

The concentration of Cu in soil solutions and Cu^{2+} activity are controlled by soil properties such as total Cu content, pH and soil organic matter (SOM) content (Sauvé et al. 1997; Sauvé et al. 2000). pH is known to affect Cu solubility (Temminghoff et al. 1994), but also copper speciation in solution (Bravin et al. 2009). Cu biogeochemistry is controlled to a large extent by its binding to organic matter, since SOM contains acidic functional groups (mainly phenolic and carboxylic groups) which have a particular and strong affinity for Cu (Manceau and Matynia 2010). Organic matter supplied to soils in different forms (fresh materials, compost, manure, sludge) has been shown to significantly reduce Cu availability in its soluble form (Navel and Martins 2014; Ferreira et al. 2018; Gonzaga et al. 2020) and its ionic form (Oustriere et al. 2016). Dissolved organic matter (DOM) plays a key role in the fate of metals in the soil. While SOM immobilises Cu through sorption onto solid phases (Sauvé et al. 2000), DOM increases Cu solubility by forming Cu complexes in soil solution. However, the free Cu fraction may also decrease due to complexation with DOM. Cu mobilisation from the solid phase into solution has been reported to be exacerbated with increasing aromatic DOM (Amery et al. 2007; Amery et al. 2008; Araújo et al. 2019). What is more, prediction of Cu in soil leachates was improved when the DOM aromaticity was taken into account in geochemical modelling (Amery et al. 2008) rather than only considering a percentage of reactive DOM (Djae et al. 2017). Phenolic and O-functional groups of aromatic molecules have high affinity for Cu binding and are highly stable, which may facilitate its solubilisation by DOM (Fuentes et al. 2013). These findings clearly underline the importance of DOM characteristics in the control of Cu dynamics in soil solutions.

The capacity of DOM to complex Cu and to promote its mobilisation from the solid phase not only depends on DOM quantity, but also on DOM quality (Baken et al. 2011; He et al. 2016; Kikuchi et al. 2017). DOM quality can be described through its optical properties assessed by Ultraviolet visible (UV-Vis) absorption and excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy (Jaffé et al. 2014). In the soil literature, DOM is largely characterised by its specific UV-absorbance index at 254 nm (SUVA_{254}), which is related to its aromaticity (Weishaar et al. 2003). But the measurements of SUVA_{254} may be biased due to the presence of colloids or iron at high concentrations (Weishaar et al. 2003). Other spectroscopic indices are widely used in studies on aquatic environments to characterise DOM (Yang and Hur 2014; Derrien et al. 2017) and its interactions with Cu (He et al. 2016). Another UV-Vis absorption index is the spectral slope ratio S_R which is inversely proportional to molecular size (Helms et al. 2008). Fluorescence indices include the humification index HIX, which expresses the degree of DOM condensation (Zsolnay et al. 1999), the biological index BIX, used to assess the recent production of autochthonous components (Huguet et al. 2009), and the fluorescence index FI which makes it possible to distinguish microbial versus higher plant origin of DOM (McKnight et al. 2001). In aquatic media, concentrations of metals (Cu, Zn, Cd) in sediment solutions were shown to be related to DOM

aromaticity (HIX) and to the autochthonous (BIX) or microbial (FI) origins of molecules and not to DOM molecular size (S_R) (He et al. 2016; Zhang et al. 2020).

Up to now, only a few studies combined all these tools to describe DOM in contrasted agricultural soils (Romero et al. 2017; Li et al. 2019; Sun et al. 2020) and their effects on metal speciation in soil solution (Guo et al. 2015) or sediments (Xu et al. 2019). To our knowledge, only one paper reported the use of these spectroscopic indices for vineyard soils exposed to herbicide glyphosate and Cu-based fungicides (Daouk et al. 2015). The main goal of the present study was thus to examine the contribution of quality of DOM in predicting Cu availability in organic vineyard soils. We hypothesized that taking the DOM optical indices into account would improve the prediction of Cu environmental availability, assessed with total soluble Cu or free Cu^{2+} .

2 Material and methods

2.1 Soil sampling and analyses

Eighteen vineyard topsoils were sampled in the vine inter-rows at a depth of between 0 and 15 cm in March 2019 in the region of Bordeaux (France), located in the AOC (i.e., controlled designation of origin) zones of '*Bordeaux supérieur*', '*Blaye Côtes de Bordeaux*' and '*Graves*'. All the vineyards sampled are organic and the only fungicide treatment they receive is Cu. The fungicide applied was mainly Bordeaux mixture (mixture of copper sulphate and lime).

The 18 soils were contrasted in terms of organic matter and pH based on the pedological bedrock and agronomic practices. After sampling, the fresh soils were sieved to 4 mm and kept at 4 °C before analysis to minimise the effects of sampling on dissolved organic carbon (Jones and Willett 2006).

Soil pH (pH_{water}), total copper (Cu_T), organic carbon (C_{org}) and total nitrogen contents were determined on separate air-dried soils. pH_{water} was determined by potentiometry in distilled water in a 1:2.5 (w/v) soil-to-solution ratio (NF ISO 10390). Cu_T was determined after *aqua regia* microwave-assisted digestion (Anton Paar Multiwave PRO Microwave Reaction System®). Aliquots (0.5 g) of crushed dried sample were placed in a microwave Teflon flask with an acid mix $HNO_3:HCl$ (3.75:1.25, v:v) (Aristar® for trace analysis, VWR Chemicals). Extracts were obtained after centrifugation at 1,300 W at 180 °C for 20 minutes and filtration on a 2- μm Whatman cellulose acetate filter. The concentration of Cu in the extracts was measured by ICP-OES (Agilent®). A certified reference material (BCR-143R, 98 % Cu recovery rate) was used to validate extraction and quantification.

C_{org} and N contents in soils were assessed by dry combustion (950 °C) with a CN analyser (Flash EA 1112 series®) after carbonates were removed with HCl (NF ISO 10694). An organic soil (ISE 973) was used as control.

2.2 Extraction of soil solutions

Before the soil solution was extracted, the wet soils were all adjusted to 80 % water holding capacity (WHC) and incubated at 20 °C for one week to avoid a possible microbial flush and its effects on Cu solubility and speciation (Cornu et al. 2007).

Soil solutions were extracted as follows: 15 g of wet soil were shaken with 30 mL of 0.01 M KCl (purity 99.5 %, Merck®) with 1:2 w/v (soil-to-solution ratio) at 35 rev. mn⁻¹ for 2 h. The soil suspensions were centrifuged at 4,600 g for 10 min. The supernatants were collected and filtered through 0.2 µm cellulose acetate filters. Extractions were performed in triplicate. The extracted soil solutions were stored at 4 °C in the dark before spectroscopic analysis, which was performed less than seven days after extraction.

The 0.01 M KCl extraction was chosen for two reasons: (i) to be in the range of common ionic strength for soil pore water and (ii) to avoid DOM coagulation which may occur in the case of CaCl₂ extraction (Römken and Dolfing 1998). The 1:2 w/v ratio was used because lower extraction ratios tend to overestimate the concentrations of DOC recovered (Jones and Willett 2006).

2.3 Analyses of soil extracts

2.3.1 Total dissolved metals and Cu²⁺ concentrations

The pH of the extracts (pH_{KCl}) was measured immediately after extraction by potentiometry using a microelectrode (E16M331, Radiometer Analytical®). The total concentrations of dissolved Ca, Cu, Fe, Mn and Zn were determined by ICP-OES (Agilent®) in a 5-mL aliquot acidified with 2 % HNO₃ (Aristar® for trace analysis purity 69 %, VWR Chemicals®). Free Cu activity was measured in non-acidified 5-mL aliquots using a cupric ion-selective electrode (ISE, 9629BNWP, Thermo Scientific Orion®). The ISE was calibrated in Cu solutions buffered with iminodiacetic acid and potassium phthalate with pCu (= - log₁₀ aCu²⁺) ranging from 5.5 to 13 as described in (Bravin et al. 2009). The calibration curve (R²=0.98, n=67) showed 85 % slope efficiency compared to the theoretical Nernstian slope (Fig. S 1). The concentrations of free Cu²⁺ were determined from pCu values and from the Cu²⁺ activity coefficient, calculated from the extended Debye-Hückel equation (Ritsema 1993).

2.3.2 Dissolved organic matter parameters

The concentrations of dissolved organic carbon (DOC) in the soil extracts were determined using a TOC analyser (TOC-VCPH, Shimadzu®, Japan). The DOC was calculated as the difference between total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) (DOC=TC - IC). The analyser was calibrated with a solution prepared from sodium carbonate, sodium bicarbonate, potassium hydrogen phthalate, and the 0.01 M KCl was used as the zero point in the calibration.

2.3.2.1 Absorbance indices

Soil solution UV-visible absorbance was measured using a Jasco® V-560 spectrophotometer, scanning from 210 to 700 nm with a 0.5 cm path length quartz cuvette. A 0.01 M KCl solution was used as a

blank. Several indices were determined from absorbance spectra to characterise the DOM in the extracts. The specific UV absorbance at 254 nm (SUVA₂₅₄, L gC⁻¹ cm⁻¹) was calculated as follows:

$$\text{SUVA}_{254} = \frac{A_{254} \cdot 1000}{b \cdot \text{DOC}}$$

where A₂₅₄ is the measured absorbance at 254 nm (dimensionless) (**Fig. S 2**), b is the path length (cm) and DOC the organic carbon concentration (mg L⁻¹).

The S_R index was calculated as the spectral slope ratio over 275-295 nm to 350-400 nm (Helms et al. 2008).

2.3.2.2 Fluorescence indices

The excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectra were recorded in a 0.5 cm quartz cuvette, thermostatted at 20 °C in the cell holder, using an Aqualog spectrofluorometer (Horiba Scientific®). Excitation scans were performed using a double-grating monochromator, a 150-Watt Xenon lamp with a 5 nm bandpass, and 2-s integration time at wavelengths of 240-800 nm at 5-nm intervals. Emission spectra were collected with high CCD detector gain at approximately 0.58 nm (1 pixel) intervals at wavelengths of 245-830 nm. A blank EEM was acquired daily from the 0.01 M KCl solution used for soil extraction and subtracted from EEM spectra of all the samples to eliminate scattering peaks. EEM spectra were corrected for instrumental biases. When the maximum intensity of the absorbance spectrum was higher than 0.1, the samples were diluted with 0.01 M KCl to avoid inner filter effects. Fluorescence data are expressed in Raman units (R.U) after normalization to the area under the Raman peak of an ultrapure water blank (Milli-Q, Millipore®) at an excitation wavelength of 350 nm. TreatEem software (<https://sites.google.com/site/daromasoft/home/treateem>) was used to remove remaining scatter peaks in EEMs and to calculate the fluorescence indices.

Several indices were obtained from fluorescence analysis. As defined by Zsolnay et al. (1999), the humification index HIX was calculated as the ratio H/L of the area under the curve for two spectral regions (between emission wavelengths 435 nm and 480 nm for H and between 300 nm and 345 nm for L) from the emission spectrum scanned for excitation at 254 nm (**Fig. S 3**). The higher the HIX, the higher the degree of condensation and aromaticity. The biological index BIX was determined as the ratio of fluorescence intensity at an emission wavelength of 380 nm to that at 430 nm, at an excitation wavelength of 310 nm (Huguet et al. 2009). High BIX values are related to predominantly recent production of DOM linked to biological activity (Huguet et al. 2009). The fluorescence index FI was calculated as the ratio of the fluorescence intensity at emission wavelength of 450 nm to that at 500 nm while excitation was set at 370 nm (McKnight et al. 2001). FI is an indicator of the source of DOM, low values are associated with vascular-plant-derived compounds, while high values indicate microbial origin or microbially processed terrestrial DOM (Cory and McKnight 2005; Broder et al. 2017).

2.4 Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R software version 4.0.2 (R core Team 2020). First, principal component analysis (PCA) was used to visualise correlations between variables and possibly groups of soils. PCA was performed using the 'FactomineR' package (Husson et al. 2008). For the PCA, all the variables were log-transformed except pH_{water} and pH_{KCl} . Second, a correlation matrix was performed to investigate the relationships between the same variables using the R 'corrplot' package (Wei and Simko 2021). The Pearson correlation coefficients were considered as statistically significant at $p < 0.01$.

Multi-linear log-log regressions were used to identify and rank the contributions of soil variables to the prediction of Cu availability proxies (Cu_{KCl} and Cu^{2+}). Multi-linear regressions were performed using the 'car' package (Fox and Weisberg 2019). Each replicate was considered as one sample. For Cu_{KCl} prediction, soil and solution variables were entered as predictors (Cu_{T} , pH_{water} , C:N, C_{org} , SUVA_{254} , S_{R} , DOC, HIX, BIX, FI). Only solution variables were used for Cu^{2+} prediction (Cu_{KCl} , pH_{KCl} , SUVA_{254} , S_{R} , DOC, HIX, BIX, FI). The variables (except pH_{water} and pH_{KCl}) were log-transformed before the computation. A total of 2,047 and 255 models with one to maximum four predictors (to avoid overparameterization) were exhaustively tested for Cu_{KCl} and Cu^{2+} predictions, respectively. The best models had the maximum R^2_{adj} (goodness of fit) with a minimum number of predictors (parsimony). The selected models also had a variation inflation factor (VIF) below 2.3 to avoid multicollinearity. The root mean square error (RMSE) was calculated to compare the accuracy of the models including or not DOM parameters.

2.5 Modelling Cu^{2+} activity

Cu speciation in solution was predicted with ORCHESTRA software (Meeussen 2003) using the DOM ion-binding model NICA-Donnan (Kinniburgh et al. 1996; Koopal et al. 2005). The objective was to compare simulations of amounts of free Cu^{2+} with the corresponding experimental measurements. The input parameters used for the calculations were pH_{KCl} , total DOM, Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} and Mn^{3+} concentrations. Cl^- and K^+ concentrations were set to 0.01 M, i.e., their concentration in the extraction solution. DOM concentrations were calculated assuming that DOM contained 50 % of C. Activity coefficients were calculated using the Davies equation. Fe activity was calculated by assuming its equilibrium with $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ($\log K_5 = 3.19$). Equilibrium reactions were described taking the equilibrium with atmospheric CO_2 ($\text{pCO}_2 = 3.9 \times 10^{-4}$ atm) into account.

Several hypotheses regarding DOM composition were examined: (i) 100 % humic acids (HA), (ii) 100 % fulvic acids (FA), or an inert DOM pool and an active DOM pool comprised of (iii) 65 % FA, or (iv) 30 % HA and 30 % FA. In each case, proton and metal binding parameters were set at their generic value (Milne et al. 2001, 2003). Sixty-five percent is the approximation generally used to determine the amount of free metal cations in soil solutions (Weng et al. 2002, Djae et al. 2017). In the second step, free Cu was optimised by adjusting the reactive DOM pool (noted rDOM) in each sample to match the experimental measurements.

3 Results and discussion

3.1 Soil properties

The main soil parameters are listed in **Table 1**.

Total concentration of Cu in the soil (Cu_T) ranged from 28 to 238 $mg\ kg^{-1}$ with a median of 107 $mg\ kg^{-1}$. In the Aquitaine region of France, large quantities of Cu-based fungicides are used to prevent downy mildew caused by the wet climate. Accordingly, El Hadri et al. (2012) found that Cu_T in soils in the Aquitaine region ranged from 0.5 to 491 $mg\ kg^{-1}$, with maximum values found in vineyard soils. All the vineyard soils in our study fell within this range. It is worth noting that Cu_T concentrations may be very different in the same location, mainly depending on the age of the vineyard (Fernández-Calviño et al. 2009). This may explain the wide range of Cu_T (i.e., 8-fold) observed in the present study.

The pH_{water} of the soils ranged from 6.3 to 8.3 (**Table 1**). The most alkaline soils were associated with the highest carbonate contents (**Table 1**). The organic carbon content (C_{org}) ranged from 5 to 31 $g\ kg^{-1}$. Vineyard soils are generally poor in organic carbon. Coll et al. (2011) reported C_{org} values ranging from 10 to 13 $g\ kg^{-1}$ for vineyard soils in the Languedoc-Roussillon region (South of France). Our results are also similar to those obtained by Parat et al. (2002) ($11 < C_{org} < 45\ g\ kg^{-1}$) in a study conducted in Burgundy viticultural region (east-central France).

The C:N ratio varied between 10.3 and 17.4 (**Table 1**). The C:N ratio varied between 10.3 and 17.4 (**Table 1**). This ratio provides information on the rate of SOM mineralisation (high for values below 12) and also on the carbon storage capacity of the soil (Swift et al. 1979).

Table 1: Chemical properties of the 18 vineyard soils analysed in this study. C_{org} stands for organic carbon, Cu_T for total Cu. Carbonate values <1 were not quantifiable

Soil id	AOC Zone	Soil classification (WRB)	Cu_T	pH_{water}	$CaCO_3$	C_{org}	C:N
			$mg\ kg^{-1}$		$g\ kg^{-1}$	$g\ kg^{-1}$	
A	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	28	8.1	< 1	9.9	10.6
B	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	35	8.3	27.6	13.7	10.9
C	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvic Cambisol	35	6.9	< 1	10.2	11.4
D	Bordeaux supérieur	Luvisol	73	6.3	< 1	10.5	11.5
E	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	80	7.9	< 1	8.3	10.7
F	Graves	Podzosol	84	6.5	< 1	16.9	15.3
G	Bordeaux supérieur	Luvisol	89	6.9	< 1	19.2	11.7
H	Bordeaux supérieur	Luvisol	103	7.9	3.2	12.6	10.6
I	Graves	Cambisol	104	8.3	19.5	7.5	11.5
J	Blaye Côtes de	Luvisol	110	8	1.1	11.3	11.6

	Bordeaux						
K	Blaye Côtes de Bordeaux	Podzosol	121	6.5	< 1	11.8	13.0
L	Graves	Leptosol	155	7.1	< 1	14.6	15.5
M	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	175	6.5	< 1	9.3	11.9
N	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	176	7.8	< 1	5.4	11.7
O	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	181	7.3	< 1	15.6	12.6
P	Graves	Leptosol	193	7.5	< 1	30.8	17.4
Q	Blaye Côtes de Bordeaux	Luvisol	195	6.3	< 1	13.3	12.6
R	Blaye Côtes de Bordeaux	Cambisol	238	8.2	30.4	10.6	10.3

3.2 Elemental composition of the soil extracts and Cu availability

Mean Fe, Mn, Ca and Zn concentrations are listed in (Table S 1) in supplementary information. The pH of the soil extracts (pH_{KCl}) fluctuated between 5.9 and 7.6 (Table S 1).

Mean concentrations of DOC in KCl extracts ranged only from 15 to 28 mg L⁻¹ (median 18) (Table S 1). This corresponds to 0.08 and 0.33 % of total C_{org}, illustrating the low solubility of SOM. Furthermore, Zsolnay (1996) reported that DOC is the most mobile and reactive fraction of C_{org}.

The mean total concentration of Cu in the extracts (Cu_{KCl}) ranged from 0.11 to 2.64 μM , i.e., a factor of 23 (Table S 1), with a median of 0.3 μM . Many studies in the literature used salt solutions - generally CaCl₂ - to extract Cu and considered it to be a correct surrogate for soil pore water Cu (Sauvé et al. 1997; Chaignon et al. 2003). Our Cu_{KCl} values were similar to those found by Djae et al. (2017) (3×10^{-2} - 3.7 μM Cu) with 2 mM KNO₃ / Ca(NO₃)₂ extractions. Similar ranges of total Cu assessed in CaCl₂ extracts were found in the literature: 0.11 - 2 μM (Sauvé et al. 1996), 0.01 - 5 μM (Sauvé et al. 1995).

The mean Cu²⁺ concentrations varied between 2.1×10^{-4} and 0.95 μM , i.e., by a factor of 4,600 (Table S 1). This variability shows that our samples were more contrasted in terms of Cu²⁺ than Cu_{KCl} . The highest Cu²⁺ values were found in the most acidic soils. The percentage of free Cu, defined as the ratio of concentrations in Cu²⁺ and Cu_{KCl} (fCu^{2+}), ranged from 0.07 % to 50 % (Table S 1). Our results are in agreement with Djae et al. (2017) who found Cu²⁺ concentrations between $3 \cdot 10^{-7}$ and 2 μM and fCu^{2+} ranged from 0.01 % to 44 % for Cu-contaminated soils. But in moderately contaminated vineyard soils, Cornu et al. (2019) found Cu²⁺ of between 6×10^{-5} - 0.3 μM and fCu^{2+} of between 0.002 % - 10 %. These results reveal dramatic differences based on free Cu²⁺, even within a collection of soils with the same source of Cu contamination.

Soil pore water Cu has been used as a proxy for Cu phytotoxicity (Michaud et al. 2008), assuming that few complex forms of Cu present in the solution play a role in Cu uptake by plant roots. The toxicity threshold found in the literature for various plants (3.94-9.55 μM) are all higher than the maximum

Cu_{KCl} (2.64 μM) found in the present study (Table 2), suggesting that our 18 vineyard soils do not *a priori* represent a risk for grapevine and also possibly maize, grapevine and sunflower production (Ouzounidou 1995, Juang et al. 2012, Kolbas et al. 2014).

Beyond total soluble Cu, the bioavailable form of Cu is generally considered to be its ionic species Cu^{2+} (Sauvé et al. 1998), so Cu^{2+} concentrations would be a far more reliable tool to assess Cu toxicity for organisms. In the present study, the Cu^{2+} measured in some KCl extracts was the same as that which caused a 50 % reduction ($EC_{50} = 6.3 \times 10^{-2} \mu M$) in root growth in durum wheat (Bravin et al. 2010) (Table 2). This EC_{50} value was found at 2.2 μM Cu^{2+} for cucumber (Kader et al. 2016). To our knowledge, no such toxicity indicator assessed via ionic Cu^{2+} has been established for grapevine. Four soils of our panel (Table S 1) may be problematic if converted from grapevine to widely consumed crops like wheat. Qiu et al. (2013) reported that Cu^{2+} concentration was also an appropriate proxy to assess Cu toxicity for earthworms and found a EC_{50} of 1 μM Cu^{2+} for *Eisenia fetida* mortality (Table 2). In our panel of soils, this suggests that one soil represents a potential toxic risk for this earthworm species (Table 2, Table S 1).

Overall, the Cu^{2+} and Cu_{KCl} levels in the soils sampled in this study cannot be considered completely risk-free for various organisms and may therefore affect the sustainability of the vineyards. The Cu^{2+} concentrations in about one-quarter of the soils were above the toxicity thresholds reported in the literature and may be toxic for organisms. It is thus important to examine and understand the factors that control Cu availability and potential toxicity.

Table 2 : Values of total Cu in solution and Cu^{2+} reported as toxicity thresholds in the literature, compared with the maximum values found in the present study

	Toxicity thresholds	Values (μM)	References
	Max value in this study	2.64	
Total Cu in solution (Cu_{KCl} in this study)	IC_{50} grapevine	3.94	Juang et al. 2012
	IC_{50} maize	6.50	Ouzounidou 1995
	IC_{50} sunflower	9.55	Kolbas et al. 2014
	Max value in this study	0.94	
Free ionic Cu^{2+}	EC_{50} durum wheat	0.06	Bravin et al. 2010
	EC_{50} cucumber	2.20	Kader et al. 2016
	EC_{50} <i>Eisenia fetida</i>	1.00	Qiu et al. 2013

3.3 Diversity of soils in terms of DOM properties

We calculated several spectroscopic indices to assess DOM quality (Fig. S 4). $SUVA_{254}$ values varied between 5 and 61 $L g^{-1} C^{-1} cm^{-1}$ (Fig. 1). This range is similar to that reported in other studies on

agricultural soils: 6-65 L g C⁻¹ cm⁻¹ (Amery et al. 2007); 27-46 L g C⁻¹ cm⁻¹ (Amery et al. 2008); 8-58 L g C⁻¹ cm⁻¹ (Supriatin et al. 2015). DOM is considered to be more aromatic when the SUVA₂₅₄ index is higher (Weishaar et al. 2003). It has been reported that SUVA₂₅₄ values below 30 L g C⁻¹ cm⁻¹ suggest that DOM is composed mainly of hydrophilic substances (Yeh et al. 2014), which is the case of about 80 % of our samples. S_R values varied three-fold between 0.42 and 1.28 (**Fig. 1, Table S 1**), which is the same range as those reported by Tang et al. (2019) for Chinese agricultural soils (0.36-1.7). The S_R index is inversely related to molecular size, high S_R values indicate low molecular weight DOM (Helms et al. 2008) while low S_R values indicate high molecular weight and highly condensed organic molecules (Gao et al. 2017).

Fluorescence EEM spectra (**Fig. S 4**) were acquired to describe heterogeneities in DOM in the samples more precisely by calculating indices such as FI, HIX and BIX. The FI values ranged from 1.10 to 1.34 (median 1.22) (**Fig. 1, Table S 1**). FI values are usually used to distinguish sources of DOM. McKnight et al. (2001) found that low FI values (~1.3) correspond to higher plant-derived molecules, while high values (~1.9) indicate microbial or microbially-processed DOM. This suggests that the majority of DOM collected from our samples originated from vascular plants, and that microbial contributions were limited. The BIX index is used to assess the relative production of recent DOM and usually ranges from 0.5 to 1. In the present study, about 75 % of the samples had BIX between 0.6 and 0.7, indicating a relatively low contribution of fresh autochthonous DOM substances (**Table S 1**), while the other 25 % had BIX between 0.7 and 0.9, suggesting fresh DOM production by organisms (Huguet et al. 2009; He et al. 2016). In our samples the HIX values were contrasted, with almost 10-fold variation from 1.31 to 10.33 (median 5.75) (**Fig. 1, Table S 1**). Two of the soils (D and L) were characterised by very low HIX values (**Table S 1**) due to the presence of tyrosine-like fluorescence at an excitation wavelength of 240-260 nm and emission of 300-340 nm (**Fig. S 4a**). This tyrosine-like fluorescence band was absent from all other EEM spectra that were similar to that of soil B (**Fig. S 4b**). HIX stands for degree of humification or condensation of DOM (Zsolnay et al. 1999), but has also been used to characterise DOM aromaticity (Ohno et al. 2007). Our HIX results are in the same range as those reported by Daouk et al. (2015) for Swiss vineyard soils (0.1-7.0) and as those reported by Tang et al. (2019) (2 to 10). However, HIX values varying from 10 to 30 have been reported in several arable soils (Kalbitz et al. 2003). Compared to the latter range, our soils had low HIX values and can be characterized as weakly-humified.

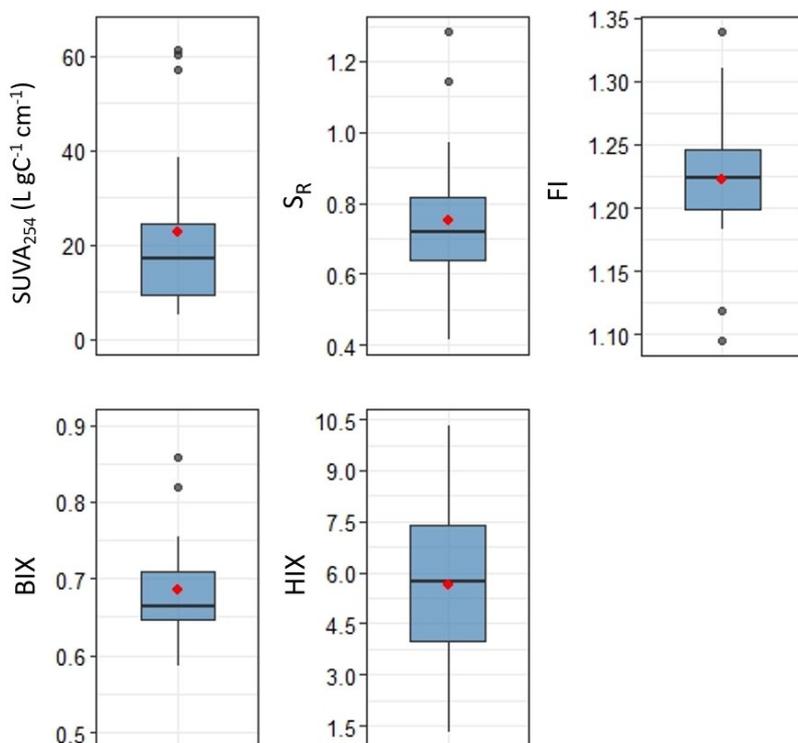


Fig. 1: Distribution of DOM optical parameters (mean of replicates), the red points represent the mean values of all the soils

3.4 Relationships between the variables

We performed a principal component analysis (PCA) of all 18 soil extracts to describe the relationships between the solution variables and to identify homogeneous groups. 64% of total variance is explained by the first two principal components (**Fig. 2a**). The first principal component revealed 44.5 % variance of data and was positively associated with Cu_{KCl} , Cu^{2+} , Fe concentrations, and SUVA_{254} , and was negatively associated with pH_{water} , pH_{KCl} and HIX. The second principal component explained 19.2 % of variance and was positively associated with C_{org} , the C:N ratio, and negatively associated with FI and BIX. Two groups can be distinguished on the principal plan plot (**Fig. 2b**): group 1 is composed of the eight most alkaline soils ($7.8 < \text{pH}_{\text{water}} < 8.3$), while group 2 is composed of the 10 most acidic soils ($6.3 < \text{pH}_{\text{water}} < 7.5$). The differences between the groups are mainly explained by the pH_{water} values (PCA correlation coefficient with Component 1: -0.92; with Component 2: 0.03). On the first axis, the soils in group 1 share high values of pH and HIX, and low values of Cu_{KCl} , Fe, and Cu^{2+} . The opposite trend was observed in group 2. On the second axis, soils in group 2 have more contrasted FI and BIX than those in group 1. Indeed, in group 1, FI values ranged from 1.20 to 1.31; and BIX values from 0.67 to 0.75. Comparatively, these indices show a larger range in group 2, with 1.10 - 1.34 for FI and 0.59 - 0.86 for BIX. Group 1 is composed of alkaline soils with low Cu concentrations in solution and relatively highly-humified DOM, while group 2 is composed of more acidic soils with high concentrations of Cu_{KCl} and Cu^{2+} , and contrasted contributions of microbial DOM.

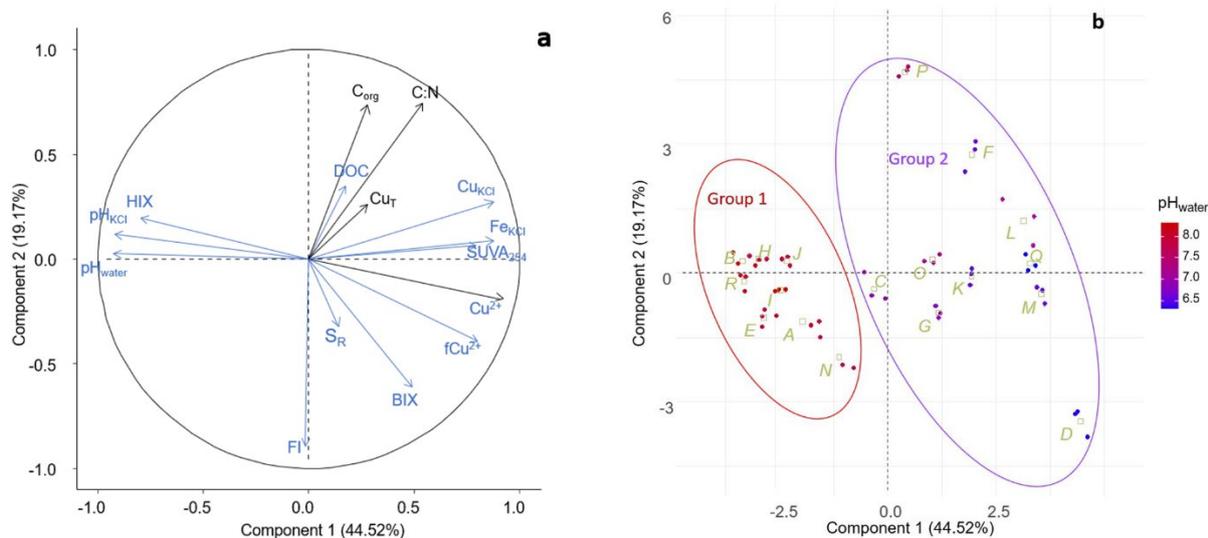


Fig. 2: Principal component analysis (PCA) of soil solution chemistry and Cu availability proxies in the dataset. All the variables except pH_{water} and pH_{KCl} were log-transformed. The correlation plot (a) shows the contribution of each variable to the two first principal components. The soil variables are shown in black, the extract variables in blue. Soil samples (grouped in triplicate) are coloured according to their pH_{water} values (b)

Pearson's correlation coefficients were analysed to describe the links between the variables measured in the soils and in the extracts (**Fig. 3**). pH_{water} and pH_{KCl} were strongly and positively correlated ($r=0.94$, $p < 0.01$). Total dissolved Fe and Cu concentrations were negatively correlated with pH (**Fig. 3**), with $r=0.77$, 0.73 ($p < 0.01$), respectively. **Fig. 4a** reports total Cu in extracts as a function of total Cu in the soils. We found no immediate relationship between Cu availability and the level of contamination. Cu_{KCl} concentrations globally increased with decreasing soil pH (**Fig. 4b**). This result confirms the fact that metals are more soluble in acidic soils, as reported by McBride et al. (1997). None of the Fe and Cu concentrations were significantly correlated with DOC (**Fig. 3**). Cu^{2+} was strongly linked to Cu_{KCl} ($r=0.82$, $p < 0.01$) (**Fig. 3**, **Fig. 4c**), showing that Cu solubilisation affects its concentration of free ions. A slightly positive relationship was found between pH_{KCl} and HIX (**Fig. 3**), suggesting that the most humified DOM was present in the most alkaline samples, as confirmed by the results of the PCA.

Cu^{2+} concentrations and fCu^{2+} were strongly linked to the pH of the extracts, with correlation coefficients of -0.94 and -0.91 respectively (**Fig. 3**, **Fig. 4d**), suggesting that Cu^{2+} decreased with increasing pH. The strong relationship between pH and Cu^{2+} has already been reported (McBride and Blasiak 1979, Sauvé et al. 1995, Laurent et al. 2020), confirming that pH is the main factor controlling Cu speciation in solution. When pH increases, DOM is more negatively charged due to the deprotonation of its functional groups. This promotes its complexation with Cu, leading to a drastic decrease in Cu^{2+} activity in solution (Bravin et al. 2009; Ren et al. 2015). Conversely, at low pH, competition for DOM binding sites is high between Cu^{2+} and H^+ , which promotes increasing Cu^{2+} activity. A pH above 6.5 seems to be the safety threshold for the soils in our collection in terms of Cu toxicity when Cu^{2+} is used as a proxy (**Fig. 4d**).

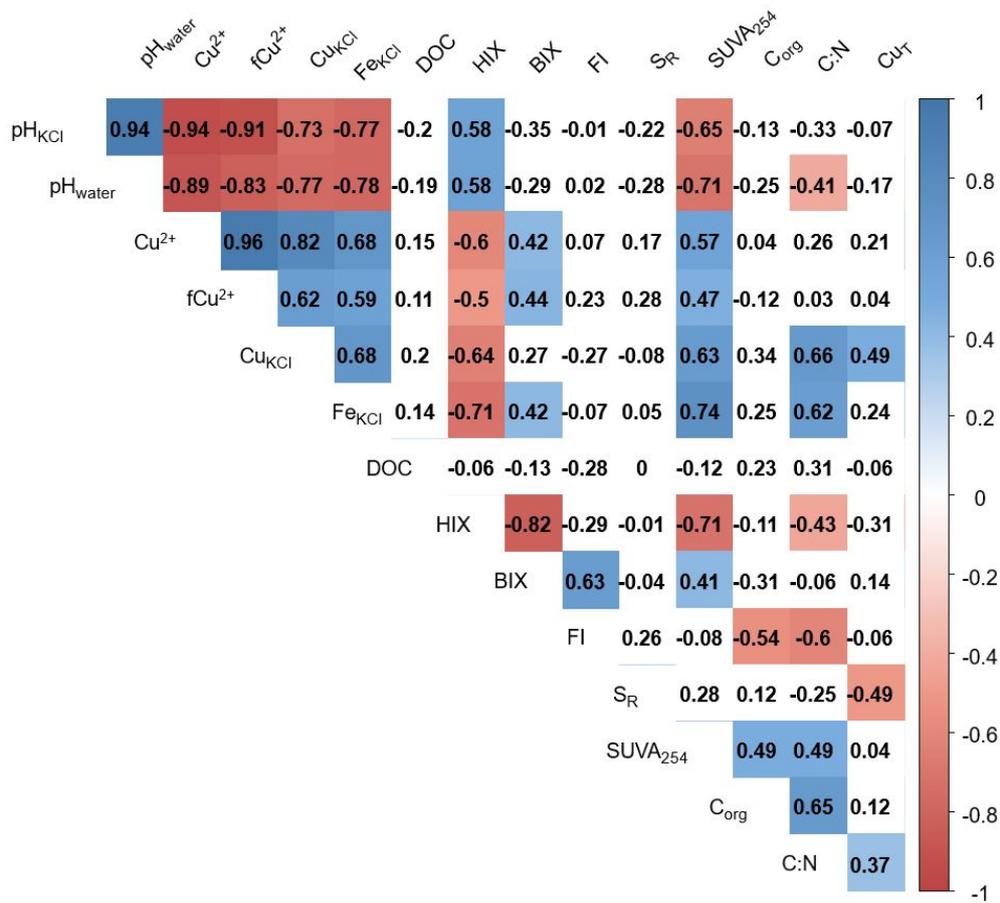


Fig. 3: Correlation matrix between soil properties (pH_{water}, C_{org}, C:N, Cu_T), solution parameters: pH of the extracts (pH_{KCl}), free ionic concentrations (Cu²⁺), free ionic fractions (fCu²⁺), total dissolved metals (Cu_{KCl}, Fe_{KCl}) and DOM properties (DOC, HIX, BIX, FI, S_R, SUVA₂₅₄). The colored boxes represent significant correlations (p < 0.01)

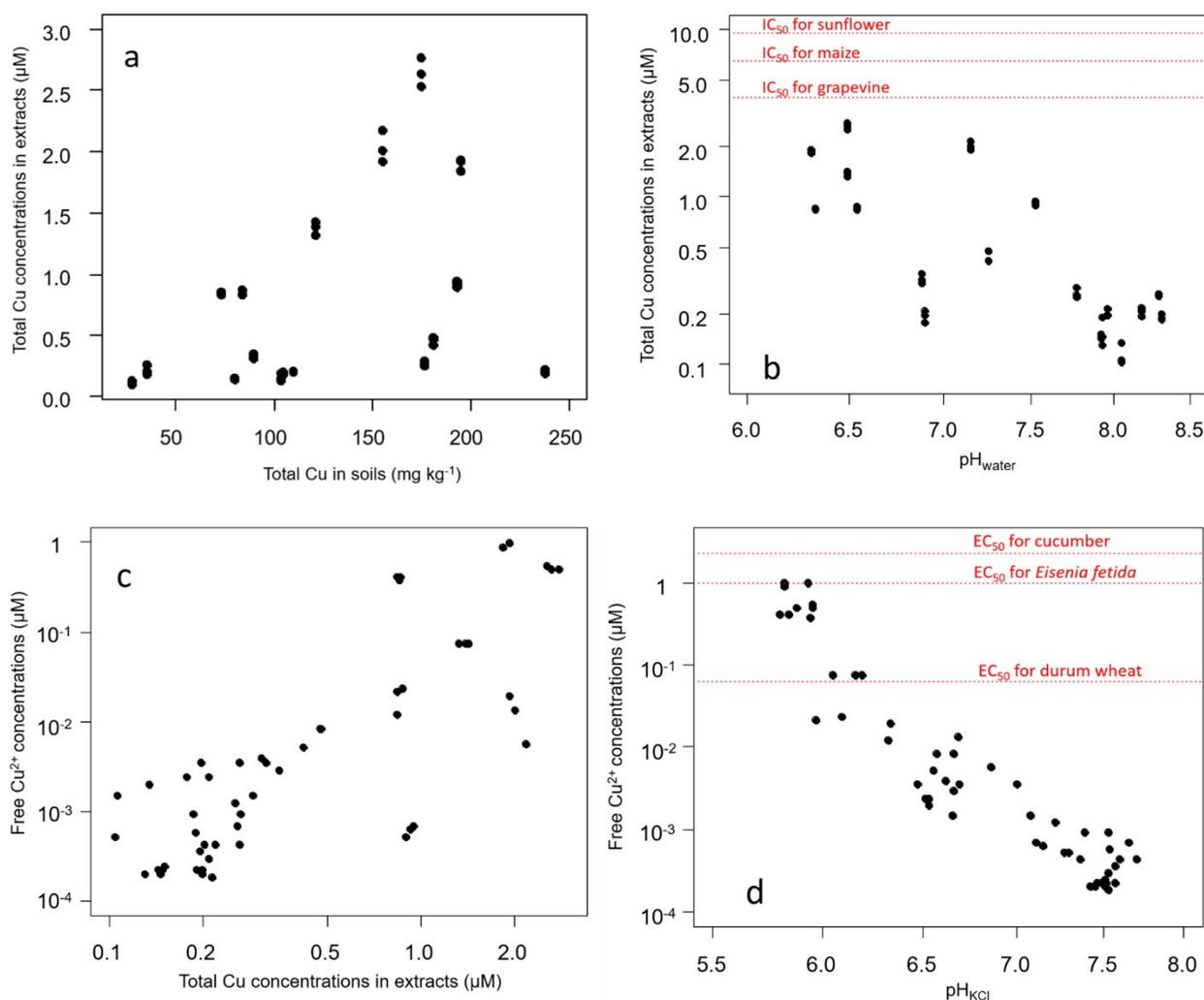


Fig. 4: Total Cu concentrations in extracts (Cu_{KCl}) as a function of total Cu in soils Cu_T (a) and pH of the soils (pH_{water}) (b); free ionic Cu concentrations (Cu^{2+}) as a function of total Cu concentrations in extracts (c) and pH of the extracts (pH_{KCl}) (d). The log-log plot is shown in (c) and only the y-axis is log-transformed in (b) and (d)

No tangible relationship was found between C_{org} values and DOC concentrations in the extracts (**Fig. 3**), meaning that the solubilisation rates of C_{org} may differ with the soil conditions or properties. None of DOM optical indices was significantly linked to DOC concentrations in the KCl extracts, indicating that DOM quality was not related to the quantity of DOM in solution. No significant relationship was found between the S_R and the $SUVA_{254}$ indices. $SUVA_{254}$ and HIX indices were negatively linked in this study ($r=-0.71$, $p < 0.01$) (**Fig. 3**). This negative relationship is all the more surprising as these indices are both related to DOM aromaticity. In the literature, $SUVA_{254}$ and HIX are generally positively correlated (He et al. 2016; Tang et al. 2019). However, such unexpected differences between these two indices have already been observed (Inamdar et al. 2011; Broder et al. 2017). Considering the differences in pH between soils, and given that fluorescence is pH-dependent, one may wonder if the variations observed in these two indices are not affected by the effect of pH on spectroscopic analyses. However, an impact on fluorescence analyses is unlikely in our range of soil pH, and would,

in any case, be less than differences due to the sources and composition of DOM (Hudson et al. 2007). The presence of protein-like fluorescence was observed in EEM spectra of only two soils (D and L) and cannot explain the negative correlation between HIX and SUVA₂₅₄. Moreover, it has been reported that SUVA₂₅₄ measurements may be subject to some bias since Fe, colloids, and other constituents also absorb at 254 nm (Weishaar et al. 2003; Yang and Hur 2014). Since there were huge differences in Fe concentrations among our samples (i.e., varying by a factor of 12, (Table S 1)), the SUVA₂₅₄ results in this study should be interpreted with caution. In a collection of samples with such contrasted concentrations of dissolved Fe as those measured in the present study, it would therefore not be appropriate to use the SUVA₂₅₄ index to assess DOM aromaticity, and HIX appears to be a more reliable tool for that purpose. No significant relationship was found between HIX and S_R, suggesting that, in our soil extracts, DOM condensation may not be directly related to its molecular size. Moreover, the negative correlation between HIX and BIX (Fig. 4b) ($r = -0.82$, $p < 0.01$) indicates that the most aromatic DOM is associated with older molecules derived from higher plants (Tang et al. 2019), which is quite consistent. No significant link was found between HIX and FI. Nevertheless, the positive relationship between BIX and FI ($r = 0.63$, $p < 0.01$) was not surprising and suggested that the soils with DOM originating from a microbial source were related to the highest autochthonous contributions, as reported in other works (Tang et al. 2019; Musadji et al. 2020).

Overall, these results indicate that the 18 soils sampled in our study differed in DOM quality even though they had similar concentrations of DOC. Given the significant affinity of Cu for DOM, these differences in DOM quality are expected to affect the geochemistry of Cu in solution.

3.5 Prediction of Cu availability using the properties of the soils and the extracts

The risk of Cu environmental toxicity could be better assessed if its availability could be predicted using the variables measured in the soil and in the soil solution. However, organisms often use mechanisms to resist the stress caused by Cu toxicity. For instance, some plants take up and sequester Cu in cells where it cannot cause harm (Küpper et al. 2009). Nevertheless, as Cu environmental availability is linked to its total (Cu_{KCl}) and ionic (Cu²⁺) concentrations in soil solutions, predicting these concentrations could enable more accurate evaluation of potential Cu toxicity to a certain extent (see Section 3.2). Table 3 shows the best models calculated to predict Cu_{KCl} and Cu²⁺ among the 18 vineyard soils sampled in this study.

Table 3: Best models for predicting Cu_{KCl} and Cu^{2+} in KCl extracts and associated statistics. R^2_{adj} : adjusted r-squared, RMSE: root mean square error, max VIF: maximum value of the variance inflation factor, N: number of observations

Statistical significance: *** for p-value < 0.001, ** for p-value < 0.01, * for p-value < 0.05

Models	R^2_{adj}	max VIF	RMSE (μM)	N
$\log_{10}\text{Cu}_{\text{KCl}} = -0.465^{***} \text{pH}_{\text{water}} + 3.066$ (a)	0.575	-	0.28	53
$-0.434^{***} \text{pH}_{\text{water}} + 0.615^{***} \log_{10}\text{Cu}_{\text{T}} + 1.598$ (b)	0.707	1.02	0.23	53
$-0.312^{***} \text{pH}_{\text{water}} + 0.443^{***} \log_{10}\text{Cu}_{\text{T}} - 7.362^{***} \log_{10}\text{FI} - 0.664^{***} \log_{10}\text{HIX} + 2.148$ (c)	0.832	1.91	0.17	53
$-1.751^{***} \text{pH}_{\text{KCl}} + 9.589$ (d)	0.883	-	0.40	53
$-1.380^{***} \text{pH}_{\text{KCl}} + 0.731^{***} \log_{10}\text{Cu}_{\text{KCl}} - 7.307$ (e)	0.912	2.30	0.34	53
$-1.316^{***} \text{pH}_{\text{KCl}} + 0.73^{***} \log_{10}\text{Cu}_{\text{KCl}} + 2.818 \log_{10}\text{BIX} + 7.338$ (f)	0.919	2.44	0.32	53

3.5.1 Prediction of total Cu in extracts Cu_{KCl}

Among the one-variable models tested to predict Cu_{KCl} , the model with pH_{water} (a) showed the best goodness of fit ($R^2_{\text{adj}} = 0.575$, Table 3). This suggests that pH is the main factor driving Cu solubilisation in the soils sampled in this study. However, this model showed marked dispersion of points around the 1:1 line (Fig. 5a), more visible in soils in group 1 than in soils in group 2. The prediction was better when Cu_{T} was added to pH (model (b)), the R^2_{adj} value raised to 0.71 and the RMSE decreased from 0.28 to 0.23 (Table 3). The points were then less dispersed than with the preceding model, except in soils in group 2 (Fig. 5b). The respective coefficients of pH and Cu_{T} are suitable for the presumed mechanisms. Indeed, it has been reported that metal desorption increases with a decrease in pH, which is why metals tend to be more soluble in acidic environments (McBride and Blasiak 1979; Degryse et al. 2009). Moreover, at higher pH, Cu oxyhydroxides or carbonates may form and precipitate thereby reducing the Cu in solution (McBride 1989). As expected, the model showed that the higher the Cu_{T} , the higher the concentration of soluble Cu in solution (Cu_{KCl}). Sauvé et al. (1997) underlined the importance of pH and Cu_{T} in Cu solubilisation, but in the reverse hierarchy. These authors found that in 66 soils with diverse sources of Cu contamination, 90 % of variation in soluble Cu was explained by total Cu in the soils and the importance of pH was minimal. This could be explained by the wider range of Cu_{T} in their study (14-3000 mg kg⁻¹) which reinforced the contribution of Cu_{T} in predicting soluble Cu.

The concentration of DOC did not appear in the best models, presumably because of its limited variability in our initial dataset. However, Cu_{KCl} predictability was dramatically improved when DOM quality parameters were added as predictors in addition to pH and Cu_{T} . This suggests that in the present study, Cu availability depended more on DOM characteristics than on its concentration. Among all the DOM indices tested in the regressions, only HIX and FI emerged significantly, and the

best prediction was obtained by equation (c) (**Table 3**, **Fig. 5c**), which explained 83.2 % of variance, showing good accuracy of this model for the prediction of Cu_{KCl} . Compared to model (b), model (c) produced lower RMSE (0.17) and a slope closer to 1 (0.85) (**Fig. 5c**). The contributions of pH_{water} , Cu_T , FI and HIX were all significant in the model ($p < 0.001$) (**Table 3**). The variance inflation factor (VIF) did not identify correlations between the predictors ($VIF < 2.3$). HIX and FI were both expressed with negative coefficients in the model, suggesting that the solubilisation of Cu is enhanced with lowly-condensed plant-derived DOM molecules. This suggests that, in the vineyard soils studied here, molecules with low aromaticity have the most affinity for Cu for its solubilisation. This finding contradicts previous studies suggesting that the most aromatic DOM had higher affinity for Cu and promoted its solubilisation through complexation (Amery et al. 2007; Amery et al. 2008; Araújo et al. 2019). In the present study, DOM composed of more hydrophilic molecules may have higher Cu-binding capacity because of its higher proportion of O-containing functional groups (hydroxyl, carboxylic acid, sulfonic acid and amine) than aromatic and hydrophobic substances (Baham et al. 1978; Leenheer 1981). Moreover, the negative coefficient of FI in the model suggests a higher plant origin for the DOM components that bind Cu. Our results are consistent with those of He et al. (2016), who found higher concentrations of heavy metals in sediment solutions with lower aromatic DOM molecules, which the authors linked to amino acids. Moreover, it has previously been reported that the ability of DOM hydrophilic and low aromatic components to transport Cu is greater than that of hydrophobic molecules (Han and Thompson 1999; 2003). These authors explained that low aromatic and hydrophilic molecules were more mobile, while aromatic and complex components tended to be adsorbed on soil particles.

3.5.2 Prediction of free ionic Cu^{2+}

Among the models with just one predictor, the one with pH_{KCl} (model (d)) appeared to be the most effective and explained 88.3 % of Cu^{2+} variance (**Table 3**). The RMSE value was low (0.4), implying good accuracy of the prediction (**Fig. 5d**). The high R^2_{adj} (0.88) of model (d) highlights the importance of pH in predicting Cu^{2+} concentrations.

We hypothesised that free Cu^{2+} may be linked to the solubility of Cu, as we found a positive relationship between Cu^{2+} and Cu_{KCl} (**Fig. 4c**). When adding Cu_{KCl} to pH_{KCl} as predictors of Cu^{2+} (model (e)), the R^2_{adj} increased from 0.88 to 0.91. This slight improvement can be observed in **Fig. 5e**. The corresponding VIF was the maximum receivable (2.3), certainly due to the relative effect of pH on Cu solubilisation. The contributions of pH_{KCl} and Cu_{KCl} were all significant ($p < 0.001$) in explaining Cu^{2+} variability. The coefficients in the model suggest that Cu^{2+} increases with Cu_{KCl} , and decreasing pH. Compared to model (d), model (e) was more accurate with a lower RMSE (0.34 instead of 0.4) (**Table 3**).

BIX was the DOM index that appeared in the best three-variables model (model (f), **Table 3**). Models with more than three variables did not present any statistical improvement (data not shown). In model (f), adding BIX to pH_{KCl} and Cu_{KCl} did not enhance the effectiveness of the prediction compared to model (e) (**Fig. 5f**), with similar R^2_{adj} and RMSE (0.92 and 0.32 respectively) (**Table 3**). Even though

the contribution of BIX to the model was significant ($p < 0.05$), the addition of BIX was not needed to explain the variability of our collection of samples. Moreover, the max VIF of model (f) (2.44) was higher than the fixed threshold of 2.3, illustrating multicollinearity between the predictors that probably weakens the stability of the prediction. Taken together, these results suggest that including DOM indices does not improve the modelling of Cu^{2+} and that only pH_{KCl} and Cu_{KCl} were needed.

In the literature, pH is widely reported to play an important role explaining free ionic Cu^{2+} activities and the log-log relationship between these two variables is usually linear (McBride and Blasiak 1979; Sauvé et al. 1995; McBride et al. 1997; Sauvé et al. 1997; Bravin et al. 2009). Sauvé et al. (1997) proposed the following equation to predict Cu^{2+} activity in CaCl_2 extracts of a collection of wide Cu-contaminated soils: $\text{pCu} = -1.7 \log_{10}\text{Cu}_T + 1.4 \text{pH} + 3.4$. In contrast to our study, the OM parameters (concentrations and quality) were not included in the model calculations and the authors underlined the importance of the degree of Cu contamination in predicting Cu^{2+} . However, interestingly, the pH coefficient in our study (model (e)) is consistent with the results of McBride (1989) who reported that slopes for $\log\text{Cu}^{2+}$ - pH plots are generally lower than 2. This suggests that pH plays a constant role in Cu^{2+} prediction. But the optical parameters describing the quality of DOM in soil solutions were of no use in explaining the concentrations of Cu^{2+} .

3.6 Influence of DOC composition on Cu speciation

We calculated Cu speciation in solution based on thermodynamic models and on several hypotheses concerning DOM composition. We found that considering DOM as 100 % HA led to underprediction of free Cu^{2+} compared to experimental observations in all samples (**Fig. S 5**). Considering all DOM as FA produced better results, but even using only 65 % of active DOM as FA (a widespread assumption in similar studies) resulted in marked discrepancies between model and experimental results. This observation - made here using the NICA-Donnan model to describe ion binding to DOM - is in agreement with previous estimations made using the Windermere humic aqueous model (WHAM) on a large set of soil solutions (Djae et al. 2017).

For the model results to fit the experimental observations, the percentage of active DOM, rDOM, was adjusted separately for each sample. The values of rDOM obtained ranged between 0.10 and 1.68, reflecting the wide variability of the active pool within DOM. This is consistent with the physically meaningful range of 35-215 % estimated by Djae et al. (2017). The variations in rDOM were compared to the variations in the chemical and optical parameters, but no multilinear regression model could be established (data not shown).

The amount of Cu bound to carboxylic or phenolic groups of DOM can be estimated using thermodynamic modelling. Results show that binding to phenolic groups becomes predominant above pH 7.4 (**Fig. S 6**). This suggests that these DOM binding groups, deprotonated at alkaline pH, have a very high affinity for Cu. Thus, in alkaline soils, the nature of DOM binding sites will be important in controlling Cu speciation.

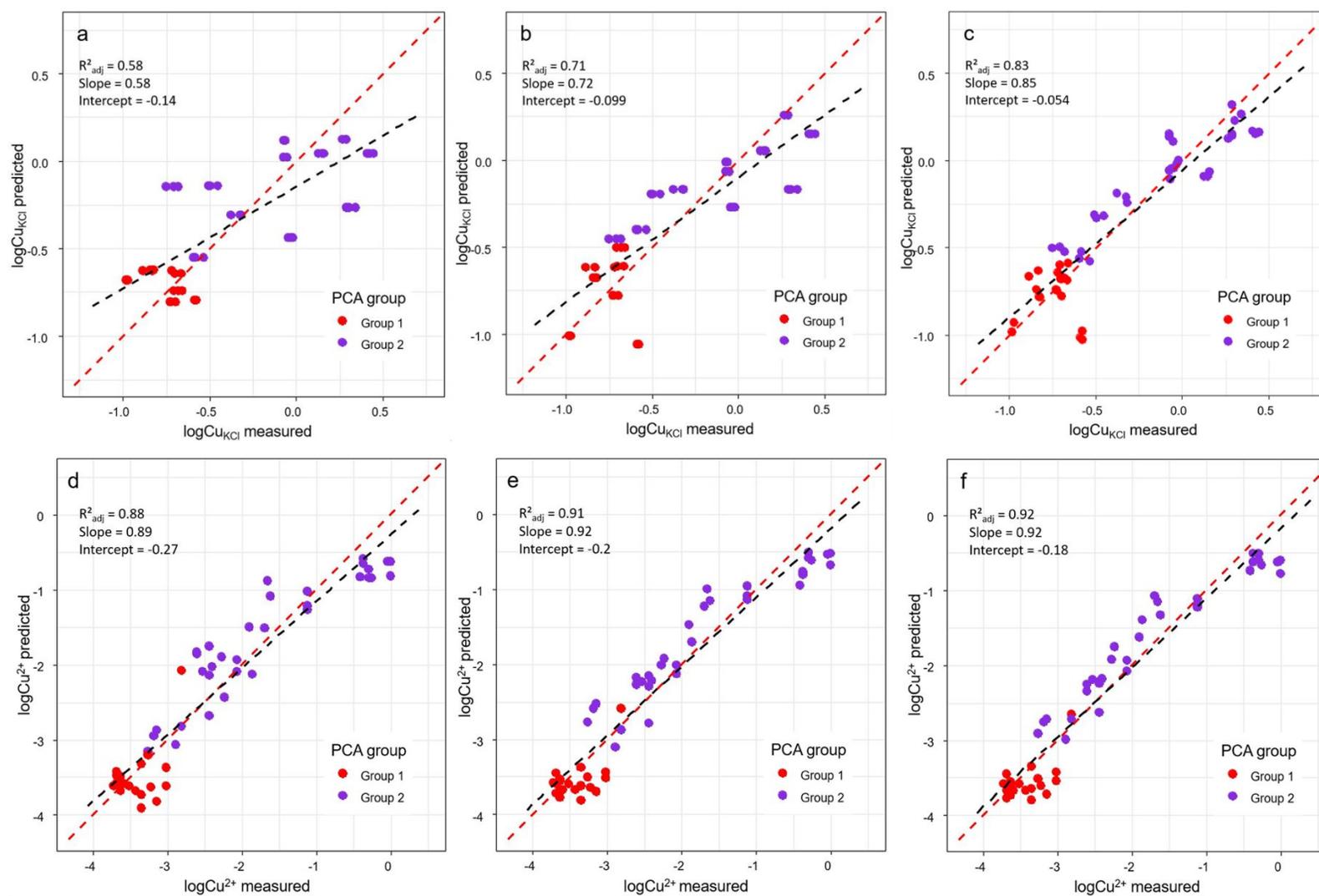


Fig. 5: Comparison of the multilinear models predicting Cu_{KCl} (a, b, c) and Cu^{2+} concentrations (d, e, f) in the 0.01 M KCl extracts. The dashed red line represents the 1:1 line, the dashed black line represents the regression line

4 Conclusions

The main goal of this work was to assess the contribution of DOM spectroscopic indices to predicting two Cu availability proxies in 18 organic vineyard soils. Our results showed that in the KCl extracts, the total concentration of Cu varied 23-fold while that of free ionic Cu^{2+} varied 4,600-fold among soils, pointing to wide diversity of soils in terms of Cu availability. Four soils had concentrations of Cu^{2+} higher than the toxicity levels for organisms reported in the literature. These samples were considered as potentially harmful for vineyard soil organisms.

Our results also showed that Cu environmental availability was weakly related to the level of Cu contamination in the soils. pH was the main factor controlling Cu environmental availability, as it was closely and positively correlated with the concentrations of total Cu and free ionic Cu^{2+} measured in KCl extracts. Thus, in theory, toxicity problems can occur even in moderately Cu-contaminated soils when the soils are particularly acidic. It would thus be safer to maintain the pH above 6.5. To this end, liming is possible but should be applied with caution, so as not to jeopardise plant uptake of other nutrients like Fe, whose availability is low at alkaline pH.

This work highlighted the fact that even though the DOC concentrations were similar among the soils, noticeable differences were found in DOM quality, as assessed by optical spectroscopy. Absorbance and fluorescence analyses are thus appropriate to identify these differences in chromophoric and fluorescent DOM in soils.

The prediction of total Cu in KCl extracts was clearly improved when DOM spectral indices (HIX and FI) were taken into account, in addition to pH and Cu_T . This study thus emphasizes that the quality of DOM affects the availability of Cu in the soil more than its quantity. Although this finding now needs to be tested on a wider dataset (with different sources of contamination), it suggests that organic management in Cu-contaminated vineyards needs to be redesigned, to better control quality of dissolved organic matter production as a function of the nature of organic matter amendments.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was financially supported by the CNRS-INSU EC2CO program under the 'INTRIGUE' project, by Bordeaux Sciences Agro Institute of Agricultural Sciences through the PhD scholarship of Frédéric Ouedraogo and by the French National Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE).

Authors' contributions

Frédéric Ouedraogo: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing-original draft

Jean-Yves Cornu: Supervision, Writing-original draft

Noémie Janot: Formal analysis, Supervision, Writing-review & editing

Christophe Nguyen: Formal analysis, Writing-review & editing

Mahaut Sourzac: Investigation

Edith Parlanti: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing-original draft

Laurence Denaix: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing-original draft

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank Thierry Robert for help in soil sampling, Sylvie Bussière for determining the DOC concentration in soil extracts, Cécile Coriou for technical and human support in ICP-OES measurements and Sylvie Millin for C_{org} and N determinations. The authors would also like to thank Dario Omanović for his assistance in adapting the TreatEEM program and Nicolas Fanin for his support throughout the PhD research of Frédéric Ouedraogo.

References

- Amery F, Degryse F, Cheyns K, De Troyer I, Mertens J, Merckx R, Smolders E (2008) The UV-absorbance of dissolved organic matter predicts the fivefold variation in its affinity for mobilizing Cu in an agricultural soil horizon. *European Journal of Soil Science* 59(6):1087-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01078.x>
- Amery F, Degryse F, Degeling W, Smolders E, Merckx R (2007) The Copper-Mobilizing-Potential of Dissolved Organic Matter in Soils Varies 10-Fold Depending on Soil Incubation and Extraction Procedures. *Environmental Science & Technology* 41(7):2277-2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
- Andrivon D, Bardin M, Bertrand C, Brun L, Daire X, Fabre F, Gary C, Montarry J, Nicot P, Reignault P, Tamm L, Savini I (2018) Can organic agriculture give up copper as a crop protection product? Synthesis of the scientific assessment report. Institut national de la recherche agronomique (INRA) :68. <https://doi.org/hal-02944872>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferracciú Alleoni LR (2019) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Baham J, Ball NB, Sposito G (1978) Gel Filtration Studies of Trace Metal-Fulvic Acid Solutions Extracted From Sewage Sludges. *Journal of Environmental Quality* 7(2):181-188. <https://doi.org/10.2134/jeq1978.00472425000700020006x>
- Baken S, Degryse F, Verheyen L, Merckx R, Smolders E (2011) Metal Complexation Properties of Freshwater Dissolved Organic Matter Are Explained by Its Aromaticity and by Anthropogenic Ligands. *Environ Sci Technol* 45(7):2584-2590. <https://doi.org/10.1021/es103532a>
- Ballabio C, Panagos P, Lugato E, Huang J-H, Orgiazzi A, Jones A, Fernández-Ugalde O, Borrelli P, Montanarella L (2018) Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. *Science of The Total Environment* 636:282-298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.268>
- Bravin MN, Le Merrer B, Denaix L, Schneider A, Hinsinger P (2010) Copper uptake kinetics in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) as compared with soil's ability to supply copper. *Plant Soil* 331(1-2):91-104. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0235-3>
- Bravin MN, Martí AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalinisation – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318(1):257-268. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9835-6>
- Broder T, Knorr K-H, Biester H (2017) Changes in dissolved organic matter quality in a peatland and forest headwater stream as a function of seasonality and hydrologic conditions. *Hydrology and Earth System Sciences* 21(4):2035-2051. <https://doi.org/10.5194/hess-21-2035-2017>
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P, Pépin M (2001) Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* 111(2):293-302. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00067-1)
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B, Hinsinger P (2003) Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123(2):229-238. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00374-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00374-3)

- Coll P, Le Cadre E, Blanchart E, Hinsinger P, Villenave C (2011) Organic viticulture and soil quality: A long-term study in Southern France. *Applied Soil Ecology* :S0929139311001570. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.013>
- Cornu JY, Denaix L, Schneider A, Pellerin S (2007) Temporal evolution of redox processes and free Cd dynamics in a metal-contaminated soil after rewetting. *Chemosphere* 70(2):306-314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.003>
- Cornu JY, Randriamamonjy S, Gutierrez M, Rocco K, Gaudin P, Ouerdane L, Lebeau T (2019) Copper phytoavailability in vineyard topsoils as affected by pyoverdine supply. *Chemosphere* 236:124347. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124347>
- Cory R, Mcknight D (2005) Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. *Environmental science & technology* 39:8142-9. <https://doi.org/10.1021/es0506962>
- Daouk S, Frege C, Blanc N, Mounier S, Redon R, Merdy P, Lucas Y, Pfeifer H-R (2015) Fluorescence spectroscopy to study dissolved organic matter interactions with agrochemicals applied in Swiss vineyards. *Environ Sci Pollut Res* 22(12):9284-9292. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4086-6>
- Degryse F, Smolders E, Parker DR (2009) Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications - a review. *European Journal of Soil Science* 60(4):590-612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01142.x>
- Derrien M, Yang L, Hur J (2017) Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: A review. *Water Research* 112:58-71. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.023>
- Djae T, Bravin MN, Garnier C, Doelsch E (2017) Parameterizing the binding properties of dissolved organic matter with default values skews the prediction of copper solution speciation and ecotoxicity in soil: Heterogeneity in reactive DOM impacts soil Cu ecotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(4):898-905. <https://doi.org/10.1002/etc.3622>
- El Hadri H, Chéry P, Jalabert S, Lee A, Potin-Gautier M, Lespes G (2012) Assessment of diffuse contamination of agricultural soil by copper in Aquitaine region by using French national databases. *Science of The Total Environment* 441:239-247. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.070>
- European Food Safety Authority (EFSA), Arena M, Auteri D, Barmaz S, Bellisai G, Brancato A, Brocca D, Bura L, Byers H, Chiusolo A, Court Marques D, Crivellente F, De Lentdecker C, Egsmose M, Erdos Z, Fait G, Ferreira L, Goumenou M, Greco L, Ippolito A, Istace F, Jarrah S, Kardassi D, Leuschner R, Lythgo C, Magrans JO, Medina P, Miron I, Molnar T, Nougadere A, Padovani L, Parra Morte JM, Pedersen R, Reich H, Sacchi A, Santos M, Serafimova R, Sharp R, Stanek A, Streissl F, Sturma J, Szentes C, Tarazona J, Terron A, Theobald A, Vagenende B, Verani A, Villamar-Bouza L (2018) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds copper(I), copper(II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture. *EFSA Journal* 16(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5152>
- Fernández-Calviño D, Nóvoa-Muñoz JC, Díaz-Raviña M, Arias-Estévez M (2009) Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). *Geoderma* 153(1-2):119-129. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.07.024>
- Fernández-Calviño D, Soler-Rovira P, Polo A, Díaz-Raviña M, Arias-Estévez M, Plaza C (2010) Enzyme activities in vineyard soils long-term treated with copper-based fungicides. *Soil Biology and Biochemistry* 42(12):2119-2127. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.007>

- Ferreira PAA, Marchezan C, Ceretta CA, Tarouco CP, Lourenzi CR, Silva LS, Soriani HH, Nicoloso FT, Cesco S, Mimmo T, Brunetto G (2018) Soil amendment as a strategy for the growth of young vines when replanting vineyards in soils with high copper content. *Plant Physiology and Biochemistry* 126:152-162. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.003>
- Flores-Álvarez JM, González I, García-de la Rosa LA, Mancilla-Peña F, Reyes-Gómez J (2011) Carbon paste electrodes modified with biosolids, soils and biocomposites utilized to study the interaction between organic matter and copper. *Journal of Environmental Management* 92(3):448-456. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.08.033>
- Fox J, Weisberg S (2019) *An R companion to applied regression*, Third Edition. Sage Publications
- Fuentes M, Olaetxea M, Baigorri R, Zamarreño AM, Etienne P, Laîné P, Ourry A, Yvin J-C, Garcia-Mina JM (2013) Main binding sites involved in Fe(III) and Cu(II) complexation in humic-based structures. *Journal of Geochemical Exploration* 129:14-17. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.12.015>
- Gonzaga MIS, Matias MI de AS, Andrade KR, Jesus AN de, Cunha G da C, Andrade RS de, Santos JC de J (2020) Aged biochar changed copper availability and distribution among soil fractions and influenced corn seed germination in a copper-contaminated soil. *Chemosphere* 240:124828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124828>
- Guo X, Zhu N, Chen L, Yuan D, He L (2015) Characterizing the fluorescent properties and copper complexation of dissolved organic matter in saline-alkali soils using fluorescence excitation-emission matrix and parallel factor analysis. *J Soils Sediments* 15(7):1473-1482. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1113-7>
- Han N, Thompson ML (1999) Copper-Binding Ability of Dissolved Organic Matter Derived from Anaerobically Digested Biosolids. *Journal of Environmental Quality* 28(3):939-944. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800030026x>
- Han N, Thompson ML (2003) Impact of Dissolved Organic Matter on Copper Mobility in Aquifer Material. *Journal of Environmental Quality* 32(5):1829-1836. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1829>
- Harmsen J (2007) Measuring Bioavailability: From a Scientific Approach to Standard Methods. *Journal of environmental quality* 36:1420-8. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0492>
- He W, Lee J-H, Hur J (2016) Anthropogenic signature of sediment organic matter probed by UV-Visible and fluorescence spectroscopy and the association with heavy metal enrichment. *Chemosphere* 150:184-193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.116>
- Helling B, Reinecke SA, Reinecke AJ (2000) Effects of the Fungicide Copper Oxychloride on the Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46(1):108-116. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1880>
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0955>
- Hudson N, Baker A, Reynolds D (2007) Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters—a review. *River Research and Applications* 23(6):631-649. <https://doi.org/10.1002/rra.1005>
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40(6):706-719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Husson F, Josse J, Lê S (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>

- Inamdar S, Singh S, Dutta S, Levia D, Mitchell M, Scott D, Bais H, McHale P (2011) Fluorescence characteristics and sources of dissolved organic matter for stream water during storm events in a forested mid-Atlantic watershed. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 116(G3). <https://doi.org/10.1029/2011JG001735>
- ISO 2006 Soil quality – Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials
- Jaffé R, Cawley KM, Yamashita Y (2014) Applications of Excitation Emission Matrix Fluorescence with Parallel Factor Analysis (EEM-PARAFAC) in Assessing Environmental Dynamics of Natural Dissolved Organic Matter (DOM) in Aquatic Environments: A Review. In: Rosario-Ortiz F (ed) ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp 27-73
- Jones D, Willett V (2006) Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38(5):991-999. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.08.012>
- Juang K-W, Lee Y-I, Lai H-Y, Wang C-H, Chen B-C (2012) Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environ Sci Pollut Res Int* 19(4):1315-1322. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0657-3>
- Kader M, Lamb DT, Wang L, Megharaj M, Naidu R (2016) Predicting copper phytotoxicity based on pore-water pCu. *Ecotoxicology* 25(3):481-490. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1605-7>
- Kalbitz K, Schmerwitz J, Schwesig D, Matzner E (2003) Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113(3):273-291. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00365-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00365-8)
- Karimi B, Masson V, Guiland C, Leroy E, Pellegrinelli S, Giboulot E, Maron P-A, Ranjard L (2021) Ecotoxicity of copper input and accumulation for soil biodiversity in vineyards. *Environ Chem Lett*. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01155-x>
- Kelepertzis E, Massas I, Fligos G, Panagiotou M, Argyraki A (2017) Copper accumulation in vineyard soils from Nemea, Greece. *Bulletin of the Geological Society of Greece* 50:2192. <https://doi.org/10.12681/bgsg.14275>
- Kikuchi T, Fujii M, Terao K, Jiwei R, Lee YP, Yoshimura C (2017) Correlations between aromaticity of dissolved organic matter and trace metal concentrations in natural and effluent waters: A case study in the Sagami River Basin, Japan. *Science of The Total Environment* 576:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.068>
- Kinniburgh DG, Milne CJ, Benedetti MF, Pinheiro JP, Filius J, Koopal LK, Van Riemsdijk WH (1996) Metal Ion Binding by Humic Acid: Application of the NICA-Donnan Model. *Environ Sci Technol* 30(5):1687-1698. <https://doi.org/10.1021/es950695h>
- Kolbas A, Marchand L, Herzig R, Nehnevajova E, Mench M (2014) Phenotypic seedling responses of a metal-tolerant mutant line of sunflower growing on a Cu-contaminated soil series: potential uses for biomonitoring of Cu exposure and phytoremediation. *Plant Soil* 376(1):377-397. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1974-8>
- Komárek M, Čadková E, Chrástný V, Bordas F, Bollinger J-C (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* 36(1):138-151. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005>
- Koopal LK, Saito T, Pinheiro JP, Riemsdijk WH van (2005) Ion binding to natural organic matter: General considerations and the NICA-Donnan model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 265(1):40-54. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.11.050>

- Küpper H, Götz B, Mijovilovich A, Küpper FC, Meyer-Klaucke W (2009) Complexation and Toxicity of Copper in Higher Plants. I. Characterization of Copper Accumulation, Speciation, and Toxicity in *Crassula helmsii* as a New Copper Accumulator. *Plant Physiology* 151(2):702-714. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139717>
- Leenheer JA (1981) Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environ Sci Technol* 15(5):578-587. <https://doi.org/10.1021/es00087a010>
- Li S, Li M, Wang G, Sun X, Xi B, Hu Z (2019) Compositional and chemical characteristics of dissolved organic matter in various types of cropped and natural Chinese soils. *Chem Biol Technol Agric* 6(1):20. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0158-z>
- Manceau A, Matynia A (2010) The nature of Cu bonding to natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9):2556-2580. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.01.027>
- Meeussen JCL (2003) ORCHESTRA: An Object-Oriented Framework for Implementing Chemical Equilibrium Models. *Environ Sci Technol* 37(6):1175-1182. <https://doi.org/10.1021/es025597s>
- McBride M, Sauve S, Hendershot W (1997) Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science* 48(2):337-346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1997.tb00554.x>
- McBride MB (1989) Reactions Controlling Heavy Metal Solubility in Soils. In: Stewart BA (ed) *Advances in Soil Science: Volume 10*. Springer, New York, NY, pp 1-56
- McBride MB, Blasiak JJ (1979) Zinc and Copper Solubility as a Function of pH in an Acid Soil. *Soil Science Society of America Journal* 43(5):866. <https://doi.org/10.2136/sssaj1979.03615995004300050009x>
- McKnight DM, Boyer EW, Westerhoff PK, Doran PT, Kulbe T, Andersen DT (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46(1):38-48. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.1.0038>
- Michaud AM, Bravin MN, Galleguillos M, Hinsinger P (2007) Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil* 298(1):99-111. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9343-0>
- Michaud AM, Chappellaz C, Hinsinger P (2008) Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant Soil* 310(1):151-165. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9642-0>
- Milne CJ, Kinniburgh DG, Tipping E (2001) Generic NICA-Donnan Model Parameters for Proton Binding by Humic Substances. *Environ Sci Technol* 35(10):2049-2059. <https://doi.org/10.1021/es000123j>
- Milne CJ, Kinniburgh DG, van Riemsdijk WH, Tipping E (2003) Generic NICA-Donnan Model Parameters for Metal-Ion Binding by Humic Substances. *Environ Sci Technol* 37(5):958-971. <https://doi.org/10.1021/es0258879>
- Musadji NY, Lemée L, Caner L, Porel G, Poinot P, Geffroy-Rodier C (2020) Spectral characteristics of soil dissolved organic matter: Long-term effects of exogenous organic matter on soil organic matter and spatial-temporal changes. *Chemosphere* 240:124808. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124808>
- Navel A, Martins JMF (2014) Effect of long term organic amendments and vegetation of vineyard soils on the microscale distribution and biogeochemistry of copper. *Science of The Total Environment* 466-467:681-689. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.064>

- Ohno T, Fernandez IJ, Hiradate S, Sherman JF (2007) Effects of soil acidification and forest type on water soluble soil organic matter properties. *Geoderma* 140(1):176-187. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.04.004>
- Oustriere N, Marchand L, Galland W, Gabbon L, Lottier N, Motelica M, Mench M (2016) Influence of biochars, compost and iron grit, alone and in combination, on copper solubility and phytotoxicity in a Cu-contaminated soil from a wood preservation site. *Science of The Total Environment* 566-567:816-825. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.091>
- Ouzounidou G (1995) Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress—I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environmental and Experimental Botany* 35(2):167-176. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)00049-B](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)00049-B)
- Parat C, Chaussod R, Leveque J, Dousset S, Andreux F (2002) The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *Eur J Soil Science* 53(4):663-670. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2002.00478.x>
- Qiu H, Vijver MG, He E, Peijnenburg WJGM (2013) Predicting copper toxicity to different earthworm species using a multicomponent Freundlich model. *Environ Sci Technol* 47(9):4796-4803. <https://doi.org/10.1021/es305240n>
- R core Team (2020) R A Lang. *Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput*, Vienna, Austria URL. <https://www.r-project.org/>
- Recatalá L, Sacristán D, Arbelo C, Sánchez J (2012) Can a Single and Unique Cu Soil Quality Standard be Valid for Different Mediterranean Agricultural Soils under an Accumulator Crop? *Water, Air, & Soil Pollution* 223. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0960-0>
- Ren Z-L, Tella M, Bravin MN, Comans RNJ, Dai J, Garnier J-M, Sivry Y, Doelsch E, Straathof A, Benedetti MF (2015) Effect of dissolved organic matter composition on metal speciation in soil solutions. *Chemical Geology* 398:61-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.01.020>
- Ritsema CJ (1993) Estimation of activity coefficients of individual ions in solutions with ionic strengths up to 0.3 mol dm⁻³. *Journal of Soil Science* 44(2):307-315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1993.tb00454.x>
- Romero CM, Engel RE, D'Andrilli J, Chen C, Zabinski C, Miller PR, Wallander R (2017) Bulk optical characterization of dissolved organic matter from semiarid wheat-based cropping systems. *Geoderma* 306:40-49. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.06.029>
- Römken PFAM, Dolfig J (1998) Effect of Ca on the Solubility and Molecular Size Distribution of DOC and Cu Binding in Soil Solution Samples. *Environmental Science & Technology* 32(3):363-369. <https://doi.org/10.1021/es970437f>
- Sacristán D, Viscarra Rossel RA, Recatalá L (2016) Proximal sensing of Cu in soil and lettuce using portable X-ray fluorescence spectrometry. *Geoderma* 265:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.11.008>
- Sauvé S, Cook N, Hendershot WH, McBride MB (1996) Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environmental Pollution* 94(2):153-157. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00081-4)
- Sauvé S, Dumestre A, McBride M, Hendershot W (1998) Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of Pb²⁺ and Cu²⁺. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(8):1481-1489. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170808>
- Sauvé S, Hendershot W, Allen HE (2000) Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ Sci Technol* 34(7):1125-1131. <https://doi.org/10.1021/es9907764>

- Sauvé S, McBride MB, Hendershot WH (1995) Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29(3):373-379. <https://doi.org/10.1007/BF00212503>
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH (1997) Copper Solubility and Speciation of In Situ Contaminated Soils: Effects of Copper Level, pH and Organic Matter. *Water, Air, & Soil Pollution* 100(1):133-149. <https://doi.org/10.1023/A:1018312109677>
- Sun R, Song C, Sun Y, Wang Q, Liu H, Wang J (2020) Agricultural Soil Organic Matters and Microbiome Are Shaped by Management and Hedgerows. *Agronomy* 10(9):1316. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091316>
- Supriatin S, Terrones CA, Bussink W, Weng L (2015) Drying effects on selenium and copper in 0.01M calcium chloride soil extractions. *Geoderma* 255-256:104-114. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.04.021>
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM (1979) Decomposition in terrestrial ecosystems. *Studies in ecology (USA)*
- Tait TN, Cooper CA, McGeer JC, Wood CM, Smith DS (2016) Influence of dissolved organic matter (DOM) source on copper speciation and toxicity to *Brachionus plicatilis*. *Environ Chem* 13(3):496. <https://doi.org/10.1071/EN15123>
- Tang J, Wang W, Yang L, Cao C, Li X (2019) Variation in quantity and chemical composition of soil dissolved organic matter in a peri-urban critical zone observatory watershed in Eastern China. *Science of The Total Environment* 688:622-631. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.270>
- Temminghoff EJM, Van Der Zee SE a. TM, Keizer MG (1994) The influence of pH on the desorption and speciation of copper in a sandy soil. *Soil Science* 158(6):398-408
- Trevors JT, Cotter CM (1990) Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology* 6(2):77-84. <https://doi.org/10.1007/BF01576426>
- Verweij W, Glazewski R, Haan HD (1992) Speciation of copper in relation to its bioavailability. *Chemical Speciation & Bioavailability* 4(2):43-51. <https://doi.org/10.1080/09542299.1992.11083177>
- Wei T, Simko V (2021) R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix. <https://github.com/taiyun/corrplot>. Accessed 5 Jan 2021
- Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fujii R, Mopper K (2003) Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environ Sci Technol* 37(20):4702-4708. <https://doi.org/10.1021/es030360x>
- Weng L, Temminghoff EJM, Lofts S, Tipping E, Van Riemsdijk WH (2002) Complexation with Dissolved Organic Matter and Solubility Control of Heavy Metals in a Sandy Soil. *Environmental Science & Technology* 36(22):4804-4810. <https://doi.org/10.1021/es0200084>
- Xu H, Zou L, Guan D, Li W, Jiang H (2019) Molecular weight-dependent spectral and metal binding properties of sediment dissolved organic matter from different origins. *Science of The Total Environment* 665:828-835. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.186>
- Yang L, Hur J (2014) Critical evaluation of spectroscopic indices for organic matter source tracing via end member mixing analysis based on two contrasting sources. *Water Research* 59:80-89. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.018>

- Yeh Y-L, Yeh K-J, Hsu L-F, Yu W-C, Lee M-H, Chen T-C (2014) Use of fluorescence quenching method to measure sorption constants of phenolic xenoestrogens onto humic fractions from sediment. *Journal of Hazardous Materials* 277:27-33. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.057>
- Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biol* 36(5):409. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Yruela I (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1):145-156. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>
- Zhang S, Chen X-W, Ye Q, Zhang Z-T, Kong S-F, Cao C, Wang J-J (2020) Dissolved Metal(loid) Concentrations and Their Relations with Chromophoric and Fluorescent Dissolved Organic Matter in an Urban River in Shenzhen, South China. *Water* 12(1):281. <https://doi.org/10.3390/w12010281>
- Zsolnay A (1996) Dissolved Humus in Soil Waters. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, pp 171-223
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0)

Supplementary information

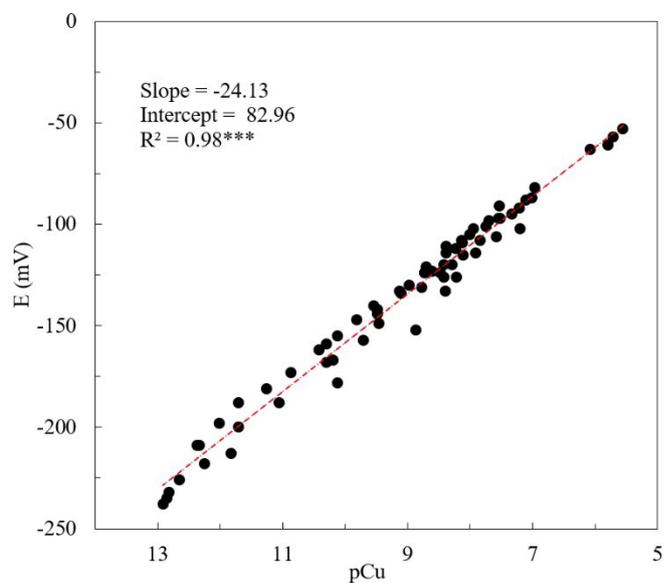


Fig. S 1: The ion-selective electrode (ISE) potential response as a function of copper activity ($pCu = -\log(a_{Cu})$) in Cu standard solutions buffered with iminodiacetic acid and potassium phthalate

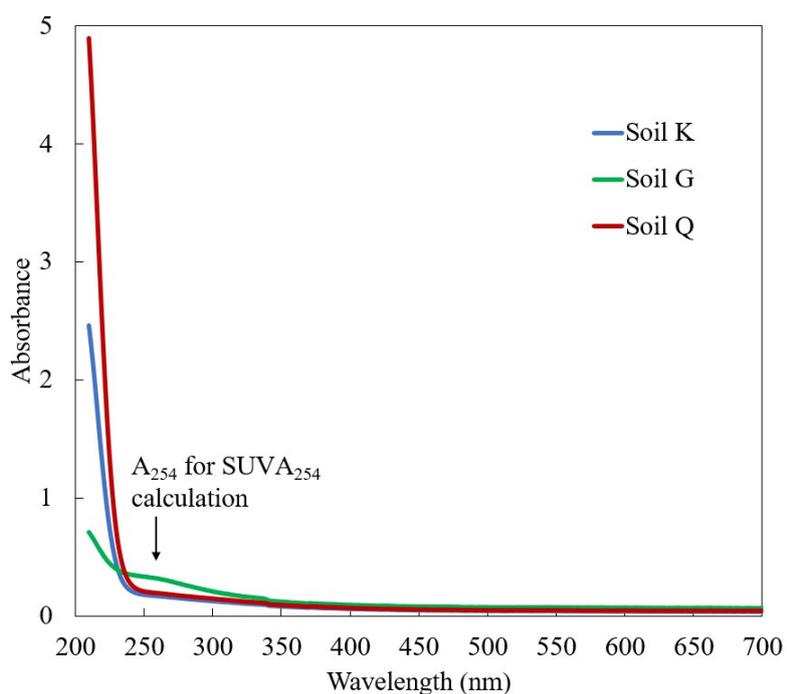


Fig. S 2: Absorbance spectra of the DOM in three out of the 18 vineyard soils extracts

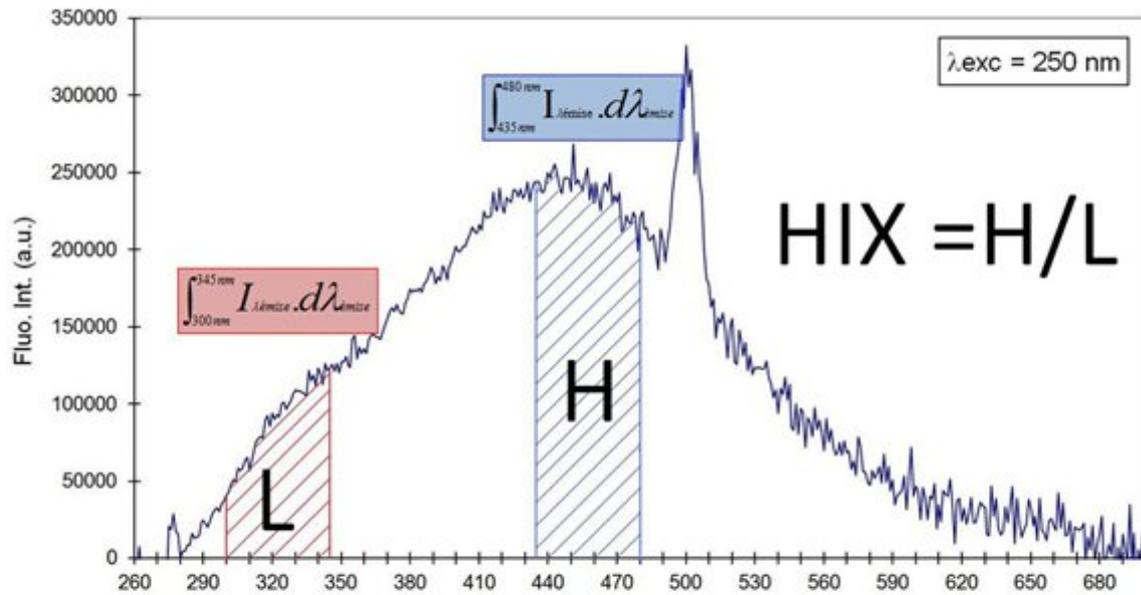


Fig. S 3: Example of a fluorescence spectrum and method of calculation of HIX

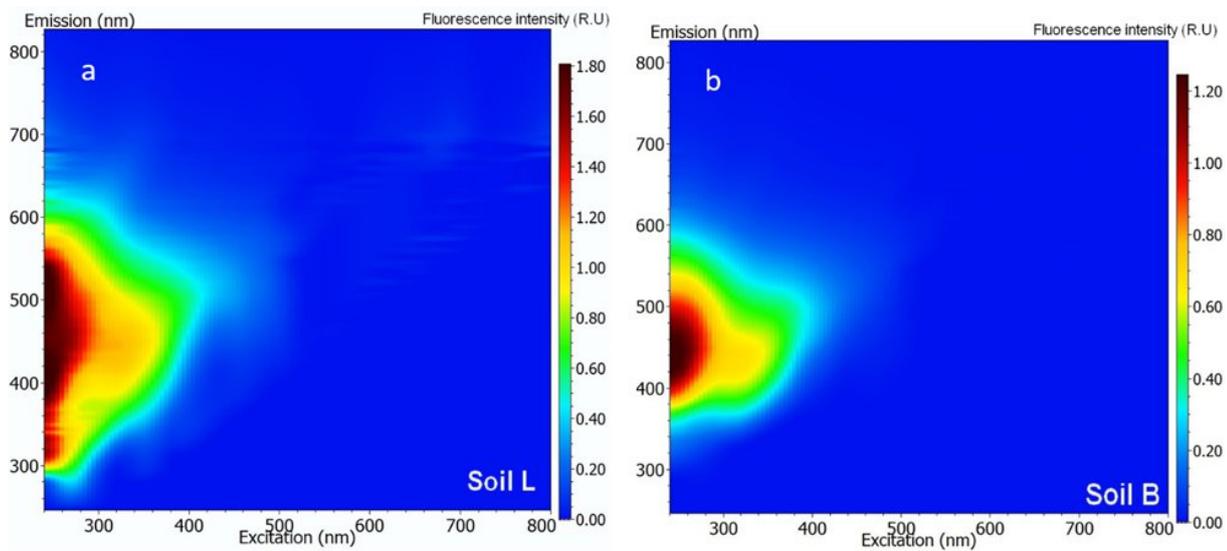


Fig. S 4 : Contour EEM plots of the DOM in two of the soils sampled, R.U: Raman unit

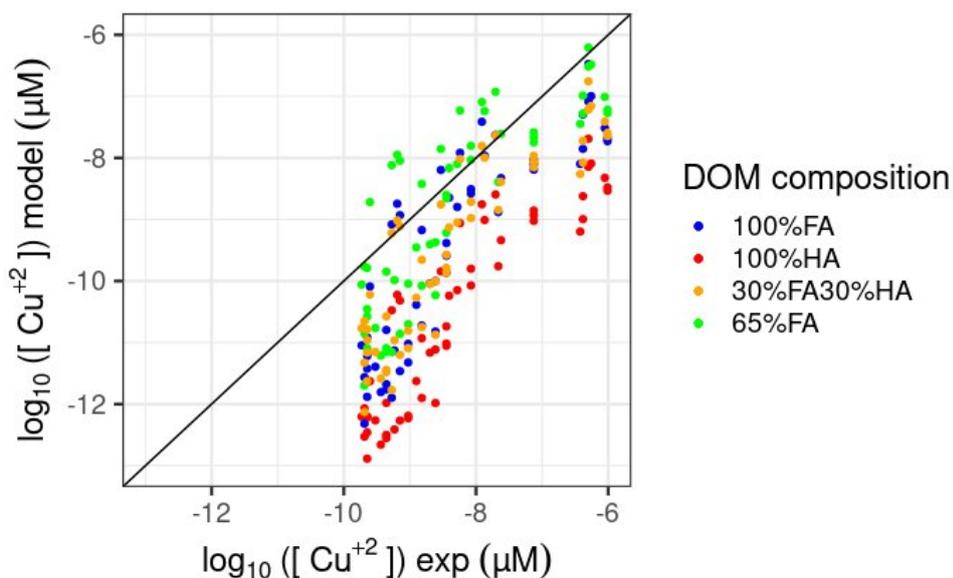


Fig. S 5 : Influence on DOM composition on predicted Cu^{2+} concentration ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{model}}$), and its comparison with Cu^{2+} measured in solution ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{exp}}$)

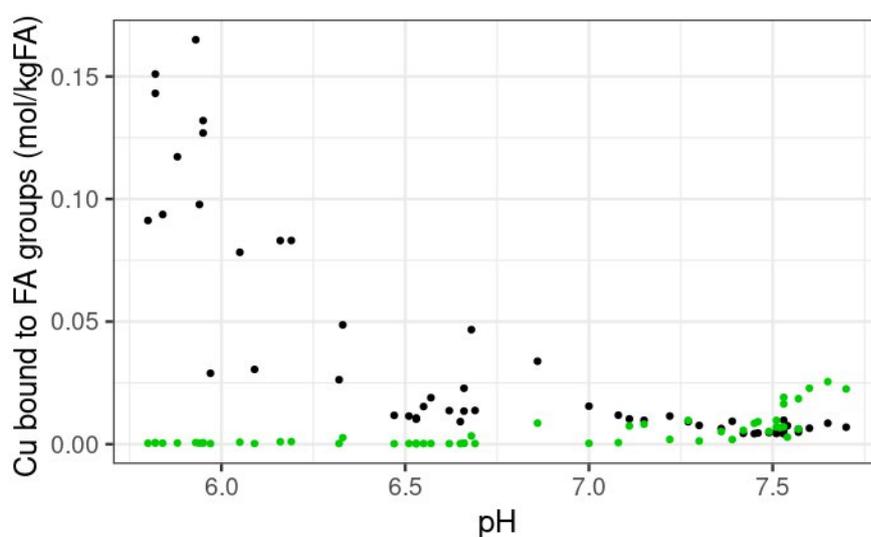


Fig. S 6 : Calculated amounts of Cu bound to FA carboxylic groups (in black) and phenolic groups (in green) as function of extracts pH

Table S 1: Chemical and optical properties of the 0.01 M KCl extracts. Mean values are given with their standard deviations (of triplicate extracts) in parentheses

Soil id	pH _{KCl}	Cu ²⁺	fCu ²⁺	Cu _{KCl}	Mn _{KCl}	Zn _{KCl}	Fe _{KCl}	Ca _{KCl}	DOC	SUVA ₂₅₄	S _R	BIX	FI	HIX
		μM	%	μM	μM	μM	μM	μM	mg L ⁻¹	L gC ⁻¹ cm ⁻¹				
A	6.83	1.8E-03	1.15	0.11	0.08	0.12	6	2602	17.1	13.6	0.97	0.66	1.23	7.18
	(0.41)	(4E-04)	(0.55)	(0.02)	(0.011)	(0.01)	(0.56)	(101)	(2.37)	(0.7)	(0.04)	(0.004)	(0.006)	(0.6)
B	7.59	7.0E-04	0.27	0.26	0.02	0.04	2.2	3570	18.0	7.5	0.88	0.64	1.2	10.33
	(0.06)	(3E-04)	(0.10)	(0.003)	(0.003)	(0.01)	(0.39)	(87)	(2.3)	(0.3)	(0.01)	(0.005)	(0.002)	(0.9)
C	6.50	2.8E-03	1.46	0.19	0.27	0.28	10.3	2450	20.8	21.8	0.75	0.65	1.21	7.11
	(0.03)	(7E-04)	(0.33)	(0.02)	(0.025)	(0.01)	(0.31)	(24)	(1.26)	(0.6)	(0.02)	(0.004)	(0.009)	(0.1)
D	5.86	4.0E-01	47.39	0.85	0.53	3.01	24.7	1527	20.6	57.2	1.28	0.86	1.34	1.59
	(0.07)	(2E-02)	(2.77)	(0.01)	(0.045)	(0.1)	(0.17)	(13)	(1.85)	(0.5)	(0.02)	(0.022)	(0.009)	(0.7)
E	7.53	2.3E-04	0.16	0.15	0.05	0.03	4.7	3183	15.8	9.4	0.75	0.67	1.24	7.64
	(0.03)	(1E-05)	(0.01)	(0.004)	(0.001)	(0)	(0.17)	(49)	(2.36)	(0.6)	(0.01)	(0.008)	(0.007)	(0.17)
F	6.13	1.9E-02	2.26	0.85	2.31	0.86	19.9	1172	27.9	19.2	0.66	0.62	1.1	6.36
	(0.18)	(6E-03)	(0.69)	(0.02)	(0.132)	(0.01)	(0.33)	(39)	(9.38)	(0.8)	(0.02)	(0.01)	(0.006)	(0.33)
G	6.66	3.5E-03	1.08	0.33	0.15	0.47	14.1	2440	16.3	61.1	1.15	0.71	1.29	3.64
	(0.04)	(5E-04)	(0.22)	(0.02)	(0.019)	(0.02)	(0.19)	(82)	(4.6)	(0)	(0.03)	(0.004)	(0.006)	(0.19)
H	7.47	2.1E-04	0.14	0.16	0.03	0.32	2.7	3647	17.3	9.8	0.68	0.63	1.21	7.7
	(0.03)	(1E-05)	(0.02)	(0.03)	(0.004)	(0.01)	(0.74)	(18)	(3.14)	(0.4)	(0.01)	(0.004)	(0.005)	(0.74)
I	7.43	6.5E-04	0.34	0.19	0.05	0.05	7.3	3687	16.9	6.2	0.63	0.67	1.22	6.86
	(0.10)	(3E-04)	(0.15)	(0.01)	(0.012)	(0.01)	(0.46)	(44)	(0.71)	(0.1)	(0.01)	(0.002)	(0.005)	(0.46)

Soil id	pH _{KCl}	Cu ²⁺	fCu ²⁺	Cu _{KCl}	Mn _{KCl}	Zn _{KCl}	Fe _{KCl}	Ca _{KCl}	DOC	SUVA ₂₅₄	S _R	BIX	FI	HIX
		μM	%	μM	μM	μM	μM	μM	mg L ⁻¹	L gC ⁻¹ cm ⁻¹				
J	7.48	2.1E-04	0.10	0.2	0.06	0.04	7.2	3419	16.2	12.9	0.64	0.66	1.23	7.45
	(0.06)	(2E-05)	(0.01)	(0.01)	(0.002)	(0.01)	(0.39)	(58)	(0.38)	(0.8)	(0.02)	(0.004)	(0.006)	(0.39)
K	6.13	7.5E-02	5.42	1.38	0.42	1.59	8.6	908	19	15.9	0.83	0.65	1.25	4.33
	(0.07)	(0E+00)	(0.21)	(0.05)	(0.007)	(0.16)	(0.21)	(33)	(1.74)	(0.74)	(0.04)	(0.013)	(0.01)	(0.21)
L	6.62	1.7E-02	0.65	2.03	1.03	0.61	16.7	1254	20.1	60.4	0.48	0.82	1.18	1.31
	(0.27)	(4E-03)	(0.38)	(0.12)	(0.045)	(0.03)	(0.83)	(40)	(1.99)	(0.9)	(0.01)	(0.053)	(0.029)	(0.83)
M	5.93	5.2E-01	19.65	2.64	4.1	1	23	935	18.1	38.4	0.73	0.7	1.19	3.89
	(0.04)	(3E-02)	(1.91)	(0.12)	(0.206)	(0.03)	(0.59)	(38)	(2.11)	(0.1)	(0.02)	(0.012)	(0.005)	(0.59)
N	7.1	2.1E-03	0.79	0.27	0.06	0.5	9.8	2826	15.6	5.3	0.5	0.75	1.31	4.15
	(0.11)	(1E-03)	(0.49)	(0.02)	(0.009)	(0.13)	(0.17)	(101)	(2.25)	(0.5)	(0.02)	(0.021)	(0.017)	(0.17)
O	6.59	7.3E-03	1.59	0.46	0.14	0.39	11.5	2769	16.6	21.6	0.42	0.73	1.25	3.93
	(0.06)	(2E-03)	(0.30)	(0.03)	(0.02)	(0.01)	(0.1)	(15)	(2.92)	(0.2)	(0.01)	(0.016)	(0.006)	(0.1)
P	7.18	6.3E-04	0.07	0.92	1.25	0.36	15.9	1914	22.3	25.4	0.77	0.59	1.12	5.14
	(0.08)	(9E-05)	(0.01)	(0.03)	(0.099)	(0.04)	(0.12)	(9)	(1.7)	(0)	(0.02)	(0.008)	(0.005)	(0.12)
Q	5.86	9.5E-01	49.89	1.9	2.38	1.52	13.1	1101	20.7	18.6	0.69	0.67	1.21	4.83
	(0.06)	(5E-02)	(1.46)	(0.05)	(0.095)	(0.01)	(0.49)	(19)	(2.22)	(0.2)	(0.01)	(0.009)	(0.009)	(0.49)
R	7.6	3.7E-04	0.18	0.21	0.03	0.27	2.11	3209	16.3	6	0.71	0.66	1.23	8.29
	(0.09)	(7E-05)	(0.03)	(0.01)	(0.002)	(0.04)	(0.19)	(41)	(1.37)	(0.7)	(0.05)	(0.005)	(0.013)	(0.9)

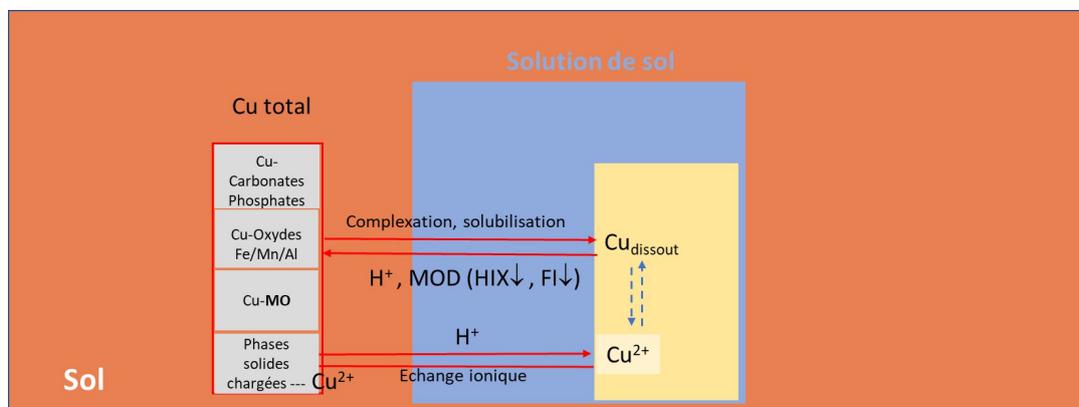
Synthèse du chapitre

Les résultats du Chapitre 4 montrent que les sols sont plus diversifiés en concentration de Cu en solution (Cu total et Cu^{2+}) que de teneur totale dans le sol. Ce résultat conforte l'hypothèse que la teneur totale de Cu dans les sols n'est pas un indicateur pertinent de disponibilité. Les sols présentaient des concentrations similaires en carbone organique dissout (COD), mais des différences des propriétés optiques de la MOD. L'usage des techniques de spectroscopie optique a ainsi permis de relever des différences qualitatives entre les sols qui étaient peu visibles lorsque nous ne considérons que la quantité de COD. Les équations de prédiction ont montré que la concentration du Cu en solution était principalement expliquée par le pH du sol et la teneur totale en Cu. Par contre, la prise en compte des indices spectroscopiques d'humification (HIX) et de fluorescence (FI) de la MOD a permis d'améliorer significativement la prédiction. Pour le cuivre libre Cu^{2+} , le pH seul expliquant la variabilité des concentrations à plus de 80%. La prise en compte des indices spectroscopiques ne s'est pas avérée significativement utile pour améliorer la prédiction des concentrations en Cu^{2+} .

Finalement, les propriétés spectroscopiques de la MOD présentent un réel intérêt pour étudier la mise en solution du Cu total dans les sols. Cependant, elles compteraient moins pour expliquer la forme ionique du Cu, qui est principalement expliquée par le pH du fait des équilibres entre le proton et le Cu^{2+} sur les sites d'échanges des surfaces minérales et organiques.

Il semble que la dynamique du Cu^{2+} soit relativement indépendante de celle du Cu total en solution, ce dernier étant généralement majoritairement constitué de cuivre complexé à la matière organique soluble. Les échanges entre la forme complexée du cuivre en solution et le cuivre libre semblent moins déterminants que la compétition entre le proton et le Cu^{2+} pour expliquer la concentration en Cu^{2+} en solution.

La figure ci-dessous résume les conclusions tirées de ce chapitre, notamment sur les liens entre pH, propriétés de la MOD et Cu disponible.

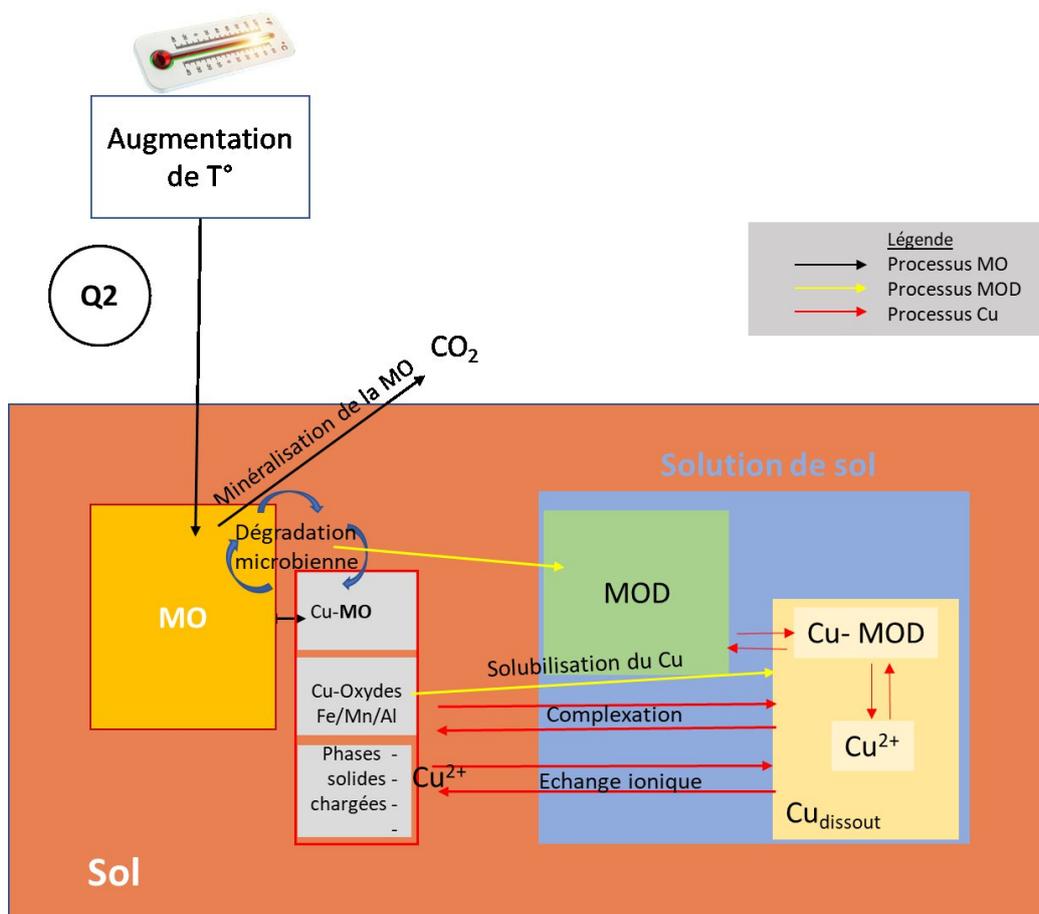


Chapitre 5 : Impact de la température de deux sols viticoles sur la dynamique de la MOD et la disponibilité du cuivre

Prélude

Nos résultats du Chapitre 4 soulignent l'importance du pH et de la prise en compte de la qualité de la MOD pour expliquer la disponibilité du cuivre dans des sols à l'équilibre. Qu'en est-il lorsque le sol est perturbé via des modifications de température ? En effet, la dynamique de la MOD est liée aux mécanismes de minéralisation de la matière organique du sol (MOS). Une augmentation de température pourrait exacerber la minéralisation de la MOS et modifier la dynamique de la MOD (augmentation de la concentration en solution et changement de la qualité des MOS et de sa réactivité potentielle vis-à-vis des métaux), modifiant ainsi le Cu disponible. Dans ce chapitre, l'objectif était d'étudier si les variations de température avaient un effet sur la disponibilité du cuivre (Question 2 de la thèse). Deux sols de la collection étudiée dans le chapitre précédent, ont été choisis du fait de leurs paramètres contrastés (ratio C:N et teneur en MOS). Ils ont été incubés pendant 2 mois à 20°C ou 30°C. Des mesures cinétiques ont été réalisées pour analyser les effets sur l'activité biologique, la chimie de la solution de sol ainsi que les dynamiques de la MOD et du Cu disponible.

La figure ci-dessous illustre les hypothèses et les dynamiques envisagées pour cette expérimentation.



Résumé

L'accumulation de cuivre dans les sols viticoles est susceptible de provoquer de l'écotoxicité pour les organismes. La toxicité du cuivre est liée à sa disponibilité, qui peut être évaluée via sa concentration totale en solution et l'activité de sa fraction libre Cu^{2+} . Les changements climatiques pourraient entraîner une augmentation de la température moyenne des sols. Cela impacterait la dynamique de la matière organique (MO) dans les sols et pourrait modifier la disponibilité du Cu. Dans ce travail, l'objectif était d'étudier l'impact de la température sur la disponibilité du Cu dans deux sols viticoles de ratios C:N différents. Les sols ont été incubés à 20°C et à 30°C pendant 60 jours et des mesures ont été réalisées aux jours 0, 1, 3, 7, 14, 23, 38 et 60. L'activité biologique des sols a été évaluée via la vitesse de minéralisation du carbone et les activités potentielles des enzymes hydrolytiques. La dynamique de la matière organique dissoute (MOD) a été évaluée à travers la concentration en carbone organique dissous (COD), les propriétés optiques obtenues par spectroscopie UV-Visible et de fluorescence couplée à l'analyse multivariée PARAFAC. Comme attendu, la température a augmenté la minéralisation de la MO du sol mais elle n'a pas significativement impacté la dynamique de la MOD. De même, la distribution des composants déterminés par PARAFAC n'a pas été affectée par la température. Cependant, la température à 30°C a provoqué une légère plus forte désorption du Cu sur l'ensemble de l'expérience. Les deux sols ont réagi différemment à l'effet de l'incubation. Le sol 1 avec le ratio C:N le plus faible a présenté les activités enzymatiques les plus élevées. La concentration de Cu dans les extraits était positivement corrélée à la concentration de COD dans le sol 1 mais négativement dans le sol 2. Ces résultats ont suggéré que les mécanismes qui régissent la dynamique conjointe MO-Cu diffère selon les sols. L'activité du Cu^{2+} était fortement liée aux changements de pH et indirectement à la dynamique de la MO. Finalement, une augmentation de la température aurait peu d'effets sur la disponibilité du cuivre. La nature des sols est le facteur qui a le plus influencé la dynamique de la MO et du Cu dans cette étude.

Mots-clés : sols viticoles - cuivre - matière organique - activité microbienne - température

1 Introduction

Depuis le début des années 1900, le cuivre (Cu) s'est fortement accumulé dans les sols viticoles suite à l'utilisation massive de fongicides cupriques pour prévenir les attaques de mildiou. Cela a entraîné de fortes concentrations en Cu allant de 100 à près de 1500 mg kg⁻¹ dans les horizons supérieurs des sols viticoles français et européens (Ballabio et al. 2018). La présence excessive du Cu dans les sols peut conduire à des problèmes de phytotoxicité pour les cultures (Michaud et al. 2007 ; Ambrosini et al. 2015) ou de toxicité pour les organismes du sol (Ávila et al. 2009). Il a été reporté que le cuivre total dans les extraits de sol et le cuivre libre Cu²⁺ sont des indicateurs probants de la disponibilité du cuivre, et capables d'interagir avec les organismes (Sauvé et al. 1996). La disponibilité du Cu dans les sols est influencée par des paramètres du sol tels que le pH et la matière organique (MO) (Temminghoff et al. 1997), mais aussi par les propriétés de la matière organique dissoute (MOD) (Amery et al. 2008 ; Laurent et al. 2020). En effet, le Cu présente une forte affinité pour la MO (Xu et al. 2016). Hunt and Ohno (2007) ont suggéré que la minéralisation de la MO produirait une MOD de plus en plus aromatique et condensée. Dans le même sens, Amery et al. (2007) ont montré qu'une MOD plus aromatique aurait une plus forte capacité à complexer le Cu et à le faire passer en solution. De ces observations, il s'avère donc que la dynamique de la matière organique impactée par l'activité biologique du sol pourrait affecter la disponibilité du cuivre dans les sols.

Les prédictions climatiques présument que la température atmosphérique mondiale pourrait augmenter de 2.7°C d'ici 2100 par rapport aux années 1900 (IPCC 2021). Les mêmes études augurent des étés plus chauds et plus longs dans certaines régions du monde dont l'Europe occidentale. A l'échelle régionale, cette augmentation risque de provoquer de profonds bouleversements sur le fonctionnement des sols agricoles, notamment sur la dégradation de la MO. La respiration du sol du fait de la minéralisation du carbone organique du sol est exacerbée lorsque la température augmente (Lloyd and Taylor 1994). Par contre, Steinweg et al. (2013) ont montré qu'une différence de 4°C de température ne présentait pas d'effet significatif sur les activités enzymatiques dans le sol. D'autres auteurs ont mentionné que l'effet de la température sur la décomposition de la MO serait limité lorsque l'humidité est constante (Rey et al. 2004 ; Qi et al. 2016).

Une augmentation de la température pourrait entraîner une baisse de la concentration en MOD dans les sols du fait de sa consommation plus accrue par les microorganismes (Bertolet et al. 2018). Liu et al. (2019) ont aussi avancé qu'une augmentation de la température entraîne une consommation plus importante des composés les plus récalcitrants de la MOD, aboutissant ainsi à une baisse de son degré d'aromaticité. En outre, l'élévation de la température pourrait provoquer une augmentation du pH des sols à travers des mécanismes biotiques (Guoju et al. 2012), avec pour probable conséquence des modifications sur la disponibilité du Cu. L'ensemble de ces constats pose des interrogations sur les effets que pourraient avoir le réchauffement climatique sur la disponibilité du cuivre dans les sols viticoles contaminés. Jusque-là, nous n'avons pas trouvé d'études portant sur l'effet de la température sur les paramètres physico-chimiques de sols viticoles de natures différentes.

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la température sur la dynamique conjointe de la MO et du Cu dans deux sols viticoles différents. Notre hypothèse principale est que la température influencerait la minéralisation de la MO, qui produirait une MOD de plus en plus aromatique et mobilisant le Cu en solution. Cet effet serait d'autant plus important que le sol a originellement une activité biologique élevée. Mais des effets sur le pH pourraient modifier ces équilibres. Pour tester ces hypothèses, nous avons travaillé sur deux sols viticoles avec des concentrations similaires en Cu total, mais différents de par leur ratio C:N.

2 Matériels et méthodes

2.1 Design expérimental

2.1.1 Choix et description des sols

Deux sols ont été choisis du lot de sols étudiés dans le Chapitre 4 de ce manuscrit. Il s'agit des sols F et G, dont les paramètres physico-chimiques contrastés pour la teneur en MO et le ratio C:N, mais avec des valeurs proches en pH_{eau} et en teneur totale en Cu. Le sol F (Sol 1) est un luvisol limono-argileux qui est enherbé avec restitution des parties aériennes fauchées et le sol G (Sol 2) est un podzosol sableux et laissé « nu » par un travail superficiel de l'inter-rang. Les deux sols ont été échantillonnés à l'état frais durant le printemps 2020, sur l'horizon 0-15 cm et entre les pieds de vigne. Les caractéristiques des deux sols sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des deux sols de cette étude

Paramètre	Sol 1	Sol 2
pH_{eau}	6.8	6.5
Cu total ($mg\ kg^{-1}$)	89	83
Ratio C:N	7.8	15.3
MO ($g\ kg^{-1}$)	21.8	29.1

2.1.2 Incubation des sols

100g équivalent sec de sol frais sont mis dans des bocaux de 1L (Le Parfait®). L'humidité des sols a été ajustée à 60% de leur capacité au champ avec de l'eau distillée. Les sols dans les bocaux sont ensuite incubés dans deux incubateurs différents (l'un à 20°C et l'autre à 30°C) pendant 60 jours. L'humidité du sol est maintenue constante pendant la durée de l'expérience. De la soude (15mL de NaOH à 2M) contenue dans des tubes à scintillation est placée dans chaque bocal pour piéger le CO_2 provenant de la minéralisation de la MO.

4 répétitions d'analyse, correspondant à 4 bocaux, ont été prévues par temps d'incubation, par sol et par température et étaient progressivement détruites pour les mesures. 4 bocaux restés vides (par incubateur) ont servi de blancs pour les mesures de minéralisation de la MO.

2.2 Mesures

2.2.1 Mesures sur les sols

2.2.1.1 Vitesse de minéralisation du carbone

Le piégeage du CO₂ par la soude a permis d'évaluer la vitesse de minéralisation du carbone dans les sols incubés. La mesure a été faite aux jours 0, 1, 2, 3, 4, 9, 11, 15, 18, 22, 29, 37, 43, 50, 57 et 60 de l'expérience. La mesure s'effectue de la manière suivante : pour chaque microcosme, 1mL de soude est titré avec 0.5 M HCl jusqu'à virage de couleur de la thymolphtaléine et précipitation des carbonates (avec du BaCl₂ à 1.5 M). Le taux de minéralisation du carbone est calculé suivant la

$$\text{formule : } R = \frac{0.5 (V_0 - V) * C * \left(\frac{V_t}{V_s}\right) * 12 * 1000}{\text{Masse de sol} * n \text{ jours}},$$

avec V₀ la moyenne des volumes de HCl titré avec le NaOH des bocaux vides, V le volume de HCl titré avec le NaOH provenant des bocaux de sols (avec ou sans résidus), V_t le volume total de NaOH dans le tube correspondant à l'échantillon mesuré, V_s le volume de NaOH échantillonné dans chaque tube pour la mesure. Le taux de minéralisation du carbone est exprimé en mg C kg⁻¹ sol jour⁻¹. Cette variable peut aussi s'exprimer en valeurs cumulées (mg C kg⁻¹ sol).

2.2.1.2 Activités enzymatiques

Les activités enzymatiques des enzymes hydrolytiques du carbone et de l'azote ont été mesurées à 0, 3, 14, 38 et 60 jours de l'incubation, en suivant le protocole décrit par Bell et al. (2013). Les enzymes liées au carbone étudiées sont : la β-1,4-glucosidase, la 1,4-β-D-cellobiohydrolase et la α-1,4-glucosidase qui dégradent la cellulose alors que la β-xylosidase dégrade l'hémicellulose. Pour les enzymes liées à l'azote, il s'agissait de la N-acétylglucosaminidase (qui dégrade l'acétylglucosamine) et de la leucine-aminopeptidase (qui catalyse l'hydrolyse des peptides et des protéines).

2.75 g de sol incubé sont mélangés à 91 mL de solution tampon d'acétate de sodium dans un mixeur pendant 1 min. Les extraits de sol sont ensuite récupérés et transférés vers des microplaques Deepwell® à l'aide d'une pipette électronique. Des échantillons de calibration sont préparés avec des standards du 4-méthylumbelliférone (MUB) ou du 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) (concentrations allant de 0 à 100 μM) et des échantillons sans standard (contrôle) sont aussi inclus dans les échantillons. Ensuite, les préparations sont incubées à 25°C pendant 3h, puis centrifugées pendant 3 min à 3000 rpm. 250 μL de surnageant sont transvasés vers des puits de microplaques de lecture. Les échantillons sont ainsi scannés par fluorescence (Synergy H1 microplate reader, Biotek, Winooski,

USA), à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 450 nm. Les activités enzymatiques potentielles sont calculées à partir des valeurs de fluorescence et exprimées en $\text{nmol}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{sol h}^{-1}$. Les résultats sont aussi exprimés en valeurs cumulées par groupe d'enzymes (carbone et azote) et exprimées en $\mu\text{mol}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{sol}$ (Fanin and Bertrand 2016).

2.2.2 Extractions et mesures sur les solutions de sol

2.2.2.1 Métaux totaux en solution et activités du Cu^{2+}

L'extraction des solutions de sol a été réalisée aux jours 0, 1, 3, 7, 14, 23, 38 et 60 et conduite sur les 4 répétitions de microcosmes. 15 g équivalent sec de sol sont extraits avec 30 mL de 0.01M de KCl à un ratio masse : volume de 1:2 (sol: solution) après une agitation à 35 rev.mn^{-1} pendant 2h. Les suspensions de sol sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 13000 rpm. Les surnageants ainsi récupérés sont filtrés à 0.2 μm avec des filtres en acétate de cellulose. Les extraits de sol obtenus sont ensuite subdivisés en aliquotes et stockés à 4 °C à l'obscurité pour les mesures ultérieures.

Le pH des extraits de sol (pH_{KCl}) est mesuré à l'aide d'une microélectrode (E16M331, Radiometer Analytical®). Les concentrations des métaux totaux en solution (Ca, Cu, Fe, Mn, Zn) sont déterminées par ICP-AES (Agilent®) dans des aliquotes de 5 mL acidifiés à 2% avec du HNO_3 . L'activité du cuivre libre est mesurée avec une électrode Cu-sélective (ISE, 9629BNWP, Thermo Scientific Orion®). Cette technique de mesure est détaillée dans Bravin et al. (2009).

2.2.2.2 Analyses de la MOD

La concentration de COD est mesurée dans les extraits de KCl avec un analyseur TOC (TOC-VCPH, Shimadzu®, Japan). La concentration de COD a été déterminée via la quantité de carbone non purgeable (NPOC) dans les extraits et exprimée en mg L^{-1} .

L'absorbance et la fluorescence de la MOD dans les extraits ont été analysées via un spectrofluorimètre Aqualog (Horiba Scientific®) et une cuve en quartz (Hellma Analytics, Suprasil QS®) de trajet optique de 1 cm thermostatée à 20 °C. Les spectres d'absorbance ont été acquis de 239 à 800 nm et le spectre de la solution de 0.01M KCl (blanc de mesure) a été soustrait des spectres des échantillons. Un indice, la pente spectrale $S_{275-295}$, a été calculé à partir de ces spectres d'absorbance comme étant la pente du spectre d'absorbance (log-transformé) dans la région 275-295 nm, tel que décrit par Helms et al. (2008). L'indice $S_{275-295}$ permet d'apprécier les variations de taille moléculaire de la MOD.

L'acquisition des matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence a également été réalisée à l'aide du spectrofluorimètre Aqualog (Horiba Scientific®), équipé d'une lampe à arc xénon de 150 watts, d'un double monochromateur d'excitation, avec une bande passante de 5 nm, et d'un temps d'intégration de 2 s à des longueurs d'onde de 240-800 nm par pas de 5 nm. Les spectres d'émission ont été obtenus avec un gain élevé du détecteur CCD à des intervalles d'environ 0,58 nm (1 pixel) à

des longueurs d'onde allant de 245 et 830 nm. Une solution de 0.01M de KCl a été considérée comme blanc d'analyse. Lorsque l'absorbance était supérieure à 0.1 à 250 nm, les échantillons étaient dilués avec la solution de KCl afin d'éviter les effets de filtre interne lors de l'acquisition des spectres de fluorescence. Les intensités de fluorescence ont été normalisées à l'aire du pic de diffusion Raman de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore) et exprimées en unités Raman (R.U), et qui est mesurée quotidiennement à une excitation de 350 nm. Le calcul des indices de fluorescence (après suppression des pics de diffusion) a été fait avec le logiciel TreatEEM (<https://sites.google.com/site/daromasoft/home/treateem> développé par Dario Omanović (Ruder Bošković Institute, Zagreb, Croatie)).

Deux indices ont ainsi été calculés à partir des mesures de fluorescence. L'indice d'humification (HIX) est le rapport entre l'aire du spectre d'émission de fluorescence dans la région 435-480 nm et celle de la région 300-345 nm pour une excitation fixée à 254 nm (Zsolnay et al. 1999). Le HIX indique le niveau de condensation et d'aromaticité de la MOD. L'indice biologique BIX est le rapport des intensités de fluorescence à 380 nm et à 430 nm, lorsque l'excitation est fixée à 310 nm et reflète la contribution des molécules produites en lien avec l'activité biologique (Huguet et al. 2009).

La décomposition PARAFAC a été réalisée sur un ensemble de 125 spectres EEM d'échantillons avec le logiciel MATLAB R2019a via le package DOMFluor 1.7. Le nombre optimal de composants PARAFAC a été choisi après la validation « split-half », l'initialisation en mode aléatoire et l'inspection visuelle pour chaque échantillon des spectres analysés, modélisés et des résidus obtenus par différence et pour chaque composant de l'éligibilité de leurs propriétés spectrales. Chaque composant ainsi déterminé est caractérisé par une intensité de fluorescence maximale (à l'excitation et à l'émission) dans chaque échantillon. L'abondance relative de chaque composant représente sa contribution par rapport à la fluorescence totale (somme des intensités de fluorescence de tous les composants déterminés par PARAFAC). Elle s'exprime en pourcentage (Stedmon and Bro 2008; Murphy et al. 2013).

2.3 Analyse et traitement statistique des données

Le traitement statistique a été réalisé avec le logiciel R (R core Team 2020). Des modèles mixtes et des tests « post-hoc Tukey » ont été élaborés pour évaluer les différences significatives entre les valeurs moyennées, suite aux traitements (sol, température) et à l'effet du temps (durée de l'incubation). Les différences et les effets sont considérés comme significatifs lorsque $p < 0.001$.

3 Résultats

3.1 Impact de la température sur les indicateurs de l'activité biologique

3.1.1 Minéralisation du carbone

La mesure du dégagement du CO₂ du sol sert à évaluer la dynamique de la décomposition de la matière organique et des flux de carbone dans le sol. Pour les deux sols, la vitesse de minéralisation présente des valeurs maximales à t1, puis baisse progressivement (Fig. 1a). La baisse d'activité semble cependant plus abrupte pour le sol 2 après le temps t1. La minéralisation cumulée du carbone montre globalement des valeurs 2 à 3 fois plus élevées pour le sol 1 que pour le sol 2, prises à la même température et à la même date. A t60, le ratio entre les taux cumulés de minéralisation du carbone à 30°C et à 20°C est d'environ 2 pour le sol 1 et 1.7 pour le sol 2 (Fig. 1b). La vitesse de minéralisation du carbone est plus influencée par le facteur « Sol » (F-value = 439, p<0.001) que par le facteur « Température » (F-value = 124, p<0.001) (Tableau S2). Au bout de 60 jours, il apparaît que 3% à 20°C et 6% à 30°C du carbone initialement présent dans le sol 1 a été minéralisé et transféré vers l'atmosphère sous forme de CO₂. Pour le sol 2, les fractions minéralisées sont beaucoup plus faibles puisqu'elles correspondent à 0.6% à 20°C et 1.2% à 30°C du carbone initial du sol.

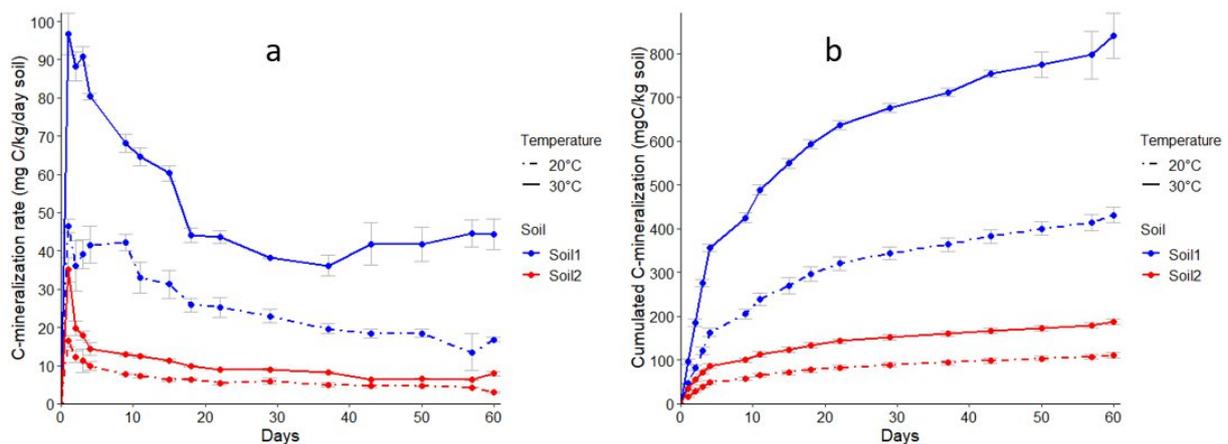


Fig. 1 : Evolution de la vitesse de minéralisation nette (a) et de la minéralisation cumulée (b) du carbone dans les deux sols au cours de l'expérience.

3.1.2 Activités enzymatiques

L'évolution temporelle des activités enzymatiques a été mesurée pour des enzymes liées à la dégradation des liaisons carbonées (Fig. 2a) ou liées à la dégradation de liaisons azotées (Fig. 2b). Comme observé avec la minéralisation du carbone, le sol 1 présente des activités enzymatiques nettement plus importantes que le sol 2, quelle que soit la nature des enzymes. Cependant, aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux températures en considérant la plage t0-t38 pour les deux sols. La date t14 marque une baisse d'activité dans les deux sols et aux deux températures appliquées. A la fin de l'incubation (t60), les activités enzymatiques sont plus importantes à 20°C qu'à 30°C pour le sol 1 et équivalentes pour le sol 2. L'analyse ANOVA révèle que

la température n'a pas eu d'effet significatif sur les activités enzymatiques sur l'ensemble de l'expérience ($p > 0.001$). Le facteur « Sol » a davantage impacté les activités enzymatiques que le facteur « Durée d'incubation » (Tableau S 2).

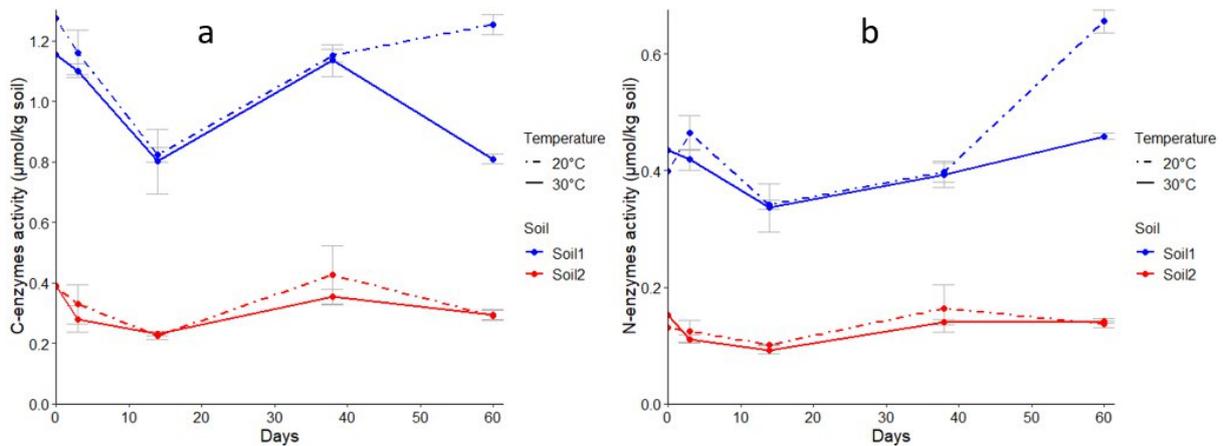


Fig. 2 : Évolution des activités enzymatiques (cumulées) liées au carbone (a) et à l'azote (b) pendant l'expérience.

3.2 Paramètres de la matière organique dissoute

3.2.1 Concentrations et indices spectroscopiques

Les concentrations de carbone organique dissout (COD) ont été déterminées dans les sols pour évaluer les changements de quantité de MOD au cours de l'expérience. Les concentrations moyennes en COD varient entre 31 et 90 mg L⁻¹ dans le sol 1, et entre 52 et 255 mg L⁻¹ dans le sol 2 (Tableau S 1). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux températures pour les concentrations en COD dans les deux sols ($p > 0.001$, Tableau S 2). Pour le sol 1, les valeurs de COD tendent à augmenter au cours de l'incubation (Fig. 3a). Ce constat est plus flagrant dans le sol 2, où on note une augmentation d'environ 4 fois des valeurs de COD entre le début et la fin de l'incubation (Fig. 3a). Tout au long de l'incubation, le sol 2 présente des valeurs en COD plus importantes que le sol 1.

En plus de la quantité, il est intéressant d'évaluer les changements de la qualité de la MOD en fonction de la température et des sols au cours de l'incubation. L'indice biologique BIX reste globalement plus élevé dans le sol 1 que dans le sol 2 (Fig. 3b). En considérant l'ensemble de l'expérience, aucune différence significative n'a été trouvée entre les valeurs de BIX à 20°C et à 30°C ($p > 0.001$, Tableau S 2). Pour le sol 1, l'indice BIX a une tendance à la diminution et fluctue peu entre 0.73 et 0.8 (Tableau S 1). Bien que les valeurs de cet indice soient bien plus faibles que celles obtenues pour le sol 1, sa dynamique est plus marquée pour le sol 2, au niveau duquel on note un pic de BIX à t1 pour l'échantillon incubé à 30°C, suivi d'un deuxième pic à t14 pour les deux températures (Fig. 3b). Les

valeurs de BIX dans le sol 2 fluctuent entre 0.59 et 0.74 et diminuent globalement entre t0 et t60 (Tableau S 1, Fig. 3b).

Les indices HIX et $S_{275-295}$ témoignent respectivement du degré d'aromaticité et de la taille moléculaire de la MOD. Les changements opérés sur les indices HIX et $S_{275-295}$ au cours de l'expérience sont représentés respectivement sur les figures Fig. 3c et Fig. 3d. Les analyses statistiques n'ont pas décelé d'effet significatif de la température sur les variations de HIX ($p > 0.001$, Tableau S 2). Le sol 2 présente des valeurs de HIX plus élevées que le sol 1 pendant l'incubation (Fig. 3c). Pour le sol 1, les valeurs moyennes de HIX tendent à augmenter et fluctuent entre 3.4 et 3.8 (Tableau S 1), mais restent très basses. Pour le sol 2, nous notons des valeurs relativement faibles de HIX, bien que plus élevées que pour le sol 1, qui augmentent de t0 à t3 puis se stabilisent jusqu'à la fin de l'incubation. Les différences entre les deux sols sont plus marquées sur l'évolution de l'indice $S_{275-295}$ dont les valeurs sont plus élevées pour le sol 1 (Fig. 3d). Les valeurs semblent constantes mais avec une tendance à la diminution pour le sol 1. Aucune différence significative n'a été démontrée entre les températures de 20°C et 30°C sur les valeurs de $S_{275-295}$ (pour les deux sols) en considérant toute la durée de l'incubation ($p > 0.001$, Tableau S 2).

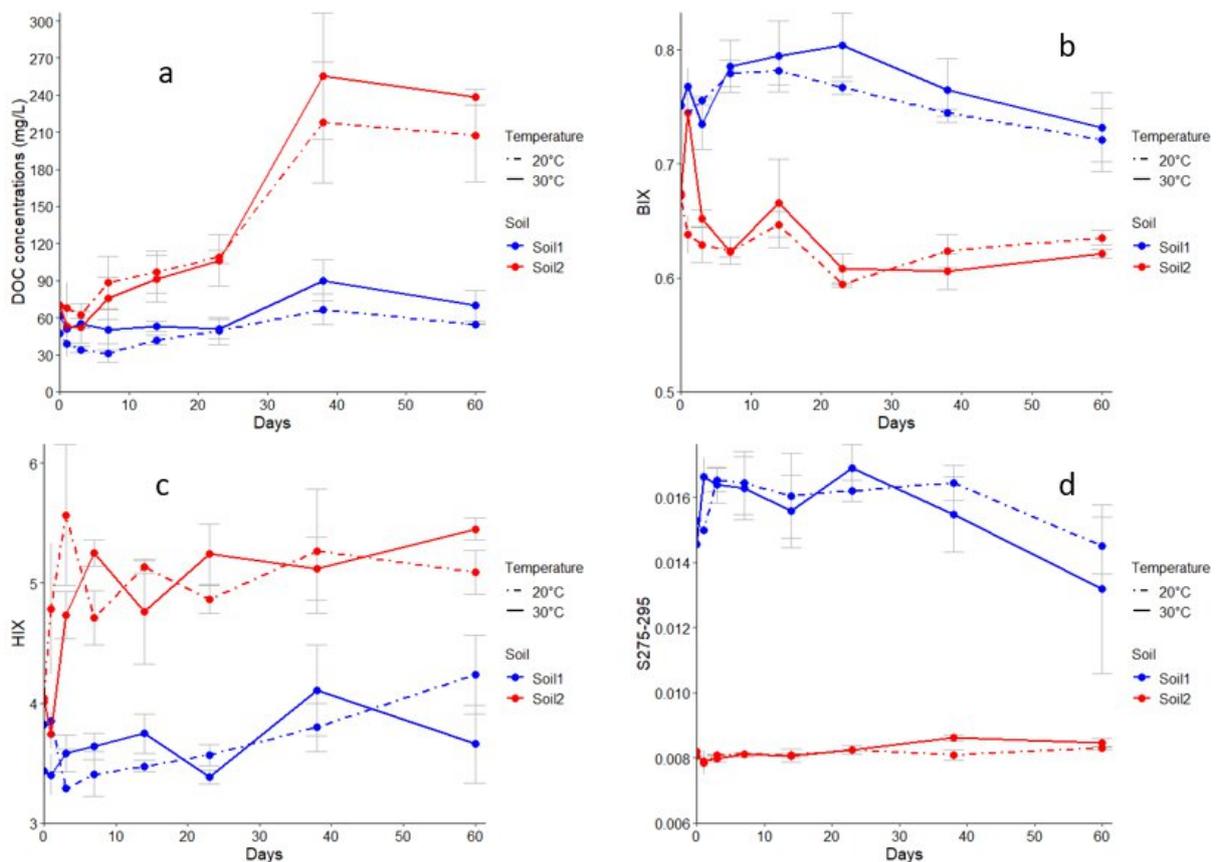


Fig. 3 : Evolution des indices de quantité et de qualité de la MOD au cours de l'expérience : concentrations de carbone organique dissous (COD) (a), indice biologique BIX (b), indice d'humification HIX (c) et indice de taille moléculaire $S_{275-295}$ (d).

3.2.2 Distribution des composants PARAFAC de la MOD

L'analyse multivariée PARAFAC a permis de déterminer, pour les 125 spectres de fluorescence des échantillons de cette expérience, 4 composants (**Fig. S 1**) expliquant l'ensemble du jeu de données. Leurs distributions au cours de l'expérience sont représentées sur la **Fig. 4**.

L'interprétation des composants a été réalisée par comparaison avec la littérature ainsi qu'avec la base de données « OpenFluor database » (<http://www.openfluor.org/>) (Murphy et al. 2014). Les distributions au cours de l'expérience de ces 4 composants sont représentées sur la **Fig. 4**.

Le composant 1 (C1) est assimilable à des composants oxydés d'origine microbienne tels que définis par (Cory and Mcknight 2005) ou dégradés à partir de la lignine (Peleato et al. 2017 ; Zhou et al. 2019). Le composant C2 est similaire à des composés dérivés des végétaux supérieurs type hydroxy-aromatiques ou quinones résultant de la dégradation de la lignine (Cory and Mcknight 2005). Le composant C3 a été observé dans la littérature comme source allochtone d'origine végétale en milieu aquatique (Gonçalves-Araujo et al. 2015; Gao and Guéguen 2017) et décrit comme correspondant à des composés de type lignine peu remanié dans les sols depuis leur production (Stubbins et al. 2014 ; Retelletti Brogi et al. 2020). Les correspondances avec le composant 4 (C4) ont été plus difficiles à établir. Il est proche néanmoins de fractions de MOD de faible poids moléculaire d'origine microbienne et de composants de type protéine et tryptophane (Jørgensen et al. 2011 ; Lambert et al. 2016).

Pour l'ensemble des dates d'incubation et pour les deux températures, les distributions relatives des composants C1, C2, C3 et C4 étaient respectivement de : 25-28%, 16-18%, 35-37%, 18-24% pour le sol 1 ; 20-25%, 22-25%, 35-39% et 14-19% pour le sol 2 (**Fig. 4**). Le composé C3 est donc le plus abondant et le composé C4 est le composant le moins abondant dans les deux sols. Les composés C1 et C4 ont une abondance plus importante dans le sol 1 que dans le sol 2. Globalement, les abondances des composants varient peu pendant l'incubation. Aucune différence significative n'a été décelée sur la distribution des composants PARAFAC au cours de l'incubation en fonction de la température ($p > 0.001$).

Pour les deux sols et sur l'ensemble de l'expérience, le facteur Température n'a pas significativement impacté les intensités de fluorescence des 4 composants ($p > 0.001$), même si les intensités paraissent plus importantes à 30°C qu'à 20°C (**Fig. S 2** : Evolution des intensités de fluorescence maximale des 4 composants PARAFAC, C1 (a), C2 (b), C3 (c) et C4 (d) au cours de l'expérience). Cependant, l'élément le plus notable est le pic d'intensité des 4 composants dans le sol 1 incubé à 20°C au 38^{ème} jour de l'incubation. Cette dynamique n'a pas été observée à 30°C, ni dans le sol 2. Globalement, les intensités de fluorescence des 4 composants sont constantes dans le sol 2 au cours de l'incubation, les oscillations étant plus discernables dans le sol 1.

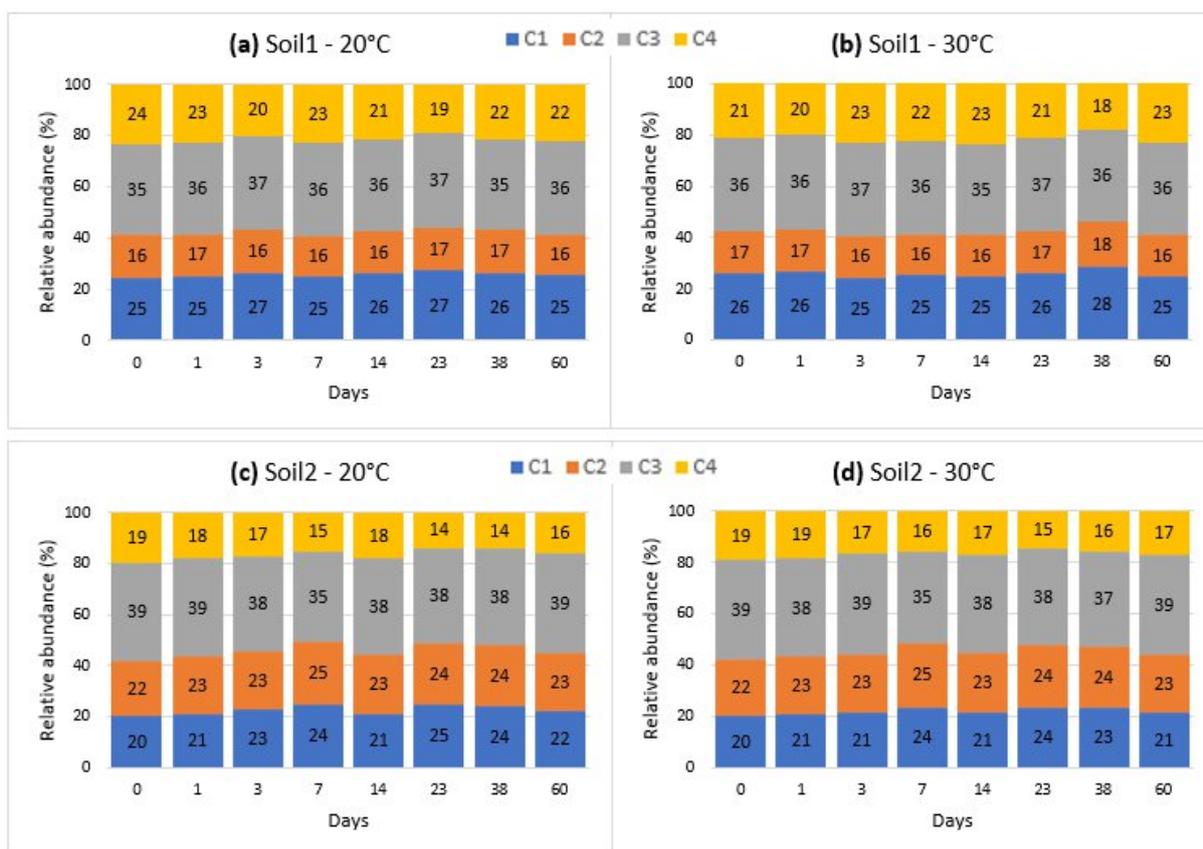


Fig. 4 : Evolution des abondances des composants PARAFAC au cours de l'incubation dans les deux sols à 20°C (a-sol 1, c-sol 2) et à 30°C (b-sol 1, d-sol 2).

3.3 Impact de la température sur la chimie du sol

3.3.1 Concentrations de Cu total et pCu dans les extraits

La concentration du Cu total dans les extraits et la pCu sont les deux indicateurs utilisés dans ce travail pour évaluer la dynamique du cuivre disponible en fonction des sols et de la température. Sur l'ensemble des dates d'extraction, les valeurs moyennes du Cu dans les extraits varient entre 0.31 μM et 0.70 μM pour le sol 1, et entre 1.14 μM et 1.64 μM pour le sol 2 pour les deux températures (Fig. 5a, Tableau S 1). En considérant toutes les dates d'extraction, la température a significativement influencé les concentrations de Cu ($p < 0.001$, Tableau S2). Cependant, le facteur « Sol » est celui qui a impacté significativement les concentrations de Cu dans les extraits ($p < 0.001$, Tableau S 2). En effet, les deux sols présentent des dynamiques contraires. Dans le sol 1, les concentrations de Cu total dans les extraits augmentent progressivement du début à la fin de l'incubation, cette augmentation est plus notable à la température de 30°C (Fig. 5a). En plus, la concentration en Cu en solution à t60 est plus importante à 30°C qu'à 20°C dans le sol 1. Cependant dans le sol 2, les concentrations de Cu baissent entre t0 et t60 avec les deux températures.

Les valeurs de pCu fluctuent entre 8.61 et 9.29 pour le sol 1, et entre 7.46 et 8.52 pour le sol 2 toutes températures considérées (Fig. 5b, Tableau S 1). La température n'a pas significativement affecté l'évolution de la pCu ($p > 0.001$, Tableau S2). Dans le sol 1, les valeurs de pCu atteignent un pic à t14 (pCu = 9.14 à 20°C et 9.29 à 30°C) puis diminuent graduellement entre t14 et t60 (Fig. 5b). Dans le sol 2, la pCu est constante entre t0 et t38 (valeurs entre 8.23 et 8.52) et baisse brusquement jusqu'à 7.46 à la fin de l'incubation. Le facteur « Sol » est celui qui affecte le plus l'évolution de la pCu au cours de l'incubation (F-value = 220, Tableau S 2).

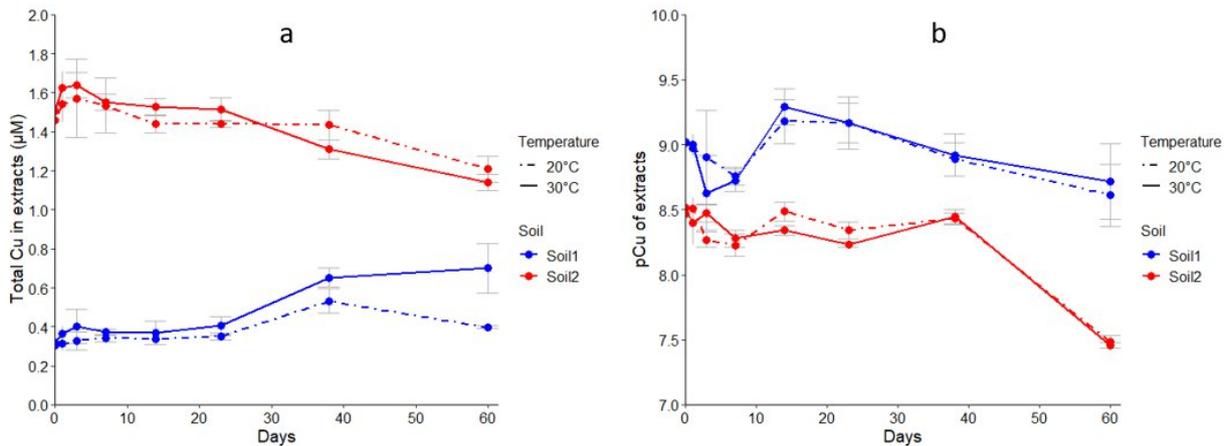


Fig. 5 : Evolution des concentrations de Cu total dans les extraits (a) et des valeurs de pCu (b) au cours de l'expérience.

3.3.2 pH et concentrations des cations en solution

La dynamique du pH pendant l'incubation est représentée sur la Fig. 6. Nous n'avons pas trouvé d'impact significatif de la température sur l'évolution du pH ($p > 0.001$, Tableau S 2). Tout au long de l'expérience, le sol 1 présente des valeurs de pH supérieures au sol 2. Pour le sol 1, les valeurs de pH varient entre 6.4 et 6.7 tandis qu'elles fluctuent entre 5.4 et 6.3 pour le sol 2 (Fig. 6, Tableau S 1). Tel que noté avec la pCu, le pH du sol 2 reste constant jusqu'à t60 où il baisse brutalement (d'environ 0.7 unité pH) à 20°C et à 30°C.

Les dynamiques des autres éléments (Fe, Mn, Zn et Ca) en solution sont représentées sur la Fig. S 3. De ces 4 métaux, le Fe et le Mn en solution semblent suivre la même évolution que le Cu (Fig. S 3a et b).

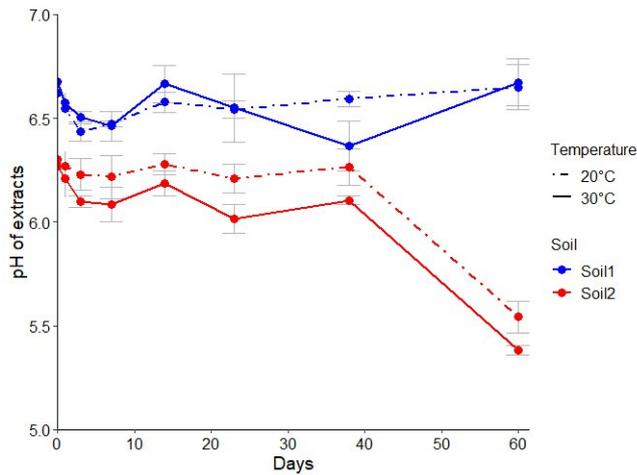


Fig. 6 : Evolution des valeurs de pH des extraits au cours de l'expérience.

4 Discussion

4.1 La nature des sols affecte davantage l'activité biologique des sols que la température

Il était important dans cette étude d'évaluer l'activité biologique des sols, afin de comprendre si elle peut engendrer des changements sur la dynamique du cuivre sous l'effet de la température. Les résultats ont montré une minéralisation du carbone plus importante pour le sol 1 que pour le sol 2 (Fig. 1). Le sol 1 a également montré des activités enzymatiques supérieures à celles du sol 2 (Fig. 2). Au début de l'incubation, la différence majeure entre les deux sols de cette étude réside dans le ratio C:N, qui est de 11.8 pour le sol 1 et de 15.3 pour le sol 2. Le ratio C:N du sol est connu pour être un indicateur de l'activité biologique et de la structure des communautés bactériennes du sol (Yamakura and Sahunalu 1990). Il est généralement admis qu'un ratio C:N supérieur à 15 indique une activité biologique ralentie dans le sol tandis que des valeurs de C:N entre 9 et 12 témoignent d'une rapide minéralisation de la MO (Swift et al. 1979). Le ratio C:N élevé dans le sol 2 indique une quantité moins importante d'azote dans le sol, ce qui induit une minéralisation plus lente. L'humus ainsi produit est plus stable dans le sol.

La température est l'un des facteurs qui affecte considérablement la respiration microbienne dans le sol (Lloyd and Taylor 1994). L'augmentation de la température dans les sols est susceptible d'impacter les émissions de CO₂ dans l'atmosphère résultant de la minéralisation de la matière organique. Dans notre étude, nous avons trouvé que la minéralisation du carbone était clairement plus importante à 30 °C qu'à 20 °C. Ce résultat est fidèle à notre hypothèse initiale et est en accord avec la littérature. Beaucoup d'études qui se sont intéressées à l'impact de la température sur la minéralisation du carbone ont été conduites en milieu forestier. L'effet de la température sur le taux de minéralisation du carbone est notable lorsque certains facteurs tels que l'humidité ne sont pas limités dans le sol

(Lloyd and Taylor 1994). Dans notre étude, l'humidité était maintenue à 60% de la capacité au champ pendant l'incubation, ce qui a probablement favorisé l'effet de la température sur la respiration microbienne. Nos résultats sur la respiration ont aussi montré que les différences induites par le changement de température sont plus importantes sur le sol 1 que sur le sol 2. En effet, il a été démontré que les fractions de carbone les plus disponibles aux microorganismes étaient les plus réactives à la décomposition face aux variations de température (Davidson et al. 2000). Ainsi, le sol 2 dont le ratio C:N est relativement élevé serait composé de matières organiques plus récalcitrantes, dont la décomposition est plus lente et sur laquelle la température a un effet limité.

Généralement, l'activité des enzymes dans le sol dépend fortement de la concentration des substrats et des variables environnementales telles que l'humidité et la température (Burns et al. 2013). Contrairement à la minéralisation du carbone, la température n'a pas eu d'effet significatif sur les activités enzymatiques dans les deux sols sur l'ensemble de l'expérience. Cela pourrait s'expliquer de deux façons. D'abord, même si les deux sols ont été incubés à 20°C et à 30°C pendant l'expérience, les activités enzymatiques ont cependant été mesurées après une incubation protocolaire à 25°C. Cette manipulation opératoire a pu effacer l'effet de la température, d'autant plus que c'est la sensibilité des enzymes à dégrader les substrats qui est évaluée dans ce travail. En plus, il se peut que les microorganismes se soient adaptés à la plage de températures utilisée dans cette expérience (20°C-30°C) si bien que leurs activités de production enzymatique varient peu quelle que soit la température appliquée au sol (acclimatation thermique). A'Bear et al. (2014) ont suggéré que les communautés impliquées dans la dégradation de la MO dans le sol étaient plus résistantes aux variations de température lorsque le sol est à une humidité constante et suffisante. Selon Nottingham et al. (2016), les enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation des composés organiques complexes (telles que la cellobiohydrolase) sont celles qui sont les plus sensibles face aux variations de température. La température influencerait également les processus de désorption et d'adsorption des molécules enzymatiques sur les particules solides du sol, ce qui peut perturber leur capacité catalytique vis-à-vis des composés organiques du sol (Fanin et al. 2022).

4.2 Les sols étudiés se différencient par l'évolution et la qualité de la MOD

La dynamique de la matière organique dissoute dans les sols est tributaire de plusieurs facteurs tels que la nature des sols, l'activité microbienne et les variables environnementales (Gmach et al. 2020). La température n'a pas significativement affecté la dynamique du COD au cours de l'incubation. Les concentrations de COD ont augmenté au cours du temps et de façon plus rapide et plus quantitativement importante dans le sol 2 (**Fig. 3a**). Dans le sol 1, l'augmentation des teneurs en COD pourrait être expliquée par l'activité biologique (relativement importante), qui par la décomposition de la MO du sol libère des composés en solution (Kalbitz et al. 2000). Cependant, cette explication est difficilement transposable sur le sol 2. En effet, le sol 2 est celui qui présentait la minéralisation la plus faible, avec des vitesses de minéralisation qui stagnent rapidement et les activités enzymatiques les plus limitées, mais qui subit une augmentation de la concentration du COD d'environ

5 fois entre le début et la fin de l'incubation (**Fig. 3a**). Il est possible que dans le sol 1 l'activité microbienne conduise à une minéralisation totale des molécules organiques, libérant ainsi plus de CO₂, alors que dans le sol 2 la minéralisation est incomplète du fait d'une activité biologique plus faible, et implique la production de molécules solubles.

Aucune relation n'a été trouvée entre l'augmentation rapide de la concentration en COD dans le sol 2 et des changements éventuels de ses propriétés spectroscopiques (**Fig. S 4**). D'ailleurs, l'absorbance à 254 nm semble diminuer tandis que la concentration en COD augmente. Ce résultat suggère que la MOD produite dans le sol 2 au cours de l'incubation serait peu aromatique. La forte augmentation de COD dans le sol serait ainsi liée à une libération de molécules plutôt aliphatiques avec peu d'insaturations et qui seraient peu ou pas analysables par spectroscopie optique. Cette libération de MOD en solution pourrait provenir de phénomènes biologiques que les variables de cette étude (vitesse de minéralisation de la MO et activités enzymatiques) n'ont pas pu déceler. En effet, dans cette expérience, seules les activités enzymatiques d'hydrolyse ont été analysées. Il est possible que les molécules organiques solubles produites l'aient été par d'autres processus de dégradation biotique, notamment avec les enzymes oxydatives (Waldrop and Zak 2006).

Les indices HIX, BIX et S₂₇₅₋₂₉₅ permettent d'évaluer les changements opérés sur la qualité de la MOD tout au long de l'expérience. D'abord, les valeurs de HIX, BIX et S₂₇₅₋₂₉₅ montrent des différences claires entre les deux sols incubés. En comparant les deux sols, le sol 1 a présenté les valeurs de BIX et de S₂₇₅₋₂₉₅ les plus élevées tandis que les valeurs de HIX étaient les plus élevées dans le sol 2 (**Fig. 3**). Cela implique que comparé au sol 1, le sol 2 comporte une MOD plus aromatique, avec une contribution limitée en molécules d'origine biologique récentes, et dont la taille moléculaire est plus élevée. Ces constats sont en accord avec les résultats de l'activité biologique, qui ont montré des activités enzymatiques et de minéralisation du carbone plus importantes dans le sol 1. Parallèlement aux indices de qualité de la MOD, la décomposition PARAFAC a montré peu d'évolution avec le temps et avec la température de la distribution des composants trouvés (**Fig. 4**). Cependant, leurs intensités de fluorescence respectives oscillaient avec le temps et la température, surtout dans le sol 1 (**Fig. S 2**), qui présente la plus forte activité biologique. Le composant 1 est prédominant pour les 2 sols, cependant, les composés C1 et C4 étaient proportionnellement plus abondants dans le sol 1 que dans le sol 2 qui est caractérisé par une plus forte proportion de C2. La distribution des composants 1 et 4, assimilables aux composés les moins condensés de cette analyse PARAFAC, confirme que les deux sols subissent des dynamiques d'évolution différentes. Le pic des composants PARAFAC à t38 dans le sol 1 à 20°C souligne une production de composés fluorescents à cette date, qui correspond aussi à une augmentation de la concentration de COD, passant de 49 à 67 mg L⁻¹ de t23 à t38 **Tableau S 1** : Récapitulatif des résultats des variables mesurées dans les extraits et dans les sols au cours de l'expérience. Les lettres symbolisent les différences significatives entre les valeurs moyennes à différentes dates d'extraction (p < 0.001). nd = Données non disponibles). Cette phase coïncide aussi à un regain des activités enzymatiques liées au carbone, qui auraient provoqué la mise en solution de molécules issues de la dégradation de la MO. Cependant, cette observation n'est pas applicable au même sol à 30°C.

Contrairement à notre hypothèse initiale, la température n'a significativement affecté ni la quantité (concentrations de COD), ni la qualité et la composition de la MOD. Le pic de production de composés fluorescents à t38 dans le sol 1 se rapporterait plus à un effet combiné Sol x Temps qu'à un effet Température. Conformément à nos résultats, Chow et al. (2006) ont trouvé que la température n'affectait pas la production, ni la composition qualitative de MOD dans des sols agricoles incubés entre 10°C et 30°C. La même étude avait trouvé que la MOD devenait de plus en plus aromatique et hydrophobe, seulement lorsque l'humidité du sol en incubation augmentait. Cependant, Bertolet et al. (2018) ont avancé que lorsque la température augmente dans le sol, les processus microbiens consomment davantage la MOD et cela entraîne la diminution de sa concentration. Selon Martínez et al. (2003), l'effet de la température est plus important sur la production de MOD lorsque des temps de plus en plus longs sont considérés. L'écart de température ainsi que le temps d'incubation appliqués dans notre expérimentation étaient peut-être trop faibles pour entrevoir des différences probantes.

4.3 La température affecte-t-elle la disponibilité du cuivre ?

Le pH est un facteur important dans le sol qui régit la plupart des mécanismes physico-chimiques et biologiques. Le pH dans les extraits au cours du temps a présenté des évolutions variables suivant le sol considéré (**Fig. 6**). Les variations de pH sont plus importantes dans le sol 2 que dans le sol 1 tout au long de l'expérience. Le sol 1 du fait de sa granulométrie argilo-limoneuse et sa plus forte concentration en Ca (**Fig. S 1d**), aurait plus de capacités à tamponner le pH en solution et à ainsi limiter ses variations (Bache 2006). Dans le sol 2, une forte baisse de pH s'est manifestée uniquement à t60. Nous pensons que cette acidification est liée à la production de MOD matérialisée par l'augmentation notable de la concentration de COD (**Fig. 3a**). Cette MOD serait composée de petits acides dont l'accumulation dans la solution a fini par provoquer la baisse du pH. La température n'a pas significativement affecté la dynamique du pH dans les deux sols au cours de l'incubation. Ces résultats diffèrent de ceux de Guoju et al. (2012) et de Cornu et al. (2011) qui ont noté que le pH augmentait avec la température du sol. Les auteurs ont avancé que l'augmentation de la température induit une minéralisation plus importante de la MO du sol avec pour conséquence une production des composés alcalinisants. Nous avons effectivement observé cette augmentation de la minéralisation, mais sans alcalinisation. A l'échelle d'une saison, le pH des sols agricoles augmente généralement lors des températures automnales mais ces observations sont fortement liées aux changements du taux d'humidité (Slattery and Ronnfeldt 1992).

L'objectif principal de cette étude était d'étudier l'impact des variations de température sur la disponibilité du cuivre dans les deux sols étudiés. Au début de l'expérience, la concentration en Cu dans les extraits était environ 5 fois plus importante dans le sol 2 que dans le sol 1 (**Fig. 5a**), alors que les deux sols présentent des concentrations similaires en Cu total (**Tableau 1**). Cette différence pourrait s'expliquer par le pH plus faible et par le degré d'humification plus important dans le sol 2,

conditions qui permettraient une plus forte mobilisation du cuivre en solution (Temminghoff et al. 1997).

Pendant toute l'expérience, la température a significativement impacté la dynamique du Cu en solution, avec des concentrations plus importantes à 30 °C qu'à 20 °C (**Fig. 5a, Tableau S 2**). Cela indique que plus la température est élevée, plus la désorption du Cu est importante. Doula et al. (2000) ont noté que la désorption du Cu est un processus endothermique et dont l'intensité augmente avec la température. Mais ce processus concernerait essentiellement une désorption qui engage les oxydes et les argiles. Dans notre étude, il est aussi envisageable que la minéralisation de la MO, plus importante à 30 °C, ait provoqué une déstructuration des complexes initiaux MO-Cu du sol, les rendant plus petits et favorisant leur passage en solution. Cependant, Sheaffer et al. (1979) ont montré que des variations de température de sol entre 16 °C et 35 °C n'avaient pas d'impact significatif sur les concentrations de Zn, Cu, Ni et Cd extraits par du 0.005 M DTPA. En plus, il a été montré dans cette même étude que les métaux étaient plus présents dans les tissus végétaux à 30 °C qu'à 16 °C. Mais ce phénomène était surtout lié à une plus forte capacité des plantes à prélever des éléments en solution lorsque la température augmente, et pas à une éventuelle augmentation de la mobilité des métaux. Cependant, l'effet de la température sur la disponibilité des métaux serait plus notable lorsque les sols sont amendés de matières organiques facilement décomposables (Silveira et al. 2003). La température dans ce cas exacerberait fortement la minéralisation de la MO, qui elle affecterait la disponibilité des métaux surtout celle du Cu. Notre étude a porté sur des sols stabilisés, relativement pauvres en MO et subissant peu de modifications saisonnières, ce qui fait que même si la température a eu un effet significatif sur le Cu en solution, les différences entre 30 °C et 20 °C restent néanmoins faibles (**Tableau S 1**).

Les concentrations de Cu dans les extraits augmentent au fil de l'incubation dans le sol 1 tandis qu'elles diminuent dans le sol 2. Ces résultats confirment les observations précédentes qui relèvent des différences de comportements entre les deux sols sous l'effet de l'incubation. La disponibilité des métaux en solution dépend généralement du pH et de la MO (fraction solide ou dissoute). Aucun lien significatif n'a été trouvé entre la concentration de Cu dans les extraits et le pH en solution (**Fig. 7a**), les variations de pH ayant été globalement faibles pendant l'expérience. Cependant, les plus faibles valeurs de pH dans le sol 2 (acidification observée à t60) correspondent aux concentrations les plus faibles de Cu. Ce résultat est surprenant dans la mesure où la concentration de Cu disponible augmente généralement lorsque le pH diminue (Temminghoff et al. 1997 ; Sauvé et al. 2000). Cette observation rejoint les résultats précédents qui confirment une dynamique particulière du Cu dans le sol 2.

La relation entre le Cu dans les extraits et la concentration de COD est différente suivant les sols : elle est positive dans le sol 1 et négative dans le sol 2 (**Fig. 7b**). Cependant, pour les deux sols et pour les deux températures, aucune relation probante n'a été établie entre la concentration du Cu en solution et l'indice d'aromaticité HIX (**Fig. 7c**), ni les intensités de fluorescence des composants PARAFAC (**Fig. S 1**). Cela suggère que la dynamique du Cu en solution n'est pas liée à la composition de la MOD. Néanmoins, les résultats du sol 1 corroborent notre hypothèse initiale, qui était que la

MOD produite par l'activité microbienne complexerait le Cu solide et l'entraînerait en solution (Mécanisme 1) (Amery et al. 2008 ; Araújo et al. 2019) ou libérerait du cuivre initialement localisé dans des complexes en phase solide MO-Cu en dégradant la partie organique du complexe solide (Mécanisme 2). Les mesures que nous avons réalisées ne permettent pas de distinguer ces deux mécanismes. Cependant ici, le faible lien entre qualité de la MOD et Cu en solution suggère que la désorption du Cu par la MOD est limitée. Ce serait ainsi le mécanisme 1 qui est majoritaire ici, mais cela nécessite des analyses plus précises. D'ailleurs, cette explication est d'autant plus plausible que le sol 1 est celui qui a présenté les activités biologiques les plus importantes au cours de l'expérience et il s'agit du sol dans lequel une relation positive a été trouvée entre Cu en solution et concentration en COD, telle que reportée classiquement dans plusieurs études (Araújo et al. 2019 ; Laurent et al. 2020).

Cependant, la dynamique Cu-MOD observée dans le sol 2 est inattendue. Il apparaît que pendant que la quantité de MOD augmente en solution, la concentration en métaux (Cu, Fe et Mn) diminue. Nous inférons que la MOD serait soumise à une désorption abiotique qui libèreraient les sites de complexation sur lesquels vont se fixer ces métaux, diminuant ainsi leur concentration en solution. De même, cette observation est partiellement similaire à un phénomène de vieillissement de Cu, qui implique sa sorption graduelle sur la phase solide du sol et diminuant ainsi sa disponibilité (Lu et al. 2009 ; Liu et al. 2020). Mais généralement, ce mécanisme survient suite à un dopage récent de métaux dans le sol et implique une corrélation positive entre la dynamique des métaux et celle de la MOD (Martínez et al. 2003). Dans le sol 2, une relation significative et positive a été trouvée entre Cu en solution et concentrations de Fe et de Mn en solution (**Fig. 8.**). La relation entre Cu et Mn en solution est plus significative dans le sol 2. Ces résultats présument que les 3 éléments ont des dynamiques conjointes et sont impliqués dans des mécanismes similaires pendant l'expérience. Ainsi, une autre hypothèse expliquant la dynamique du Cu dans le sol 2 est la formation de complexes Cu-Fe ou Cu-Mn qui vont se sorber ou sédimenter, indépendamment de la dynamique du COD. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que le sol 2 est le sol est un podzosol naturellement riche en oxydes amorphes de Fe, Mn et qu'il a présenté durant l'expérience les concentrations de Fe et de Mn les plus élevées. De même, il a été reporté une forte affinité du Cu pour les oxydes de Fe et de Mn dans des conditions où ces oxydes sont présents en quantité importante en solution (Young and Harvey 1992; Fuller and Harvey 2000). Ces complexes Cu-Fe et Cu-Mn ainsi formés se seraient sorbés soient sur des phases libérées par la MOD, soit sur de nouvelles phases réactives créées sur la MO solide du fait de sa transformation biologique. Cependant, une mesure sur les oxydes de Fe et de Mn dans le sol et en solution s'impose pour confirmer cette hypothèse. Néanmoins, la combinaison de ces réactions permettrait d'expliquer la baisse du Cu en solution dans le sol 2. D'ailleurs dans ce dernier, le Zn et le Ca ont montré une dynamique différente du Cu, du Fe et du Mn (**Fig. S 3 : Évolution des concentrations totales de Fe (a), de Mn (b), de Zn (c) et de Ca (d) dans les extraits de sols au cours de l'expérience.**), démontrant donc que le Zn et le Ca sont moins impactés par les mécanismes avancés ci-dessus. Ainsi, le Zn serait en équilibre avec des sites de réaction autres que ceux engagés avec le Cu, le Fe et le Mn, ce qui est en phase avec les différences de géochimie entre le Cu et le Zn évoquées dans la littérature (Martínez et al. 2003 ; Antoniadis and Golia 2015 ; Laurent et al. 2020).

La dynamique du Cu^{2+} dans les extraits est dans cette étude représentée par les valeurs de pCu. Ainsi, les valeurs faibles de pCu correspondent à de fortes concentrations en Cu^{2+} (Rachou et al. 2007). Même si des variations se sont opérées au cours de l'incubation, la température n'a pas significativement affecté les valeurs de pCu (Tableau S 2: Analyses répétées ANOVA pour hiérarchiser les facteurs (température, sol, durée d'incubation) ayant influencé les variables mesurées au cours de cette expérience (niveau de significativité : $p < 0.001$).). La variation la plus spectaculaire est la forte baisse de pCu à t60 dans le sol 2, cette baisse correspond aussi à la baisse de pH dans ce même sol à cette date. D'ailleurs, une relation linéaire positive a été trouvée entre les valeurs de pCu et le pH des extraits des deux sols ($R^2=0.74$, Fig. 7d). Notre hypothèse initiale était que la minéralisation de la MO sous l'effet de la température, produirait de la MOD de plus en plus réactive (aromatique) et qui complexerait les ions Cu^{2+} pour diminuer leurs concentrations en solution. Cette hypothèse ne s'est pas confirmée dans cette étude. En effet, aucune relation significative n'a été trouvée entre les valeurs de pCu et la quantité de MOD (Fig. 7e), ni son degré d'aromaticité (Fig. 7f). Nous n'avons pas non plus décelé de liens pertinents entre pCu et abondances relatives des composants PARAFAC (Fig. S 6). Ces observations nous conduisent à inférer que le pH est le principal facteur qui régit la dynamique des ions Cu^{2+} au cours de l'incubation. De même, ces résultats suggèrent que les mécanismes affectant le Cu total dans les extraits et l'activité du Cu^{2+} sont décorrélés dans cette expérience. La MOD, de par ses propriétés optiques, n'a pas affecté la dynamique du Cu^{2+} . Cependant, la forte accumulation de MOD probablement acidifiante dans le sol 2 aurait finalement entraîné une baisse de pH, qui a ainsi diminué les valeurs de pCu. L'influence de la MOD sur le Cu^{2+} serait donc indirecte et passerait par des variations de pH.

Cependant, comment la température affecte-t-elle la toxicité du cuivre envers les organismes du sol ? Cedergreen et al. (2013) ont étudié l'impact des variations de température (allant de 11°C à 25°C) sur la toxicité du cuivre envers des vers de terre. Les auteurs n'ont pas relevé de relation probante entre l'écotoxicité du Cu et la température sur les espèces étudiées. Ils ont cependant avancé que la température influencerait certains processus physiologiques tels que le passage du Cu dans les organismes sans pour autant devenir plus toxique. Inversement, Henriques et al. (2015) ont montré que l'effet combiné « Température X Degré de contamination » sur le Cu se manifesterait à des temps longs (> 80 jours) et aurait un impact important sur la diversité des communautés bactérienne du sol. Les auteurs ont ainsi recommandé de considérer les critères climatiques des sols lors des études portant sur la toxicité des métaux.

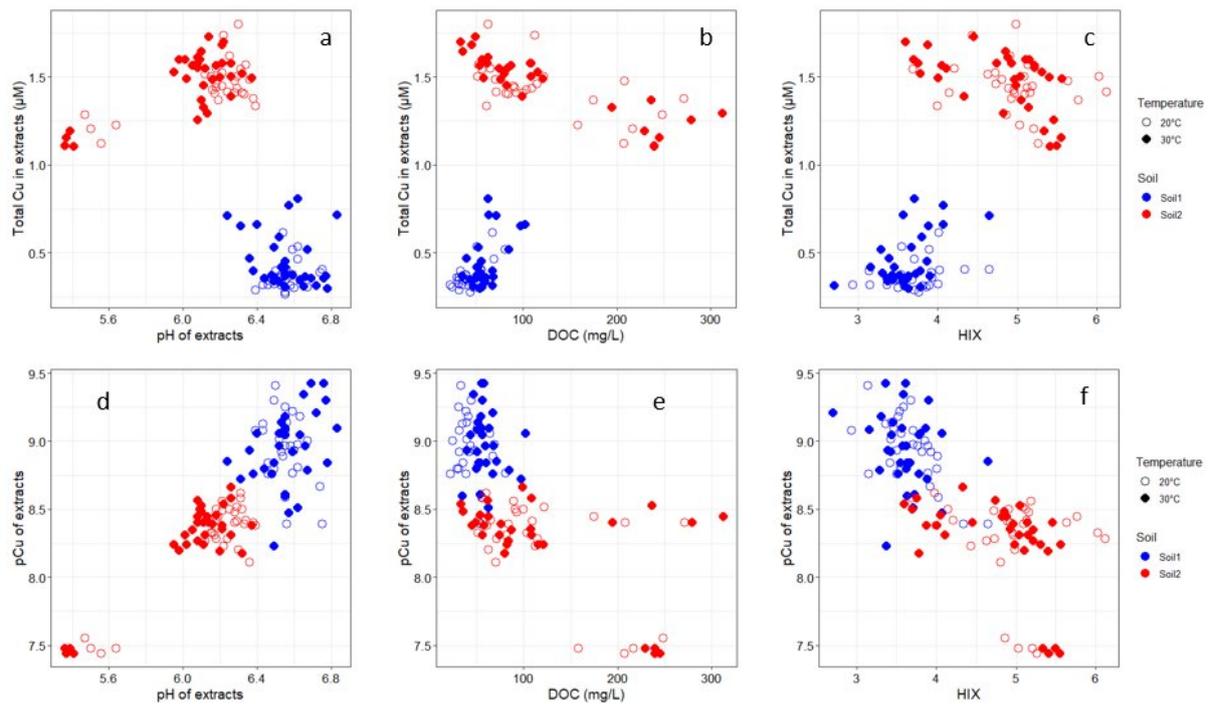


Fig. 7 : Le cuivre total dans les extraits et la pCu en fonction du pH (a, d), de la concentration en COD (b, e) et de l'indice d'aromaticité HIX (c, f) dans les extraits des deux sols au cours de l'expérience.

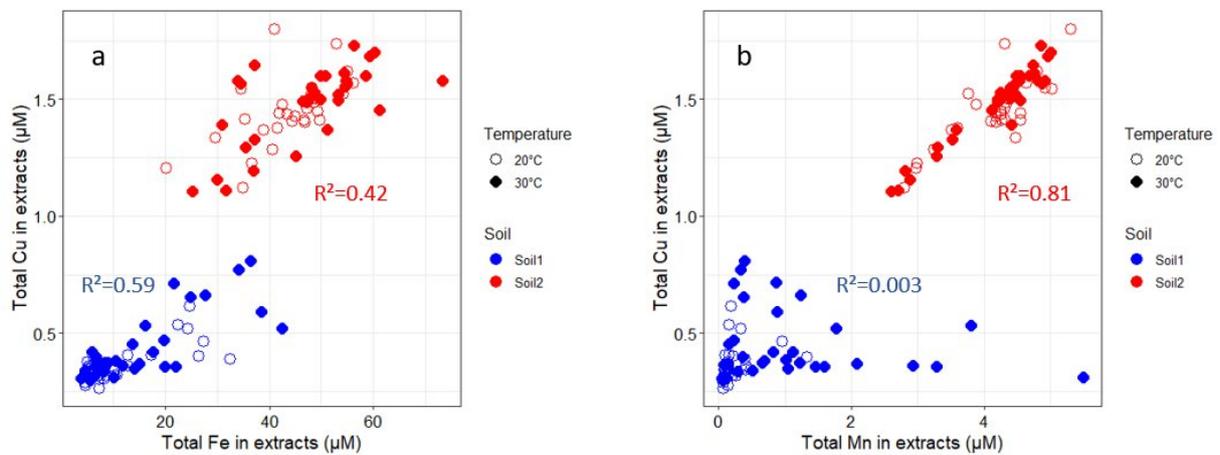


Fig. 8 : Le cuivre total dans les extraits en fonction du Fe en solution (a) et du Mn en solution (b) au cours de l'expérience.

5 Conclusion

L'objectif de cette étude était d'analyser dans deux sols viticoles différents l'effet de la température sur la disponibilité du cuivre en lien avec la dynamique de la matière organique. Les résultats ont montré que la nature des sols via leur statut organique a été le principal facteur ayant contrôlé les

dynamiques observées. Le sol avec le ratio C:N le plus faible (sol 1) a présenté les indicateurs d'activité biologique les plus importants. Les indices spectroscopiques et la décomposition PARAFAC des spectres de fluorescence ont permis de relever des différences de qualité de la MOD provenant des deux sols. La température a surtout impacté la minéralisation du carbone mais n'a pas eu d'effets significatifs sur la plupart des autres variables mesurées. Cependant, la température à 30°C a engendré plus de Cu en solution qu'à 20°C, sur l'ensemble des sols et des dates de mesure. Le cuivre total dans les extraits a augmenté pendant l'incubation dans le sol 1 mais a diminué dans le sol 2, du fait de mécanismes opérant différemment dans les deux sols, en lien avec la dynamique de la MOD et des autres métaux. Le cuivre libre Cu^{2+} , évalué via la pCu, était principalement contrôlé par le pH au cours de l'expérience et n'était pas directement lié à la dynamique de la MOD. Cette étude a consisté en l'application de températures constantes. Des études ultérieures seraient intéressantes pour analyser l'effet de températures fluctuantes sur la disponibilité et la toxicité du cuivre dans les sols contaminés.

Références

- A'Bear AD, Jones TH, Kandeler E, Boddy L (2014) Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal-mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity. *Soil Biology and Biochemistry* 70:151-158. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.017>
- Ambrosini VG, Rosa DJ, Corredor Prado JP, Borghezan M, Bastos de Melo GW, Fonsêca de Sousa Soares CR, Comin JJ, Simão DG, Brunetto G (2015) Reduction of copper phytotoxicity by liming: A study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 96:270-280. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.08.012>
- Amery F, Degryse F, Cheyns K, De Troyer I, Mertens J, Merckx R, Smolders E (2008) The UV-absorbance of dissolved organic matter predicts the fivefold variation in its affinity for mobilizing Cu in an agricultural soil horizon. *European Journal of Soil Science* 59(6):1087-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01078.x>
- Amery F, Degryse F, Degeling W, Smolders E, Merckx R (2007) The Copper-Mobilizing-Potential of Dissolved Organic Matter in Soils Varies 10-Fold Depending on Soil Incubation and Extraction Procedures. *Environmental Science & Technology* 41(7):2277-2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
- Antoniadis V, Golia EE (2015) Sorption of Cu and Zn in low organic matter-soils as influenced by soil properties and by the degree of soil weathering. *Chemosphere* 138:364-369. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.037>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferracciú Alleoni LR (2019) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Ávila G, Gaete H, Sauvé S, Neaman A (2009) Organic Matter Reduces Copper Toxicity for the Earthworm *Eisenia fetida* in Soils from Mining Areas in Central Chile. *Chilean J Agric Res* 69(2). <https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000200015>
- Bache B (2006) The role of calcium in buffering soils. *Plant, Cell & Environment* 7:391-395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01428.x>
- Ballabio C, Panagos P, Lugato E, Huang J-H, Orgiazzi A, Jones A, Fernández-Ugalde O, Borrelli P, Montanarella L (2018) Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. *Science of The Total Environment* 636:282-298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.268>
- Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahon SK, Wallenstein MD (2013) High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (81):e50961. <https://doi.org/10.3791/50961>
- Bertolet BL, Corman JR, Casson NJ, Sebestyen SD, Kolka RK, Stanley EH (2018) Influence of soil temperature and moisture on the dissolved carbon, nitrogen, and phosphorus in organic matter entering lake ecosystems. *Biogeochemistry* 139(3):293-305. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0469-3>
- Bravin MN, Martí AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalisation – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318(1):257-268. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9835-6>
- Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A (2013) Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58:216-234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>

- Cedergreen N, Nørhave NJ, Nielsen K, Johansson HKL, Marcussen H, Svendsen C, Spurgeon DJ (2013) Low temperatures enhance the toxicity of copper and cadmium to *Enchytraeus crypticus* through different mechanisms. *Environ Toxicol Chem* 32(10):2274-2283. <https://doi.org/10.1002/etc.2274>
- Chow AT, Tanji KK, Gao S, Dahlgren RA (2006) Temperature, water content and wet-dry cycle effects on DOC production and carbon mineralization in agricultural peat soils
- Cornu JY, Schneider A, Jezequel K, Denaix L (2011) Modelling the complexation of Cd in soil solution at different temperatures using the UV-absorbance of dissolved organic matter. *Geoderma* 162(1-2):65-70. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.01.005>
- Cory R, Mcknight D (2005) Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. *Environmental science & technology* 39:8142-9. <https://doi.org/10.1021/es0506962>
- Davidson E, Trumbore S, Amundson R (2000) Soil warming and organic carbon content. *Nature* 408:789-790. <https://doi.org/10.1038/35048672>
- Doula M, Ioannou A, Dimirkou A (2000) Thermodynamics of Copper Adsorption-Desorption by Ca-Kaolinite. *Adsorption* 6(4):325-335. <https://doi.org/10.1023/A:1026513032260>
- Fanin N, Bertrand I (2016) Aboveground litter quality is a better predictor than belowground microbial communities when estimating carbon mineralization along a land-use gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 94:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.007>
- Fanin N, Mooshammer M, Sauvadet M, Meng C, Alvarez G, Bernard L, Bertrand I, Blagodatskaya E, Bon L, Fontaine S, Niu S, Lashermes G, Maxwell TL, Weintraub MN, Wingate L, Moorhead D, Nottingham AT (2022) Soil enzymes in response to climate warming: Mechanisms and feedbacks. *Functional Ecology* n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14027>
- Fuller CC, Harvey JW (2000) Reactive Uptake of Trace Metals in the Hyporheic Zone of a Mining-Contaminated Stream, Pinal Creek, Arizona. *Environ Sci Technol* 34(7):1150-1155. <https://doi.org/10.1021/es990714d>
- Gao Z, Guéguen C (2017) Size distribution of absorbing and fluorescing DOM in Beaufort Sea, Canada Basin. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* C(121):30-37. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2016.12.014>
- Gmach MR, Cherubin MR, Kaiser K, Cerri CEP (2020) Processes that influence dissolved organic matter in the soil: a review. *Sci agric (Piracicaba, Braz)* 77(3):e20180164. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0164>
- Gonçalves-Araujo R, Stedmon CA, Heim B, Dubinenkov I, Kraberg A, Moiseev D, Bracher A (2015) From Fresh to Marine Waters: Characterization and Fate of Dissolved Organic Matter in the Lena River Delta Region, Siberia. *Frontiers in Marine Science* 2
- Guoju X, Qiang Z, Jiangtao B, Fengju Z, Chengke L (2012) The Relationship between Winter Temperature Rise and Soil Fertility properties. *Air, Soil and Water Research* 5:ASWR.S8599. <https://doi.org/10.4137/ASWR.S8599>
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0955>
- Henriques I, Araújo S, Pereira A, Oliveira V, Correia A, Soares A, Scott-Fordsmand J, Amorim M (2015) Combined effect of temperature and copper pollution on soil bacterial community: Climate

- change and regional variation aspects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.010>
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40(6):706-719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Hunt JF, Ohno T (2007) Characterization of fresh and decomposed dissolved organic matter using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multiway analysis. *J Agric Food Chem* 55(6):2121-2128. <https://doi.org/10.1021/jf063336m>
- IPCC (2021) *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press In Press
- Jørgensen L, Stedmon CA, Kragh T, Markager S, Middelboe M, Søndergaard M (2011) Global trends in the fluorescence characteristics and distribution of marine dissolved organic matter. *Marine Chemistry* 126(1):139-148. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.05.002>
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review
- Lambert T, Bouillon S, Darchambeau F, Massicotte P, Borges AV (2016) Shift in the chemical composition of dissolved organic matter in the Congo River network. *Biogeosciences* 13(18):5405-5420. <https://doi.org/10.5194/bg-13-5405-2016>
- Laurent C, Bravin MN, Crouzet O, Pelosi C, Tillard E, Lecomte P, Lamy I (2020) Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc availability despite contamination. *Science of The Total Environment* 709:135927. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135927>
- Liu G, Yu Z, Liu X, Xue W, Dong L, Liu Y (2020) Aging Process of Cadmium, Copper, and Lead under Different Temperatures and Water Contents in Two Typical Soils of China. *Journal of Chemistry* 2020:e2583819. <https://doi.org/10.1155/2020/2583819>
- Liu H, Wu Y, Ai Z, Zhang J, Zhang C, Xue S, Liu G (2019) Effects of the interaction between temperature and revegetation on the microbial degradation of soil dissolved organic matter (DOM) - A DOM incubation experiment. *Geoderma* 337:812-824. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.10.041>
- Lloyd J, Taylor JA (1994) On the Temperature Dependence of Soil Respiration. *Functional Ecology* 8(3):315-323. <https://doi.org/10.2307/2389824>
- Lu A, Zhang S, Qin X, Wu W, Liu H (2009) Aging effect on the mobility and bioavailability of copper in soil. *Journal of Environmental Sciences* 21(2):173-178. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62247-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62247-0)
- Martínez CE, Jacobson AR, McBride MB (2003) Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. *Environ Pollut* 122(1):135-143. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00276-2](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00276-2)
- Michaud AM, Bravin M, Galleguillos M, Hinsinger P (2007) Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. Michaud Aurélie M., Bravin Matthieu, Galleguillos M., Hinsinger Philippe. 2007. *Plant and Soil*, 298 (1-2) : pp. 99-111. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-007-9343-0>
- Murphy KR, Stedmon CA, Graeber D, Bro R (2013) Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Anal Methods* 5(23):6557. <https://doi.org/10.1039/c3ay41160e>

- Murphy KR, Stedmon CA, Wenig P, Bro R (2014) OpenFluor- an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Anal Methods* 6(3):658-661. <https://doi.org/10.1039/C3AY41935E>
- Nottingham AT, Turner BL, Whitaker J, Ostle N, Bardgett RD, McNamara NP, Salinas N, Meir P (2016) Temperature sensitivity of soil enzymes along an elevation gradient in the Peruvian Andes. *Biogeochemistry* 127(2):217-230. <https://doi.org/10.1007/s10533-015-0176-2>
- Ouédraogo F, Cornu J-Y, Janot N, Nguyen C, Sourzac M, Parlanti E, Denaix L (2021) Do DOM optical parameters improve the prediction of copper availability in vineyard soils? *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16361-5>
- Peleato NM, Sidhu BS, Legge RL, Andrews RC (2017) Investigation of ozone and peroxone impacts on natural organic matter character and biofiltration performance using fluorescence spectroscopy. *Chemosphere* 172:225-233. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.118>
- Qi R, Li J, Lin Z, Li Z, Li Y, Yang X, Zhang J, Zhao B (2016) Temperature effects on soil organic carbon, soil labile organic carbon fractions, and soil enzyme activities under long-term fertilization regimes. *Applied Soil Ecology* 102:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.004>
- R core Team (2020) R core Team,
- Rachou J, Gagnon C, Sauvé S (2007) Use of an ion-selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices. *Environmental Chemistry* 4(2):90. <https://doi.org/10.1071/EN06036>
- Retelletti Brogi S, Balestra C, Casotti R, Cossarini G, Galletti Y, Gonnelli M, Vestri S, Santinelli C (2020) Time resolved data unveils the complex DOM dynamics in a Mediterranean river. *Science of The Total Environment* 733:139212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139212>
- Rey A, Petsikos C, Jarvis PG, Grace J (2004) Effect of temperature and moisture on rates of carbon mineralization in a Mediterranean oak forest soil under controlled and field conditions. *European Journal of Soil Science* :13
- Sauvé S, Cook N, Hendershot WH, McBride MB (1996) Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environmental Pollution* 94(2):153-157. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00081-4)
- Sauvé S, Hendershot W, Allen HE (2000) Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ Sci Technol* 34(7):1125-1131. <https://doi.org/10.1021/es9907764>
- Sauvé S, McBride MB, Hendershot WH (1995) Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29(3):373-379. <https://doi.org/10.1007/BF00212503>
- Sheaffer CC, Decker AM, Chaney RL, Douglass LW (1979) Soil Temperature and Sewage Sludge Effects on Metals in Crop Tissue and Soils. *Journal of Environmental Quality* 8(4):455-459. <https://doi.org/10.2134/jeq1979.00472425000800040003x>
- Silveira MLA, Alleoni LRF, Guilherme LRG (2003) Biosolids and heavy metals in soils. *Sci agric (Piracicaba, Braz)* 60:793-806
- Slattery WJ, Ronnfeldt GR (1992) Seasonal variation of pH, aluminium, and manganese in acid soils from north-eastern Victoria. *Aust J Exp Agric* 32(8):1105-1112. <https://doi.org/10.1071/ea9921105>

- Stedmon CA, Bro R (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography* :6
- Steinweg J, Dukes J, Paul E, Wallenstein M (2013) Microbial responses to multi-factor climate change: effects on soil enzymes. *Frontiers in Microbiology* 4
- Stubbins A, Lapierre J-F, Berggren M, Prairie YT, Dittmar T, del Giorgio PA (2014) What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. *Environ Sci Technol* 48(18):10598-10606. <https://doi.org/10.1021/es502086e>
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM, Anderson JM (1979) *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. University of California Press
- Temminghoff EJM, Van der Zee SEATM, de Haan FAM (1997) Copper Mobility in a Copper-Contaminated Sandy Soil as Affected by pH and Solid and Dissolved Organic Matter. *Environ Sci Technol* 31(4):1109-1115. <https://doi.org/10.1021/es9606236>
- Waldrop MP, Zak DR (2006) Response of Oxidative Enzyme Activities to Nitrogen Deposition Affects Soil Concentrations of Dissolved Organic Carbon. *Ecosystems* 9(6):921-933. <https://doi.org/10.1007/s10021-004-0149-0>
- Xu J, Tan W, Xiong J, Wang M, Fang L, Koopal LK (2016) Copper binding to soil fulvic and humic acids: NICA-Donnan modeling and conditional affinity spectra. *Journal of Colloid and Interface Science* 473:141-151. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.03.066>
- Yamakura T, Sahunalu P (1990) Soil Carbon/Nitrogen Ratio as a Site Quality Index for Some South-East Asian Forests. *Journal of Tropical Ecology* 6(3):371-377
- Young LB, Harvey HH (1992) The relative importance of manganese and iron oxides and organic matter in the sorption of trace metals by surficial lake sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56(3):1175-1186. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90055-N](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90055-N)
- Zhou Y, Martin P, Müller M (2019) Composition and cycling of dissolved organic matter from tropical peatlands of coastal Sarawak, Borneo, revealed by fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Biogeosciences* 16(13):2733-2749. <https://doi.org/10.5194/bg-16-2733-2019>
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0)

Informations supplémentaires

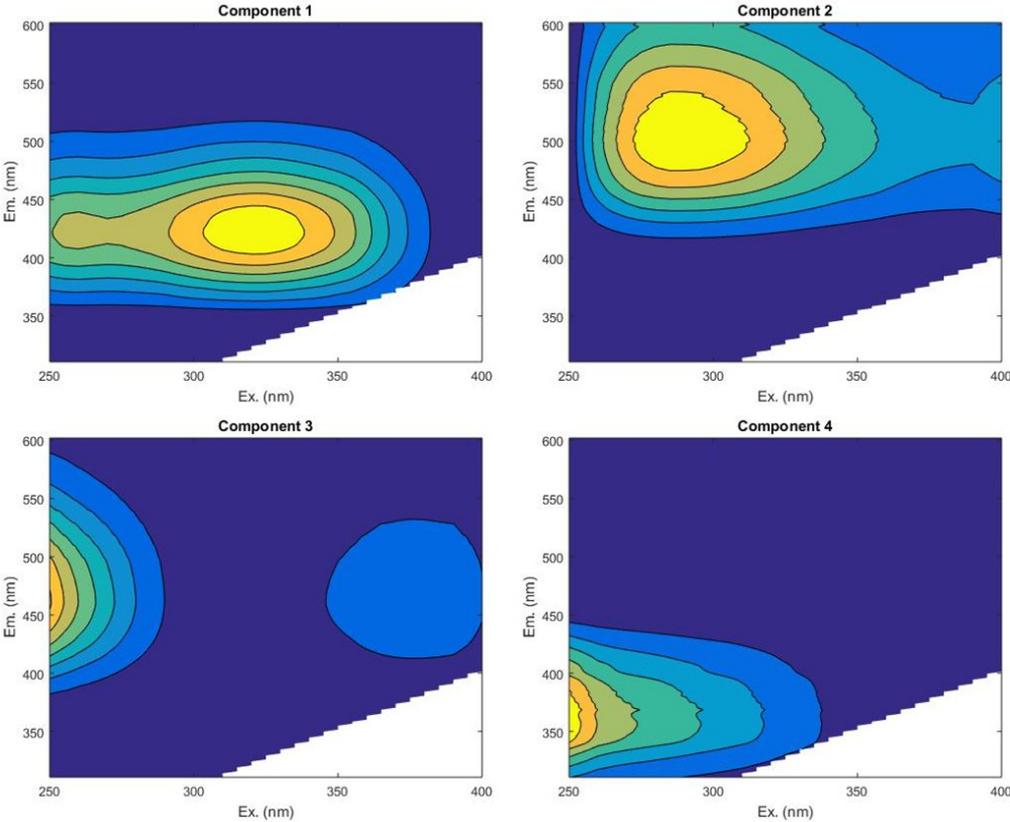


Fig. S 1 : Représentations des 4 composants issus de l'analyse PARAFAC de cette étude

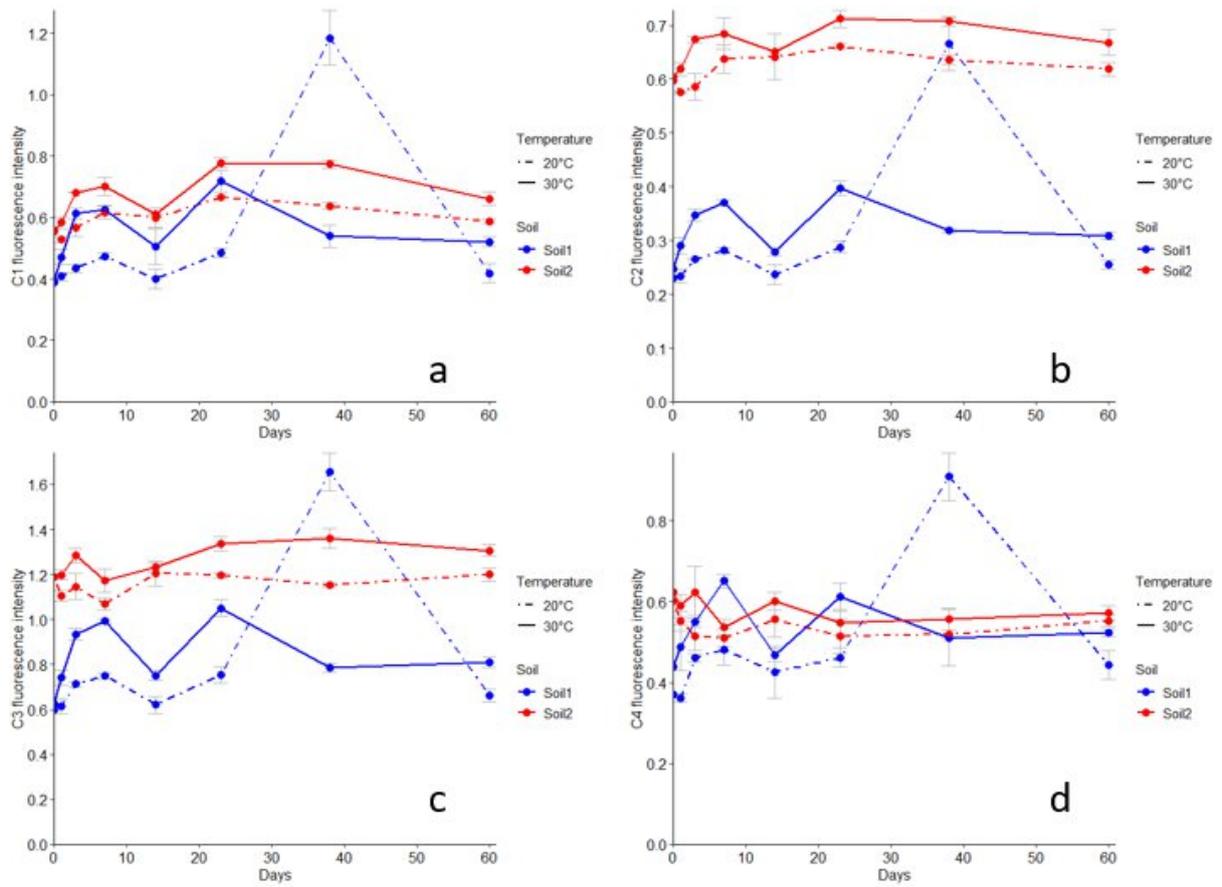


Fig. S 2 : Evolution des intensités de fluorescence maximale des 4 composants PARAFAC, C1 (a), C2 (b), C3 (c) et C4 (d) au cours de l'expérience

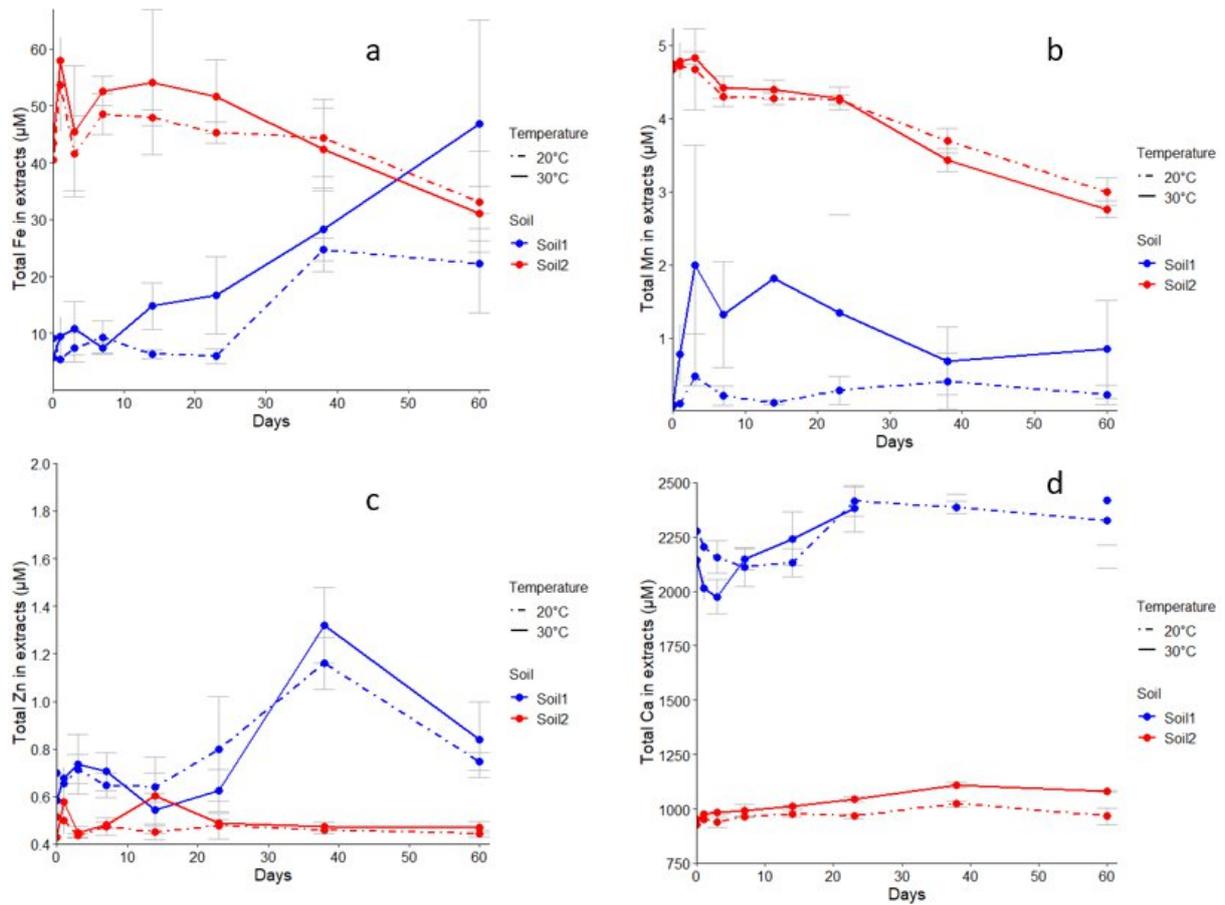


Fig. S 3 : Évolution des concentrations totales de Fe (a), de Mn (b), de Zn (c) et de Ca (d) dans les extraits de sols au cours de l'expérience.

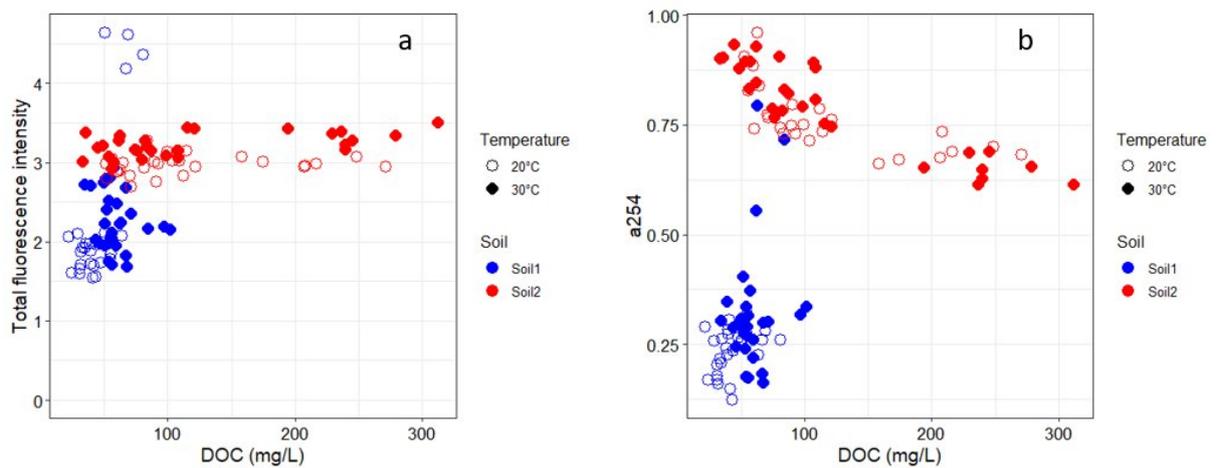


Fig. S 4: La fluorescence totale (a) et l'absorbance à 254 nm (b) en fonction des concentrations de COD au cours de l'expérience.

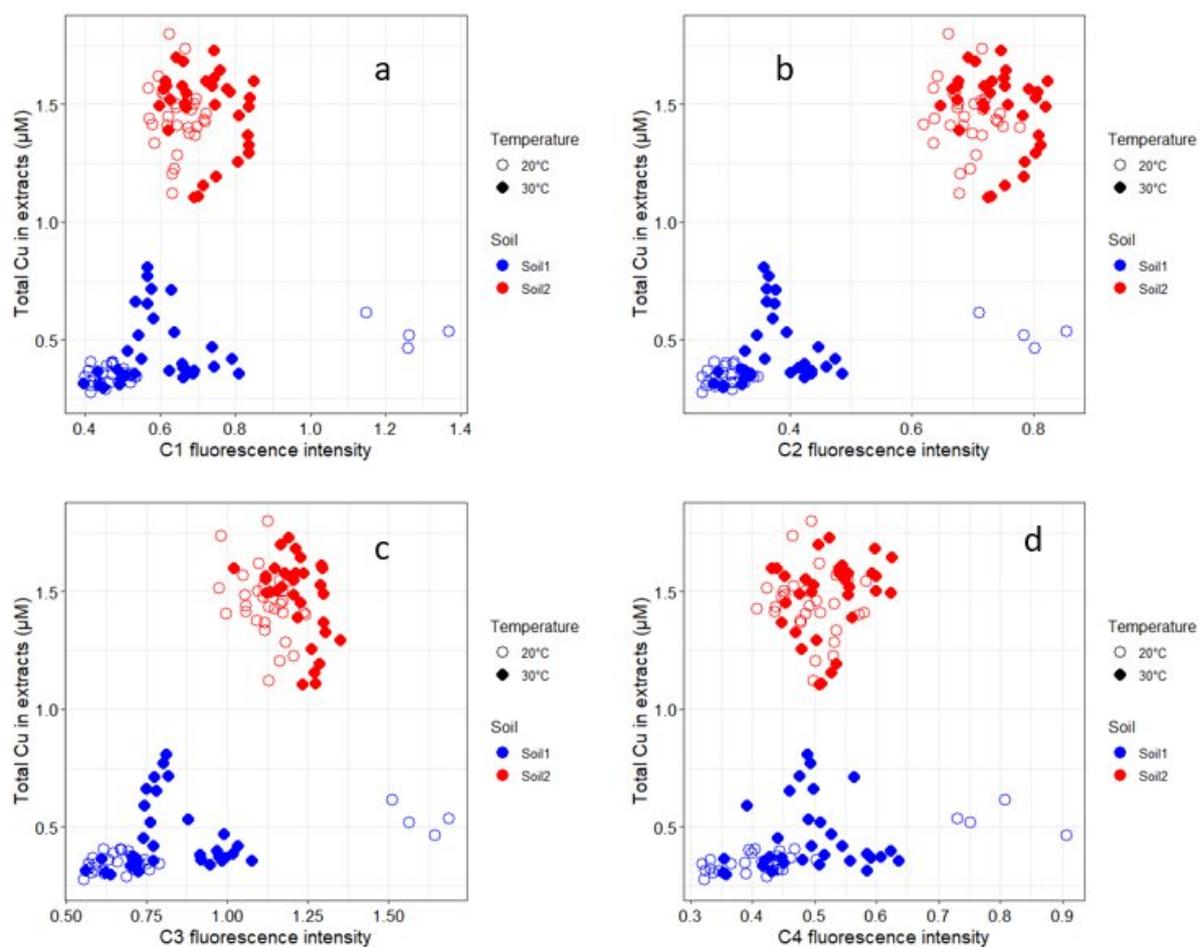


Fig. S 5: Le Cu total dans les extraits en fonction des intensités de fluorescence des 4 composants PARAFAC, C1 (a), C2 (b), C3 (c) et C4 (d)

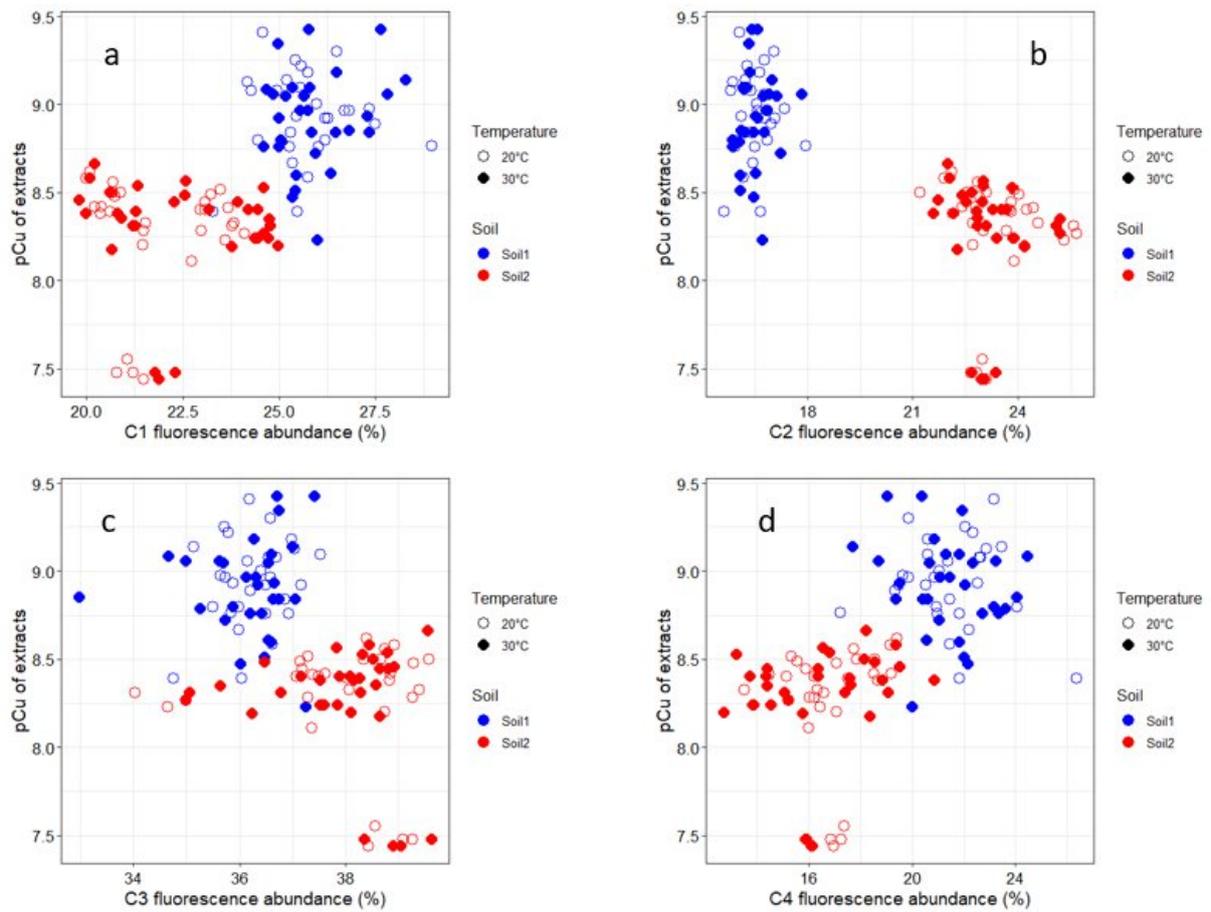


Fig. S 6 : La pCu dans les extraits en fonction des pourcentages de fluorescence des composants PARAFAC, C1 (a), C2 (b), C3 (c) et C4 (d) au cours de l'expérience.

Tableau S 1 : Récapitulatif des résultats des variables mesurées dans les extraits et dans les sols au cours de l'expérience. Les lettres symbolisent les différences significatives entre les valeurs moyennes à différentes dates d'extraction ($p < 0.001$). nd = Données non disponibles

	Sol	Température	t 0	1	3	7	14	23	38	60
pH _{KCl}	Sol 1	30°C	6.68 c	6.57 bc	6.51 ac	6.46 ab	6.67 c	6.55 ac	6.37 a	6.67 c
		20°C	6.62 bd	6.55 bc	6.44 a	6.47 ab	6.58 cd	6.54 bc	6.59 cd	6.65 d
	Sol 2	30°C	6.27 d	6.21 d	6.1 bc	6.09 b	6.19 cd	6.02 b	6.11 bc	5.38 a
		20°C	6.3 c	6.27 bc	6.23 b	6.22 b	6.28 bc	6.21 bc	6.27 bc	5.54 a
Cu (µM)	Sol 1	30°C	0.32 a	0.37 a	0.4 a	0.37 a	0.37 a	0.41 a	0.65 b	0.7 b
		20°C	0.31 a	0.31 a	0.33 a	0.34 ab	0.34 ab	0.35 ab	0.53 c	0.4 b
	Sol 2	30°C	1.51 c	1.62 de	1.64 e	1.55 ce	1.53 ce	1.52 cd	1.31 b	1.14 a
		20°C	1.46 b	1.54 b	1.57 b	1.53 b	1.44 b	1.44 b	1.44 b	1.21 a
Ca (µM)	Sol 1	30°C	2142 ab	2014 a	1976 a	2148 ab	2243 bc	2381 cd	2578 d	2419 cd
		20°C	2279 ac	2206 ab	2157 ab	2110 a	2132 a	2413 c	2386 c	2327 bc
	Sol 2	30°C	953 a	976 b	983 b	990 bc	1011 c	1045 d	1110 f	1081 e
		20°C	929 a	953 ab	939 ac	963 ab	977 b	968 bc	1024 d	966 bc
Fe (µM)	Sol 1	30°C	5.77 a	9.39 ab	10.86 ab	7.37 ab	14.78 b	16.65 b	28.25 c	46.77 d
		20°C	9.19 a	5.33 a	7.49 a	9.3 a	6.31 a	5.98 a	24.75 b	22.33 b
	Sol 2	30°C	43.5 ac	57.93 c	45.51 ac	52.61 bc	54.16 bc	51.61 bc	42.35 ab	31.03 a
		20°C	40.53 ab	53.68 c	41.6 ac	48.46 bc	47.95 bc	45.26 ac	44.32 ac	33.14 a
Zn (µM)	Sol 1	30°C	0.59 ab	0.68 ac	0.74 bc	0.71 ac	0.55 a	0.62 ab	1.32 d	0.84 c
		20°C	0.7 a	0.66 a	0.71 a	0.65 a	0.64 a	0.8 a	1.16 b	0.75 a
	Sol 2	30°C	0.43 a	0.58 bc	0.45 a	0.48 ab	0.6 c	0.49 ac	0.48 ab	0.47 ab
		20°C	0.51 a	0.5 a	0.44 a	0.47 a	0.45 a	0.48 a	0.46 a	0.44 a
Mn (µM)	Sol 1	30°C	0.07 a	0.78 a	1.99 a	1.32 a	1.82 a	1.34 a	0.68 a	0.84 a
		20°C	0.08 a	0.11 a	0.47 a	0.21 a	0.12 a	0.28 a	0.41 a	0.22 a
	Sol 2	30°C	4.68 de	4.79 e	4.83 e	4.42 cd	4.39 cd	4.28 c	3.43 b	2.76 a
		20°C	4.75 d	4.72 d	4.68 cd	4.3 c	4.28 c	4.25 c	3.69 b	3.01 a
pCu	Sol 1	30°C	9.01 bd	9 bd	8.63 a	8.73 ab	9.29 d	9.17 cd	8.92 abc	8.71 ab
		20°C	9.02 cd	8.97 bc	8.9 d	8.76 b	9.18 cd	9.17 b	8.89 bc	8.61 a
	Sol 2	30°C	8.52 f	8.4 cde	8.47 ef	8.28 bc	8.34 bd	8.23 b	8.44 df	7.46 a
		20°C	8.47 d	8.51 d	8.27 b	8.23 b	8.49 d	8.34 bc	8.43 cd	7.48 a

	Sol	Température	t 0	1	3	7	14	23	38	60	
DOC (mg L ⁻¹)	Sol 1	30°C	61.2 ab	51.1 a	55.4 ab	50.4 ab	53.1 ab	50.7 a	90.1 c	69.8 b	
		20°C	47.3 b	39 bc	34.2 ab	31.3 ab	42 ac	49.2 cd	66.8 e	54.8 de	
	Sol 2	30°C	70 ab	52.8 ab	52.2 a	75.8 ab	91.6 ab	106.5 b	255.4 c	238.6 c	
		20°C	70.2 a	67.7 a	61.9 a	88.1 a	96.8 a	109.2 a	217.9 b	207.4 b	
HIX	Sol 1	30°C	3.44 a	3.4 a	3.58 a	3.64 ab	3.75 ab	3.39 a	4.11 b	3.66 ab	
		20°C	3.82 bc	3.85 c	3.29 a	3.41 a	3.48 ab	3.56 ac	3.8 bc	4.24 d	
	Sol 2	30°C	4.04 a	3.74 a	4.74 b	5.25 c	4.76 b	5.24 c	5.12 bc	5.45 c	
		20°C	4.01 a	4.79 b	5.57 c	4.71 b	5.14 bc	4.86 bc	5.27 bc	5.09 bc	
BIX	Sol 1	30°C	0.75 ab	0.77 ac	0.73 a	0.79 bc	0.79 bc	0.8 c	0.76 ac	0.73 a	
		20°C	0.75 bc	0.74 ab	0.76 bc	0.78 cd	0.78 d	0.77 bd	0.74 ab	0.72 a	
	Sol 2	30°C	0.67 c	0.74 d	0.65 bc	0.62 ab	0.67 c	0.61 a	0.61 a	0.62 a	
		20°C	0.67 b	0.64 a	0.63 a	0.62 a	0.65 a	0.59 c	0.62 a	0.64 a	
S ₂₇₅₋₂₉₅	Sol 1	30°C	0.0146 ad	0.0166 bc	0.0164 bc	0.0163 bc	0.0156 bc	0.0169 c	0.0155 bc	0.0132 a	
		20°C	0.0153 ac	0.015 ab	0.0165 c	0.0164 c	0.016 bc	0.0162 bc	0.0164 c	0.0145 a	
	Sol 2	30°C	0.0081 ab	0.0079 a	0.008 ab	0.0081 ab	0.0081 ab	0.0083 bc	0.0086 d	0.0085 cd	
		20°C	0.0082 b	0.0078 a	0.0081 ab	0.0081 ab	0.0081 ab	0.0082 b	0.0081 ab	0.0083 b	
Enzymes (nmol kg ⁻¹)	C	Sol 1	30°C	1.16 b	nd	1.1 b	nd	0.8 a	nd	1.14 b	0.81 a
			20°C	1.28 c	nd	1.16 b	nd	0.82 a	nd	1.15 b	1.25 c
	Sol 2	30°C	0.39 b	nd	0.28 b	nd	0.23 b	nd	0.36 b	0.3 a	
		20°C	0.39 c	nd	0.33 b	nd	0.23 a	nd	0.43 b	0.29 a	
Enzymes (nmol kg ⁻¹)	N	Sol 1	30°C	0.43 bc	nd	0.42 bc	nd	0.34 a	nd	0.39 b	0.46 c
			20°C	0.4 b	nd	0.46 c	nd	0.34 a	nd	0.4 b	0.66 d
	Sol 2	30°C	0.15 b	nd	0.11 a	nd	0.09 a	nd	0.14 a	0.14 a	
		20°C	0.13 a	nd	0.12 a	nd	0.1 b	nd	0.16 a	0.14 b	

Tableau S 2: Analyses répétées ANOVA pour hiérarchiser les facteurs (température, sol, durée d'incubation) ayant influencé les variables mesurées au cours de cette expérience (niveau de significativité : $p < 0.001$).

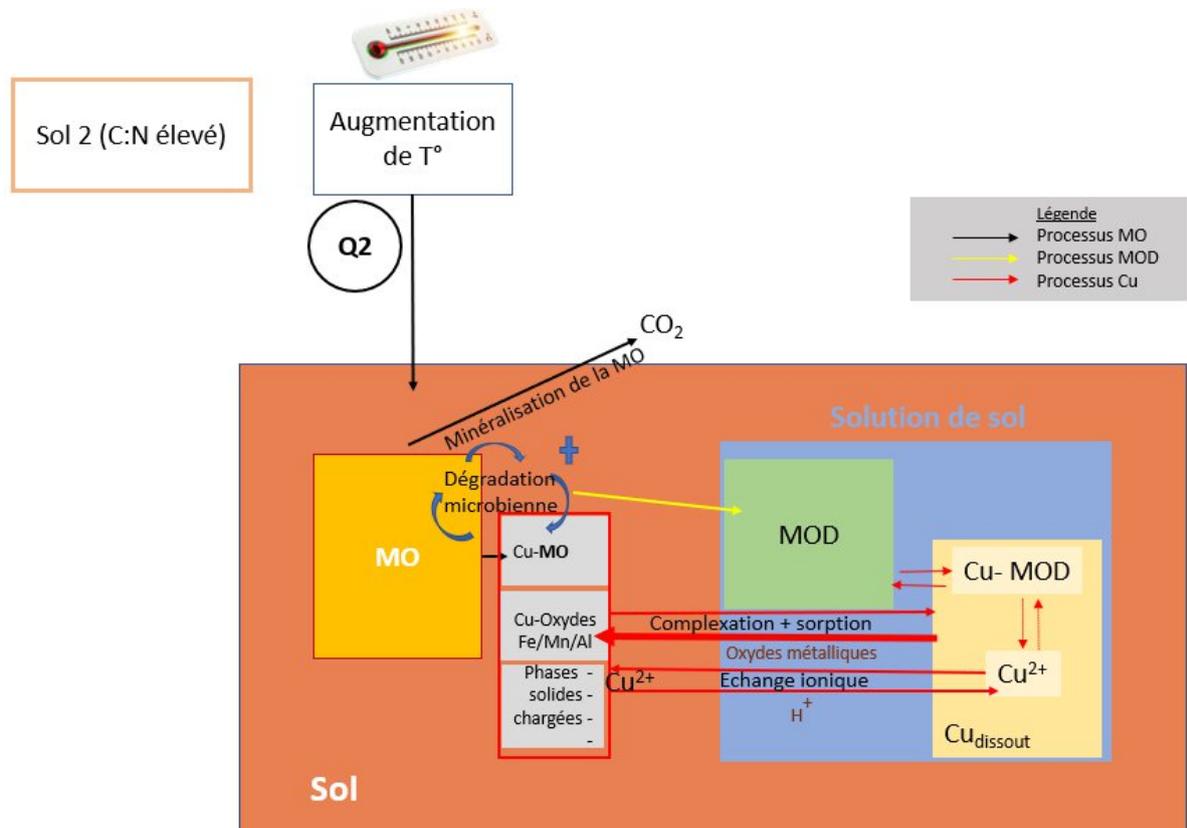
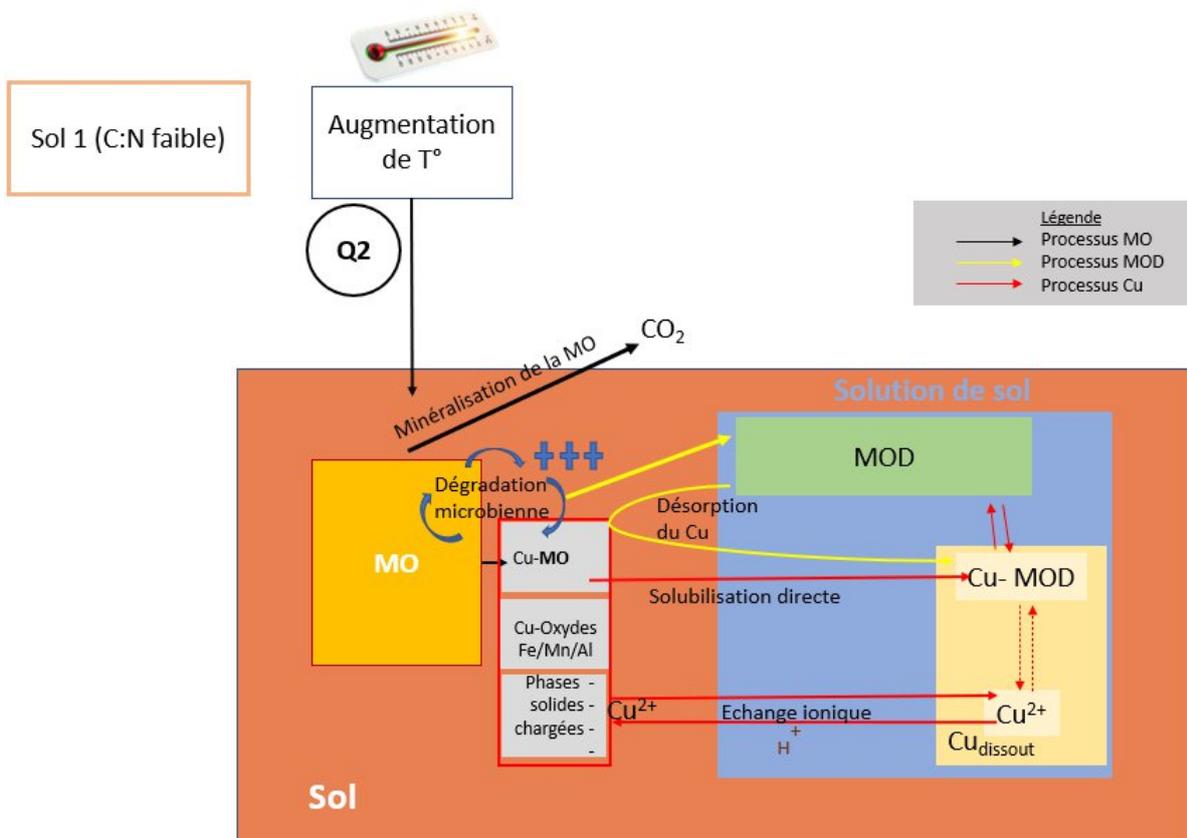
	dF	F value	p-value
Vitesse nette de minéralisation du carbone ($\text{mg C kg}^{-1} \text{ jour}^{-1}$)			
Température	12	124	<0.001
Sol	12	439	<0.001
Temps d'incubation	236	66	<0.001
Activités enzymatiques C ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ sol}$)			
Température	12	5	0.0421
Sol	12	1009	<0.001
Temps d'incubation	60	19	<0.001
Activités enzymatiques N ($\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ sol}$)			
Température	12	6	0.0296
Sol	12	350	<0.001
Temps d'incubation	60	13	<0.001
HIX			
Température	12	1	0.3184
Sol	12	268	<0.001
Temps d'incubation	106	30	<0.001
BIX			
Température	12	5	0.0383
Sol	12	499	<0.001
Temps d'incubation	106	20	<0.001
$S_{275-295}$			
Température	12	1	0.4447
Sol	12	2272	<0.001
Temps d'incubation	105	5	0.0312
DOC (mg L^{-1})			
Température	12	3	0.1288
Sol	12	137	<0.001
Temps d'incubation	91	248	<0.001
pH			
Température	12	5	0.0546
Sol	12	236	<0.001
Temps d'incubation	106	46	<0.001
Cu (μM)			
Température	12	37	<0.001
Sol	12	5998	<0.001
Temps d'incubation	105	4	0.0488
pCu			
Température	12	1	0.88
Sol	12	220	<0.001
Temps d'incubation	106	62	<0.001

Synthèse du chapitre

Les résultats du chapitre 5 montrent donc une forte influence de la nature des sols sur les variables mesurées. La MOD du sol 1 était moins aromatique et constituée de molécules de plus petite taille que le sol 2. Dans le sol 1, qui présentait les activités biologiques les plus importantes, une relation positive a été trouvée entre la concentration de carbone organique dissout et le Cu total en solution (COD). Cela a suggéré que la MOD a entraîné le passage du cuivre en solution, soit par une désorption du Cu initialement localisé sur la phase solide, soit des petits complexes MO-Cu passaient directement en solution suite à la dégradation microbienne des molécules organiques dans le sol. Dans le sol 2 (ratio C:N le plus élevé), les observations étaient différentes. Tandis que la concentration de MOD augmentait, la concentration de Cu en solution (aussi du Fe et du Mn) diminuait au cours de l'incubation. Nous avons suggéré que le Cu se sorbait sur la phase solide sous forme de complexes impliquant les particules de Fe ou de Mn. Ni les indices de qualité de la MOD, ni sa composition en fluorophores déterminés par PARAFAC, n'ont été affectés par la différence de température. La MOD produite dans le sol 2 s'est montrée particulière. En effet, l'augmentation de la concentration en COD n'était pas suivie par des modifications des intensités de fluorescence et d'absorbance, la MOD produite n'était donc ni chromophorique ni fluorescente. Malgré une minéralisation de carbone plus forte à 30°C, la température n'a pas affecté la dynamique de la MOD en termes de concentration et de qualité spectroscopique. Cependant nous notons une désorption légèrement plus forte de Cu à 30°C qu'à 20°C. Le Cu^{2+} a été principalement affecté par les variations de pH, qui étaient plus importantes dans le sol 2. Les paramètres spectroscopiques de la MOD n'ont pas permis d'établir des liens directs avec l'évolution du Cu total en solution et du Cu^{2+} .

Au final, une différence de 10°C impacte certainement la minéralisation de la MO, mais aurait une faible influence sur la dynamique de la MOD et du Cu disponible. Cependant, les dynamiques temporelles observées dépendent fortement de la nature des sols étudiés et de leur activité biologique intrinsèque.

Les deux figures ci-dessous illustrent les dynamiques observées pour ce chapitre, dans les deux sols étudiés.

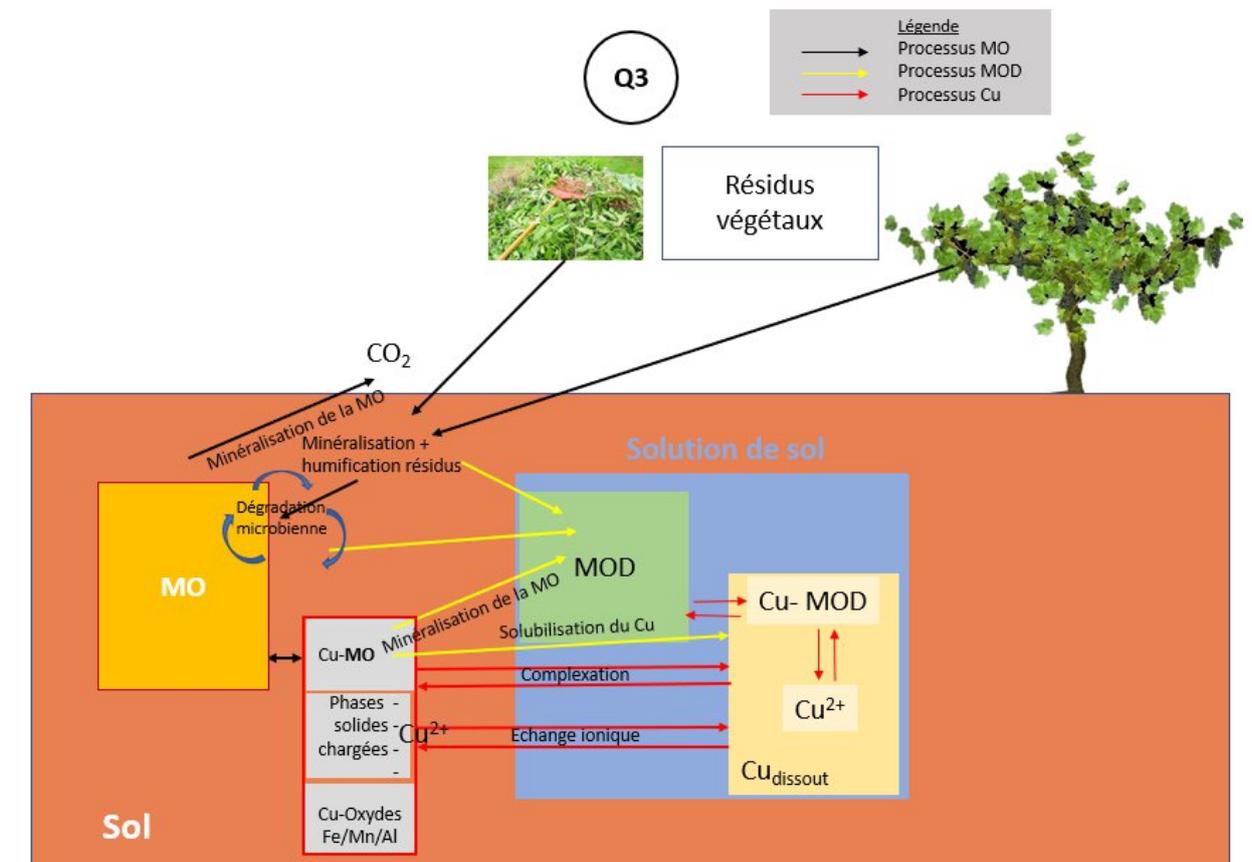


**Chapitre 6 : Effets de l'apport de résidus végétaux
sur la dynamique de la MOD et du Cu disponible
dans le sol**

Prélude

Nos résultats du Chapitre 5 montrent que la perturbation du sol via des modifications de température aurait peu d'effets sur les dynamiques de la MOD et du Cu. Cependant, une autre façon de perturber l'état biologique du sol est de lui apporter des matières organiques fraîches (MOF). Dans l'étude bibliographique du Chapitre 1, il est mentionné que l'apport de MOF ravive l'activité biologique en augmentant la minéralisation de la matière organique totale du sol et les activités enzymatiques de dégradation. Ce phénomène pourrait donc modifier la dynamique de la MOD et ainsi impacter la disponibilité du cuivre, qui peut être à l'équilibre dans le sol sous forme de complexes MO-Cu. Dans ce présent chapitre, nous avons voulu comprendre l'effet de l'apport de MO fraîches sur les dynamiques de la MOD et du Cu disponible (Question 3 de la thèse). La première partie du chapitre porte sur l'étude de deux sols différents amendés avec un seul type de MOF (résidus de feuilles de vigne), et la deuxième partie aborde les effets dans un même sol amendé avec deux MOFs de qualités différentes (résidus de féverole et d'avoine). Ainsi, les sols ont été amendés de résidus avec la même quantité de carbone apporté. Les sols sont ensuite incubés à 20°C pendant 3 mois, avec de mesures cinétiques pour évaluer l'activité biologique dans le sol, la chimie de la solution de sol, ainsi que la dynamique de la MOD et celle du Cu disponible (Cu total et Cu libre Cu^{2+}).

La figure ci-dessous illustre les hypothèses ainsi que les mécanismes envisagés pour ces expérimentations.



Sous-Chapitre 6.1: Changements de la dynamique de la MOD et du cuivre suite à l'incubation de deux sols viticoles amendés de résidus de feuilles de vigne

Résumé

Dans de nombreuses parcelles viticoles en France et dans le monde, le cuivre s'est fortement accumulé et représente un potentiel risque de toxicité pour les organismes du sol. La disponibilité du cuivre dépend de sa concentration totale en solution et de la teneur de sa fraction ionique Cu^{2+} . Le cuivre a une affinité particulière pour la matière organique. Dans les parcelles viticoles, les feuilles de vigne tombent et se dégradent dans le sol, enrichissant ainsi le cycle de la matière organique (MO). Dans cette étude, notre objectif était d'étudier l'impact de l'apport de résidus de feuilles de vigne sur la dynamique de la MO et du cuivre dans deux sols viticoles de même pH mais de ratio C:N et de teneur en MO différents. Le sous-objectif était d'analyser si les dynamiques de qualité de MOD et de disponibilité du Cu étaient différentes suivant les deux sols étudiés. Une incubation de 92 jours a été menée sur les deux sols après apport de feuilles de vigne broyées. L'activité biologique de dégradation de la MO a été évaluée via le taux de minéralisation du carbone et les activités enzymatiques. La dynamique de la matière organique dissoute (MOD) a été suivie quantitativement (concentrations en carbone organique dissout) et qualitativement (propriétés de fluorescence et absorbance et indices spécifiques). Les résultats montrent que l'apport des résidus de feuilles de vigne augmentent les activités enzymatiques, surtout dans le sol au ratio C:N le plus élevé. Les concentrations en MOD sont élevées en début d'incubation, puis diminuent drastiquement en quelques jours. La MOD était composée de molécules de taille de plus en plus petite au cours du temps mais dont le degré d'humification fluctuait de manière irrégulière. La décomposition des spectres de fluorescence par l'analyse PARAFAC a révélé 4 composants, dont un était propre aux résidus et était préférentiellement consommé par l'activité microbienne. Le cuivre total dans les extraits était lié à la dynamique de la MOD via sa concentration et via sa composition. Cependant, l'activité du Cu^{2+} est principalement expliquée par les changements de pH induits par l'apport et la minéralisation des résidus. Finalement, suite à l'apport des résidus, les deux sols ont montré des réponses similaires mais le sol qui avait le ratio C:N le plus élevé a été le plus réactif suite aux perturbations liées à l'apport des résidus.

Mots-clés : résidus de plante - sols viticoles - cuivre - matière organique - activité microbienne - vigne

1 Introduction

Depuis près de 150 ans, les fongicides à base de cuivre ont été massivement utilisés dans les exploitations viticoles dans le but de prévenir les attaques de mildiou (*Plasmopara viticola*). En conséquence, le cuivre s'est fortement accumulé à la surface des sols dans plusieurs régions viticoles du monde. Ceci est d'autant plus notable que le cuivre est peu mobile dans les sols et a tendance à s'y stocker. L'accumulation du cuivre a entraîné des concentrations excessivement supérieures aux fonds pédogéochimiques locaux en France et dans d'autres pays (Ballabio et al. 2018). La présence excessive de cuivre dans les sols peut causer des effets toxiques sur les végétaux et sur les organismes du sol. La disponibilité du métal représente la part de ce métal mesuré à l'aide de méthodes chimiques et qui peut potentiellement être accessible aux organismes. La disponibilité du cuivre est généralement évaluée à travers sa fraction totale en solution et sa fraction ionique (Sauvé et al. 1995; Sauvé et al. 1997). Le cuivre a une forte affinité pour la matière organique. La matière organique comporte des groupements chimiques (phénoliques, carboxyliques) qui sont capables d'interagir avec le Cu (Manceau and Matynia 2010). La matière organique dissoute (MOD) est la fraction la plus mobile et la plus réactive de la MO (Kalbitz et al. 2000). Elle joue un rôle important dans le cycle des nutriments et dans le transport des éléments-traces métalliques dans le sol (Bolan et al. 2011). Dans plusieurs études, il a été démontré que la MOD, en fonction de ses propriétés, peut complexer le Cu ionique et / ou exacerber la mobilité du cuivre en le mobilisant en solution (Amery et al. 2008; Baken et al. 2011; Araújo et al. 2019). De même, les propriétés Cu-complexantes de la MOD peuvent être évaluées à travers ses propriétés optiques par absorbance et par fluorescence (Chen et al. 2013; Gao et al. 2017; Hu et al. 2019).

La dynamique de la MOD est liée à la minéralisation de la MO dans les sols (Kalbitz et al. 2000). Il a été reporté que l'apport des résidus végétaux améliorerait la vie biologique des sols viticoles à travers l'augmentation des activités enzymatiques (McGourty and Reganold 2005; Cheng and Baumgartner 2006; Okur et al. 2009). D'autre part, certains auteurs ont reporté que la minéralisation de la MO dans les sols produisait une MOD de plus en plus aromatique et humifiée (Merritt and Erich 2003; Usman et al. 2004). Dans les exploitations viticoles, les feuilles de vigne tombent et se dégradent sur le sol à la fin de l'automne. La litière ainsi formée est le plus souvent mélangée mécaniquement au sol et est progressivement décomposée. La dynamique de la MOD va donc dépendre de ces apports annuels et il est probable que cela affecte la dynamique et la disponibilité du cuivre. Selon Dan-na et al. (2017), l'apport d'engrais verts dans le sol accroît la concentration de MOD, sa taille moléculaire et son aromaticité augmentent aussi au cours du temps telles que mesurées par les techniques optiques. Cui et al. (2008) ont trouvé qu'une incubation de sols amendés avec des résidus de riz faisait augmenter le cuivre total en solution tandis que le Cu^{2+} diminuait suite à l'augmentation du pH. Au vu de ces constats, la dégradation des résidus végétaux (tels que les feuilles de vigne) dans les sols viticoles Cu-contaminés suscite de réelles interrogations pour mieux évaluer la dynamique du cuivre disponible.

La nature des sols à travers les conditions physicochimiques, le stock initial de MO et son activité microbienne intrinsèque pourrait affecter différemment les effets de la minéralisation de litières sur la dynamique du cuivre. Dans cette étude, l'objectif était donc d'analyser les effets d'apport de résidus de feuilles de vigne. Notre hypothèse est que la minéralisation des résidus conduira à la production de MOD de plus en plus aromatique, potentiellement plus réactive envers le Cu. Cela entraînerait une augmentation du Cu en solution et une diminution du $[Cu^{2+}]$.

2 Matériels et méthodes

2.1 Design expérimental

2.1.1 Echantillonnage des sols et des litières

Les sols utilisés dans cette étude sont les sols F et G de la collection de sols du chapitre III. Ces deux sols ont été choisis sur la base de leurs paramètres physico-chimiques, pour leurs pH_{eau} et des teneurs totales en Cu similaires, mais avec des teneurs de MO et C/N différents. Le sol F est un podzosol sableux alors que le sol G est un luvisol limono-argileux. Dans ce travail, le sol G sera appelé Sol 1 et le sol F sera appelé Sol 2. Le sol 1 reçoit régulièrement des apports organiques (composts, engrais verts), contrairement au sol 2. Les propriétés des deux sols sont présentées dans le Tableau 1.

Les feuilles de vigne ont été récoltées pendant l'été 2019 dans une des parcelles d'essai de l'Unité Expérimentale Viticole du Centre INRAE Bordeaux Aquitaine. Les feuilles proviennent de vignes de variété, issues d'un croisement « Cabernet sauvignon X Riparia Gloire de Montpellier ». Cette variété est auto résistante au mildiou et les vignes plantées depuis 2001 n'ont jamais subi d'apport de cuivre foliaire. Après la récolte, les feuilles de vigne sont lavées et séchées à 40°C dans une étuve pendant 4 jours. Elles sont ensuite broyées à moins de 0.5 mm avec un broyeur planétaire dans des bols en oxydes de zirconium. Les poudres ainsi obtenues sont stockées dans un environnement sec en attendant les analyses et l'incorporation au sol.

Tableau 1 : Propriétés chimiques des deux sols de cette étude

Paramètre	Sol 1	Sol 2
pH_{eau}	6.8	6.5
Cu total ($mg\ kg^{-1}$)	89	83
Ratio C:N	11.7	15.3
MO ($g\ kg^{-1}$)	21.8	29.1

2.1.2 Analyses des poudres de vigne

Des mesures ont été faites en laboratoire pour caractériser les poudres de vigne. Les quantités de carbone et d'azote sont déterminées avec un analyseur CN par combustion sèche à 950°C (Flashea 1112 series). Les éléments totaux dans la poudre végétale sont déterminés après digestion acide par microonde (Anton Paar Multiwave PRO Microwave reaction System). Après réaction, les concentrations des éléments totaux dans les digestats sont déterminées par ICP-AES (Agilent®). La composition chimique de la poudre de feuilles de vigne est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Composition chimique de la poudre de vigne utilisée dans cette étude

Paramètre	Valeur
C (%)	46.3
N (%)	2.71
Ratio C:N	17.1
Ca (mg g ⁻¹)	10.1
Cu (µg g ⁻¹)	9.6
Fe (µg g ⁻¹)	54

Un protocole a été développé pour extraire et caractériser la fraction soluble de la poudre des feuilles de vigne. La masse de poudre de résidus extraite (0.33g) a été déterminée comme étant la quantité apportée à 15g de sol extrait (unité de sol extraite). Ainsi, 0.33 g de poudre de feuilles de vigne ont été mélangés à 30 mL de 0.01M KCl, puis l'extraction est réalisée exactement comme pour les sols (Section 2.1.4.2.1.). Le pH des extraits, la concentration en carbone organique dissout (COD) et les éléments totaux en solution sont déterminés dans les extraits via les mêmes techniques que pour les extraits de sol. La caractérisation de la fraction dissoute de la poudre est présentée dans le Tableau 3.

Tableau 3: Caractéristiques de l'extrait au KCl de poudre de feuilles de vigne

Paramètre	Valeur
pH _{KCl}	3.3
Ca (µM)	10.1
Cu (µM)	9.6
Fe (µM)	53.9
DOC (mg L ⁻¹)	1300

2.1.3 Incubation des sols

Environ 100g de sol frais sont amendés de poudre de feuilles de vigne de masse équivalente à 1g de carbone (soit 2.23 g de poudre par bocal). Les mélanges sont mis dans des bocaux de 1L (Le Parfait®). Les sols sont humidifiés à 60% de leur capacité au champ avec de l'eau distillée (et incubés à 20°C

pendant 92 jours. L'humidité du sol est maintenue constante pendant la durée de l'expérience. Des tubes à scintillation contenant chacun 15mL de NaOH à 2M sont placés dans les bocaux pour piéger le CO₂ émanant de la minéralisation de la MO. 4 répliques ont été utilisées par traitement et à chaque temps et sont progressivement détruits au fil de l'incubation pour les analyses. 4 bocaux avec des sols non amendés sont préparés pour chaque temps de cinétique, détruits aussi au fil de l'incubation et servent de contrôle pour évaluer l'effet de l'apport des résidus sur les dynamiques observées. 4 autres bocaux restés vides, sont conservés pendant l'incubation, et serviront de contrôles pour les mesures de respiration à tous les temps de cinétique

2.2 Mesures

2.2.1 Mesures sur les sols

2.2.1.1 Vitesse de minéralisation du carbone

La vitesse de minéralisation du carbone est évaluée à travers le flux de CO₂ piégé par la soude. Cette mesure a été faite aux jours 2, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 30, 37, 44, 51, 65, 79 et 92 de l'expérience. A partir de chaque microcosme, 1mL de soude est titré avec 0.5 M HCl jusqu'au virage de couleur de la thymolphaléine et précipitation des carbonates (avec du BaCl₂ à 1.5 M). Le taux de minéralisation

du carbone est calculé comme suit :
$$R = \frac{0.5 (V_0 - V) * C * \left(\frac{V_t}{V_s}\right) * 12 * 1000}{\text{Masse de sol} * n \text{ jours}},$$

où V₀ est la moyenne des volumes de HCl titré avec le NaOH des bocaux vides, V est le volume de HCl titré avec le NaOH provenant des bocaux de sols (avec ou sans résidus), V_t est le volume total de NaOH dans le tube correspondant à l'échantillon mesuré, V_s est le volume de NaOH échantillonné dans chaque tube pour la mesure. Le taux de minéralisation du carbone est exprimé en mg C kg⁻¹ sol jour⁻¹. Cette variable peut aussi s'exprimer en taux cumulés (mg C kg⁻¹ sol).

2.2.1.2 Activités enzymatiques

Les activités enzymatiques des enzymes hydrolytiques du carbone et de l'azote ont été mesurées à 0, 1, 3, 38 et 92 jours en suivant le protocole décrit par Bell et al. (2013). Les enzymes liées au carbone sont la β-1,4-glucosidase, la 1,4-β-D-cellobiohydrolase et la α-1,4-glucosidase qui dégradent la cellulose alors que la β-xylosidase dégrade l'hémicellulose. Les enzymes liées à l'azote sont la N-acétylglucosaminidase (qui dégrade l'acétylglucosamine) et la leucine-aminopeptidase (qui catalyse l'hydrolyse des peptides et des protéines).

2.75 g de sol incubé sont mélangés à 91 mL de solution tampon (acétate de sodium) dans un mixeur pendant 1 min. Les suspensions sont ensuite récupérées et transvasées dans 96 microplaques Deepwell

® avec une pipette électronique. Des échantillons de contrôle sont utilisés avec des standards du 4-méthylumbelliféron (MUB) ou du 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) (concentrations allant de 0 à 100 µM) et des échantillons sans standard (contrôle) sont aussi inclus dans les échantillons. Les préparations sont ensuite incubées à 25 °C pendant 3h, puis les microplaques sont ensuite centrifugées pendant 3 min à 3000 rpm. 250 µL de surnageant sont ensuite récupérés de chaque puits et transférés dans des puits de microplaques de lecture. Les échantillons sont ainsi scannés par fluorescence (Synergy H1 microplate reader, Biotek, Winooski, USA), à une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 450 nm. Les activités enzymatiques sont calculées à partir des valeurs de fluorescence et exprimées en $\text{nmol}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{sol h}^{-1}$. Les résultats sont aussi exprimés en valeurs cumulées avec pour unités $\text{mmol}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{sol}$ (Fanin and Bertrand 2016).

2.2.2 Extractions et mesures sur les solutions de sol

2.2.2.1 Métaux totaux en solution et activités du Cu^{2+}

L'extraction des solutions de sol a été faite aux jours 0, 1, 3, 7, 14, 23, 38, 60 et 92 et conduite sur des microcosmes en 4 réplicats. 15 g équivalent sec de sol (avec ou sans résidus) sont mélangés avec 30 mL de 0.01M de KCl à un ratio masse : volume de 1:2 (sol: solution) et mis en agitation à $35 \text{ rev.} \cdot \text{mn}^{-1}$ pendant 2h. Les suspensions de sol sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 13000 rpm. Les surnageants sont récupérés et filtrés à 0.2 µm avec des filtres en acétate de cellulose. Les extraits de sol récupérés sont ensuite subdivisés en aliquotes et stockés à 4 °C à l'obscurité pour les mesures ultérieures.

Le pH des extraits de sol (pH_{KCl}) est mesuré avec une microélectrode (E16M331, Radiometer Analytical®). Les concentrations des métaux totaux en solution (Ca, Cu, Fe, Zn) sont déterminées par ICP-AES (Agilent®) dans des aliquotes de 5 mL acidifiés à 2% avec du HNO_3 . L'activité du cuivre libre est mesurée avec une électrode Cu-sélective. Cette technique de mesure est détaillée dans Bravin et al. (2009).

2.2.2.2 Analyses de la MOD

La concentration de COD est mesurée dans les extraits de KCl avec un analyseur TOC (TOC-VCPH, Shimadzu®, Japan). La concentration de COD est calculée en soustrayant le carbone inorganique du carbone total ($\text{COD} = \text{TC} - \text{IC}$) et exprimée en mg L^{-1} .

L'absorbance et la fluorescence de la MOD dans les extraits ont été analysées avec un spectrofluorimètre Aqualog (Horiba Scientific®) et une cuve en quartz (Hellma Analytics, Suprasil QS®) de trajet optique de 1 cm thermostatée à 20 °C. Les spectres d'absorbance ont été acquis en scannant les échantillons de 239 à 800 nm et en soustrayant le spectre de la solution de 0.01M KCl (blanc de mesure).

La pente spectrale $S_{275-295}$ est calculée comme étant la pente du spectre d'absorbance (log-transformé) dans la région 275-295 nm, tel que décrit par Helms et al. (2008). Le $S_{275-295}$ est un indicateur de taille moléculaire de la MOD.

L'acquisition des matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence a également été réalisée à l'aide du spectrofluorimètre Aqualog (Horiba Scientific®), équipé d'une lampe à arc xénon de 150 watts, d'un double monochromateur d'excitation, avec une bande passante de 5 nm, et d'un temps d'intégration de 2 s à des longueurs d'onde de 240-800 nm par pas de 5 nm. Les spectres d'émission ont été collectés avec un gain élevé du détecteur CCD à des intervalles d'environ 0,58 nm (1 pixel) à des longueurs d'onde comprises entre 245 et 830 nm. Une solution de 0.01M de KCl était utilisée quotidiennement comme blanc d'analyse. Les échantillons étaient dilués avec la solution de KCl lorsque l'absorbance était supérieure à 0.1 à 250 nm afin d'éviter les effets de filtre interne lors de l'acquisition des spectres de fluorescence. Les intensités de fluorescence ont été normalisées à l'aire, mesurée quotidiennement à une excitation de 350 nm, du pic de diffusion Raman de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore) et exprimées en unités Raman (R.U). Le logiciel TreatEEM (<https://sites.google.com/site/daromasoft/home/treateem> développé par Dario Omanović (Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatie)) a été utilisé pour calculer les indices de fluorescence après suppression des pics de diffusion dans les spectres EEM.

Deux indices ont été calculés à partir des mesures de fluorescence. L'indice d'humification (HIX) est le rapport entre l'aire du spectre d'émission de fluorescence dans la région 435-480 nm et celle de la région 300-345 nm pour une excitation fixée à 254 nm (Zsolnay et al. 1999). Le HIX reflète le niveau d'aromaticité de la MOD. L'indice de production de MOD en lien avec l'activité biologique, BIX, est le rapport des intensités de fluorescence à 380 nm et à 430 nm, lorsque l'excitation est fixée à 310 nm (Huguet et al. 2009).

La décomposition PARAFAC des spectres de fluorescence a été réalisée avec le logiciel MATLAB R2019a (package DOMFluor 1.7) sur l'ensemble des 136 matrices EEM d'échantillons. Le nombre optimal de composants PARAFAC a été déterminé après la validation « split-half », l'initialisation en mode aléatoire et l'inspection visuelle pour chaque échantillon des spectres analysés, modélisés et des résidus obtenus par différence et pour chaque composant de l'éligibilité de leurs propriétés spectrales. Chaque composant ainsi déterminé est caractérisé par une intensité F_{max} qui est son intensité de fluorescence maximale (à l'excitation et à l'émission) pour chaque échantillon. L'abondance relative de chaque composant représente sa contribution par rapport à la fluorescence totale (somme des intensités de fluorescence de tous les composants déterminés par PARAFAC). Elle est notée % F_{max} et s'exprime en pourcentage (Stedmon and Bro 2008; Murphy et al. 2013). L'interprétation des composants a ensuite été faite en se basant sur la littérature ainsi que par comparaison avec la base de données « OpenFluor database » (<http://www.openfluor.org/>) (Murphy et al. 2014).

2.3 Traitement statistique des données

Le traitement statistique a été réalisé avec le logiciel R (R core Team 2020). Des modèles mixtes et des tests « post-hoc Tukey » ont été réalisés pour évaluer les différences significatives entre les valeurs moyennées, suite aux traitements (sol, résidus) et à l'effet du temps (durée de l'incubation). Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.001$.

3 Résultats

3.1 Minéralisation de la matière organique

Le taux de minéralisation du carbone et les activités enzymatiques sont utilisés pour évaluer l'intensité de minéralisation de la matière organique dans les sols.

Le taux cumulé de minéralisation du carbone a drastiquement augmenté dès l'ajout des résidus de feuilles de vigne (Fig. 1). L'augmentation est plus notable pendant les 3 premiers jours de l'incubation pour les deux sols. Dans les sols contrôle, le sol 1 a une minéralisation significativement plus forte que le sol 2. Cependant, l'ordre s'inverse après ajout des résidus, le sol 2 minéralisant plus et plus rapidement les résidus apportés. Ces résultats soulignent que l'apport des résidus a provoqué plus de réponse en termes de minéralisation du C pour le sol 2 que pour le sol 1. L'apport de 1g de carbone pour 100g de sol a induit la minéralisation supplémentaire par rapport au sol témoin de 0.8g de carbone pour le sol 1 et 1g de carbone pour le sol 2.

En considérant l'ensemble de l'incubation, les activités enzymatiques dans les sols témoins sont significativement plus élevées dans le sol 1 que dans le sol 2, montrant une différence d'activité biologique intrinsèque. Elles augmentent faiblement au début de l'incubation pour atteindre un palier dès le jour 3. Dans les sols ayant reçu les feuilles de vigne, les activités enzymatiques présentent un pic le premier jour après le début de l'incubation (Fig. 2, Tableau S 1). Comme observé avec le taux de minéralisation du carbone, le pic d'activités enzymatiques était plus élevé dans le sol 2 que dans le sol 1 lorsque les résidus sont apportés. Pour les enzymes relatives au carbone, après le pic, les activités enzymatiques diminuent drastiquement jusqu'à égaliser les activités des sols témoins à la fin de l'incubation (Fig. 2 a). D'ailleurs, pour les activités enzymatiques du carbone, aucune différence significative n'a été trouvée entre l'échantillon contrôle et l'échantillon amendé dans les deux sols à t92 ($p > 0.001$). Cependant pour les enzymes liées à l'azote, les activités dans les échantillons amendés restent élevées par rapport aux contrôles à la fin de l'incubation (Fig. 2 b).

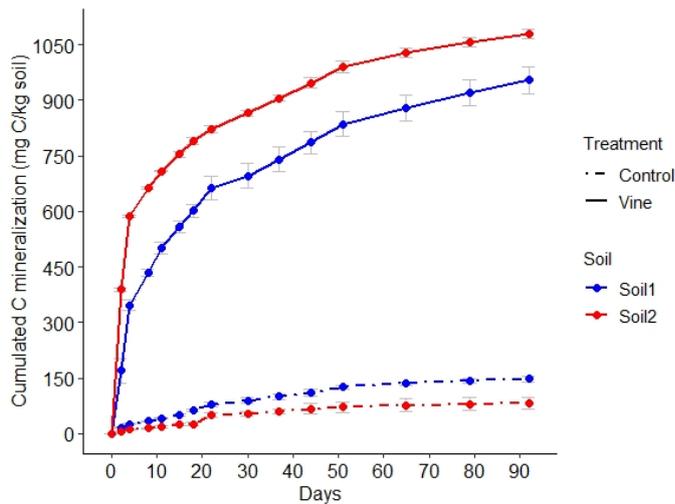


Fig. 1 : Minéralisation cumulée du carbone dans les sols durant l'incubation

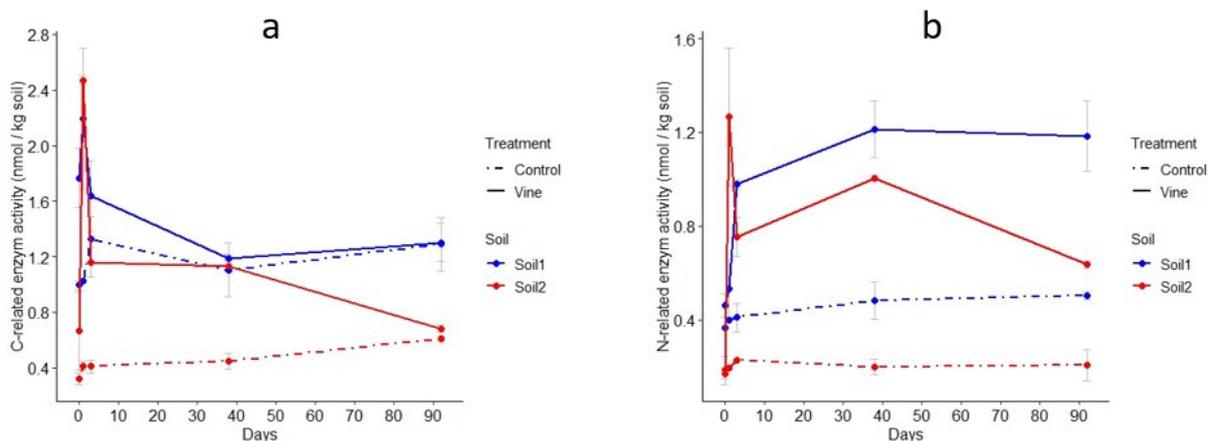


Fig. 2 : Activités enzymatiques liées au carbone (a) et à l'azote (b) dans les sols durant l'incubation

3.2 Evolution des propriétés de la matière organique dissoute

3.2.1 Concentration en COD et propriétés optiques

Dans les sols contrôle, les concentrations en COD sont plus élevées à t0 puis elles diminuent après une journée d'incubation (Fig. 3a). Cette diminution est certainement liée au retour à l'équilibre après la perturbation du sol lors de sa préparation pour l'incubation. De t3 à t92, les concentrations en COD dans les sols contrôle sont constantes et aucune différence significative n'a été trouvée entre les concentrations des deux sols (entre 10 et 58 mg L⁻¹ pour le sol 1 et entre 20 et 45 mg L⁻¹ pour le sol 2, (Tableau S 1). Suite à l'apport des résidus dans les deux sols, la concentration de COD augmente à t0, (d'environ 8 fois par rapport aux témoins) avec des valeurs à 710 pour le sol 1 et à 820 mg L⁻¹ pour le sol 2 (Fig. 3a, Tableau S1). A t3, la concentration de COD diminue drastiquement dans les sols amendés (100 mg L⁻¹ pour le sol 1 et 229 mg L⁻¹ pour le sol 2, Tableau S1). Cette forte teneur en COD

dans les sols amendés peut s'expliquer par la mise en solution des composés solubles des résidus apportés (**Tableau 3**).

La concentration en COD continue de diminuer lentement jusqu'à se stabiliser entre t38 et la fin de l'incubation. A t92, aucune différence significative n'a été trouvée entre l'échantillon contrôle et l'échantillon amendé pour le sol 1 alors que le rapport de concentrations en COD entre sol amendé et sol contrôle est de 6.4 pour le sol 2. Contrairement au sol 1, le sol 2 ne retrouve pas son équilibre initial même après 3 mois d'incubation.

Les propriétés optiques de la MOD permettent d'évaluer les changements opérés sur la qualité de la MOD tout au long de l'incubation. L'indice BIX renseigne sur la contribution de composés récemment produits dans le milieu en lien avec l'activité biologique (Huguet et al. 2009). Comparés aux contrôles, l'apport de résidus a entraîné une baisse importance de l'indice BIX à t0 dans les sols amendés (0.37 pour le sol 1 et 0.25 pour le sol 2, Tableau S1). Les valeurs de BIX augmentent rapidement ensuite et atteignent un pic entre 3 et 7 jours après le début de l'incubation. Les valeurs de BIX vont ensuite se stabiliser jusqu'à t92, sauf pour le sol 2 amendé où l'on observe un 2^{ème} pic inattendu à t38.

L'indice $S_{275-295}$ est évalué comme étant inversement proportionnel à la taille moléculaire de la MOD (Helms et al. 2008). L'apport des résidus entraîne (à t0) une baisse des valeurs de $S_{275-295}$ dans les deux sols comparés aux échantillons contrôle (Fig. 3 c). Les valeurs de $S_{275-295}$ augmentent ensuite fortement entre t1 et t3 et semblent se stabiliser jusqu'à la fin de l'incubation (Fig.3 c). A la fin de l'incubation (t92) dans les deux sols, les valeurs de $S_{275-295}$ des échantillons amendés sont supérieures aux échantillons contrôle (0.011 contre 0.02 pour le sol 1, 0.0085 contre 0.0106 pour le sol 2 (**Tableau S 1**)).

L'indice HIX renseigne sur le degré d'aromaticité et d'humification de la MOD (Zsolnay et al. 1999). Les variations du HIX au cours de l'expérience sont multiphasiques et irrégulières. Pour le sol 1, les valeurs de HIX de l'échantillon contrôle varient peu avec une tendance à l'augmentation (Fig. 3d). Cependant, les variations sont moins linéaires pour l'échantillon amendé du même sol. Avec l'apport des résidus de feuilles de vigne, les valeurs de HIX sont relativement faibles à t0 (2.65) puis augmentent à t1 (5.09) avant de retrouver des valeurs faibles entre t3 et t23 (Fig. 2 d). Un deuxième pic de HIX apparaît à t38 et les valeurs de HIX diminuent à nouveau à la fin de l'incubation (3.57). Pour le sol 2, l'échantillon amendé et le contrôle vont présenter des évolutions similaires de HIX, avec des pics à t1 et à t23. Les valeurs de HIX diminuent ensuite drastiquement à t38 et réaugmentent jusqu'à t92. Contrairement au sol 1, le sol 2 amendé (7.9) présente une valeur de HIX plus forte que le contrôle (6.86) à la fin de l'incubation.

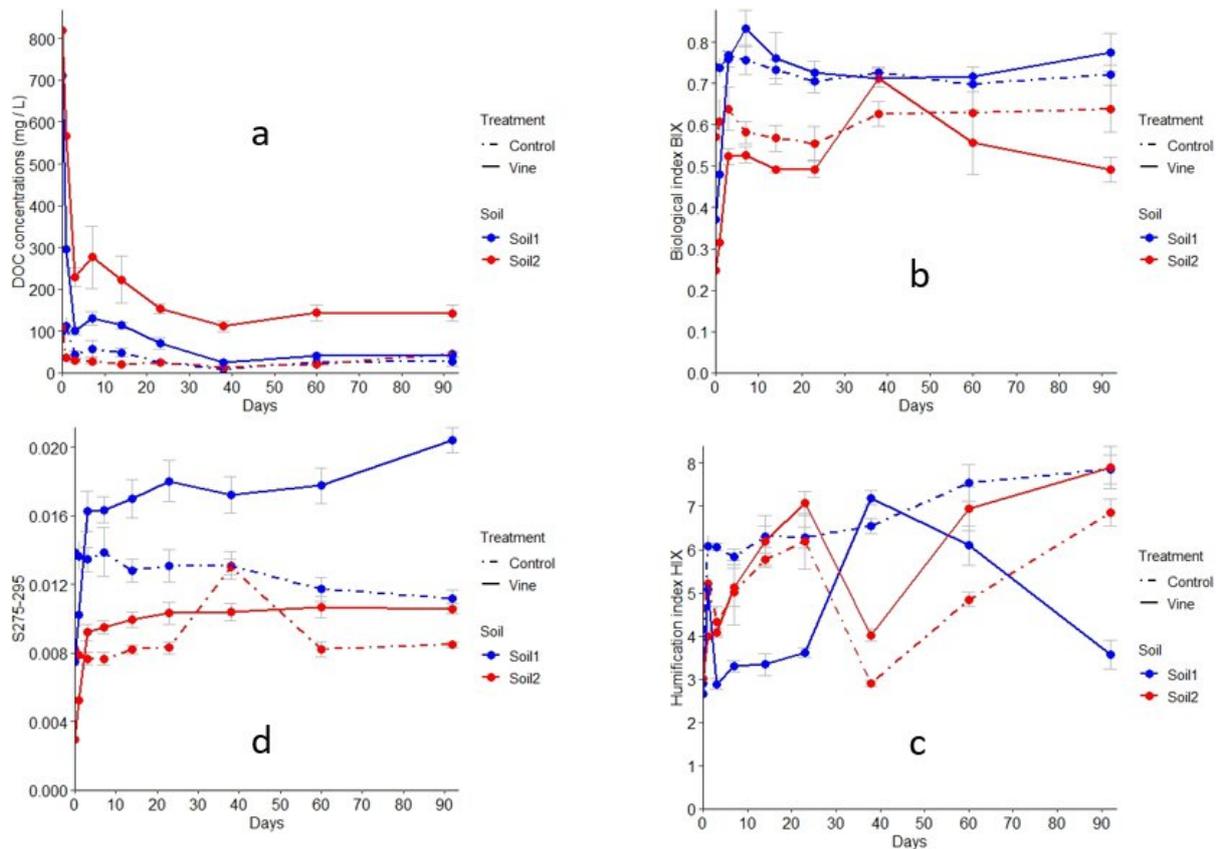


Fig. 3 : Evolution des paramètres de la MOD au cours de l'incubation : concentration en COD (a), indice biologique BIX (b), indice de taille moléculaire $S_{275-295}$ (c) et indice d'humification HIX (d).

3.2.2 Evolution des composants PARAFAC

L'analyse PARAFAC des 136 spectres EEM représentant les 4 modalités d'échantillons (sol 1 contrôle et amendé, sol 2 contrôle et amendé) a révélé 4 composants dont les distributions respectives varient en fonction du traitement et du temps d'incubation (Fig. 4, Fig. S 1).

Le composant 1 (C1) a été identifié comme une substance de poids moléculaire élevé à fort caractère aromatique (Stubbins et al. 2014 ; Pitta and Zeri 2021). Son pic d'émission se trouvant à une longueur d'onde relativement haute (~500 nm) indique qu'il s'agit d'un composant condensé avec un état d'évolution relativement avancé. Il a aussi été attribué à une semiquinone dérivée de plantes supérieures et associées à des réactions de réduction microbienne (Cory and Mcknight 2005). Le composant 2 (C2) est classiquement attribué aux acides aminés, libres ou liés à des protéines ou encore à des composés de type phénoliques (Osburn and Stedmon 2011; Cuss and Guéguen 2015). Le composant 3 (C3) a été rapporté dans la littérature comme un produit de dégradation de la lignine (Zhou et al. 2019) ou dérivé de feuilles lixiviées (Graeber et al. 2021 ; Calderó-Pascual et al. 2021). Derrien et al. (2018) ont montré qu'il comptait parmi les composants les plus abondants de tous les échantillons de plantes (feuilles de forêt, plantes cultivées en C3 et C4 et plantes de zones ripariennes). Catalán et al. (2021) ont d'autre part montré que ce composant était le constituant

majoritaire de la MOD provenant de litière de feuilles d'aulne et qu'il était particulièrement sensible à la dégradation. Quant au composant 4 (C4), des attributions contradictoires ont été rapportées dans la littérature. Il a été décrit comme un composant hydrophobe, aromatique, plutôt récalcitrant, bien que moins que le composant C1, classique des sols et des sources terrestres en milieu aquatique (Garcia et al. 2018 ; Sheng et al. 2021). D'autres études ont au contraire attribué ce composant à une matière organique plus labile et riche en carbone aliphatique ou à une origine microbienne dans des environnements oxydés (Cory and Mcknight 2005; Yamashita and Jaffé 2008).

La distribution de ces composants varie peu entre le début et la fin de l'incubation dans les deux sols contrôle (Fig. 4a et c). Cependant, nous notons une tendance à l'augmentation de la proportion des composants C1 et C4 tandis que celle du composant C2 tend à diminuer. Le composant C3 est absent des deux sols contrôle. Aussi, les différences initiales des MOD des deux sols peuvent s'évaluer à partir de la distribution des composants PARAFAC à t0. A cette date, les résultats montrent que le composant C4 est majoritaire dans le sol 1 (40%) alors que dans le sol 2 contrôle, c'est le composant C1 qui est le plus abondant (40.5%) (Fig. 4a et c).

Les dynamiques des 4 composants PARAFAC sont différentes dans les deux sols amendés avec les résidus de feuilles de vigne. D'abord, l'apport des résidus dans les deux sols entraîne l'apparition du composant C3 à t0, avec une contribution plus importante dans le sol 2 (33%) que dans le sol 1 (21%). En plus de cela, les MOD des deux sols amendés présentent une augmentation de la proportion du composant C2 et une diminution de celle des composants C1 et C4, comparées aux échantillons contrôle. De t0 à t1, le composant C3 disparaît du sol 1 mais demeure dans le sol 2, où sa proportion passe de 33 à 3 %. Au fil de l'incubation, tel qu'observé avec les sols contrôle, les composants C1 et C4 deviennent de plus en plus abondants au détriment des composés C2 et C3 dans les sols amendés (Fig. 4). A la fin de l'incubation, les proportions des composants C1, C2, C3 et C4 sont respectivement : 29%, 36%, 0% et 35% pour le sol 1 amendé et 53%, 13%, 0.7% et 33% pour le sol 2 amendé.

Globalement, les intensités de fluorescence des composants PARAFAC (Fig. S 2) ont suivi la même dynamique que la concentration en COD, avec cependant des particularités suivant les composants et le sol considéré. Pour les sols contrôles, l'évolution des intensités des composants est constante, cependant on distingue nettement un pic à t38 de l'intensité du composant C2 dans le sol 2 contrôle. Pour tous les composants, les intensités sont beaucoup plus importantes dans les sols amendés et que dans les sols contrôles au début de l'incubation (t0), surtout pour les composants C2 et C3. De même, ces derniers composants ont montré des intensités de fluorescence plus importantes dès l'apport des résidus (t0), que celles des composants C1 et C4. Pour tous les composants, les intensités de fluorescence baissent radicalement entre t0 et t3 puis se stabilisent, à l'exception des composants 1 et 4, dont les intensités réaugmentent au bout de 60 jours d'incubation. La comparaison globale entre les deux sols amendés montre que les intensités de tous les composants sont plus élevées dans le sol 2 que dans le sol 1 tout au long de l'incubation.

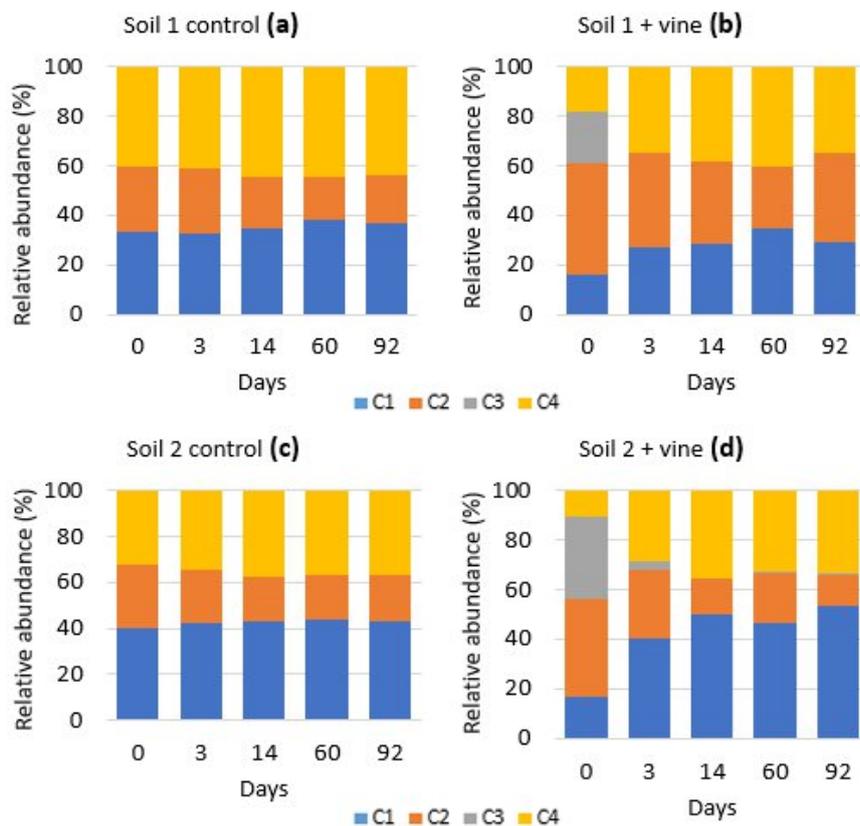


Fig. 4: Evolution pendant l'incubation des sols de la distribution de l'abondance relative des 4 composants déterminés par PARAFAC (n=136) pour (a) le sol 1 contrôle, (b) le sol 1 + feuilles de vigne, (c) le sol 2 contrôle et (d) le sol 2 + feuilles de vigne.

3.3 Changements dans la solution du sol

3.3.1 Variations du pH

Les variations du pH des extraits des sols au cours de l'expérience sont représentées sur la Fig. 5. Dans les sols contrôle, la solution est légèrement acide à t0 (6.6 pour le sol 1 et 6.2 pour le sol 2, **Tableau S 1**). Au cours de l'incubation le pH baisse de t0 à t92 avec des valeurs à t92 de 5.9 pour le sol 1 et de 5.7 pour le sol 2. Les changements de pH sont rapides dans les sols amendés et peuvent être séparés en 3 phases distinctes. A t0, le pH des sols diminue fortement suite à l'apport des résidus de feuilles de vigne (4.8 pour le sol 1 et 4.5 pour le sol 2). Entre t0 et t3, le pH des sols amendés augmente de plus de 2 unités pH, avec des valeurs de 7.0 et de 6.9 pour respectivement le sol 1 et le sol 2 à t3. Les valeurs de pH vont ensuite rester relativement stables après t3 et puis une légère baisse se manifeste à t92.

3.3.2 Variations des concentrations du Cu et des autres métaux dans les extraits

Dans les sols contrôle, les concentrations totales de Cu dans les extraits sont constantes et varient entre 0.26 μM et 0.39 μM pour le sol 1 ; et entre 0.93 μM et 1.31 μM pour le sol 2, avec des valeurs significativement plus importantes pour le sol 2 (Fig. 6a). L'apport des résidus de feuilles de vigne fait exponentiellement augmenter la concentration de Cu total dans les extraits des deux sols, avec à t0 8.01 μM pour le sol 1 et 11.29 μM pour le sol 2. Comparés aux sols contrôle, l'apport des résidus provoque une augmentation de la concentration de cuivre de 30 fois pour le sol 1 et d'environ 10 pour le sol 2. La concentration en Cu baisse ensuite drastiquement pendant les 3 premiers jours de l'incubation. Entre t7 et t92, la concentration de Cu est constante dans le sol 1 amendé mais réaugmente dans le sol 2. A la fin de l'incubation, les concentrations en Cu total étaient de 0.37 μM et 0.93 μM (pas de différence significative) pour respectivement le sol 1 contrôle et amendé, de 0.94 μM et 4.05 μM pour respectivement le sol 2 contrôle et amendé (**Tableau S 1**).

La variable pCu donne une indication de l'activité du cuivre libre dans les extraits KCl. Dans les sols contrôle entre t0 et t92, les valeurs de pCu varient entre 8.09 et 9.28 pour le sol 1 et entre 8.06 et 8.62 pour le sol 2 ; aucune différence significative n'ayant été trouvée entre les deux sols (Tableau S1, Fig. 6b). La pCu dans les sols contrôle montre un pic à t7 puis baisse progressivement jusqu'à t92. Comparés aux contrôles, l'apport des résidus fait baisser fortement à t0 la pCu dans les sols amendés, avec une valeur de 6.79 pour le sol 1 et 6.67 pour le sol 2. Les valeurs de pCu vont ensuite augmenter nettement entre t0 et t3, avec des valeurs à 10.05 pour le sol 1 et à 10.13 pour le sol 2. Aucune différence significative n'a été trouvée entre la pCu du sol 1 amendé (9.47) et celle du sol 2 amendé (9.82) à t92.

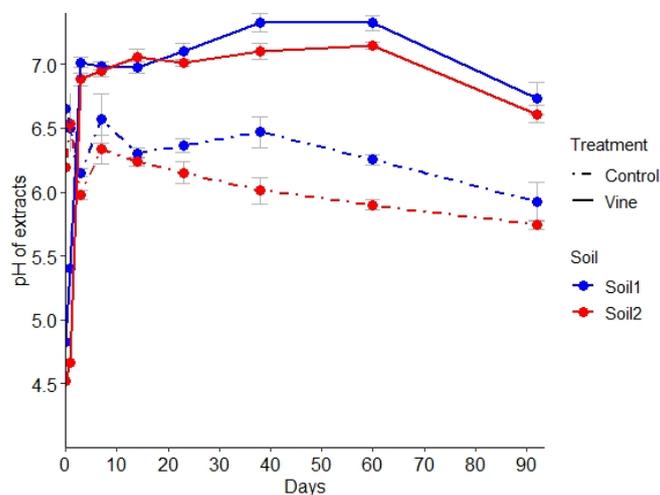


Fig. 5 : Evolution du pH dans les extraits pendant l'expérience

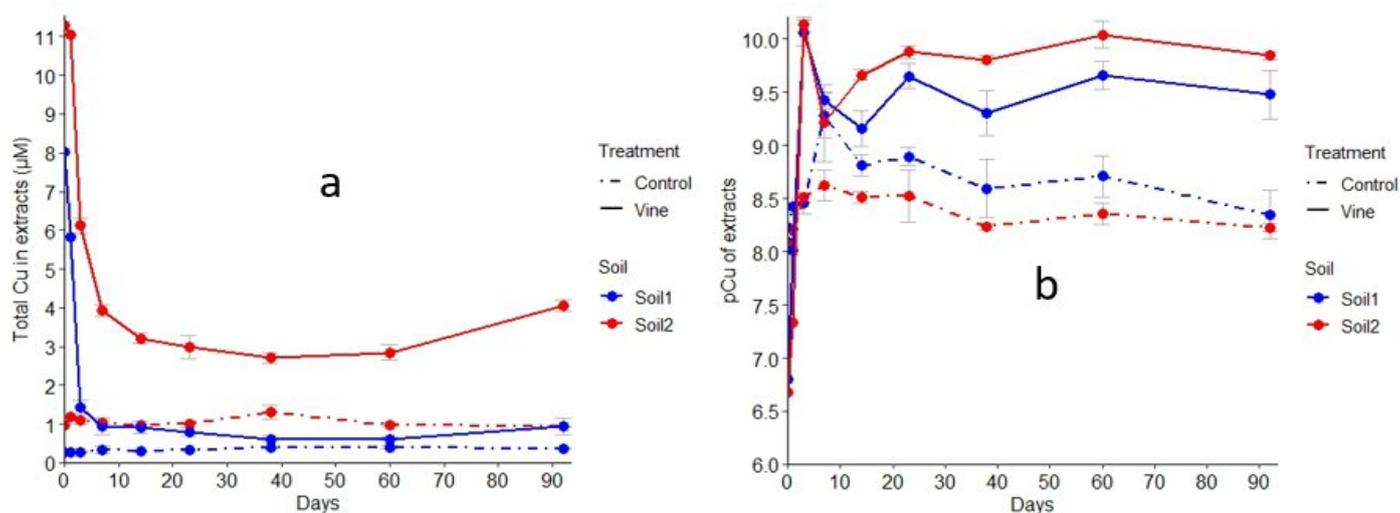


Fig. 6 : Evolution des paramètres de disponibilité du cuivre pendant l'expérience, avec le cuivre total en solution (a) et la valeur pCu indicateur de l'activité du cuivre libre Cu^{2+} (b)

4 Discussion

4.1 L'apport des résidus de feuilles de vigne ravive l'activité biologique des sols

L'addition de résidus a intensifié le taux de minéralisation du carbone (Fig. 1), certainement dû à l'apport de composés facilement décomposables. Le sol 2 recevait rarement des apports organiques contrairement au sol 1, ce qui expliquerait les différences d'activités biologiques des sols contrôle. Dans les sols amendés, la rapide minéralisation observée au début de l'incubation correspondrait à une consommation intense des constituants les plus simples et les plus accessibles des résidus tels que des acides aminés, des sucres simples, etc. (Voir section 4.2.1) (Lynch et al. 2016). D'ailleurs, la fraction dissoute des résidus comportait une concentration relativement élevée en COD (Tableau 3). Ces composés dissous sont les plus accessibles aux microorganismes et cela a probablement provoqué la forte minéralisation, comme l'ont observé d'autres auteurs (Hassan 2013; Ghimire et al. 2017).

Les activités enzymatiques ont augmenté suite à l'apport des résidus et celles liées à l'azote sont restées élevées à la fin de l'incubation. Cela suggère qu'à la fin de l'incubation, les enzymes étaient encore sollicitées pour dégrader les composés azotés. Il est possible que les deux sols aient été limités en azote si bien que les enzymes liées à l'azote étaient encore très présentes 92 jours après l'apport des résidus de feuilles de vigne. Généralement, l'apport de litière fraîche dans les sols stimule l'activité microbienne de dégradation de la MO (Asghar and Kataoka 2021). De même, les résidus dont le ratio C:N est inférieur à 20 ont tendance à se dégrader rapidement dans le sol car riches en composés azotés (Cheng and Baumgartner 2006; Błońska et al. 2021). Dans cette étude, les résidus de feuille de vigne apportés ont un ratio C:N de 17.1, ce qui explique la forte activité observée avec

les activités enzymatiques, surtout lors des premiers jours de l'incubation. Le pic d'activités enzymatiques observé à t1 dans les sols amendés correspondrait à une dégradation des composés simples type cellulose. Les activités enzymatiques de dégradation de la MO produisent des composés qui servent de matière première pour d'autres réactions enzymatiques ou qui constituent directement des sources d'énergie pour les microorganismes. Błońska et al. (2021) ont montré dans une étude similaire que l'augmentation des activités enzymatiques dans le sol était proportionnelle à la quantité de MOD apportée par les résidus.

Il est aussi envisageable que l'apport des résidus de feuilles de vigne ait provoqué une surminéralisation partielle de la MO intrinsèque du sol (plus importante dans le sol 2). En effet, l'addition de ces composés faciles à décomposer conférerait plus de capacités aux microorganismes à décomposer la MO complexe du sol, cela a été décrit dans la littérature comme un phénomène de « priming-effect » (Jackson et al. 2019). Une analyse isotopique sur le carbone du CO₂ produit par le sol permettrait de conforter cette hypothèse.

4.2 Impact de l'apport des résidus sur la dynamique et la composition de la MOD

4.2.1 Forte augmentation puis diminution de la quantité de MOD dans les extraits

L'apport des résidus de feuilles de vigne a entraîné une forte augmentation du COD dans les extraits, qui diminue drastiquement les premiers jours de l'incubation (Fig. 3a). Les fortes concentrations de COD à t0 proviennent de la mise en solution de composés organiques issus des résidus. En effet, la fraction dissoute des résidus avait montré aussi de fortes concentrations de COD (Caractéristiques de l'extrait au KCl de poudre de feuilles de vigne), avec un ordre de grandeur ($\approx 1 \text{ g L}^{-1}$) similaire à celles retrouvées dans les extraits de sols à t0. Aussi, la MOD dans les sols amendés à t0 présente de plus faibles valeurs de BIX et de $S_{275-295}$ que dans les sols contrôle. Ces très faibles valeurs de BIX au début de l'incubation montrent que les composés présents en solution ne proviennent pas de l'activité biologique dans le sol, mais sont principalement originaires des résidus fraîchement apportés. Les faibles valeurs de $S_{275-295}$ s'expliqueraient par le fait que les résidus ont apporté des composés dissouts de taille moléculaire plus importante que celle des composés nativement présents dans la MOD des sols.

La concentration en COD durant les premiers jours de l'expérience s'est montrée fortement corrélée à l'intensité cumulée des composants C2 et C3 ($R^2=0.83$, Fig. S 3), et la relation est plus faible lorsque ce sont les composants C1 et C4 qui sont considérés ($R^2=0.61$). Cela indique que c'est principalement la présence des composants C2 et C3 qui explique l'augmentation de concentration de COD au début de l'incubation dans les sols amendés, mais aussi la dynamique du COD tout au long de l'incubation. En effet, ces deux composants ont été décrits comme étant caractéristiques des résidus apportés, et leur abondance augmentait aussi dans les sols lors de l'apport des résidus (Fig. 4 b et d).

La diminution rapide de COD entre t0 et t3 correspond probablement à la disparition des composés simples et dissouts des résidus suite à leur consommation par les microorganismes dans le sol (Kalbitz et al. 2000). Cette phase correspond d'ailleurs au pic noté avec le taux de minéralisation du carbone. Pour les deux sols amendés, nous notons un léger deuxième pic de COD à t7, signifiant une production supplémentaire de composés organiques pendant l'incubation. Cette production est probablement issue de la dégradation directe des résidus apportés, à un moment où les microorganismes commençaient à manquer de ressources disponibles. En effet, une fois que les composés les plus simples en solution ont été consommés, les microorganismes dégradent davantage les résidus pour accéder aux nutriments. En effet, une augmentation du BIX est observée dans cet intervalle de temps et s'explique par une intensification de l'activité biologique qui est à l'origine de la présence de plus en plus importante de composés fraîchement produits dans la MOD (Gao et al. 2018a). Cependant, le pic de BIX pour le sol 2 amendé à t38 est difficilement explicable et semble indiquer un regain d'activité biologique à cette date.

A la fin de l'incubation, le statut du COD est différent suivant les sols. En effet, à t92, l'écart des concentrations de COD entre échantillon contrôle et échantillon amendé était négligeable pour le sol 1 et important dans le sol 2. Comme avancé précédemment, il se peut que l'apport des résidus dans le sol 2 ait provoqué une solubilisation supplémentaire des composés de la MO native du sol (Kuzyakov 2010). Une autre raison qui pourrait expliquer la baisse plus abrupte de COD dans le sol 1 est probablement une sorption des molécules organiques sur les particules solides. Cette hypothèse est envisageable d'autant plus que le sol 1 est d'une granulométrie argileuse et donc potentiellement riche en sites de sorption pour la MOD.

4.2.2 Evolution de la taille moléculaire, de l'aromaticité et de la composition de la MOD au cours du temps

L'augmentation quasi verticale (t1-t3) des valeurs de $S_{275-295}$ indique un appauvrissement important des composés issus des résidus apportés, aboutissant à de la MOD composée de molécules de plus en plus petites. Cette phase correspond bien à la baisse initiale de COD (Fig. 3 a) et confirme la consommation intensive des composés organiques issus de la MOD des résidus de feuilles de vigne. A la fin de l'incubation (t92) dans les deux sols, les valeurs de $S_{275-295}$ sont plus importantes dans les sols amendés que dans les échantillons contrôle (**Tableau S 1**). Cela indique qu'à la fin de l'incubation, la MOD des échantillons amendés était de taille moléculaire plus petite que celle des échantillons contrôle. Ce changement persistant de taille moléculaire pourrait être imputé à l'activité biologique qui entraînerait l'accumulation de petites molécules organiques en solution. Aussi, il est envisageable que si les sols amendés revenaient à l'équilibre initial, les valeurs de $S_{275-295}$ devraient être similaires entre les échantillons amendés et contrôle à t92. La similarité des dynamiques du BIX et du $S_{275-295}$ pendant les premiers jours de l'incubation suggérerait que plus les composés de la MOD sont issus de l'activité biologique, plus petite est leur taille moléculaire moyenne. Cette conclusion est recevable,

en supposant que l'activité biologique induite par les microorganismes dégrade les résidus et la MO native du sol, jusqu'à production de molécules de plus en plus petites. Cependant, ces résultats divergent de ceux rencontrés dans la littérature. (Gao et al. 2018a) ont aussi montré que l'apport des résidus végétaux dans des sols agricoles (sol latéritique et loess) aboutissait à la production de MOD de taille moléculaire de plus en plus petite avec le temps. Cependant, la taille moléculaire des MOD était plus importante dans le sol latéritique que dans le loess. La dynamique de la taille moléculaire de la MOD produite est donc tributaire des caractéristiques initiales de la fraction dissoute des résidus apportés mais aussi des propriétés du sol étudié.

Les variations de HIX montrent les changements opérés sur l'aromaticité de la MOD produite dans les échantillons. En lien avec les variations de $S_{275-295}$, il apparaît que les composés organiques dissouts apportés avec les résidus étaient peu aromatiques (faibles valeurs de HIX) mais de taille moléculaire importante. Ces composés issus des résidus pourraient s'assimiler à des grandes chaînes aliphatiques, mais aussi à des protéines, des substances exopolymériques ou encore des polysaccharides. Il a été reporté dans plusieurs études que l'apport de résidus organiques frais provoquait immédiatement une baisse de l'aromaticité de la MOD (Dan-na et al. 2017; Sharma et al. 2017; Gao et al. 2018b). Les mêmes auteurs ont avancé que pendant la dégradation de la MO, l'aromaticité de la MOD tend à augmenter car les composés simples dissouts des résidus sont consommés et en retour, des composés de plus en plus condensés sont produits par l'activité microbienne. La baisse d'aromaticité à t_0 semble ici liée à la présence du composant C2 et C3 qui sont les plus caractéristiques des résidus apportés. Le composant C3 a d'ailleurs été décrit comme un composant abondamment présent dans les lixiviats d'origine végétale (Derrien et al. 2018) et les caractéristiques spectroscopiques du composant C2 indiquent une substance faiblement condensée et attribuée à des acides aminés (Osburn and Stedmon 2011). De même, la relation entre concentration de COD et intensités de fluorescence cumulées des composants montre que la solubilisation de MOD est principalement expliquée par la présence des composants C2 et C3, principalement durant les premiers jours de l'incubation dans les deux sols amendés (Fig. 5 3). Ceci corrobore les faibles degrés d'aromaticité et de BIX retrouvés dans sols amendés au début de l'incubation.

Aussi, les évolutions des intensités et des proportions de fluorescence montrent que les dynamiques des composants C1 et C4 sont similaires et différentes de celles de C2 et C3. Les composants C2 et surtout C3 dans les sols amendés disparaissent rapidement durant les premiers jours de l'incubation et ont été considérés comme des produits proches d'acides aminés et dérivés de la lignine respectivement, et spécifiques aux lixiviats de résidus. Les processus microbiens dans le sol ont tendance à consommer les composés les plus simples de la MOD et à en produire d'autres plus évolués. Dans une étude similaire à la présente, Cuss and Guéguen (2012) ont montré que l'activité microbienne entraînait la déplétion rapide des composants PARAFAC typiques de résidus organiques frais et la production graduelle de composants de plus en plus complexes. Les auteurs ayant travaillé avec des inocula, ont avancé que les processus expliquant les changements ne pouvaient être abiotiques. Les mêmes observations ont été faites par Gao et al. (2018a) qui ont analysé l'apport de résidus de blé sur la dynamique de la MOD dans des sols agricoles.

Les valeurs de l'indice HIX dans le sol 2 baisse soudainement à t38. Les résultats inattendus notés à cette date (t38) pour les indices BIX, HIX et $S_{275-295}$ convergent vers un phénomène méconnu qui apparaîtrait spécifiquement à ce temps de l'incubation. L'explication plausible est qu'entre t38 et t92, il ait eu furtivement une production supplémentaire d'ordre biologique de composés simples et peu humifiés issus soit des résidus soit de la MO native du sol, qui se retrouvent dans la MOD des échantillons. Un changement de communauté microbienne s'est probablement opéré à cette date avec un regain de production de substances organiques. D'ailleurs à t38, il est aussi noté un pic de production du composant C2 (sol 2 contrôle, Fig. S 2). Ce postulat est cohérent avec les fortes valeurs de BIX à cette date, surtout dans le sol 2, et de $S_{275-295}$ qui indiquent une production de composés de faible poids moléculaire. Cependant, cette hypothèse ne semble pas expliquer le pic de HIX à t38 dans le sol 1 amendé. La dynamique observée à t38 dans le sol 1 amendé ressemble plutôt à une contamination ou à un artéfact de mesure. Ces hypothèses sont à considérer avec prudence et nécessitent des mesures supplémentaires pour clarifier ces phénomènes observés à t38 sur la qualité de la MOD.

Dans le sol 2, les valeurs de HIX à t92 étaient plus importantes dans l'échantillon amendé que dans l'échantillon contrôle, ce qui est cohérent avec l'enrichissement en composant C1 dans le sol amendé. Ce résultat montre que la MOD produite dans le sol 2 amendé était plus aromatique et plus humifiée que dans le contrôle à la fin de l'incubation. Similairement, Chen et al. (2010) ont montré que la dégradation de la MOD issue de résidus végétaux produisait des composés de plus en plus humifiés et provenant des constituants ligniniques des résidus. Les composés peu aromatiques comme les acides aminés, les monosaccharides et les sucres étaient consommés rapidement au début de l'expérience. D'ailleurs à t92, la différence d'abondances relatives des composants PARAFAC entre l'échantillon contrôle et l'échantillon amendé est plus importante sur le composant C2 pour le sol 1, et sur le composant C1 pour le sol 2 (Fig. 4). Cela conforte notre hypothèse qui était que le sol 2 est le plus réactif aux perturbations suite à l'apport des résidus, et son retour à l'équilibre se fait plus lentement certainement dû à ses caractéristiques initiales et au fait qu'il recevait rarement des apports de MO fraîche.

Au final, la nature des sols influence fortement la dynamique de la MOD durant la minéralisation des résidus. A la fin de l'incubation, l'apport des résidus aura provoqué plus de modifications au niveau des concentrations de COD sur le sol 2, qui semble plus lent à retrouver son état initial.

4.3 La minéralisation des résidus affecte la disponibilité du cuivre via des changements dans la solution de sol

Le principal objectif de ce travail est d'étudier l'impact de la minéralisation des résidus de feuilles de vigne sur la dynamique du cuivre disponible. La dynamique observée du cuivre pourrait provenir de changements opérés sur d'autres paramètres du sol tels que le pH, qui a été décrit comme l'un des facteurs majeurs affectant la disponibilité du Cu (Temminghoff et al. 1997; Sauvé et al. 1997).

L'apport et la minéralisation des résidus ont modifié la dynamique du pH dans les sols amendés. Les résultats du pH avaient montré une importante acidification des sols juste après l'apport des résidus (Fig. 5). Les feuilles de vigne comporteraient dans leurs caractéristiques biochimiques des molécules acidifiantes telles que les acides organiques présents dans la fraction soluble. Butterly et al. (2010) ont avancé que les modifications initiales du pH suite à l'apport des résidus organiques dans le sol dépendaient du pH de base de la fraction soluble des résidus. Or, dans notre étude, le pH mesuré dans les extraits des résidus était très faible (de l'ordre de 3.3, Tableau 3), ce qui explique l'acidification à t0 dans les sols. Une relation positive a été trouvée entre le pH des 2 premiers temps de l'expérience (t0, t1) et l'intensité de fluorescence des composants dans les sols amendés, surtout avec le composant C2 ($R^2=0.64$, Fig. 5 4). Parmi les fluorophores identifiés, il se peut donc que le composant C2 soit la principale substance de la MOD qui a provoqué l'acidification des sols. Ce composant a été identifié comme des acides aminés propres aux résidus et son abondance augmente dans les sols lors de l'apport des résidus (Fig. 4 b et d).

L'augmentation du pH entre t0 et t3 pourraient provenir des mécanismes de dégradation des résidus très forte à cette date de l'incubation, avec en l'occurrence la baisse de l'abondance du composant C2, considéré ici comme substance possiblement acidifiante. En effet, c'est entre ces dates que les activités enzymatiques et le taux de minéralisation du carbone atteignent des valeurs élevées. La dynamique de pH dans notre étude a été observée dans des conditions similaires dans d'autres travaux (Butterly et al. 2010 ; Wang et al. 2013). De même, Xu and Coventry (2003) ont observé que la dégradation de résidus de lupin dans un sol acide entraînait l'augmentation du pH de 1.5 unité en 20 jours d'incubation. Lors de la dégradation des résidus apportés par les micro-organismes, la minéralisation des anions organiques produit des ions OH^- qui neutralisent les protons présents et augmentent son pH (Ritchie and Dolling 1985). Ce mécanisme stagne lorsque la minéralisation des résidus baisse d'intensité, ce qui expliquerait nos valeurs de pH qui se stabilisent à partir de t3 dans les sols amendés.

Une relation significative ($R^2=0.87$) a été établie entre le pH et la concentration de Cu dans les extraits des deux sols amendés pendant les 2 premiers jours de l'expérience (Fig. 7 a). Dans le sol, le cuivre est fortement lié aux phases solides telles que la matière organique, les oxydes de Fe et de Mn et les minéraux argileux. Lorsque le pH du sol diminue, le cuivre peut se désorber de ces constituants et migrer en solution (Temminghoff et al. 1994 ; 1997). Effectivement, ces 2 premiers jours représentent le laps de temps qui matérialise le choc de pH suite à l'apport des résidus. Cette relation Cu-pH cesse d'être pertinente entre t3 et t92, plage correspondante à la séquence où le pH se stabilise dans les sols (Fig. 5a). Cependant, dans les sols contrôle, le Cu total dans les extraits n'est pas lié au pH, qui varie pourtant de près d'une unité pH pour chacun des sols entre t0 et t92. Cela confirme que dans cette étude, la relation observée entre le Cu total dans les extraits et le pH est indirectement liée à l'apport puis à la minéralisation des résidus.

Le COD n'a pas montré d'impact significatif sur le Cu des extraits des sols contrôle (Fig. 6b). Cela indique que la teneur en COD influencerait peu la concentration de Cu en solution dans des sols

longtemps à l'équilibre. En effet, les sols contrôles ont montré des activités biologiques relativement faibles, peu susceptibles d'entraîner des modifications significatives de la concentration en COD.

Le cuivre total dans les extraits est significativement lié à la concentration en COD tout au long de l'incubation dans les sols amendés (Fig. 7b). Nous en déduisons que la désorption liée à la compétition avec le proton sur les surfaces chargées négativement et la complexation avec la matière organique soluble produite sont les deux mécanismes qui régissent la concentration du Cu total dans les extraits des deux sols. En effet, le cuivre ayant une forte affinité pour la MOD, l'ajout des résidus a entraîné un apport important de composés organiques dissouts qui ont désorbé le Cu solide et l'ont transporté en solution (Amery et al. 2007; Amery et al. 2008). Des résultats similaires ont été reportés dans la littérature. Araújo et al. (2019) avaient aussi établi une relation positive entre Cu dissout et concentration en COD dans des sols amendés de fumier de bovins. La baisse notable des concentrations de Cu dans les extraits entre t_0 et t_3 peut s'expliquer par une (ré) sorption du Cu sur les particules solides. A la fin de l'incubation, la concentration du Cu dans les extraits reste relativement élevée dans le sol 2 amendé, ce qui est en accord avec les concentrations de COD qui demeurent aussi importantes dans ce sol. Notre hypothèse initiale était que l'aromaticité de la MOD serait le facteur explicatif de la concentration du Cu dans les extraits, tels qu'observé dans des études précédentes (Amery et al. 2007 ; 2008). Cependant, aucune relation significative n'a été trouvée entre le Cu dans les extraits et l'indice d'aromaticité HIX (Fig. S 5 a). Ainsi, la relation entre la qualité de la MOD et la disponibilité du cuivre semble ambiguë lorsqu'on considère uniquement les indices spectroscopiques de la MOD. Cependant, parmi les 4 composants PARAFAC, la concentration de Cu dans les extraits des sols amendés s'est montrée le plus étroitement liée à l'intensité du composant C4 (Fig. 8d, $R^2=0.84$) et le plus faiblement à celle du composant C3 (Fig. 8c, $R^2=0.67$). Il apparaît donc que parmi les composants déterminés par PARAFAC dans cette étude, le composant C4 est le plus impliqué dans la mobilisation du Cu en solution décrite au-dessus. Cela pourrait s'expliquer par son caractère plus aromatique (Sheng et al. 2021), alors que le composant C3 est assimilé à des acides aminés avec probablement moins de capacité de complexation pour le Cu. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour mieux distinguer la contribution de chaque composant dans la mise en solution du Cu.

Notre hypothèse initiale était que la minéralisation des résidus produirait du COD de plus en plus aromatique qui complexerait les ions Cu^{2+} et diminuerait leur concentration en solution. Aucune relation significative n'a cependant été trouvée entre la pCu et l'indice d'aromaticité HIX (Fig. S 5 b) pour l'ensemble de l'expérience, ce qui disconvient notre hypothèse initiale. Toutefois, la Fig. 7c montre une forte relation entre le pH et la pCu ($R^2=0.79$) pour l'ensemble des échantillons étudiés. Ainsi, les échantillons avec les valeurs de pH les plus élevées présentent les pCu les plus importantes, donc les concentrations de Cu^{2+} les plus faibles. Cela implique que l'incubation des sols amendés de résidus de feuilles de vigne provoque : i) à court terme une acidification de la solution du sol qui fait augmenter les concentrations de Cu^{2+} ; ii) puis à moyen terme une alcalinisation de la solution du sol qui fait baisser les concentrations de Cu^{2+} . Il apparaît donc de cette expérience que le pH est le principal facteur qui régit la dynamique du Cu^{2+} dans les extraits. La MOD agit indirectement sur le

Cu^{2+} , non pas par son aromaticité, mais sa capacité à modifier le pH du sol via ses propriétés biochimiques initiales et sa composition (déterminée ici par fluorescence couplée à PARAFAC) ou via son utilisation par les microorganismes. Même si la pCu diminue avec la teneur en COD pendant les 3 premiers jours de l'incubation (Fig. 7d), nous pensons que cette relation est liée à l'acidification des sols à cette étape de l'expérience. Cui et al. (2008) ont également montré que l'apport des résidus de plantes de riz entraînait la diminution des concentrations de Cu^{2+} et de Cd^{2+} suite à l'augmentation du pH par la minéralisation des résidus. Dans le même sens, Walker et al. (2004) ont souligné que l'apport à long terme de compost et d'engrais organiques dans le sol réduisait la concentration de Cu dans les parties aériennes de plantes Cu-tolérantes (*Chenopodium album* L.). Comme dans notre étude, les auteurs ont expliqué ces constats par l'augmentation de pH provoqué par les apports organiques. La minéralisation des composés organiques (à travers l'augmentation du pH) présente donc à la fois un potentiel de réduction de la biodisponibilité du cuivre et d'amélioration des propriétés agronomiques des sols contaminés au Cu.

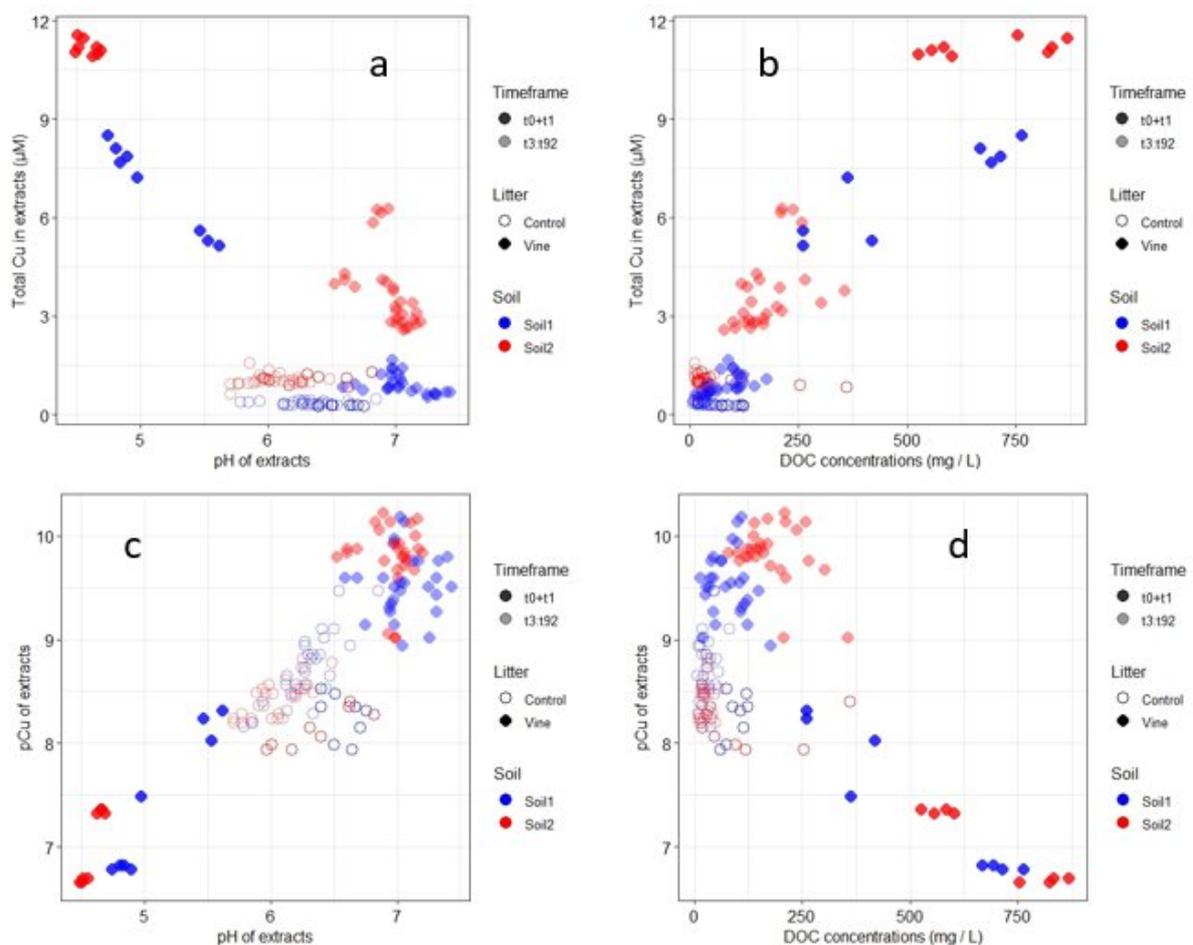


Fig. 7 : Les concentrations de cuivre total en solution et l'activité du cuivre libre en fonction du pH (a, c) et du COD (b, d). Les cercles pleins représentent les sols amendés, les cercles creux représentent les sols contrôle. Les cercles nets représentent les sols amendés, les cercles floutés représentent les mesures réalisées entre 3 et 92 jours de l'incubation.

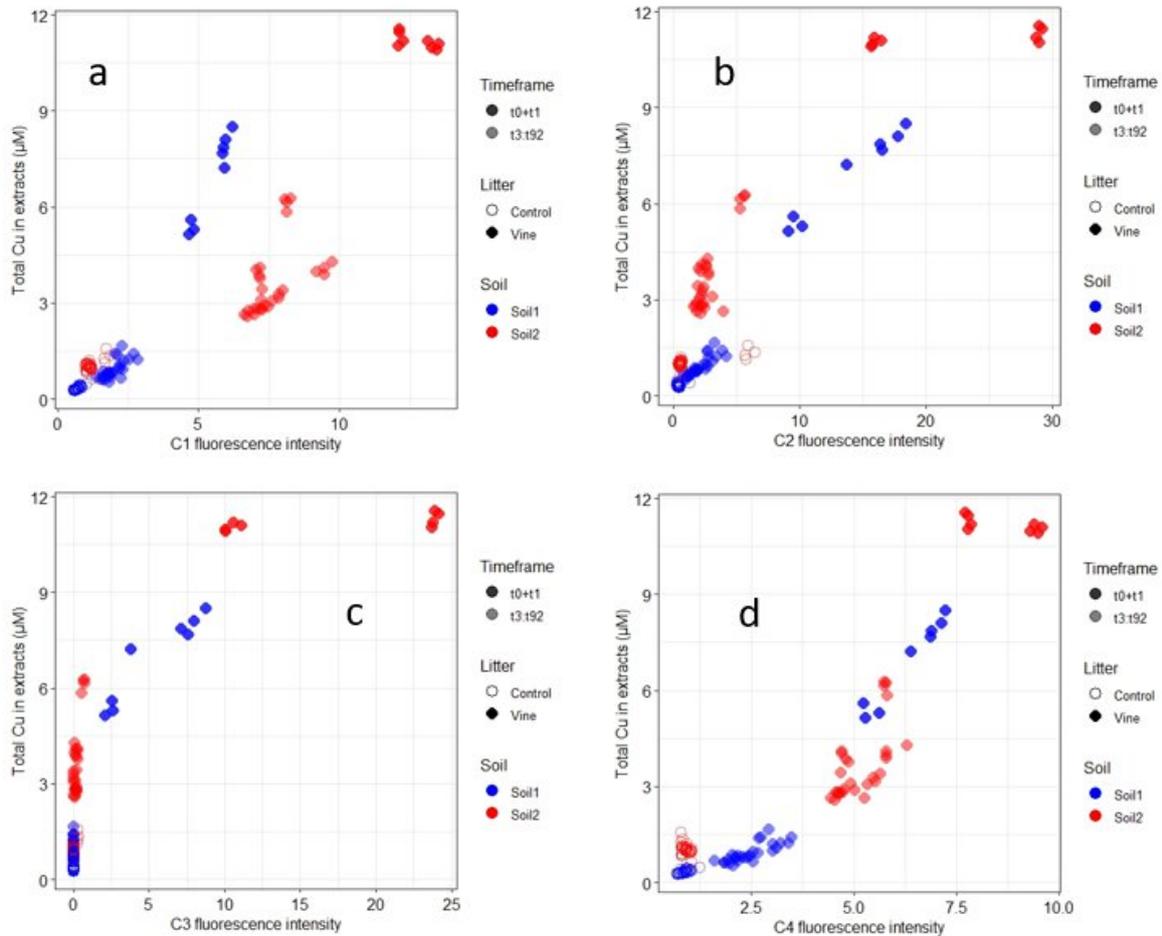


Fig. 8 : Les concentrations de cuivre total en solution en fonction des intensités de fluorescence maximales des composants PARAFAC. Les cercles pleins représentent les sols amendés, les cercles creux représentent les sols contrôle. Les cercles nets représentent les sols amendés, les cercles floutés représentent les mesures réalisées entre 3 et 92 jours de l'incubation.

5 Conclusion

L'apport de résidus de feuilles de vigne dans les sols étudiés a entraîné une perturbation des dynamiques de la matière organique et du cuivre. Les sols amendés ont connu une augmentation de leur activité biologique suite à l'apport des résidus. Cependant, les activités enzymatiques et la minéralisation du carbone étaient surtout intenses les premiers jours de l'incubation. L'activité microbienne a produit une matière organique dissoute de taille moléculaire de plus en plus petite, mais dont l'aromaticité subissait des variations irrégulières. L'analyse des spectres de fluorescence par PARAFAC a révélé quatre fluorophores, dont un était spécifique des résidus et disparaissait rapidement au cours de l'incubation. L'activité microbienne a consommé rapidement les composés dissouts des résidus, mais à la fin de l'incubation, la différence contrôle/traité était plus importante pour le sol 2. L'apport des résidus a provoqué une forte acidification immédiate du sol, qui a entraîné une diminution de la pCu^+ . Mais sur le long terme, la minéralisation des résidus aboutit à une

augmentation du pH qui finalement, induit une baisse de la pCu. Si le Cu^{2+} dans cette expérience est particulièrement lié aux variations de pH, il ressort que la dynamique du Cu total dans les extraits était fortement corrélée à celle de la MOD. La MOD provenant des litières a désorbé le Cu des phases solides et l'a entraîné en solution, augmentant ainsi sa mobilité. Finalement, les deux sols ont montré des réactions similaires suite à l'ajout des résidus. Mais, le sol qui a réagi le plus fortement à cette perturbation est le sol qui avait la teneur en MO et le ratio C:N les plus élevés. Pour la plupart des variables mesurées, le sol 1, qui reçoit régulièrement des apports organiques variés a retrouvé en 3 mois des valeurs similaires aux valeurs initiales avant apport des résidus. Des études ultérieures seraient donc utiles pour investiguer davantage les mécanismes observés, notamment en suivant la spéciation solide du cuivre avant les apports organiques et pendant leur minéralisation.

Références

- Amery F, Degryse F, Cheyns K, De Troyer I, Mertens J, Merckx R, Smolders E (2008) The UV-absorbance of dissolved organic matter predicts the fivefold variation in its affinity for mobilizing Cu in an agricultural soil horizon. *European Journal of Soil Science* 59(6):1087-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01078.x>
- Amery F, Degryse F, Degeling W, Smolders E, Merckx R (2007) The Copper-Mobilizing-Potential of Dissolved Organic Matter in Soils Varies 10-Fold Depending on Soil Incubation and Extraction Procedures. *Environmental Science & Technology* 41(7):2277-2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferracciú Alleoni LR (2019) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Asghar W, Kataoka R (2021) Green manure incorporation accelerates enzyme activity, plant growth, and changes in the fungal community of soil. *Arch Microbiol* 204(1):7. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02614-x>
- Baken S, Degryse F, Verheyen L, Merckx R, Smolders E (2011) Metal Complexation Properties of Freshwater Dissolved Organic Matter Are Explained by Its Aromaticity and by Anthropogenic Ligands. *Environ Sci Technol* 45(7):2584-2590. <https://doi.org/10.1021/es103532a>
- Ballabio C, Panagos P, Lugato E, Huang J-H, Orgiazzi A, Jones A, Fernández-Ugalde O, Borrelli P, Montanarella L (2018) Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. *Science of The Total Environment* 636:282-298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.268>
- Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahon SK, Wallenstein MD (2013) High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (81):e50961. <https://doi.org/10.3791/50961>
- Błońska E, Piaszczyk W, Staszal K, Lasota J (2021) Enzymatic activity of soils and soil organic matter stabilization as an effect of components released from the decomposition of litter. *Applied Soil Ecology* 157:103723. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103723>
- Bolan NS, Adriano DC, Kunhikrishnan A, James T, McDowell R, Senesi N (2011) Dissolved Organic Matter: Biogeochemistry, Dynamics, and Environmental Significance in Soils. *Advances in agronomy*
- Bravin MN, Martí AL, Clairrotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalisation – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318(1):257-268. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9835-6>
- Butterly C, Baldock J, CaiXian T (2010) Chemical mechanisms of soil pH change by agricultural residues. *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia, 1-6 August 2010 Symposium 222 Dynamics of organic material in soils* :43-46
- Calderó-Pascual M, Yıldız D, Yalçın G, Metin M, Yetim S, Fiorentin C, Andersen MR, Jennings E, Jeppesen E, Ger KA, Beklioğlu M, McCarthy V (2021) The importance of allochthonous organic matter quality when investigating pulse disturbance events in freshwater lakes: a mesocosm experiment. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04757-w>
- Catalá TS, Reche I, Fuentes-Lema A, Romera-Castillo C, Nieto-Cid M, Ortega-Retuerta E, Calvo E, Álvarez M, Marrasé C, Stedmon CA, Álvarez-Salgado XA (2015) Turnover time of fluorescent

- dissolved organic matter in the dark global ocean. *Nat Commun* 6(1):5986. <https://doi.org/10.1038/ncomms6986>
- Catalán N, Pastor A, Borrego CM, Casas-Ruiz JP, Hawkes JA, Gutiérrez C, von Schiller D, Marcé R (2021) The relevance of environment vs. composition on dissolved organic matter degradation in freshwaters. *Limnology and Oceanography* 66(2):306-320. <https://doi.org/10.1002/lno.11606>
- Chen H-L, Zhou J-M, Xiao B-H (2010) Characterization of dissolved organic matter derived from rice straw at different stages of decay. *J Soils Sediments* 10(5):915-922. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0210-x>
- Chen WB, Smith DS, Guéguen C (2013) Influence of water chemistry and dissolved organic matter (DOM) molecular size on copper and mercury binding determined by multiresponse fluorescence quenching. *Chemosphere* 92(4):351-359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.075>
- Cheng X, Baumgartner K (2006) Microbial utilization of nitrogen from vineyard cover crops. *Am J Enol Vitic* 57(3):384A-384A
- Cory R, Mcknight D (2005) Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. *Environmental science & technology* 39:8142-9. <https://doi.org/10.1021/es0506962>
- Cui YS, Du X, Weng LP, Zhu YG (2008) Effects of rice straw on the speciation of cadmium (Cd) and copper (Cu) in soils. *Geoderma* 146(1):370-377. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.06.010>
- Cuss CW, Guéguen C (2015) Relationships between molecular weight and fluorescence properties for size-fractionated dissolved organic matter from fresh and aged sources. *Water Res* 68:487-497. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.013>
- Cuss CW, Guéguen C (2012) Impacts of Microbial Activity on the Optical and Copper-Binding Properties of Leaf-Litter Leachate. *Front Microbio* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00166>
- Dan-na C, Wei-dong C, Jin-shun B, Song-juan G, Xue-cui W, Nao-hua Z, Katsuyoshi S (2017) Effects of Green Manures on Soil Dissolved Organic Matter in Moisture Soil in North China. *Spectrosc Spectr Anal* 37(1):221-226. [https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2017\)01-0221-06](https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2017)01-0221-06)
- Derrien M, Kim M-S, Ock G, Hong S, Cho J, Shin K-H, Hur J (2018) Estimation of different source contributions to sediment organic matter in an agricultural-forested watershed using end member mixing analyses based on stable isotope ratios and fluorescence spectroscopy. *Science of The Total Environment* 618:569-578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.067>
- Fanin N, Bertrand I (2016) Aboveground litter quality is a better predictor than belowground microbial communities when estimating carbon mineralization along a land-use gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 94:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.007>
- Gao J, Liang C, Shen G, Lv J, Wu H (2017) Spectral characteristics of dissolved organic matter in various agricultural soils throughout China. *Chemosphere* 176:108-116. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.104>
- Gao J, Lv J, Wu H, Dai Y, Nasir M (2018a) Impacts of wheat straw addition on dissolved organic matter characteristics in cadmium-contaminated soils: Insights from fluorescence spectroscopy and environmental implications. *Chemosphere* 193:1027-1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.112>

- Gao S, Gao J, Cao W, Zou C, Huang J, Bai J, Dou F (2018b) Effects of long-term green manure application on the content and structure of dissolved organic matter in red paddy soil. *Journal of Integrative Agriculture* 17(8):1852-1860. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61901-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61901-4)
- Garcia RD, Diéguez M del C, Gereá M, Garcia PE, Reissig M (2018) Characterisation and reactivity continuum of dissolved organic matter in forested headwater catchments of Andean Patagonia. *Freshwater Biology* 63(9):1049-1062. <https://doi.org/10.1111/fwb.13114>
- Ghimire B, Ghimire R, VanLeeuwen D, Mesbah A (2017) Cover Crop Residue Amount and Quality Effects on Soil Organic Carbon Mineralization. *Sustainability* 9(12):2316. <https://doi.org/10.3390/su9122316>
- Graeber D, Tenzin Y, Stutter M, Weigelhofer G, Shatwell T, von Tümpling W, Tittel J, Wachholz A, Borchardt D (2021) Bioavailable DOC: reactive nutrient ratios control heterotrophic nutrient assimilation—An experimental proof of the macronutrient-access hypothesis. *Biogeochemistry* 155(1):1-20. <https://doi.org/10.1007/s10533-021-00809-4>
- Hassan W (2013) C and N mineralization and dissolved organic matter potentials of two contrasting plant residues: effects of residue type, moisture, and temperature. *Acta Agric Scand Sect B- Soil Plant Sci* 63(7):642-652. <https://doi.org/10.1080/09064710.2013.846398>
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0955>
- Hu B, Wang P, Wang C, Qian J, Bao T, Shi Y (2019) Investigating spectroscopic and copper-binding characteristics of organic matter derived from sediments and suspended particles using EEM-PARAFAC combined with two-dimensional fluorescence/FTIR correlation analyses. *Chemosphere* 219:45-53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.113>
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40(6):706-719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Jackson O, Quilliam RS, Stott A, Grant H, Subke J-A (2019) Rhizosphere carbon supply accelerates soil organic matter decomposition in the presence of fresh organic substrates. *Plant Soil* 440(1):473-490. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04072-3>
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review
- Kuzyakov Y (2010) Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42(9):1363-1371. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003>
- Lynch MJ, Mulvaney MJ, Hodges SC, Thompson TL, Thomason WE (2016) Decomposition, nitrogen and carbon mineralization from food and cover crop residues in the central plateau of Haiti. *SpringerPlus* 5(1):973. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2651-1>
- Manceau A, Matynia A (2010) The nature of Cu bonding to natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9):2556-2580. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.01.027>
- McGourty G, Reganold J (2005) Managing Vineyard Soil Organic Matter with Cover Crops
- Merritt KA, Erich MS (2003) Influence of organic matter decomposition on soluble carbon and its copper-binding capacity. *J Environ Qual* 32(6):2122-2131. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.2122>

- Murphy KR, Stedmon CA, Graeber D, Bro R (2013) Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Anal Methods* 5(23):6557. <https://doi.org/10.1039/c3ay41160e>
- Murphy KR, Stedmon CA, Wenig P, Bro R (2014) OpenFluor- an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Anal Methods* 6(3):658-661. <https://doi.org/10.1039/C3AY41935E>
- Okur N, Altindisli A, Cengel M, Gocmez S, Kayikcioglu HH (2009) Microbial biomass and enzyme activity in vineyard soils under organic and conventional farming systems. *Turk J Agric For* 33(4):413-423. <https://doi.org/10.3906/tar-0806-23>
- Osburn CL, Stedmon CA (2011) Linking the chemical and optical properties of dissolved organic matter in the Baltic-North Sea transition zone to differentiate three allochthonous inputs. *Marine Chemistry* 126(1):281-294. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.06.007>
- Pitta E, Zeri C (2021) The impact of combining data sets of fluorescence excitation - emission matrices of dissolved organic matter from various aquatic sources on the information retrieved by PARAFAC modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 258:119800. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119800>
- R core Team (2020) R core Team,
- Ritchie G, Dolling P (1985) The Role of Organic Matter in Soil Acidification. *Australian Journal of Soil Research* 23(4):569-576. <https://doi.org/10.1071/SR9850569>
- Sauvé S, McBride MB, Hendershot WH (1995) Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29(3):373-379. <https://doi.org/10.1007/BF00212503>
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH (1997) Copper Solubility and Speciation of In Situ Contaminated Soils: Effects of Copper Level, pH and Organic Matter. *Water, Air, & Soil Pollution* 100(1):133-149. <https://doi.org/10.1023/A:1018312109677>
- Sharma P, Laor Y, Raviv M, Medina S, Saadi I, Krasnovsky A, Vager M, Levy GJ, Bar-Tal A, Borisover M (2017) Green manure as part of organic management cycle: Effects on changes in organic matter characteristics across the soil profile. *Geoderma* 305:197-207. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.06.003>
- Sheng Y, Yan C, Nie M, Ju M, Ding M, Huang X, Chen J (2021) The partitioning behavior of PAHs between settled dust and its extracted water phase: Coefficients and effects of the fluorescent organic matter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 223:112573. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112573>
- Stedmon CA, Bro R (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography* :6
- Stubbins A, Lapierre J-F, Berggren M, Prairie YT, Dittmar T, del Giorgio PA (2014) What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. *Environ Sci Technol* 48(18):10598-10606. <https://doi.org/10.1021/es502086e>
- Temminghoff EJM, Van Der Zee SE a. TM, Keizer MG (1994) The influence of pH on the desorption and speciation of copper in a sandy soil. *Soil Science* 158(6):398-408
- Temminghoff EJM, Van der Zee SEATM, de Haan FAM (1997) Copper Mobility in a Copper-Contaminated Sandy Soil as Affected by pH and Solid and Dissolved Organic Matter. *Environ Sci Technol* 31(4):1109-1115. <https://doi.org/10.1021/es9606236>

- Usman ARA, Kuzyakov Y, Stahr K (2004) Dynamics of Organic C Mineralization and the Mobile Fraction of Heavy Metals in a Calcareous Soil Incubated with Organic Wastes. *Water, Air, & Soil Pollution* 158(1):401-418. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000044864.07418.8f>
- Walker DJ, Clemente R, Bernal MP (2004) Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57(3):215-224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.020>
- Wang Y, Tang C, Wu J, Liu X, Xu J (2013) Impact of organic matter addition on pH change of paddy soils. *J Soils Sediments* 13(1):12-23. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0578-x>
- Xu RK, Coventry DR (2003) Soil pH changes associated with lupin and wheat plant materials incorporated in a red-brown earth soil. *Plant and Soil* 250(1):113-119
- Yamashita Y, Jaffé R (2008) Characterizing the Interactions between Trace Metals and Dissolved Organic Matter Using Excitation–Emission Matrix and Parallel Factor Analysis. *Environmental Science & Technology* 42(19):7374-7379. <https://doi.org/10.1021/es801357h>
- Zhou Y, Martin P, Müller M (2019) Composition and cycling of dissolved organic matter from tropical peatlands of coastal Sarawak, Borneo, revealed by fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Biogeosciences* 16(13):2733-2749. <https://doi.org/10.5194/bg-16-2733-2019>
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0)

Informations supplémentaires

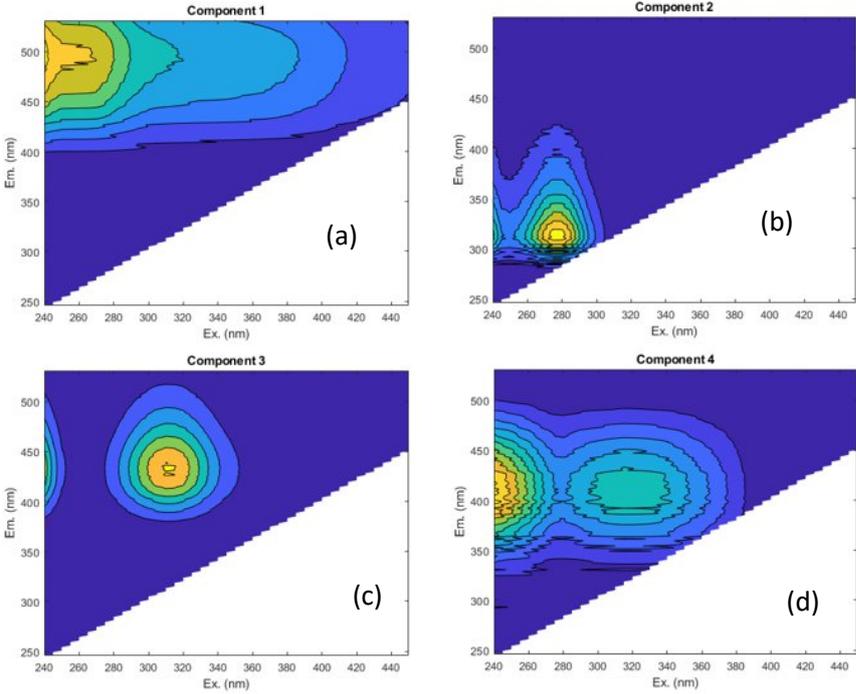


Fig. S 1 : Spectres des 4 composants (a) C1, (b) C2, (c) C3 et (d) C4 déterminés par l'analyse PARAFAC sur les 136 sols étudiés dans l'expérience

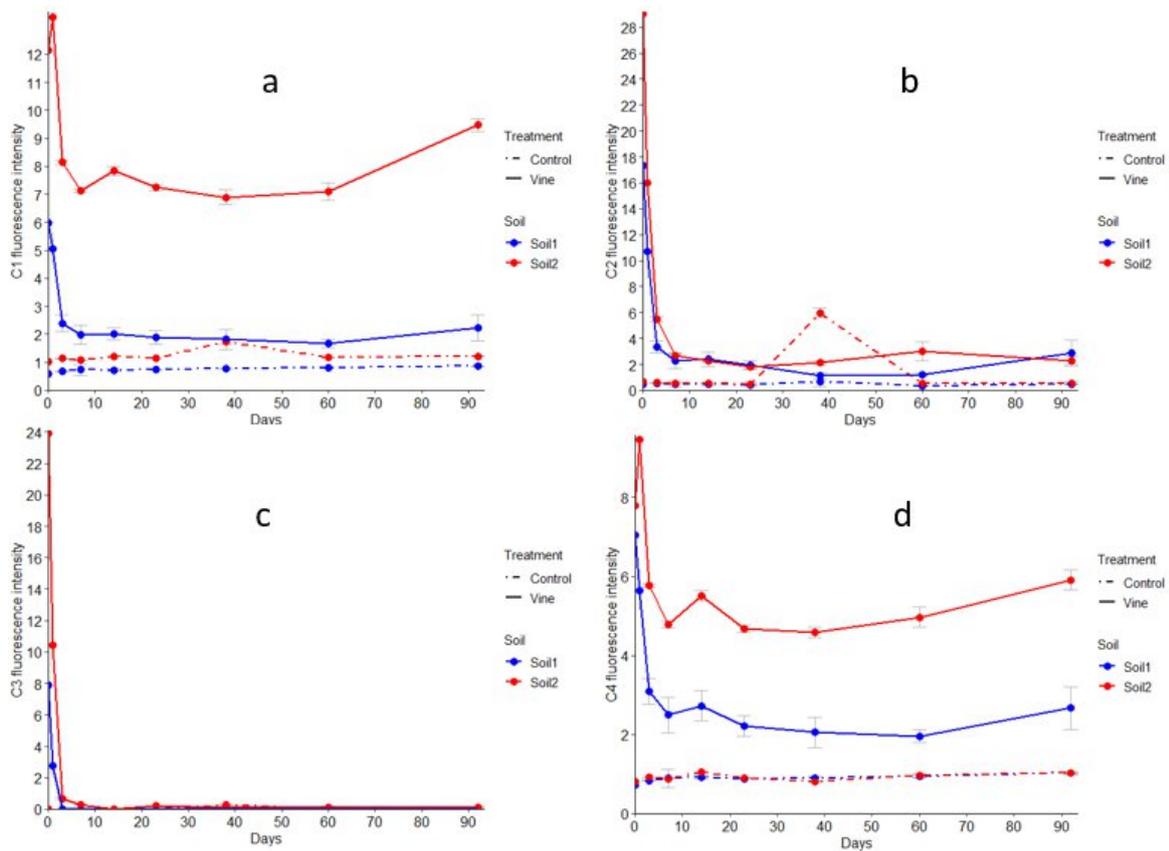


Fig. 5 2 : Evolution des intensités maximales de fluorescence des composants PARAFAC au cours de l'expérience ; composant C1 (a), composant C2 (b), composant C3 (c), composant C4 (d)

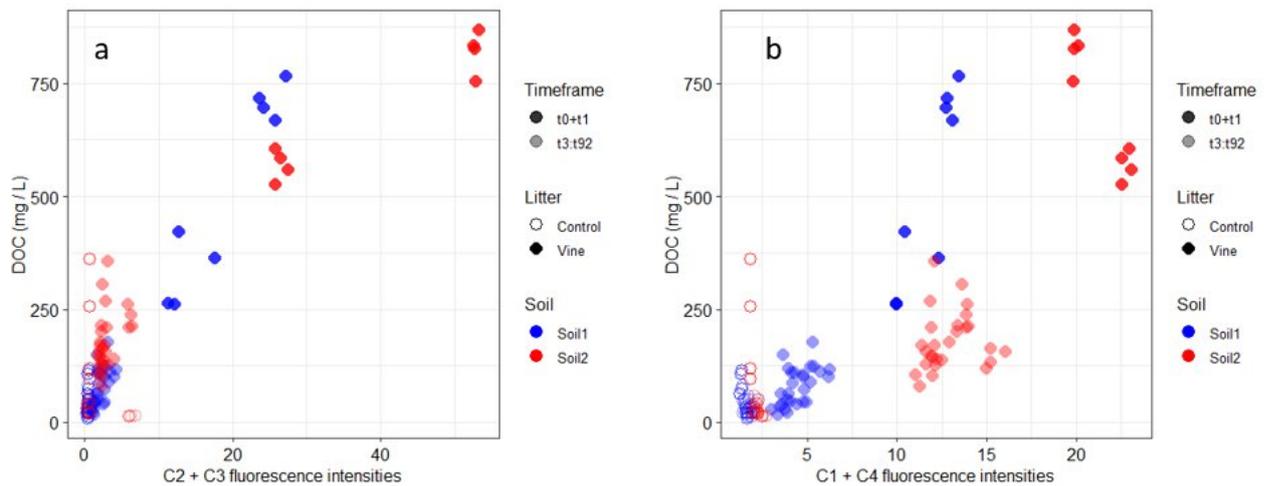


Fig. 5 3 : Relations entre concentration en COD et intensités cumulées de fluorescence des composants C2 et C3 (a), et des composants C1 et C4 (b).

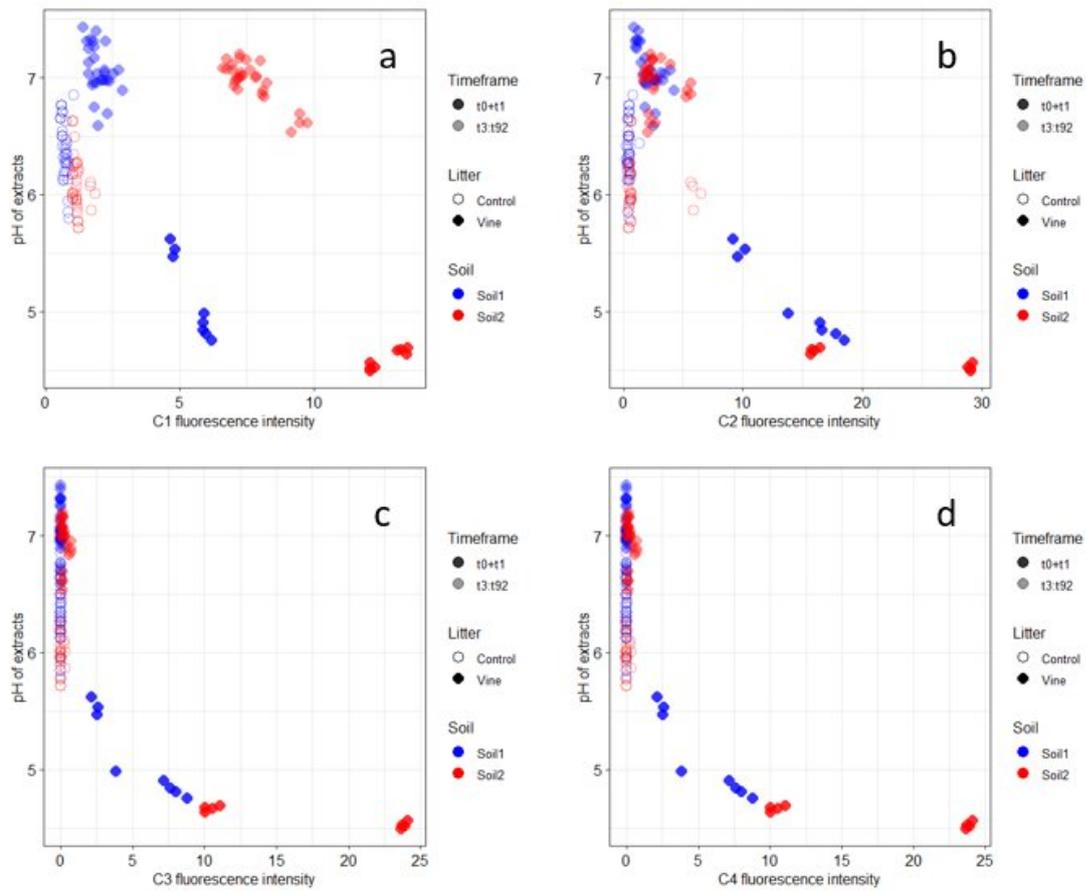


Fig. S 4 : Relations entre pH et intensités de fluorescence des composants C1 (a), C2 (b), C3 (c), et C4 (d).

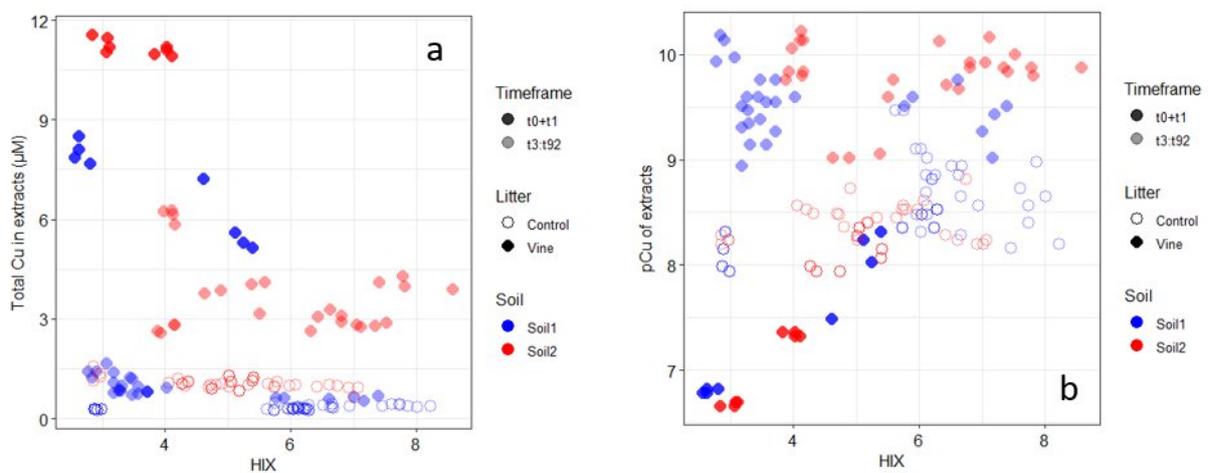


Fig. S 5 : Les concentrations de Cu dans les extraits (a) et les valeurs de pCu (b) en fonction de l'indice d'aromaticité HIX

Tableau S 1: Récapitulatif des résultats des variables mesurées au cours de l'expérience. Les lettres symbolisent les différences significatives entre les valeurs moyennes à différentes dates d'incubation ($p < 0.001$). nd = Données non récoltées

			Day 0	1	3	7	14	23	38	60	92
pH _{KCl}	Soil 1	Control	6.65 e	6.49 de	6.15 b	6.57 e	6.30 bd	6.36 cd	6.47 de	6.25 bc	5.92 a
		Vine	4.82 a	5.4 b	7.01 d	6.98 d	6.97 d	7.09 d	7.32 e	7.32 e	6.73 c
	Soil 2	Control	6.19 cde	6.53 f	5.97 bc	6.33 ef	6.24 de	6.15 cde	6.01 bd	5.9 ab	5.74 a
		Vine	4.52 a	4.66 b	6.88 d	6.95 de	7.05 fg	7.01 ef	7.10 gh	7.14 h	6.61 c
Cu (µM)	Soil 1	Control	0.26 a	0.26 a	0.28 a	0.32 ad	0.30 ab	0.32 ac	0.39 cd	0.39 d	0.37 bcd
		Vine	8.01 d	5.81 c	1.42 b	0.95 ab	0.9 ab	0.8 ab	0.61 a	0.62 a	0.93 ab
	Soil 2	Control	0.96 ab	1.18 cd	1.08 bc	1.04 ac	0.97 ab	0.99 ac	1.31 d	0.98 ab	0.93 a
		Vine	11.29 e	11.03 e	6.11 d	3.93 c	3.21 b	2.98 ab	2.70 a	2.83 a	4.05 c
Ca (µM)	Soil 1	Control	2483 a	2525 ab	2491 a	2444 a	2573 ab	2625 ab	2714 b	2948 c	3067 c
		Vine	4182 e	3269 d	2066 c	1984 ac	1909 ab	1874 a	2028 bc	2093 c	1894 ab
	Soil 2	Control	1034 b	966 a	954 a	991 a	972 a	972 a	1037 b	1084 c	1137 d
		Vine	2594 f	2333 e	611 d	598 d	538 c	485 b	469 ab	464 ab	446 a
Fe (µM)	Soil 1	Control	8.80 ab	6.39 ab	10.19 ab	5.91 b	8.17 ab	10.75 ab	2.82 a	3.53 ab	8.22 ab
		Vine	238.33 de	300.27	101.57 ab	113.79 cd	133.35 bc	87.06 ab	17.07 a	21.72 a	130.67 bc
	Soil 2	Control	30.78 bcd	34.94 e	35.77 de	32.52 ce	28.94 bcd	30.54 bce	24.03 ac	17.35 a	26.00 ab
		Vine	172.01 e	197.28 f	132.48 d	103.28 c	75.39 b	61.10 a	53.82 a	61.45 a	78.40 b
Zn (µM)	Soil 1	Control	0.71 ab	0.76 ac	0.64 a	0.62 a	0.79 ac	0.94 cd	0.85 bc	1.10 d	1.09 d
		Vine	9.68 c	6.05 b	0.86 a	0.78 a	0.82 a	0.74 a	0.48 a	0.44 a	0.83 a
	Soil 2	Control	0.44 a	0.40 a	0.43 a	0.45 a	0.42 a	0.39 a	0.52 a	0.52 a	0.44 a
		Vine	6.83 e	6.14 d	0.68 c	0.57 bc	0.43 ab	0.47 ab	0.44 ab	0.41 a	0.45 ab
pCu	Soil 1	Control	8.09 a	8.42 bc	8.45 bc	9.28 e	8.81 d	8.89 d	8.59 bd	8.70 cd	8.35 ab
		Vine	6.79 a	8.01 b	10.05 f	9.42 ce	9.15 c	9.64 e	9.30 cd	9.66 e	9.47 de
	Soil 2	Control	8.06 a	8.20 ab	8.50 cd	8.62 d	8.51 cd	8.52 cd	8.23 ab	8.36 bc	8.22 ab
		Vine	6.67 a	7.33 b	10.13 f	9.20 c	9.66 d	9.87 de	9.80 de	10.03 ef	9.84 de
COD (mg L ⁻¹)	Soil 1	Control	98.94 b	111.80 b	43.93 a	58.3 a	49.15 a	24.94 a	9.19 a	26.24 a	26.70 a
		Vine	710.89 e	295.21 d	100.02 bc	130.51 c	113.83 c	71.13 ac	25.26 a	40.58 ab	44.49 ac
	Soil 2	Control	107.63 b	37.60 a	30.52 a	28.40 a	20.44 a	24.11 a	13.28 a	20.70 a	44.97 a
		Vine	820.13 d	567.85 c	229.94 b	277.11 b	223.65 b	153.68 a	111.35 a	143.57 a	142.53 a

			Day 0	1	3	7	14	23	38	60	92	
HIX	Soil 1	Control	2.91 a	6.07 bc	6.06 b	5.83 b	6.30 bc	6.28 bc	6.53 c	7.54 d	7.85 d	
		Vine	2.65 a	5.08 c	2.89 a	3.30 b	3.34 b	3.61 b	7.19 d	6.09 e	3.57 b	
	Soil 2	Control	4.64 bc	5.21 bd	4.33 c	5.00 bc	5.77 de	6.18 ef	2.91 a	4.83 bc	6.85 f	
		Vine	3.02 a	3.99 b	4.08 b	5.12 c	6.19 f	7.07 d	4.01 b	6.94 d	7.90 e	
BIX	Soil 1	Control	0.73 bd	0.73 ad	0.76 d	0.75 cd	0.73 ad	0.70 ab	0.72 abc	0.69 a	0.72 abc	
		Vine	0.37 a	0.48 b	0.75 c	0.83 d	0.76 c	0.72 c	0.71 c	0.71 c	0.77 cd	
	Soil 2	Control	0.57 a	0.60 a	0.63 a	0.58 a	0.56 a	0.55 a	0.62 a	0.62 a	0.63 a	
		Vine	0.24 a	0.31 b	0.52 cd	0.52 cd	0.49	0.49 c	0.71 e	0.55 d	0.49 c	
S ₂₇₅₋₂₉₅	Soil 1	Control	0.0138 c	0.0136 c	0.0134 c	0.0138 c	0.0128 bc	0.0130 bc	0.0131 bc	0.0117 ab	0.0111 a	
		Vine	0.0075 a	0.0102 b	0.0162 c	0.0163 c	0.0169 c	0.0180 c	0.0172 c	0.0177 c	0.0204 d	
	Soil 2	Control	0.0082 ab	0.0079 ab	0.0076 a	0.0076 a	0.0082 ab	0.0083 ab	0.0130 c	0.0082 ab	0.0085 b	
		Vine	0.0029 a	0.0052 b	0.0092 c	0.0095 cd	0.0099 ce	0.0103 de	0.0104 e	0.0106 e	0.0105 e	
Enzymes (nmol kg ⁻¹)	C	Soil 1	Control	0.99 a	1.02 a	1.32 c	nd	nd	nd	1.10 ab	nd	1.28 bc
		Vine	1.76 c	2.19 d	1.63 bc	nd	nd	nd	1.18 a	nd	1.30 ab	
	Soil 2	Control	0.32 a	0.41 b	0.40 b	nd	nd	nd	0.44 b	nd	0.60 c	
		Vine	0.66 a	2.47 c	1.15 b	nd	nd	nd	1.13 b	nd	0.68 a	
Enzymes (nmol kg ⁻¹)	N	Soil 1	Control	0.36 a	0.39 a	0.40 ab	nd	nd	nd	0.48 bc	nd	0.50 c
		Vine	0.46 a	0.53 a	0.97 b	nd	nd	nd	1.21 c	nd	1.18 c	
	Soil 2	Control	0.17 a	0.19 a	0.22 a	nd	nd	nd	0.19 a	nd	0.20 a	
		Vine	0.18 a	1.26 d	0.75 bc	nd	nd	nd	1.00 cd	nd	0.63 b	

Sous-Chapitre 6.2: A short-term incubation with cover-crop residues affected OM dynamics and Cu availability in an organic vineyard soil

Abstract

The high concentrations of copper (Cu) in vineyard soils may cause toxicity for soil microorganisms. In some vineyard soils, cover crops are sown and mixed to the soil to improve the properties of the soil. Organic matter is known to affect the dynamics of available Cu in soils. In this study, we investigated the impact of cover crops residue mineralization on organic matter dynamics and Cu geochemistry in an organic vineyard soil of the Bordeaux region (France). A 92-days incubation was conducted on one soil amended with residues from Faba bean and oat and a 0.01 M KCl extraction was performed at different days. To assess the organic matter mineralization intensity, we measured the enzymatic activities (C and N related) and the carbon mineralization rate through CO₂ trapping. The DOM properties were assessed through its concentrations (dissolved organic carbon DOC), and its optical properties: with the S₂₇₅₋₂₉₅ (DOM average molecular weight), the HIX (humification index), the BIX (biological index) and the PARAFAC components distribution. The total Cu in solution and the free ionic Cu²⁺ activities (pCu) were measured to evaluate the effects on Cu availability. The results showed that the incorporation of the cover crop residues improved the biological properties of the soil through the increase of carbon mineralization rate and the enzymatic activities. The PARAFAC components distribution were clearly different between the two cover crops at t₀ but tended to be similar at the end of the incubation. The residues supply provoked an increase of DOC in the soil, that was more humified and composed of high molecular weight compounds at the end of the incubation. The total Cu in extracts was intimately linked to the changes of DOM quantity and quality in the residue amended soils. The free ionic Cu activity, assessed through pCu values, appeared to be unaffected by DOM dynamics but rather linked to the pH changes. Overall, the cover crop residue incorporation may cause important changes on organic matter dynamics and Cu availability in the short term.

Keywords: Copper - Cover crop - Organic matter - Fluorescence - Absorbance - PARAFAC - Vineyard soil

1 Introduction

Since 19th century, copper-based fungicides have been massively used in vineyards to prevent downy mildew, caused by *Plasmopara viticola*. This massive use has provoked an important accumulation of Cu in soils, up to several hundred mg Cu kg⁻¹ in old vineyards as reported in many studies conducted in Europe and in France (Ballabio et al. 2018). Cu is still used in viticulture, in spite of the reduction of the authorized application rate to 4 kg Cu ha⁻¹ year⁻¹ (EFSA et al. 2018). The high concentrations of Cu in vineyard soils can lead to toxicity problems for organisms, raising the importance to control the bioavailability of Cu in soils.

In general, vineyard soils are poor in organic matter. In the perspective of sustainable viticulture, winegrowers try several management techniques to improve the organic status of the soils. For example, cover crops are sown in inter-rows so that they constitute a source of OM. They are cut and mixed to the soil in-situ as green manure. Cover crops have many benefits for soils: increasing of soil OM amounts and nitrogen supply in case of use of legumes, reducing of the loss of nutrients through leaching, improvement of soil physical properties, stimulation of biological activity and suppression of weeds (Blanco-Canqui et al. 2015). *Festuca arundinacea* Schreb (Fescue) used as inter-row cover crop, increased by 136 % the OC concentrations in the soil of an Italian vineyard over two years of incorporation at a rate of 50 kg ha⁻¹ (Gattullo et al. 2020). The addition of organic residues enhanced soil enzymatic activities and stimulated carbon mineralization (Ghimire et al. 2017; Błońska et al. 2021). All of these transformations in the soil affect the dynamics of dissolved organic matter. Danna et al. (2017) reported that organic residues (hairy vetch, February orchid, and rye) mineralization during a 56-day incubation produced more and more aromatic DOM in soils as assessed by optical techniques.

It is well established that Cu has an important affinity for soil organic matter (SOM) and more for dissolved organic matter (DOM) (Manceau and Matynia 2010). SOM tends to immobilize Cu in the soil (Ferreira et al. 2018; Gonzaga et al. 2020) while DOM, depending on its properties, promotes Cu mobilization in solution from solid phase (Amery et al. 2007; Araújo et al. 2019). Merritt and Erich (2003) reported that copper-binding strength of fresh litter DOMs is generally higher than those of degraded litter DOMs. Consequently, the supply and the degradation of organic residues in soils may affect directly or indirectly Cu availability. Cui et al. (2008) found that a 6-month incubation of soils added with rice straw provoked a significant increase of dissolved organic carbon and soluble Cu and a reduction of Cu²⁺ concentrations. The decrease of the Cu²⁺ concentrations was related to the pH variations, as the authors explained that the residues mineralization caused an alkalization of the soil solution. Similar results were found in other studies (Merritt and Erich 2003; Usman et al. 2004; Gao et al. 2018) and emerge the importance of organic matter mineralization when studying the dynamics of metals in agricultural soils.

Little is known about the effects of cover crops mineralization on Cu dynamics in vineyard soil solutions. Regarding the diversity of cover crops growing in the vineyard soils (grasses, legumes, forbs,

etc.), their incorporation may affect differently Cu availability depending on their native biochemical characteristics (C:N ratio). Moreover, few studies aimed to link the Cu dynamics to the changes in DOM properties during mineralization, through optical techniques such as ultraviolet visible (UV-Vis) absorption and excitation-emission matrix (EEM) fluorescence.

The main objective of the present work was then to study the effects of the incorporation of two cover crops residues on the dynamics of organic matter and on the availability of copper in an organic vineyard soil. The two residues differed on their quality, assessed through C:N ratio. We hypothesized that the mineralization of residues would affect DOM properties, making it more reactive towards Cu ions. This would lead to an increase of the total soluble Cu and a decrease of the free ionic Cu^{2+} over time. We expect the reactions to be exacerbated for the lower C:N ratio residue.

2 Material and methods

2.1 Experimental design

2.1.1 Soil and litter sampling

The soil F used in this work belongs to the collection of the soils studied in Ouédraogo et al. (2021). In the present experiment, the soil F was chosen because of its relatively high total organic carbon (C_{org}) content and slightly acidic pH_{water} . The soil comes from an organic vineyard located in the region of Bordeaux (France) and where only the Bordeaux mixture (copper sulphate + lime) was used as fungicide. After sampling, the fresh soil was sieved to 4 mm and kept in a cold room at 4°C before operations. The soil was a podzsol ($\text{pH}_{\text{water}} = 6.5$) and had Cu total content of 84 mg kg^{-1} . The organic carbon content was 17 g kg^{-1} with a C:N ratio of 15.3.

The green manure plants chosen were oat (*Avena sativa L.*) and Faba bean (*Vicia faba L.*) because of the contrasting differences in the composition of the two species. Oat is a grass plant cultivated in vineyards as a source of carbon, whereas Faba bean is a leguminous plant that brings N to the soil. The two cultures were harvested fresh in the same vineyard plot near Bordeaux in January 2021. Only aerial parts were sampled (leaves, stems and flowers). After sampling, the plants were dried at 40°C during 3 days. The residues were then crushed into fine powder (< 0.5 mm) using planetary mill and zirconium oxides bowls and balls and stocked in a dried place.

2.1.2 Plant residues analyses

C_{org} and N contents were determined on residue powders with a CN analyzer (Flashea 1112 series) by dry combustion at 950°C. Total elements in residues (Cu, Ca, Fe) were assessed through aqua regia microwave-assisted digestion (Anton Paar Multiwave PRO Microwave reaction System) with HNO_3 :HCl (3.75:1.25, v:v). The concentrations of total metals in digestates were then measured by ICP-OES (Agilent®). The chemical composition of the residues is presented in Table 1.

An extraction procedure was developed here to assess the quality and the composition of the soluble fraction of the residue powders. The objective was to conduct the extraction on the same quantity of residues as statistically present in the fraction of amended soil used for the KCl extraction, with the aim to compare the treatment effects. The extraction of the residues was the same as conducted on the soils (see Section 2.2.2.1). Then, the mass of each of the two residue powders used in the extraction was the equivalent to the mass brought to 15 g soil (see section 2.1.3). Thus, 0.33 and 0.35 g of F. bean and oat respectively were mixed with 30 mL of 10 mM KCl and extracted after shaking, centrifugation and filtration. Then, pH, dissolved organic carbon (DOC) and dissolved elements (Ca, Cu, Fe) concentrations were measured in residue extracts, with the same procedures as for soils (sections 2.2.2.). The characteristics of the soluble fraction of residues are presented in Table 2.

Table 1: Chemical properties of the 2 cover-crop residues in this study

Parameter	F.bean	Oat
C (%)	45.1	42.5
N (%)	4.3	2.85
C:N	10.5	14.9
Ca (mg g ⁻¹)	8.12	3.69
Cu (ug g ⁻¹)	12.74	6.34
Fe (ug g ⁻¹)	53.3	72.48

Table 2: Chemical properties of the extracts of the 2 cover-crop residues in this study

Parameter	F.bean	Oat
Ca (μM)	1050	765
Cu (μM)	0.28	0.79
Fe (μM)	0.06	2.37
DOC (mg L ⁻¹)	1647	1766
pH	4.81	5.55

2.1.3 Microcosm incubation

Around 100 g of fresh soil were mixed with residue powders in 1 L glass jars (Le Parfait®) to have 1g carbon per 100 g dried soil (2.22 g and 2.35 g for F. bean and oat respectively). The residue-added soils are rewetted at 60% of water hold capacity with deionized water and incubated for 92 days at 20°C. 20°C is used in literature as an appropriate temperature to study microbial activity of OM decomposition (McDowell et al. 2006; De Troyer et al. 2011). It is also the mean soil temperature in Bordeaux vineyard surface soils (0-10 cm) during May-September period (Pierdet 2020). Soil humidity was maintained constant throughout the incubation by regularly watering the microcosms. Scintillation vials containing each 15 mL NaOH (2M) were placed in the jars above soils to trap CO₂ originated from OM mineralization. 4 replicates of microcosms were conducted per treatment and

per time and were successively destroyed for further chemical and biochemical analyses. 4 microcosms per time contained soils without residue and 4 other microcosms were maintained empty for control measurements.

2.2 Measurements

2.2.1 Measurements on incubated soils

2.2.1.1 Carbon mineralization

Carbon mineralization was assessed by measuring CO₂ trapped by NaOH during the incubation at days 2, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 30, 37, 44, 51, 65, 79, and 92. For each microcosm, 1 mL of reacted NaOH was titrated with 0.5 M HCl until precipitation of all carbonates (with 1.5 M BaCl₂) and color change at neutral pH (with thymolphthalein). The carbon mineralization rate was then calculated as follows:

$$R = \frac{0.5 (V_0 - V) * C * \left(\frac{V_t}{V_s}\right) * 12 * 1000}{\text{Soil mass} * n \text{ days}}$$

where V₀ is the mean volume of HCl titrated with NaOH of control jars, V the volume of HCl titrated with NaOH of the sample, C the molar concentration of HCl, V_t the total volume of NaOH in each scintillation vial, V_s the volume of NaOH sampled in each vial for titration. The C mineralization rate is expressed in mg C kg⁻¹ soil day⁻¹ and the cumulated mineralization was also calculated (mg C kg⁻¹ soil).

2.2.1.2 Enzymatic assays

The potential soil hydrolytic enzyme activities were measured at days 0, 1, 3, 38 and 92 according to Bell et al. (2013). We measured the activities of C-related and N-related enzymes. The C-related enzymes assessed were: β-1,4-glucosidase, 1,4-β-D-cellobiohydrolase and α-1,4-glucosidase that degrade cellulose whereas β-xylosidase degrades hemicellulose. N-acetylglucosaminidase (which degrades acetylglucosamines) and leucin-aminopeptidase (which catalyzes the hydrolysis of peptides and proteins) were the N-related enzymes measured.

2.75 g of each soil sample was mixed with 91 mL of 50 mM sodium acetate buffer in a blender for 1 min. The buffer was adjusted to the pH of the soil sample. Soil slurries were recovered and added to a 96-deepwell microplate using an eight-channel electronic pipette. Additional quench control replicates of soil slurries with 4-methylumbelliferone (MUB) or 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) standard curves (0 - 100 μM concentrations) and controls without substrate addition (soil slurry + water) were included with each sample. An incubation at 25°C (usual temperature for this measurement) for 3h was conducted on soil slurries with fluorescent substrates corresponding to each enzyme measured (Bell et al. 2013). After the incubation step, the plates were centrifuged for 3 min at 3000 rpm and 250 μL of supernatant was transferred from each well into a black flat-bottomed 96-well plate. After that, the samples were scanned on a microplate reader (Synergy H1 microplate

reader, Biotek, Winooski, USA) using fluorescence with excitation at 365 nm and emission at 450 nm. The enzymes activities measured were expressed in $\text{nmol}^{-1} \text{g}^{-1} \text{soil h}^{-1}$. They are integrated over time as cumulative enzymes activities calculated in $\text{nmol kg}^{-1} \text{soil}$ (Fanin and Bertrand 2016).

2.2.2 Soil solution extraction and analyses

2.2.2.1 Total dissolved metals and Cu^{2+} concentrations

Soil solutions were extracted at days 0, 1, 3, 7, 14, 23, 38, 60 and 92 and conducted on the four replicate microcosms. 15 g equivalent to dry soil (with and without residues) were mixed with 30 mL of 0.01 M KCl at 1:2 w/v (soil-to-solution ratio) and shaken at 35 rev. mn^{-1} for 2 h. The soil suspensions were then centrifuged for 10 min at 4600 g . The supernatants were filtered with $0.2\text{-}\mu\text{m}$ cellulose acetate filters. The soil solutions recovered were sub-divided into aliquots and stored in the dark at 4°C before analyses. The reasons of choosing 0.01 M KCl extraction are explained in Ouédraogo et al. (2021).

The pH of the extracts (pH_{KCl}) was measured using a microelectrode (E16M331, Radiometer Analytical®). Cu^{2+} ion activity was measured on extracts using a Cu ion selective electrode (ISE, 9629BNWP, Thermo Scientific Orion®) and assessed here through pCu values (Rachou et al. 2007). The electrode was calibrated by using Cu solutions buffered with iminodiacetic acid and potassium phthalate. The method allowed calibration for pCu ($-\log_{10} a_{\text{Cu}^{2+}}$) ranging from 5.5 to 13, as described in Bravin et al. (2009).

The total concentrations of dissolved Cu, Ca, Fe, Mn and Zn were measured by ICP-OES (Agilent®) in 5-mL aliquots acidified with 2% HNO_3 .

2.2.2.2 DOM analyses

The concentrations of dissolved organic carbon (DOC) in the KCl extracts were measured within 5 days with a TOC analyzer (TOC V-CPH, Shimadzu®, Japan). The DOC concentration was determined as inorganic carbon subtracted from total carbon ($\text{DOC} = \text{TC} - \text{IC}$) and expressed in mg L^{-1} .

The absorbance and fluorescence of soil extracts were recorded using an Aqualog spectrometer (Horiba Scientific®) with a 1-cm quartz cuvette thermostated at 20°C .

The absorbance spectrum was run scanning from 239 to 800 nm and a 0.01 M KCl solution was used as a blank. The spectral slope $S_{275-295}$ was calculated from the slope of the natural logarithm-transformed absorbance spectra in the 275-295 nm wavelength range, as detailed by Helms et al. (2008). $S_{275-295}$ is thought to be inversely proportional to the average molecular size of DOM (Helms et al. 2008).

Regarding excitation-emission matrix (EEM) fluorescence, excitation scans were performed using a double-grating monochromator (150-Watt Xenon lamp) at wavelengths of 240-800 nm at 5-nm intervals. Emission spectra were obtained using a high CCD detector gain at approximately 0.58-nm

intervals (1-pixel) at wavelengths of 245-830 nm. A blank EEM of 0.01 M KCl solution was acquired daily and subtracted from sample EEM spectra to eliminate scattering peaks. For samples with maximum absorbance intensity greater than 0.1, extracts were diluted accordingly with 0.01 M KCl to avoid inner filter effects. Fluorescence intensities are normalized to the area under the Raman peak (at an excitation wavelength of 350 nm) of an ultra-pure water (Milli-Q, Millipore) blank daily acquired and expressed in Raman units (R.U). TreatEEM software was used to process the EEM spectra and calculate the fluorescence indices (<https://sites.google.com/site/daromasoft/home/treateem> developed by Dario Omanović (Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia)).

Two indices were calculated. The humification index (HIX) is the ratio of the fluorescence over E_m 435-480 nm to that over 300-345 nm from the emission spectrum scanned for excitation at 255 nm (Zsolnay et al. 1999). HIX increases with the degree of aromaticity of DOM. The biological index (BIX) is the ratio of the fluorescence at E_m 380 nm to that at 430 nm, when excitation wavelength is set at 310 nm (Huguet et al. 2009). BIX indicates DOM source, high values (>0.7) report an important contribution of DOM produced from biological activity.

Parallel factor analysis (PARAFAC) is a multiway mathematical tool which statistically decomposes the EEM spectra into individual fluorescence components. A total of 108 EEMs (including 36 control soils, 36 soils + oat and 36 soils + F.bean) were modeled with PARAFAC in MATLAB R2019a with the DOMFluor toolbox 1.7 (Stedmon and Bro 2008; Murphy et al. 2013). The scatter peak regions affected by Rayleigh peaks and Raman effects were carefully removed. The PARAFAC model was run for 3 to 8 components with non-negativity constraints. The optimal number of PARAFAC components was determined after split-half analysis, random initialization and visual inspection of spectral shapes of each component and residuals from models. Each sample was characterized by the maximum fluorescence intensity F_{max} of the components determined by PARAFAC. The relative abundance of each component is represented by its percent contribution to total fluorescence (% F_{max}) for each sample (Stedmon and Bro 2008; Murphy et al. 2013). Interpretation of the determined components was performed by comparison with the literature as well as the "OpenFluor database" (<http://www.openfluor.org/>) (Murphy et al. 2014).

2.3 Statistical treatment

The statistical treatment was performed with the software R (R core Team 2020). Mixed-models and post-hoc Tukey's HSD tests were used to assess the significant differences between the mean values at different treatments. Then, we assessed the temporal evolution of variables and the effect of treatments (soil, residue). Significant differences were observed at $p < 0.001$.

3 Results

3.1 Organic matter mineralization

The carbon mineralization rate in amended soils reached its maximal values 2 days after the beginning of the incubation (**Fig. 1a**), showing that green manure supply caused an immediate effect on SOM mineralization. Overall, the results showed that oat residues had higher C mineralization rate than F. bean residues ($p < 0.001$), as shown by the cumulative carbon mineralization (**Fig. 1b**), for which the differences between the two residues appeared 22 days after the start of incubation. At the end of incubation, the cumulative carbon mineralization in residue-amended soils was around 15 times higher than in the control soil. After 92 days, the mineralization corresponds to around 20 % of carbon supply of the residues.

For the whole experience, no significant difference was found between C-enzyme activities of oat and F. bean amended soils ($p = 0.02$, $p > 0.001$), although, the type of residue impacted significantly the dynamics of N-enzyme activities ($p < 0.001$), with more important activities for F. bean residues. Following the addition of residues in the soil, the C-related (**Fig. 2a**) and N-related (**Fig. 2b**) enzyme activities increased significantly and reached a peak 3 days after the beginning of the incubation. From t_3 to t_{38} , the enzyme activities decreased for both F. bean and oat residue amended soils. But at t_{92} , the C-enzyme activities decreased for F. bean while continuing increasing for oat (**Fig. 2a**). In the control soil, the enzyme activities decreased slightly from t_0 to t_3 and tended to remain constant until t_{92} . Overall, the residual activities at the end of incubation in residue-amended soils were relatively high compared to the control (**Fig. 2**) showing that the enzymes produced persisted in the soils over 92 days of residue decomposition.

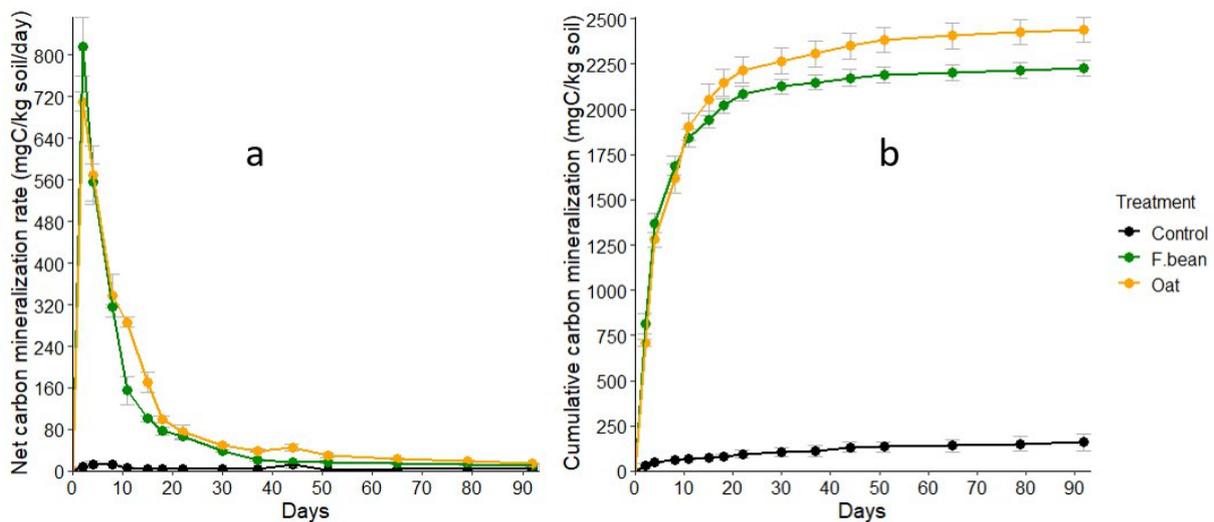


Fig. 1: Net carbon mineralization rate (a) ($\text{mg C kg}^{-1} \text{ soil day}^{-1}$) and cumulative carbon mineralization (b) ($\text{mg C kg}^{-1} \text{ soil}$) measured in the soils throughout the incubation

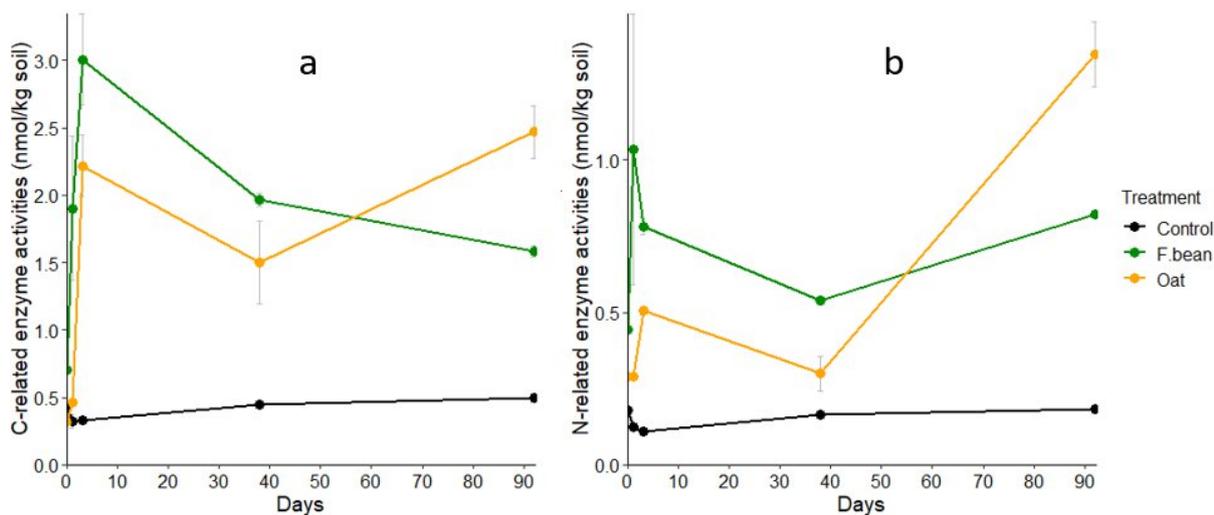


Fig. 2: Temporal evolution of C-related (a) and N-related (b) enzyme activities throughout the incubation.

3.2 Dissolved organic matter parameters

3.2.1 Concentration and optical indices

Fig. 3 reports the temporal evolution of DOM parameters throughout the 92 day-incubation. Comparatively to the control, the addition of plant residues increased the DOC concentrations almost 100-fold in soil extracts at t_0 (Fig. 3a, Table S 1). No significant difference was found between the DOC concentrations for oat and F. bean soils at t_0 . DOC concentrations of amended soil extracts decreased by more than half 3 days after the start of incubation, showing a depletion of DOM brought by residues (Fig. 3a). DOC concentrations increased again between t_3 and t_{14} , more importantly for oat residues than for F. bean ones. Until the end of incubation, DOC concentrations in the amended soils decreased and were close to the control sample at t_{92} (Fig. 3a, Table S1).

$S_{275-295}$ was calculated from absorbance spectra and its evolution during incubation is shown in Fig. 3b. What is interesting to note is that $S_{275-295}$ followed the same temporal evolution as DOC concentrations. At t_0 , the $S_{275-295}$ value of the F. bean-amended soil (0.017) was lower than that of the oat-amended soil (0.025). As the incubation progressed, the $S_{275-295}$ values of the soils amended with both residues decreased sharply from t_0 to t_1 , then increased until t_{23} and finally decreased again at the end of the experiment. For the control soil, $S_{275-295}$ remained fairly constant throughout the incubation (Table S 1).

The supply of residues in the soil caused important changes on the fluorescence signature of the samples, with an apparition of the protein-like band, that tended to disappear at the end of the incubation (Fig. S 1).

Fig. 3c and Fig. 3d report the temporal changes of the two fluorescence indices, BIX and HIX respectively. The addition of plant residues immediately decreased their values in the soil (t_0), with the lowest values for oat residues. Then, HIX decreased (sharply for oat) while BIX increased and peaked on day 3. Between days 7 and 60, HIX was fairly constant and increased markedly from day 60 to 92. BIX seemed to stop increasing after day 23 and reached a steady state where it remained higher in the amended soils than in the control (Fig. 3c, Table S 1).

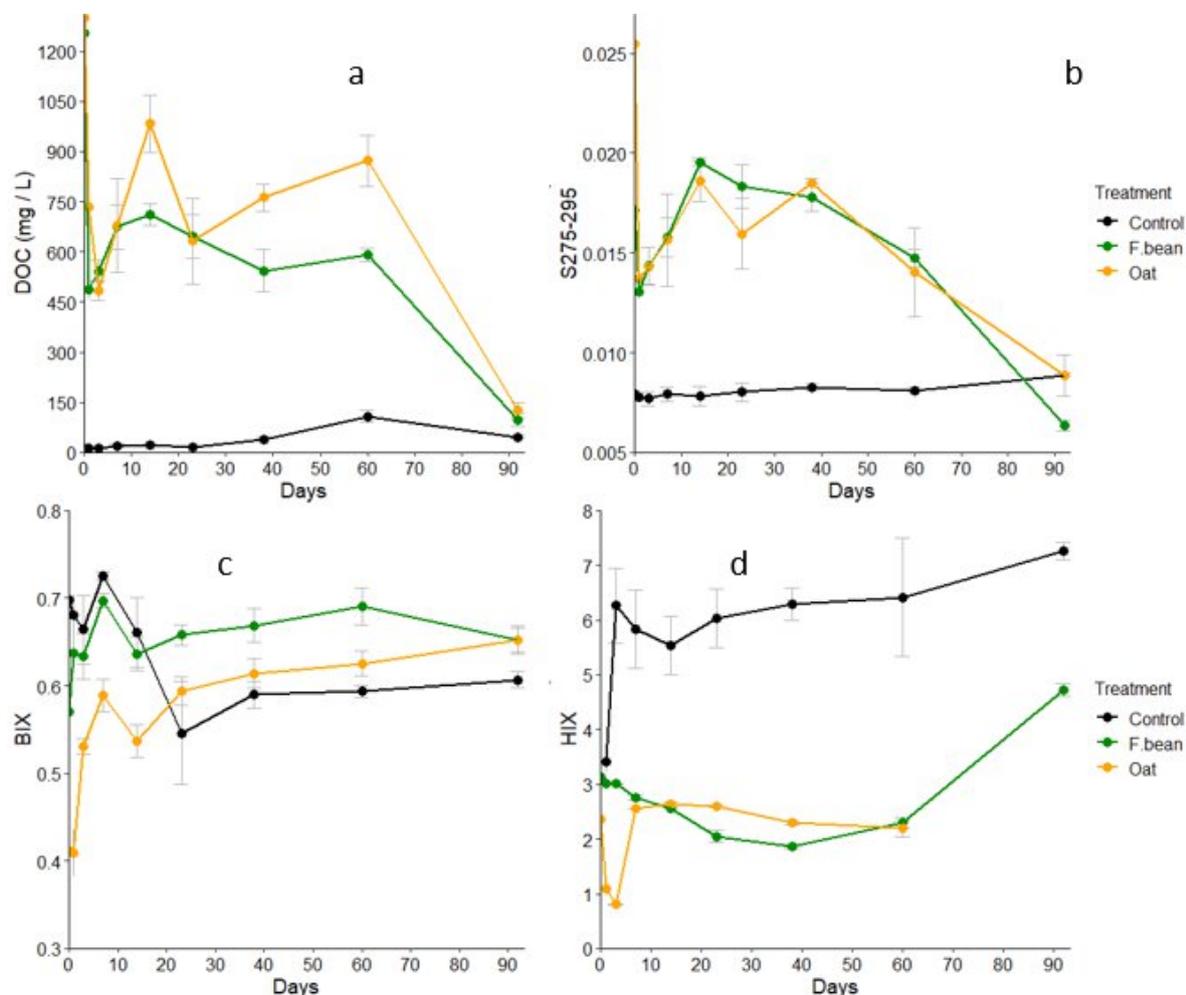


Fig. 3: Temporal evolution of dissolved organic matter parameters during the incubation: DOC concentration in the extracts (a), $S_{275-295}$ absorbance spectral slope over 275-295 nm (b), biological index BIX (c) and humification index HIX (d).

3.2.2 PARAFAC components distribution

The PARAFAC modelling revealed 8 components explaining the fluorescence of the samples of this study (Fig. S 2). Component 1 (C1) was reported as a protein-like or tryptophan-like fluorophore (Cory and Mcknight 2005; Derrien et al. 2019). Component 2 (C2) was assigned to amino acids, free or bound in proteins (Stedmon et al. 2007; Murphy et al. 2008). Component 3 (C3) was reported as a protein-like or tyrosine-like fluorophore (Paerl et al. 2020; DeFrancesco and Guéguen 2021).

Component 4 (C4) was similar to a protein-like or tryptophan-like fluorophore as reported by (Calderó-Pascual et al. 2021). However, these 4 components can also be attributed to other indolic or phenolic type compounds (Aiken 2014). Component 5 (C5) indicated compounds with high contribution of conjugated fluorophores (Zhou et al. 2019) and high molecular weight (MW), low N content, and high aromatic content (Stubbins et al. 2014). It was also reported as reduced semi-quinone fluorophore derived from higher plants and associated with microbial reduction reactions (Cory and Mcknight 2005). Component 6 (C6) was assigned to terrestrial DOM degraded from lignin (Peleato et al. 2017; Zhou et al. 2019) and also to leaf leachate sources (Cuss and Guéguen 2015; Wheeler et al. 2017; Calderó-Pascual et al. 2021). Component C7 has been attributed in the literature to a family of rather high MW, high aromaticity and low N-content molecules consistent with lignin-like compounds and suggesting a pool of plant-derived organic matter that has undergone little reworking in soils since their production (Stubbins et al. 2014; Retelletti Brogi et al. 2020). As for component 8 (C8), it was described as a low MW, low aromaticity, N-enriched DOM pool (Stubbins et al. 2014). The spectral characteristics of this component are similar to those of oxidized quinone-like DOM moieties (Singh et al. 2013). Previous studies have also attributed this component to be derived from aliphatic carbon-rich labile organic matter or to a microbial origin in oxidized environments (Cory and Mcknight 2005; Yamashita and Jaffé 2008; Singh et al. 2013).

The relative abundance of components changed with incubation time and with treatments (Fig. 4). In the control soil, C3 (22%), C4 (20%) and C8 (25%) were the major components at the beginning of the incubation (Fig. 4a). The components C2 and C6 were not found in the control soil throughout the experiment except at t60 where a surprising presence of C2 concomitant with the collapse of C4 was noted (Fig. 4a). The component C1 was the least abundant component detected (0.6 - 4.3 %) in the control soil throughout the incubation. Overall, the incubation tended to increase the relative abundance of components C5, C7 and C8 while components C1, C3 and C4 tended to disappear (Fig. 4a). The two residue-amended soils showed noticeable differences in terms of fluorescence characteristics at the beginning of the experiment. At t0, the components C2 (55%) and C3 (21%) were the most abundant in the soils amended with F.bean residues (Fig. 4b) while the components C1 (36%) and C3 (34%) were predominant in the oat amended-soils (Fig. 4c). It is interesting to observe that at t0, the relative abundance of component C2 was 18 times higher in the oat soil than in the F.bean soil. C2 may be a discriminating factor to differentiate the immediate effects of oat and F.bean residues supply on the fluorescence spectra of the soil.

Taken together, the total abundance of C4, C5, C6, C7 and C8 components at t₀ was 17% and 26% for the soils amended with bean and oat residues respectively, while it was 76% for the control soil. During the incubation, the relative abundance of component C2 decreased clearly in the F.bean amended soil (from 55% at t₀ to 9% at t₉₂), while components C5, C6, C7 and C8 were more abundant at t₉₂ (70%) compared to t₀ (11%) (Fig. 4b). These samples were more enriched in components C2, C5, C7 and C8 at the end (70%) of the incubation compared to t₀ (12%). Meanwhile, an important decrease of the relative abundance of components C1 and C3 was observed at t₉₂. The 8 PARAFAC components showed very different distributions at t₀ between the three modalities (control, F.bean and oat),

whereas incubation tended to lift these differences with time (Fig. 4) as shown also by the similarity of the EEM fluorescence spectra of samples at t_{92} (Fig. S 1).

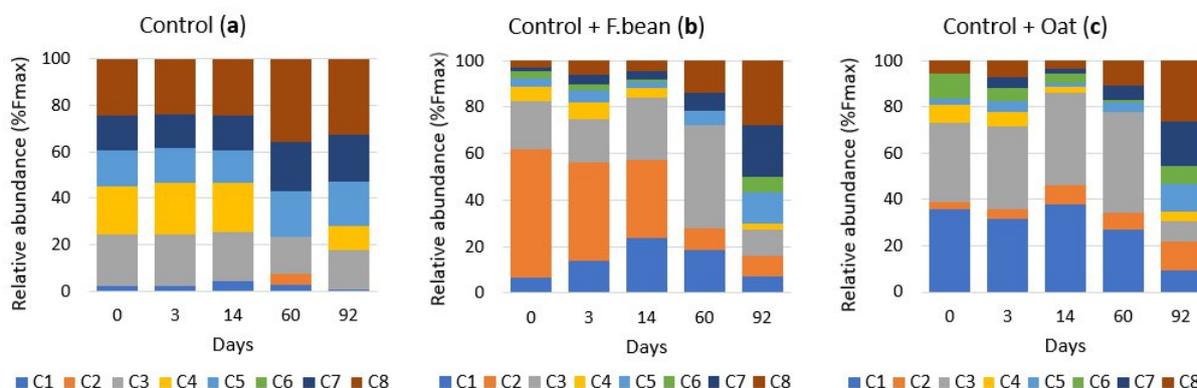


Fig. 4: Variation over time in the distribution of the 8 PARAFAC components in soils incubated without residues (a) or with F. bean (b), or oat (c)

The changes of the fluorescence intensities of the eight PARAFAC components are presented on Fig. 5. Statistically, the intensities in the control soil remained constant all along the incubation ($p > 0.001$). As expected, in the amended samples, the fluorescence intensities clearly increased with the supply of residues, compared to the control soil. The intensities remained higher in the amended soils all along the experiment (Fig. S 3). When considering all the treatments, the maximal intensities were found with components 1, 2 and 3, at the date t_{14} of the experiment. Except for components 1 and 2, no significant differences were found between oat and F.bean residue treatments on the fluorescence intensities during the whole experiment ($p > 0.001$). However, the fluorescence intensity was higher for oat amended soil when considering the components 1, 3 and 6. For the component 2, the intensity was higher for F.bean soil until t_{14} . The components 1, 2, 3, 4, 5, and 6 presented similar dynamics in the residue amended soils. Basically, their intensities decreased sharply after t_0 , then increased at t_{14} or at t_{23} , and decreased again progressively until t_{92} . Another peak was noticeable at t_{60} , especially for components 3, 7 and 8 in the F.bean soil (Fig. 5c). Components 7 and 8 followed similar trends (Fig. 5g, 5h). At the end of the incubation (t_{92}), no significant difference were found between fluorescence intensities of F.bean and oat amended soils for components 1, 2, 3, 5. Their intensities increased until t_{60} , and then fell down at t_{92} . Overall, the total fluorescence intensity differed among the treatments ($p < 0.001$), with higher values for oat amended soil (Fig. S 3). Also, its values in the amended soils tended to get closer to those in the control sample at the end of the experiment.

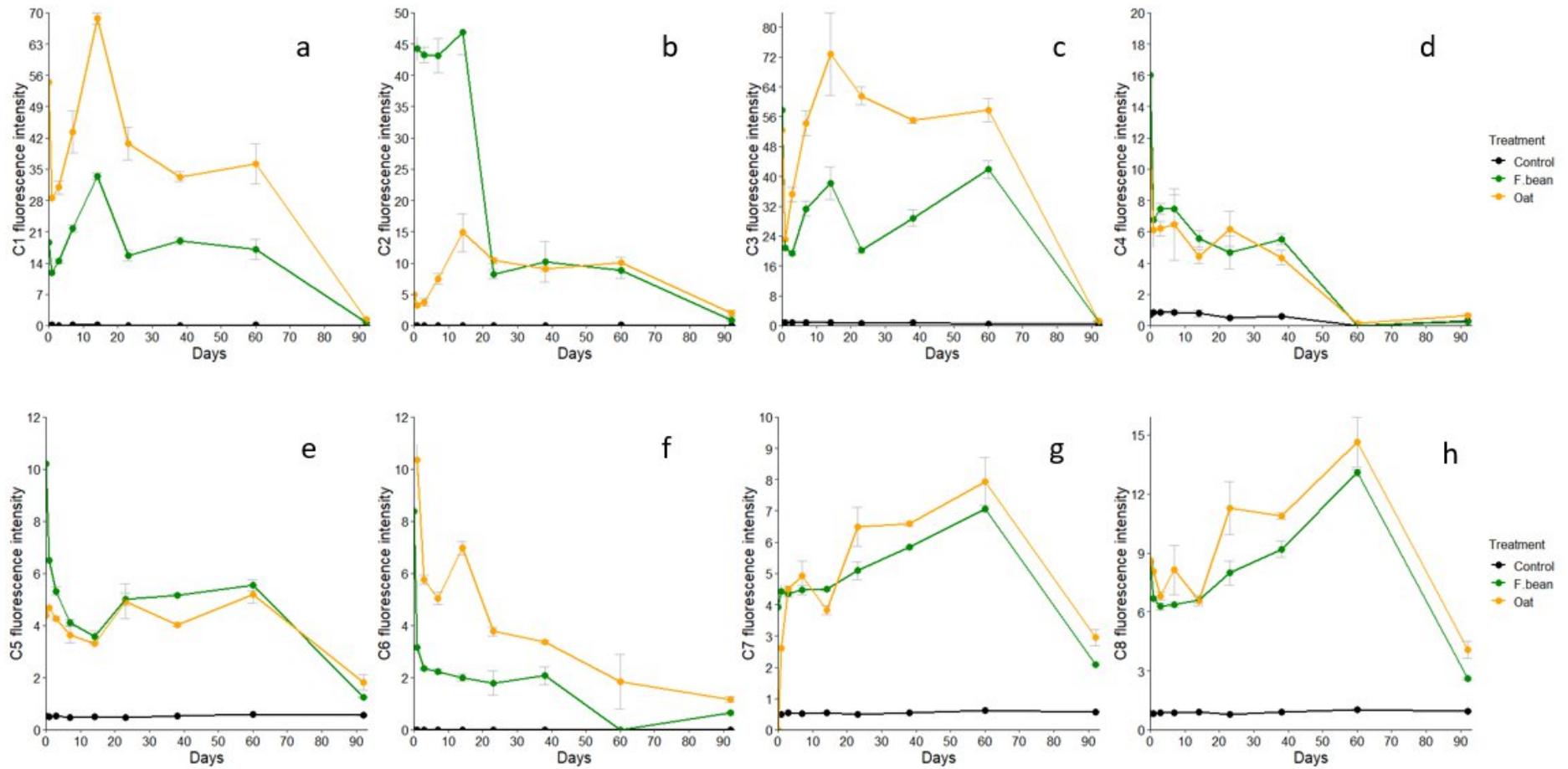


Fig. 5: Temporal evolution of the fluorescence intensity of the 8 PARAFAC components of this study: component 1 (a), component 2 (b), component 3 (c), component 4 (d), component 5 (e), component 6 (f), component 7 (g), component 8 (h).

3.3 pH of soil extracts and Cu dynamics

The addition of plant residues caused soil acidification at the initial stage of incubation (t_0) (**Fig. 6**, **Table 2**). The difference in pH between the amended soils and the control was more spectacular for F.bean (pH = 5.5) than for oat (pH= 6.0), showing that F.bean residues acidify the soil more than oat residues. The pH values of amended soils increased the day after the beginning of the incubation (**Fig. 6**), reaching higher values than in the control sample. The pH values then decreased sharply again and continued to fluctuate between 5.5 and 7. Considering the pH, no significant difference was found between the two residues, and between the treatments and control at the end of the incubation (t_{92}).

The dynamics of pCu (free Cu activity) are plotted in **Fig. 7a**. Visually, pCu tends to have the same trends as the pH of the extracts, whereas the addition of plant residues caused important fluctuations of Cu activity. Overall, the amended soils had higher pCu values than the control soil throughout the incubation period (Fig. 7a). The plant residues supply seems to have decreased ionic free Cu concentrations compared to the control soil.

Compared to the control soil, total dissolved Cu increased drastically (more than 20-fold) as plant residues were brought to the soil at day 0 (Fig. 7b, Table S1). Then, the total dissolved Cu dropped almost vertically during the 14 first days of the incubation. After that, as noticed for DOC with a maximum at t_{14} , the total Cu in extracts increased again between 14 and 23 days before decreasing progressively until t_{92} (Fig. 7b), for which time similar values were found between the amended soils and the control (with higher concentrations for oat residues) (Table S1). Hence, the temporal evolution of total Cu concentrations in extracts (Fig. 7b) seems to follow approximately the pattern of DOC concentrations (Fig. 3a).

The results of the other total elements (Ca, Fe, Zn, Mn) are presented on **Fig. S 4**. The concentrations were all higher in the amended soils than in the control sample, but no significant difference was found between the 2 residue treatments ($p>0.001$). Considering all the incubation duration, the concentrations of these metals remained constant in the control sample, except Ca whose concentrations fluctuated from a date to another (Fig. S4d). As noticed with Cu, the concentrations of Fe and Zn (Fig. S4a, b) in the amended soils diminished after t_0 , tended to increase slightly in the meantime, and then decreased again until the end of the experiment (t_{92}). That observation was not applicable to Ca and Mn, whose concentrations fluctuated greatly with huge variations between the replicates, then it was difficult to find clear trends (Fig. S4c, d).

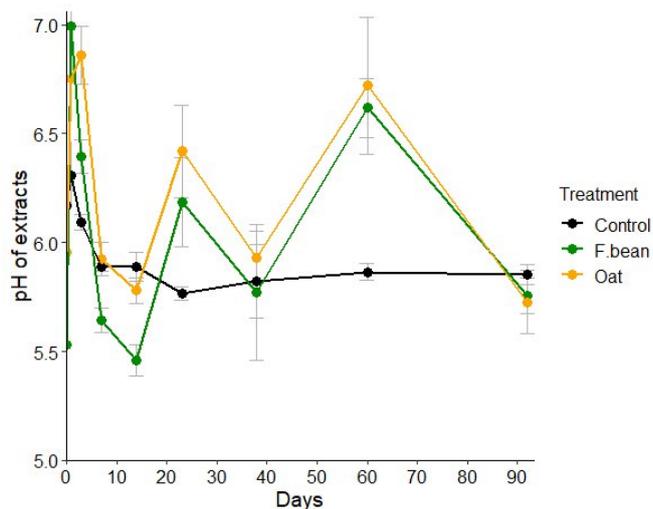


Fig. 6: Temporal evolution of the soil extract pH during the incubation

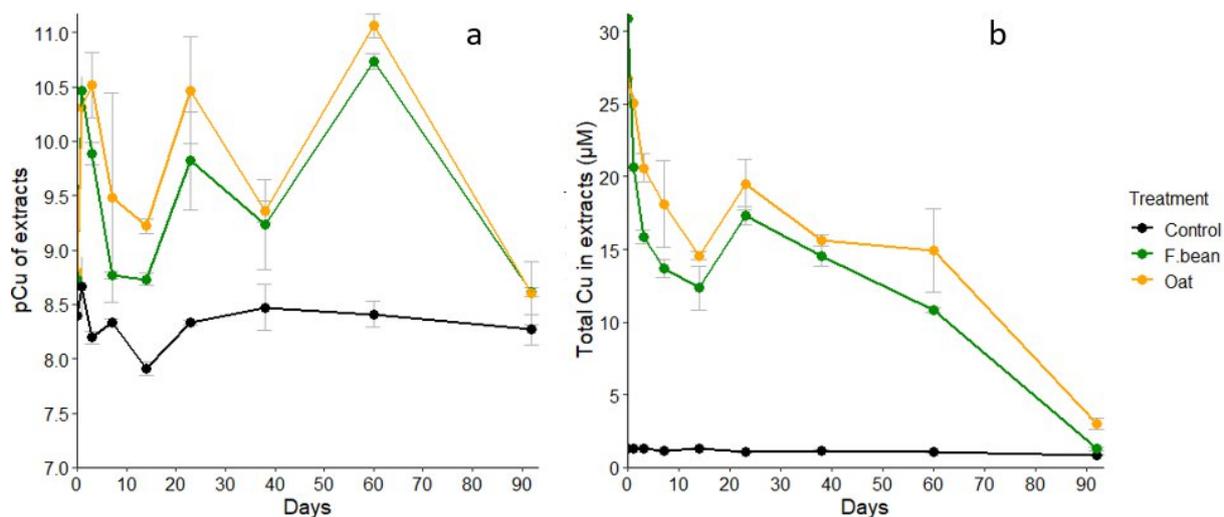


Fig. 7: Cu dynamics throughout the incubation., with ionic Cu activity indicator pCu (a) and total Cu in extracts (b)

4 Discussion

4.1 The cover crop residues brought soluble materials that boosted soil biological activity

4.1.1 Changes in DOC concentrations and optical parameters

The results of this study indicate that the quantity and the quality of DOM recovered from residue-amended soils varied noticeably throughout the 92-days incubation. In the literature, it is well known that the concentration and the quality of DOM are related to the decomposition of organic matter in

ecosystems (Kalbitz et al. 2000; Gmach et al. 2020). Firstly, in the control soil, some unexpected trends in HIX and BIX values occurred during the first days (0-7) of the incubation. These findings may be due to the initial perturbation of the soil caused by the disaggregation of soil particles prior to the incubation.

As expected, the addition of cover crop residues increased soil DOC concentrations in the early stages of incubation (**Fig. 3a, Table S 1**). At t_0 , the DOC concentrations increased almost 100-fold in the residue-amended soils compared to the control (Table S1). The DOC concentrations of the amended soils at t_0 represented approximately 75% of the values measured in the soluble fraction of the residues (**Table 2**). Hence, the important increase in DOC can be explained by the immediate release of the readily-soluble components from residues. The low values of HIX and BIX at the beginning of the incubation (**Fig. 3c, d**) indicate that the recovered DOC was little humified and poorly related to microbial activity. These results support the idea that the DOC recovered at the beginning of the experiment came directly from fresh residues, as also reported by Dan-na et al. (2017). Moreover, using tracer and isotopic techniques, De Troyer et al. (2011) found that around 98% of the initial DOM originating from residues consisted of hydrophilic, low aromatic and easily degradable compounds.

The DOC concentrations decreased sharply between 0 and 3 days in the residue-amended soils, indicating an important loss in DOC at this stage of the incubation (**Fig. 3a**). These findings are likely to be related to a microbial consumption of the simplest components coming from residue solubilization. Indeed, this decrease in DOC concentrations is concomitant with the peak of C mineralization, confirming that DOC components in solution were mineralized by micro-organisms. These results reflect those of Hassan (2013) who also found that DOC originating from green manure residues are vulnerable to rapid mineralization because it is mainly composed of easily-decomposable components. Moreover, it should be mentioned that the little particle size of the residues (transformed into powders) has certainly contributed to exacerbate the mineralization. Indeed, the thinner the litter is, the more available it is to microorganisms. From day 3 to day 14, the DOC concentrations in amended-soils increased again, especially with oat residues (**Fig. 3a**). This increase in DOC seems to come after the increase of BIX values at t_7 , indicating that a part of the released DOC may be related to the increased biological activity in the soil (Huguet et al. 2009). Moreover, it also corresponds to the high enzymatic activities in the amended-soils (**Fig. 2a, b**). Hence, it seems possible that at this stage of the incubation, the micro-organisms started decomposing the simplest components of solid residues because of the previous depletion of available-DOM. This decomposition of solid residues may have led to a supplementary production of DOM which was still low-humified.

From day 60 to day 92, the concentrations of DOC in amended-soils decreased frankly to the same order of magnitude as the control sample (**Fig. 3a**), suggesting a second net depletion in DOC during the whole incubation. Surprisingly, contrary to the first depletion, the decrease of DOC during 60-92 days does not correspond to an important C-mineralization rate. This suggests that the DOC was used by micro-organisms for their growth or was sorbed on soil mineral surfaces that provoked its decrease

in the extracts. Elsewhere, the most hydrophobic and aromatic components of DOM are vulnerable to mineral sorption due to their structure and are then more resistant to microbial decomposition (Zhou and Wong 2000). This hypothesis corroborates HIX trend in our study which shows a remarkable increase of DOM aromaticity between 60 and 92 days of the experiment. In accordance with the present results, previous studies have demonstrated that long-term manuring increased DOM aromaticity since it originates from decomposition of the most recalcitrant components of green manure or from soil native organic carbon (Chen et al. 2010; De Troyer et al. 2011; Xie et al. 2019). The authors stated that the precedent finding was more and more relevant as the decomposition progressed, where the refractory organic components (lignin, cellulose) are gradually decomposed.

$S_{275-295}$ is inversely proportional to DOM molecular weight (Helms et al. 2008). The evolution trend of $S_{275-295}$ (Fig. 3b) corroborates the previous findings with DOC. First, the $S_{275-295}$ values at t_0 showed that oat residues (0.025) produced smaller DOM molecules in soil than F.bean residues (0.017) (Table S 1). The decrease of $S_{275-295}$ between t_0 and t_1 (Fig. 3) is likely to correspond to the rapid depletion of smaller and simpler molecules of the DOM pool that are preferentially consumed by microorganisms at the beginning of the mineralization. Consequently, DOM becomes more concentrated in higher molecular-weight compounds saved from the decomposition at this moment, and that are characterized by lower $S_{275-295}$ values. From t_1 to t_{14} , the $S_{275-295}$ values increased by about 30% for the two residue-amended soils (Table S1). As explained above, with the depletion of DOC, microorganisms may have decomposed more intensively the solid residues and released into solution some products characterized by low molecular weights. The last stage corresponding to t_{14} - t_{92} can be defined as a progressive enrichment in solution of larger and more complex products coming from residues decomposition and transformation. This explanation can be pertinently associated to the increase of HIX since t_{60} , that reflects the gradual humification of the DOM in the residue-amended soils.

4.1.2 Changes in DOM composition

The distribution of the 8 components determined by PARAFAC changed over the incubation time. As also reported by Hunt and Ohno (2007), the mineralization of organic residues tends to provoke a depletion of some fluorophores and an accumulation of other ones. In our study, it is likely that components C1, C2 and C3 (and C6 at some extent) were both consumed and produced by microbial activity while components C5, C7 and C8 seem to be products of the mineralization of the residues (Fig. 4) or of the transformation or reworking of small molecules contributed by the amendments. At t_{14} , the abundance of the components C1, C2 and C3 (for F.bean) and C1 and C3 (for oat) clearly increased (Fig. 4). The latter components were dominant in soils amended with residues just before incubation (t_0). This is in agreement with our earlier observations, where we hypothesized a disrupting change in DOM dynamics (at t_{14}) due to an additional release of material from residue decomposition.

At the end of the incubation, the soils amended with both types of residues show quite similar fluorophore distributions and very close to that of the control sample (Fig. 4, Fig. S 1), as also

reported by Xie et al. (2019). The increase of the HIX after t60 corresponds to the highest abundances of PARAFAC components C5, C6 and C7 (Fig. 3d, Fig. 4). Then, we infer that the enrichment in components C5, C6 and C7 may be the causal factor of DOM humification. Moreover, the abundance of components C1 and C3 seems to follow the same evolution as DOC and $S_{275-295}$. As discussed above, these components are characterized as hydrophilic compounds like amino-acids, probably with low molecular size. Then, we presume that the depletion of components C1 and C3 may be the determinant of the increase in molecular weight of DOM observed during the experiment.

The DOC produced during the incubation of the amended-soils increased with total fluorescence intensity (Fig. S 5). This suggests that the DOM produced had sufficient aromatic compounds to express fluorescent properties. The peak of DOC production at t14 coincides with an increase of fluorescence intensities of components C1, C2, C3 and C6, suggesting a release of lowly-humified compounds at this stage of the experiment. The peak of DOC concentrations at t60 corresponds better to the increase of components C7 and C8 fluorescence intensity, meaning a production of more humified substances. This finding corroborates the results of HIX that showed an increase of DOM aromaticity after t60. The components C1, C2, C3, and C4 tend to disappear more rapidly from the soil solution, certainly because of their lowly-humified and hydrophilic character, that caused their intense degradation and transformation by microbial activity.

4.1.3 Effects of residue supply on the soil biological activity

A first objective of this work was to study the effects of the addition of organic residues on organic matter dynamics. Soil CO₂ fluxes are generally exploited to assess the microbial decomposition of litters (Fanin and Bertrand 2016), assuming that CO₂ is released by nutrient decomposition and respiration of soil organisms.

We observed that the addition of residues provoked a peak of carbon mineralization rate 2 days after the start of incubation followed by a sharp decrease until day 23 (Fig. 1a). The likely explanation of this rapid mineralization may be the consumption by micro-organisms of the most soluble and readily-decomposable components of the organic residues (organic acids, amino acids and simple sugars). This hypothesis corroborates our findings on the distribution of HIX and PARAFAC components, which showed an abundance of weakly-humified compounds right after the supply of residues. Our results reflect those of many other authors who also underlined a rapid increase in C mineralization at the beginning of incubation and a relative slowing down of this increase in subsequent stages (Lynch et al. 2016; Ghimire et al. 2017; De Notaris et al. 2020; Li et al. 2021). Moreover, as mineralization proceeds, the pool of soluble compounds diminishes due to microbial consumption and the relationship between the intensity of the C mineralization and the presence of soluble compounds finally fades (Trinsoutrot et al. 2000).

The both residues had high amounts of soluble carbon, slightly higher for oat than F.bean (Table 2). This can explain the important C mineralization compared to the control soil. Overall, the two residues seemed to have the same intensity of C mineralization with a peak occurring at day 2. But in the long-term, the cumulated C mineralization of oat was higher than F.bean after day 23 (Fig. 1). The two crop residues differ on the C:N ratio, 10.5 and 14.9 for F.bean and oat respectively (Table 1). Generally, the lowest the C:N ratio of crop residues, the fastest its decomposition in the soil (Finney et al. 2016). We expected then the mineralization of F.bean residues to be more important than that of oat. On that point, it was mentioned in literature that legume cover crop residues decompose faster than grass cover crop residues as legumes have generally greater nitrogen and bioavailable carbon pools (Johnson et al. 2007). In our study, the oat residues tended to be mineralized more intensively, in terms of C quantities, as observed with cumulative carbon mineralization (Fig. 1b). The C:N ratio of plant residues is probably an insufficient index of OM decomposability, as it gives an incomplete information about the quality of C compounds (Carvalho et al. 2011). The recalcitrant fraction of plant residues must be taken into account as it decomposes slowly and produces little CO₂ flux in the longer term (Li et al. 2021). Then, the stage of the incubation corresponding to 23-92 days may correspond to a depletion of the readily-decomposable compounds and an accumulation of recalcitrant organic compounds, leading to lower C mineralization (Fig. S 1). Furthermore, of the 2 residues, those from oats may have a lower stoichiometric abundance of complex plant molecules such as lignin compounds, that is generally assessed through lignin/N ratio (Walela et al. 2014; Li et al. 2021). Moreover, despite the differences in quality of the two residues, they both provoked similar C mineralization rates at the initial peak of the incubation (Fig. 1a). It seems possible that these results are due to the fact that the two residues were brought to the soil at the same rates of total C (1g C for 100 g of soil).

Soil enzyme activities are related to soil biological functioning and are exploited as sensitive indicators to different land managements. Only carbon and nitrogen enzyme activities were discussed in this work. As expected, the enzyme activities increased rapidly as cover crop residues were added to the soil (peak on day 3) and remained high compared to the control (Fig. 2a, b). These results are in line with those of previous studies (Tejada et al. 2008; Khan et al. 2020; Zhou et al. 2020). When fresh materials are added to the soil, soil microorganisms are stimulated and produce extracellular enzymes to degrade the organic matter. Then, the application of green manure provokes an increase of soil enzymatic activities, especially if the soil was initially poor in organic matter like vineyard soils (Okur et al. 2009; Khan et al. 2020). It has also been reported that green manures contain intra and extracellular enzymes that can be released when applied to the soil (Tejada et al. 2008). In our case, the high dose of the amendments may have caused an important production of microbial biomass to degrade the exogenous organic matter, as reported by Longa et al. (2017). The β -glucosidase is one of the most active of the C-related enzymes. It plays a key role at the initial stage of the organic matter decomposition (Khan et al. 2020). As mentioned in the literature, the enzymatic activities are positively correlated to DOC concentrations from decomposing residues (Błońska et al. 2021). At t_{92} , the enzyme activities were higher for oat than for F.bean. It is likely that a limitation in C and N

nutrients occurred at the end of the incubation, more noticeably in oat residue-amended soils than with F.bean. In this case, the microorganisms synthesize more enzymes to decompose the oat residues and to make the targeted nutrients available (Błońska et al. 2021).

4.2 Explaining the changes in Cu availability during cover crop residue mineralization

One of the objectives of this study was to assess the impact of the mineralization of fresh organic residues on the dynamics of available Cu in vineyard soils. The Cu availability was assessed through its total concentration in the extracts and the indicator of its ionic fraction activity (pCu).

As noted for DOC, the addition of residues increased the Cu concentrations in extracts at day 0, compared to the control (Fig. 6c). Considering only the first two days of the incubation, we have identified two mechanisms that can explain the fate of available Cu in the residue amended soils. The first hypothesis is that DOM, due to its huge concentrations at this stage of the experiment (t_0 - t_1), caused an intense desorption of Cu. Indeed, a positive relationship was established between the total Cu and the DOC concentrations ($R^2= 0.8$, Fig. 8a). The relationship remained important considering only the 3 first days of the incubation ($R^2=0.76$, Fig. S 6a). Then, DOMs of residues through their high quantity and hydrophilic character, caused the solubilization of Cu and increased its concentrations in solution. The soluble Cu from the soluble fraction of residue was negligible (Table 2), compared to that of the amended soils. In view of that, the dissolved Cu concentrations in amended-soils can only originate from the solid phase of the soil and very slightly from residues. The second hypothesis explaining the important release of Cu in solution at t_0 is a desorption of Cu due to the supply of H^+ protons from organic residues. Then, the acidification of the soil solution from the residues enhances the mobility of Cu and of other metals such as Zn. Accordingly, the total Cu concentrations were not correlated to pH during the whole experiment ($R^2=0.1$, Fig. 8b). Nevertheless, the relationship pH-Cu becomes significative when we consider only the timeframe t_0 - t_1 in the amended soils ($R^2=0.86$, Fig. S 6b). That observation was also applicable to the most of the other metals measured in solution, except for Fe, whose dynamics depended on the residue (Fig. S 7). Then, it seems that DOMs coming from residues acidified the soil solution, that caused a desorption of metals at the earlier stage of the incubation. This hypothesis is plausible because of the low pH values measured in the soluble fraction of residues before the incubation (Table 2). Overall, the solubilization via DOM and the desorption through soil acidification probably operated simultaneously in the system.

The Cu concentrations dropped at t_3 , increased again and finally collapsed between t_{60} and the end of the incubation in the amended-soils. The strong positive correlation between DOC and dissolved Cu concentrations ($R^2=0.8$, Fig. 8a) suggests that DOC and dissolved Cu dynamics are simultaneous and are mechanistically linked. As evoked above, it seems that the addition and the mineralization

of residues provoked a solubilization of soil Cu through the production of DOC. The mechanism behind this finding is thought to be a complexation of Cu by DOM-components that brings Cu into solution and enhance then its mobility (Amery et al. 2007; Araújo et al. 2019; Laurent et al. 2020). A positive significant relationship was found between DOM total fluorescence intensity and total Cu concentrations in solution ($R^2=0.78$, Fig. S 8a). This relationship was stronger when considering only the fluorescence intensities of component C5, C6 and C7 ($R^2=0.95$, Fig. S 8c). These 3 components were the most humified of the 8 PARAFAC components of this study. Even if no relevant relationship was found between Cu in extracts and HIX (Fig. 8c), our results suggest that the interaction DOM-Cu and mobilization of Cu onto solution involved the most humified and aromatic compounds of the whole DOM, that corroborates previous findings (Hu et al. 2019; Chen et al. 2020).

After t_3 , DOC concentrations decrease, which also caused a decrease in the Cu desorption and its concentrations in solution. Cu has a high affinity for DOM. Cu availability may depend on its interactions with DOM through complexation. The intensity of the complexation depends on the quality and the concentration of the DOC produced by residues. Even if the high concentrations of Cu between 0 and 1 day may be related to pH changes, it is admissible that between 3 and 92 days, the evolution of Cu in extracts was especially linked to DOM dynamics. Furthermore, the intense biological activity after the supply of the residues may have caused a degradation of stable Cu-MO complexes in the soil, reducing their molecular size and then favorizing their passage into solution. Hence, it is conceivable that the simultaneous decrease of DOC and Cu concentrations may be due to a disappearance of the DOM-Cu complexes, as result of two mechanisms. On the one hand, the DOM molecules are intensively consumed by microorganisms, this stage corresponds to the peak of C mineralization rate noted between 0 and 3 days of the incubation. On the other hand, the Cu-DOM complexes would be sorbed onto soil particles, reducing its concentration in solution. Wang and Zhou (2006) reported that the mobility of Cu decreases as microbial degradation of manure takes place in the long term. Furthermore, Wang et al. (2020) compared several sources of DOM and found that microbially processed DOM enhanced more metals adsorption on soil particles than DOM extracted from organic residues. Then, microbially processed DOM may present more ability to decrease metal mobility, due to its high molecular weight and aromaticity that promote the sorption of DOM-Cu complexes onto soil. Considering this reasoning, if the incubation continued over 92 days, we would expect the DOC humification to increase and the concentrations of dissolved Cu in residues amended-soils to continue decreasing, until being lower than in the control sample.

The residue addition provoked an acidification of soil extracts (Fig. 6). The pH values fluctuated then during the incubation but tended to be higher than the pH of the control. It is interesting to notice that the residues were acidic in their nature (Table 2), probably due to their respective biochemical constitution. Consequently, the initial acidification of residues amended-soils (especially with F.bean) may be explained by a release of organic acids and other acidifying components that were present in the residues before their addition in the soil. Ritchie and Dolling (1985) mentioned that organic matter decomposition can lower soil pH through nitrification (that produces protons) or may increase pH through mineralization of organic anions (that releases OH^-). The authors also argued that the

predominance of one of the two previous phenomena depends on the association of organic anions from plant residues with H^+ in the soil.

The addition of plant residues seems to have increased the pCu values compared to the control (Fig. 7a), meaning that the treatments have decreased the concentrations of Cu^{2+} . Moreover, a positive relationship was found between pCu and the pH of extracts ($R^2=0.72$, Fig. 9a), suggesting that the changes in Cu^{2+} activity are related to the activity of proton. In the residue amended-soils, no tangible relationship was found between Cu^{2+} activity and DOC concentrations (Fig. 9b), neither DOM aromaticity (Fig. 9c). Nevertheless, the less humified DOMs tend to promote high pCu values and then, less Cu^{2+} concentrations (Fig. 9c). Moreover, we did not find any relevant relationship between pCu values and the abundance of PARAFAC components in the extracts (Fig. S 9). Taking the previous results together, we can infer that the variation of pH is the main factor explaining the variability of Cu^{2+} activity. The link between DOM changes and Cu speciation is unclear. We presume that DOM did not affect directly the Cu^{2+} dynamics through its quality and composition. Nevertheless, DOM modified the soil pH via its initial chemical properties and during its mineralization by microbes. Then, the combination of all of these phenomena led up to impact the free Cu^{2+} dynamics.

Overall, our results based on total and free Cu dynamics in solution are in agreement with those found in many studies. Laurent et al. (2020) found that a long-term supply in organic amendments has increased soluble Cu but decreased Cu^{2+} activity. The decreasing of Cu^{2+} activity was thought to be directly driven by soil solution pH whereas the increase of total Cu in solution was explained by the increase of DOC concentration and its aromaticity. These findings further support the idea that in a perturbed system through the addition of organic materials, the dynamics of total Cu in solution and those of free ionic Cu are dissociated. The addition of plant residues and their decomposition may change the soil pH and subsequently modify indirectly the speciation of Cu in solution (Cui et al. 2008). Further research is needed to clarify the effect of DOM optical properties on Cu speciation.

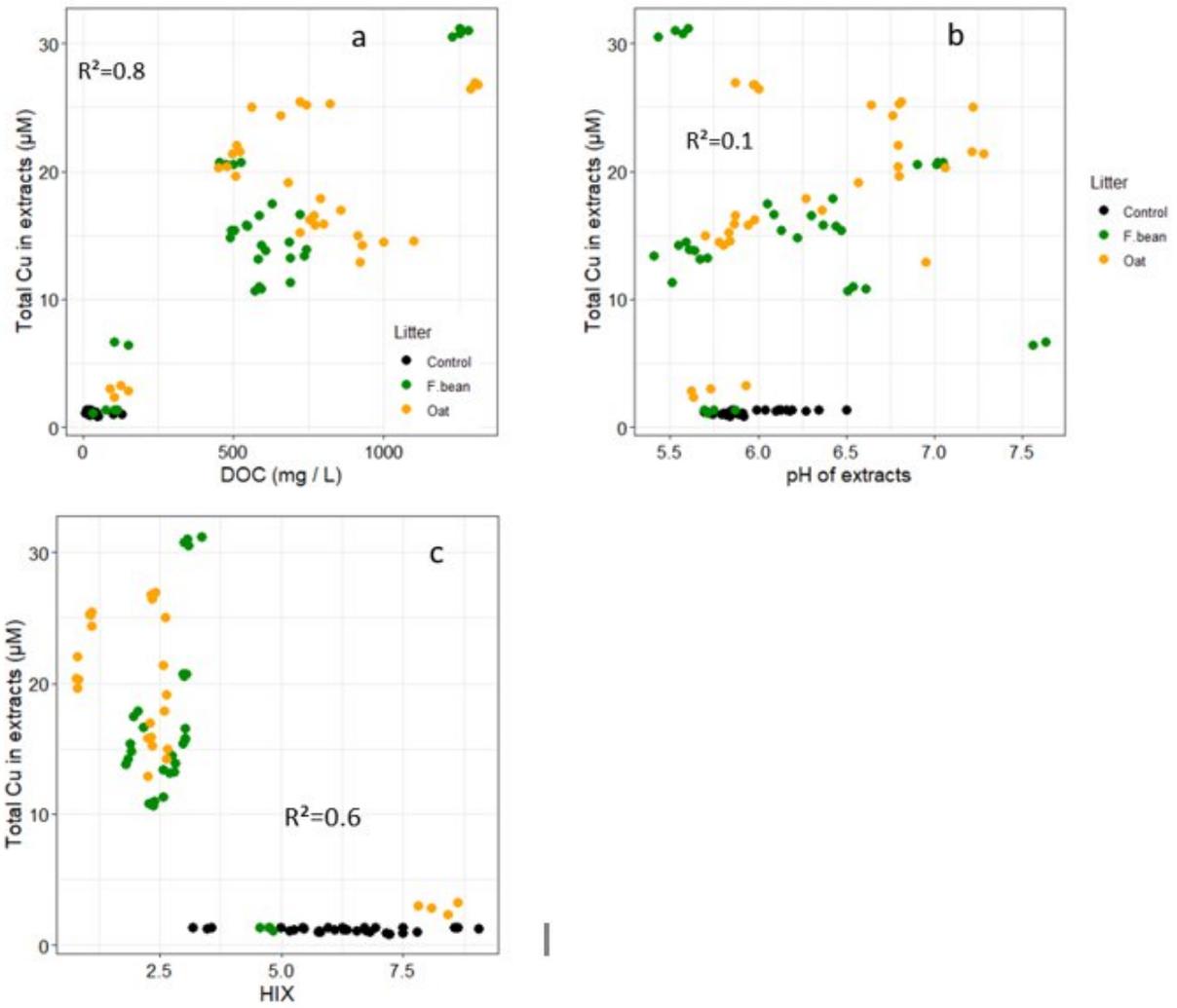


Fig. 8: Relationships between total Cu in extracts and DOC concentrations (a), pH of extracts (b) and humification index HIX (c).

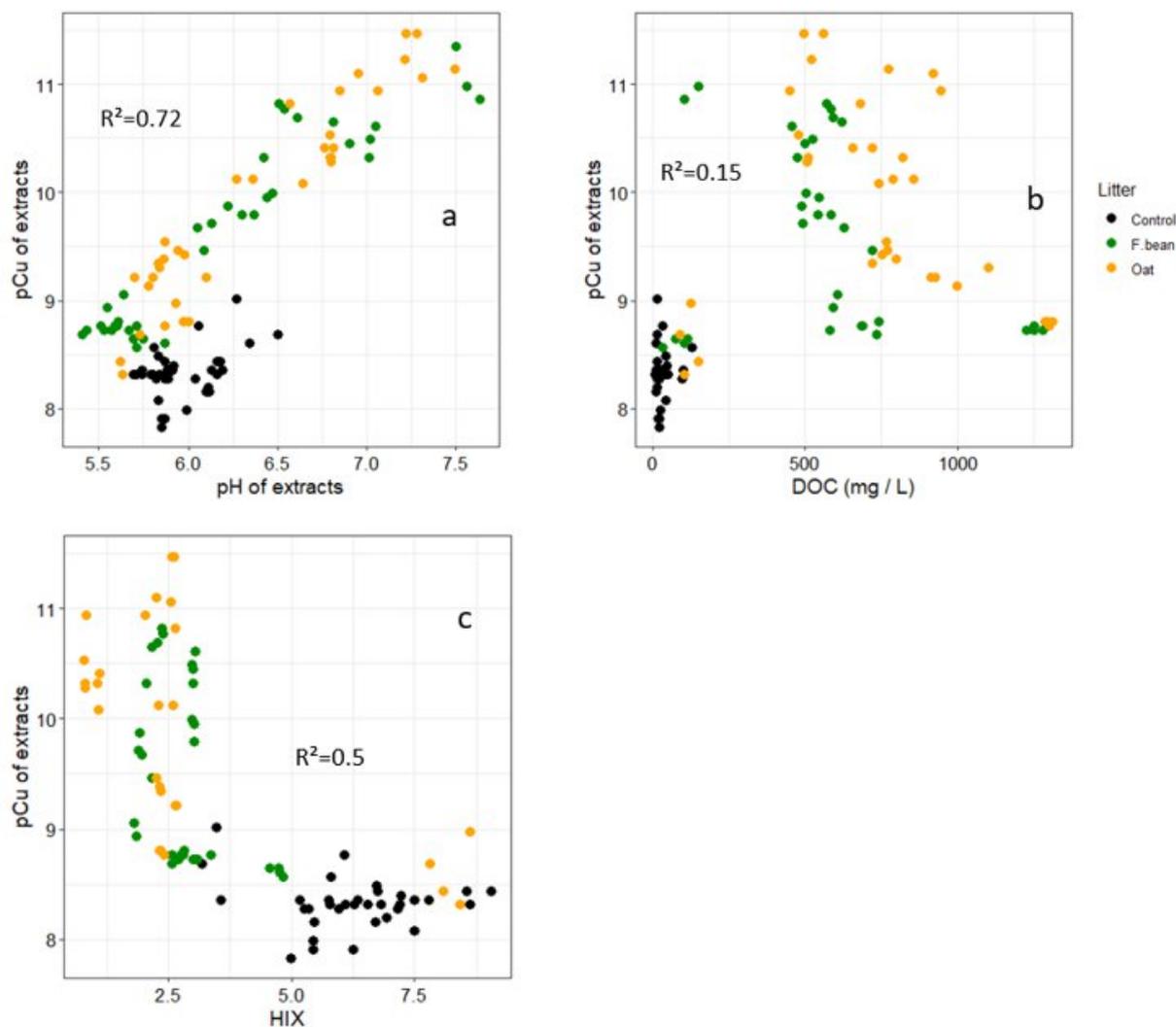


Fig. 9: Relationships between pCu of extracts and pH of extracts (a), DOC concentrations (b), and humification index HIX (c).

5 Conclusions

Through the combination of several techniques, this study focused on the modifications of biogeochemistry of copper in a vineyard soil following the mineralization of two cover crop residues. The indicators of soil biological activity (carbon mineralization and enzyme activities) increased as a result of the residue decomposition. In the residue amended soils, the mineralization was boosted and the enzyme activities remained high even at the end of the experiment. At the beginning of the experiment, the PARAFAC modelling revealed flagrant differences between the treatments, but the DOM composition of residue amended-soils and the control were finally quite similar 92 days after the residue supply. The incubation tended to promote a microbial consumption of some organic compounds specific to residues and the production of other humified compounds similar to those found initially in the control soil. The supply of the fresh residues in the soil provoked an important release of DOM that transformed and collapsed from the soil solution through microbial consumption.

As the residues were mineralized, the DOM produced was more and more humified and composed of higher molecular-weight compounds, capable to sorb onto soil particles. Our results suggest that the temporal dynamics of the DOM affected significantly the concentrations of Cu in solution but not the free ionic Cu activity. Cu^{2+} concentrations seemed to follow changes in pH, suggesting a competition between free copper and proton. Ultimately, the two residues were different in terms of composition and chemical properties. But considering the whole set of the measured variables in this study, the residues showed similar effects on the soil solution chemistry and on the availability of Cu. One theoretical implication of this work is that the supply of fresh organic material on Cu-contaminated soils may provoke a decrease of the availability of Cu due to the increase of pH and the sorption of Cu with DOM complexes. Further research could usefully explore in a longer term the same dynamics with different soils, in order to validate our findings in a broader perspective.

References

- Aiken G (2014) Fluorescence and Dissolved Organic Matter: A Chemist's Perspective. In: Baker A, Reynolds DM, Lead J, Coble PG, Spencer RGM (eds) *Aquatic Organic Matter Fluorescence*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 35-74
- Amery F, Degryse F, Degeling W, Smolders E, Merckx R (2007) The Copper-Mobilizing-Potential of Dissolved Organic Matter in Soils Varies 10-Fold Depending on Soil Incubation and Extraction Procedures. *Environmental Science & Technology* 41(7):2277-2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferraciu Alleoni LR (2019) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Ballabio C, Panagos P, Lugato E, Huang J-H, Orgiazzi A, Jones A, Fernández-Ugalde O, Borrelli P, Montanarella L (2018) Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. *Science of The Total Environment* 636:282-298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.268>
- Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahan SK, Wallenstein MD (2013) High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (81):e50961. <https://doi.org/10.3791/50961>
- Blanco-Canqui H, Shaver TM, Lindquist JL, Shapiro CA, Elmore RW, Francis CA, Hergert GW (2015) Cover Crops and Ecosystem Services: Insights from Studies in Temperate Soils. *Agronomy Journal* 107(6):2449-2474. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0086>
- Błońska E, Piaszczyk W, Staszal K, Lasota J (2021) Enzymatic activity of soils and soil organic matter stabilization as an effect of components released from the decomposition of litter. *Applied Soil Ecology* 157:103723. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103723>
- Bravin MN, Martí AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalinisation – a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318(1):257-268. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9835-6>
- Calderó-Pascual M, Yıldız D, Yalçın G, Metin M, Yetim S, Fiorentin C, Andersen MR, Jennings E, Jeppesen E, Ger KA, Beklioğlu M, McCarthy V (2021) The importance of allochthonous organic matter quality when investigating pulse disturbance events in freshwater lakes: a mesocosm experiment. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04757-w>
- Carvalho AM de, Souza LLP de, Guimarães Júnior R, Alves PCAC, Vivaldi LJ (2011) Cover plants with potential use for crop-livestock integrated systems in the Cerrado region. *Pesq agropec bras* 46:1200-1205. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000012>
- Chen B, Zhao M, Liu C, Feng M, Ma S, Liu R, Chen K (2020) Comparison of copper binding properties of DOM derived from fresh and pyrolyzed biomaterials: Insights from multi-spectroscopic investigation. *Science of The Total Environment* 721:137827. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137827>
- Chen H-L, Zhou J-M, Xiao B-H (2010) Characterization of dissolved organic matter derived from rice straw at different stages of decay. *J Soils Sediments* 10(5):915-922. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0210-x>
- Cory R, Mcknight D (2005) Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. *Environmental science & technology* 39:8142-9. <https://doi.org/10.1021/es0506962>

- Cui YS, Du X, Weng LP, Zhu YG (2008) Effects of rice straw on the speciation of cadmium (Cd) and copper (Cu) in soils. *Geoderma* 146(1):370-377. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.06.010>
- Cuss C w., Guéguen C (2015) Characterizing the Labile Fraction of Dissolved Organic Matter in Leaf Leachates: Methods, Indicators, Structure, and Complexity. In: *Labile Organic Matter—Chemical Compositions, Function, and Significance in Soil and the Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 237-274
- Dan-na C, Wei-dong C, Jin-shun B, Song-juan G, Xue-cui W, Nao-hua Z, Katsuyoshi S (2017) Effects of Green Manures on Soil Dissolved Organic Matter in Moisture Soil in North China. *Spectrosc Spectr Anal* 37(1):221-226. [https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2017\)01-0221-06](https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2017)01-0221-06)
- De Notaris C, Olesen JE, Sørensen P, Rasmussen J (2020) Input and mineralization of carbon and nitrogen in soil from legume-based cover crops. *Nutr Cycl Agroecosyst* 116(1):1-18. <https://doi.org/10.1007/s10705-019-10026-z>
- De Troyer I, Amery F, Moorleghem C, Smolders E, Merckx R (2011) Tracing the source and fate of dissolved organic matter in soil after incorporation of a ¹³C labelled residue: A batch incubation study. *Soil Biology & Biochemistry - SOIL BIOL BIOCHEM* 43:513-519. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.016>
- DeFrancesco C, Guéguen C (2021) Long term Trends in Dissolved Organic Matter Composition and Its Relation to Sea Ice in the Canada Basin, Arctic Ocean (2007-2017). *Journal of Geophysical Research (Oceans)* 126:e16578. <https://doi.org/10.1029/2020JC016578>
- Derrien M, Shin K-H, Hur J (2019) Assessment on applicability of common source tracking tools for particulate organic matter in controlled end member mixing experiments. *Sci Total Environ* 666:187-196. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.258>
- European Food Safety Authority (EFSA), Arena M, Auteri D, Barmaz S, Bellisai G, Brancato A, Brocca D, Bura L, Byers H, Chiusolo A, Court Marques D, Crivellente F, De Lentdecker C, Egsmose M, Erdos Z, Fait G, Ferreira L, Goumenou M, Greco L, Ippolito A, Istace F, Jarrah S, Kardassi D, Leuschner R, Lythgo C, Magrans JO, Medina P, Miron I, Molnar T, Nougadere A, Padovani L, Parra Morte JM, Pedersen R, Reich H, Sacchi A, Santos M, Serafimova R, Sharp R, Stanek A, Streissl F, Sturma J, Szentes C, Tarazona J, Terron A, Theobald A, Vagenende B, Verani A, Villamar-Bouza L (2018) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds copper(I), copper(II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture. *EFSA Journal* 16(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5152>
- Fanin N, Bertrand I (2016) Aboveground litter quality is a better predictor than belowground microbial communities when estimating carbon mineralization along a land-use gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 94:48-60. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.007>
- Ferreira PAA, Marchezan C, Ceretta CA, Tarouco CP, Lourenzi CR, Silva LS, Soriani HH, Nicoloso FT, Cesco S, Mimmo T, Brunetto G (2018) Soil amendment as a strategy for the growth of young vines when replanting vineyards in soils with high copper content. *Plant Physiology and Biochemistry* 126:152-162. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.003>
- Finney DM, White CM, Kaye JP (2016) Biomass Production and Carbon/Nitrogen Ratio Influence Ecosystem Services from Cover Crop Mixtures. *Agronomy Journal* 108(1):39-52. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0182>
- Gao J, Lv J, Wu H, Dai Y, Nasir M (2018) Impacts of wheat straw addition on dissolved organic matter characteristics in cadmium-contaminated soils: Insights from fluorescence spectroscopy and environmental implications. *Chemosphere* 193:1027-1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.112>

- Gattullo CE, Mezzapesa GN, Stellacci AM, Ferrara G, Occhiogrosso G, Petrelli G, Castellini M, Spagnuolo M (2020) Cover Crop for a Sustainable Viticulture: Effects on Soil Properties and Table Grape Production. *Agronomy* 10(9):1334. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091334>
- Ghimire B, Ghimire R, VanLeeuwen D, Mesbah A (2017) Cover Crop Residue Amount and Quality Effects on Soil Organic Carbon Mineralization. *Sustainability* 9(12):2316. <https://doi.org/10.3390/su9122316>
- Gonzaga MIS, Matias MI de AS, Andrade KR, Jesus AN de, Cunha G da C, Andrade RS de, Santos JC de J (2020) Aged biochar changed copper availability and distribution among soil fractions and influenced corn seed germination in a copper-contaminated soil. *Chemosphere* 240:124828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124828>
- Hassan W (2013) C and N mineralization and dissolved organic matter potentials of two contrasting plant residues: effects of residue type, moisture, and temperature. *Acta Agric Scand Sect B- Soil Plant Sci* 63(7):642-652. <https://doi.org/10.1080/09064710.2013.846398>
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0955>
- Hu B, Wang P, Wang C, Qian J, Bao T, Shi Y (2019) Investigating spectroscopic and copper-binding characteristics of organic matter derived from sediments and suspended particles using EEM-PARAFAC combined with two-dimensional fluorescence/FTIR correlation analyses. *Chemosphere* 219:45-53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.113>
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40(6):706-719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Hunt JF, Ohno T (2007) Characterization of fresh and decomposed dissolved organic matter using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multiway analysis. *J Agric Food Chem* 55(6):2121-2128. <https://doi.org/10.1021/jf063336m>
- Johnson JM-F, Barbour NW, Weyers SL (2007) Chemical Composition of Crop Biomass Impacts Its Decomposition. *Soil Science Society of America Journal* 71(1):155-162. <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0419>
- Khan MI, Gwon HS, Alam MA, Song HJ, Das S, Kim PJ (2020) Short term effects of different green manure amendments on the composition of main microbial groups and microbial activity of a submerged rice cropping system. *Appl Soil Ecol* 147:103400. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103400>
- Laurent C, Bravin MN, Crouzet O, Pelosi C, Tillard E, Lecomte P, Lamy I (2020) Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc availability despite contamination. *Science of The Total Environment* 709:135927. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135927>
- Li X, Tan A, Chen K, Pan Y, Gentry T, Dou F (2021) Effect of Cover Crop Type and Application Rate on Soil Nitrogen Mineralization and Availability in Organic Rice Production. *Sustainability* 13(5):2866. <https://doi.org/10.3390/su13052866>
- Longa CMO, Nicola L, Antonielli L, Mescalchin E, Zanzotti R, Turco E, Pertot I (2017) Soil microbiota respond to green manure in organic vineyards. *J Appl Microbiol* 123(6):1547-1560. <https://doi.org/10.1111/jam.13606>

- Lynch MJ, Mulvaney MJ, Hodges SC, Thompson TL, Thomason WE (2016) Decomposition, nitrogen and carbon mineralization from food and cover crop residues in the central plateau of Haiti. *SpringerPlus* 5(1):973. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2651-1>
- Manceau A, Matynia A (2010) The nature of Cu bonding to natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74(9):2556-2580. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.01.027>
- McDowell WH, Zsolnay A, Aitkenhead-Peterson JA, Gregorich EG, Jones DL, Jödemann D, Kalbitz K, Marschner B, Schwesig D (2006) A comparison of methods to determine the biodegradable dissolved organic carbon from different terrestrial sources. *Soil Biology and Biochemistry* 38(7):1933-1942. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.018>
- Merritt KA, Erich MS (2003) Influence of organic matter decomposition on soluble carbon and its copper-binding capacity. *J Environ Qual* 32(6):2122-2131. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.2122>
- Murphy KR, Stedmon CA, Graeber D, Bro R (2013) Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Anal Methods* 5(23):6557. <https://doi.org/10.1039/c3ay41160e>
- Murphy KR, Stedmon CA, Waite TD, Ruiz GM (2008) Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 112(1-2):40-58. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.10.003>
- Murphy KR, Stedmon CA, Wenig P, Bro R (2014) OpenFluor- an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Anal Methods* 6(3):658-661. <https://doi.org/10.1039/C3AY41935E>
- Okur N, Altindisli A, Cengel M, Gocmez S, Kayikcioglu HH (2009) Microbial biomass and enzyme activity in vineyard soils under organic and conventional farming systems. *Turk J Agric For* 33(4):413-423. <https://doi.org/10.3906/tar-0806-23>
- Ouédraogo F, Cornu J-Y, Janot N, Nguyen C, Sourzac M, Parlanti E, Denaix L (2021) Do DOM optical parameters improve the prediction of copper availability in vineyard soils? *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16361-5>
- Paerl RW, Claudio IM, Shields MR, Bianchi TS, Osburn CL (2020) Dityrosine formation via reactive oxygen consumption yields increasingly recalcitrant humic-like fluorescent organic matter in the ocean. *Limnology and Oceanography Letters* 5(5):337-345. <https://doi.org/10.1002/lol2.10154>
- Peleato NM, Sidhu BS, Legge RL, Andrews RC (2017) Investigation of ozone and peroxone impacts on natural organic matter character and biofiltration performance using fluorescence spectroscopy. *Chemosphere* 172:225-233. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.118>
- Pierdet M (2020) Evolution spatiale et temporelle de la mobilité des contaminants organiques et inorganiques dans des sols viticoles contrastés. PhD Thesis
- R core Team (2020) R core Team,
- Rachou J, Gagnon C, Sauvé S (2007) Use of an ion-selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices. *Environmental Chemistry* 4(2):90. <https://doi.org/10.1071/EN06036>
- Retelletti Brogi S, Balestra C, Casotti R, Cossarini G, Galletti Y, Gonnelli M, Vestri S, Santinelli C (2020) Time resolved data unveils the complex DOM dynamics in a Mediterranean river. *Science of The Total Environment* 733:139212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139212>

- Ritchie G, Dolling P (1985) The Role of Organic Matter in Soil Acidification. *Australian Journal of Soil Research* 23(4):569-576. <https://doi.org/10.1071/SR9850569>
- Singh S, Inamdar S, Scott D (2013) Comparison of Two PARAFAC Models of Dissolved Organic Matter Fluorescence for a Mid-Atlantic Forested Watershed in the USA. *Journal of Ecosystems* 2013:e532424. <https://doi.org/10.1155/2013/532424>
- Stedmon CA, Bro R (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography* :6
- Stedmon CA, Markager S, Tranvik L, Kronberg L, Slätis T, Martinsen W (2007) Photochemical production of ammonium and transformation of dissolved organic matter in the Baltic Sea. *Marine Chemistry* 104(3):227-240. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.11.005>
- Stubbins A, Lapierre J-F, Berggren M, Prairie YT, Dittmar T, del Giorgio PA (2014) What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. *Environ Sci Technol* 48(18):10598-10606. <https://doi.org/10.1021/es502086e>
- Tejada M, Gonzalez JL, García-Martínez AM, Parrado J (2008) Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresource Technology* 99(6):1758-1767. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.052>
- Trinsoutrot I, Recous S, Bentz B, Linères M, Chèneby D, Nicolardot B (2000) Biochemical Quality of Crop Residues and Carbon and Nitrogen Mineralization Kinetics under Nonlimiting Nitrogen Conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64(3):918-926. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.643918x>
- Usman ARA, Kuzyakov Y, Stahr K (2004) Dynamics of Organic C Mineralization and the Mobile Fraction of Heavy Metals in a Calcareous Soil Incubated with Organic Wastes. *Water, Air, & Soil Pollution* 158(1):401-418. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000044864.07418.8f>
- Walela C, Daniel H, Wilson B, Lockwood P, Cowie A, Harden S (2014) The initial lignin:nitrogen ratio of litter from above and below ground sources strongly and negatively influenced decay rates of slowly decomposing litter carbon pools. *Soil Biology and Biochemistry* 77:268-275. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.013>
- Wang G, Zhou L (2006) [Vertical fractionation of dissolved organic matter and its effect on the transport of Cu in Cu-contaminated soils]. *Huan Jing Ke Xue* 27(6):1229-1234
- Wang P, Peng H, Liu J, Zhu Z, Bi X, Yu Q, Zhang J (2020) Effects of exogenous dissolved organic matter on the adsorption-desorption behaviors and bioavailabilities of Cd and Hg in a plant-soil system. *Sci Total Environ* 728:138252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138252>
- Wheeler KI, Levia DF, Hudson JE (2017) Tracking senescence-induced patterns in leaf litter leachate using parallel factor analysis (PARAFAC) modeling and self-organizing maps. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 122(9):2233-2250. <https://doi.org/10.1002/2016JG003677>
- Xie J, Dong A, Liu J, Su J, Hu P, Xu C, Chen J, Wu Q (2019) Relevance of dissolved organic matter generated from green manuring of Chinese milk vetch in relation to water-soluble cadmium. *Environ Sci Pollut Res* 26(16):16409-16421. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05114-0>
- Yamashita Y, Jaffé R (2008) Characterizing the Interactions between Trace Metals and Dissolved Organic Matter Using Excitation-Emission Matrix and Parallel Factor Analysis. *Environ Sci Technol* 42(19):7374-7379. <https://doi.org/10.1021/es801357h>
- Zhou G, Gao S, Lu Y, Liao Y, Nie J, Cao W (2020) Co-incorporation of green manure and rice straw improves rice production, soil chemical, biochemical and microbiological properties in a

typical paddy field in southern China. *Soil Tillage Res* 197:104499. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104499>

Zhou LX, Wong JWC (2000) Microbial Decomposition of Dissolved Organic Matter and Its Control during a Sorption Experiment. *Journal of Environment Quality* 29(6):1852. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900060017x>

Zhou Y, Martin P, Müller M (2019) Composition and cycling of dissolved organic matter from tropical peatlands of coastal Sarawak, Borneo, revealed by fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis. *Biogeosciences* 16(13):2733-2749. <https://doi.org/10.5194/bg-16-2733-2019>

Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0)

Supplementary information

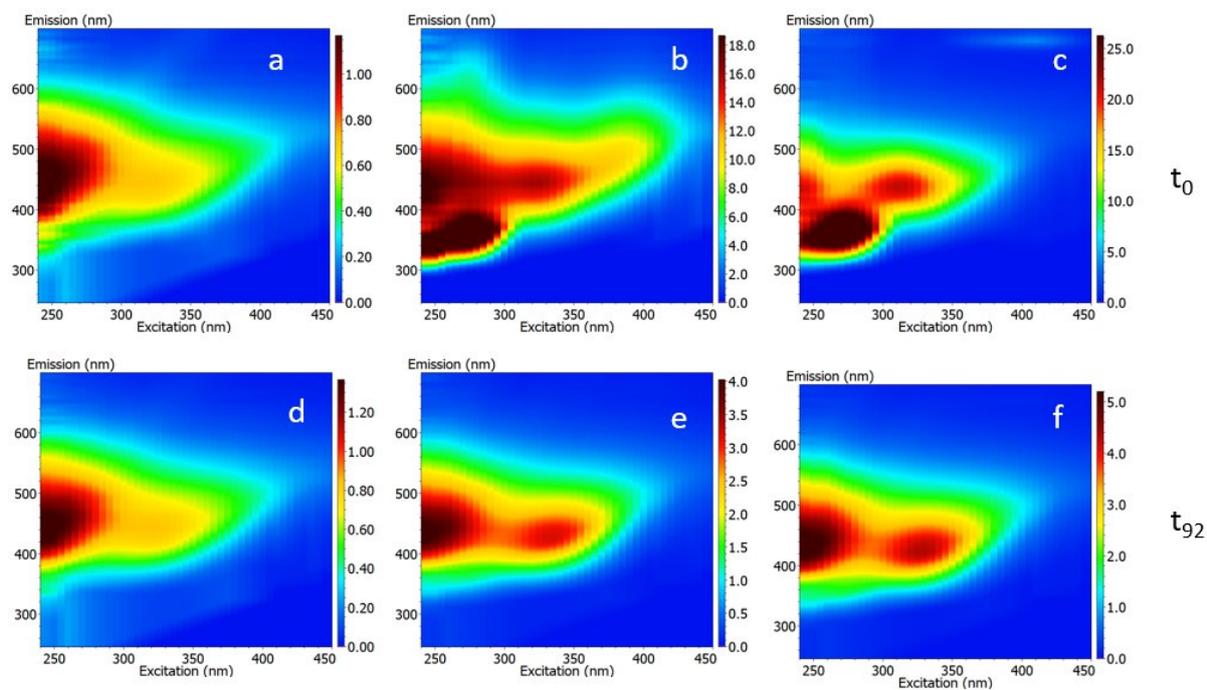


Fig. S 1: DOM excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectra of control soil (a, d), soil amended with F-bean residues (b, e) and soil amended with oat residues (c, f) at t_0 and at t_{92}

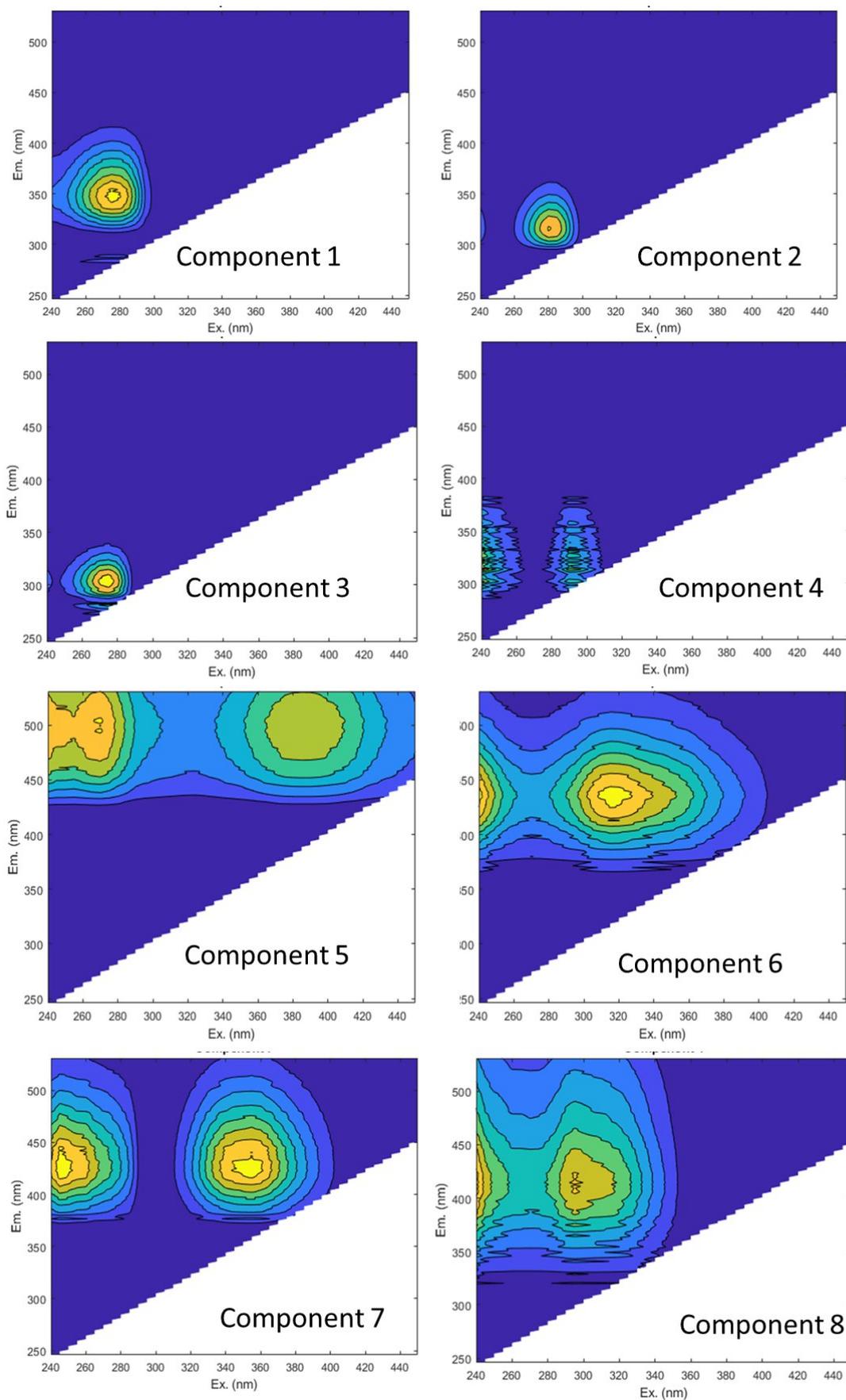


Fig. S 2 : EEM spectra of the eight components determined by PARAFAC for the 108 soil extract samples (Controls + residue amended-soils)

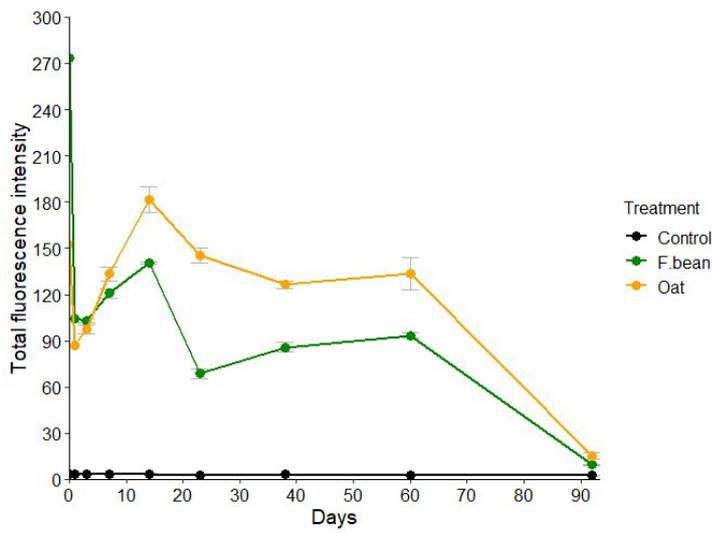


Fig. S 3: Temporal evolution of the total fluorescence intensity of the soils during the experiment

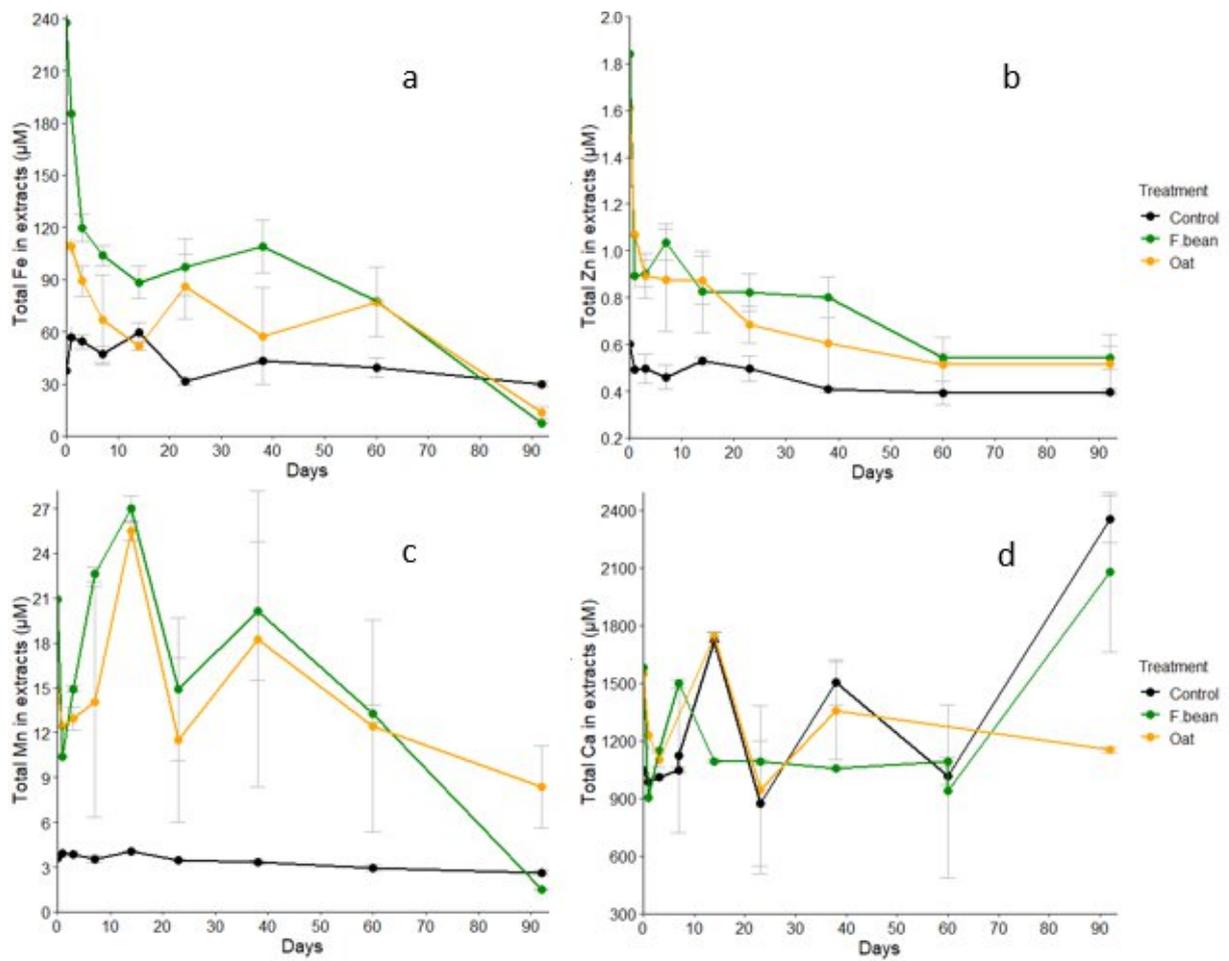


Fig. S 4: Temporal evolution of the total metals concentrations in extracts during the experiment: Fe (a), Zn (b), Mn (c) and Ca (d).

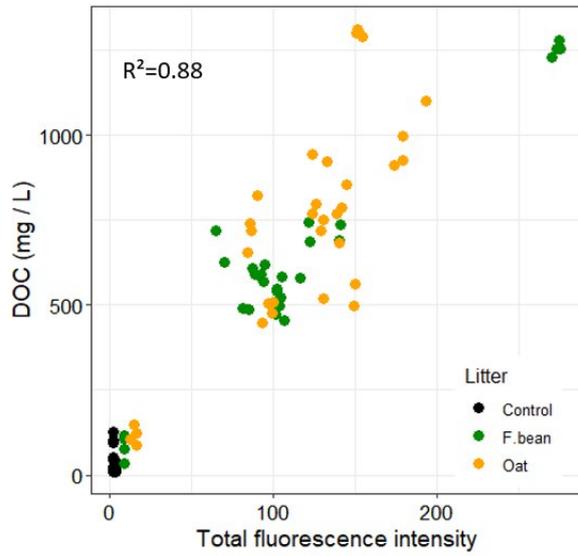


Fig. S 5: Relationship between DOC concentrations and total fluorescence intensity measured during the experiment

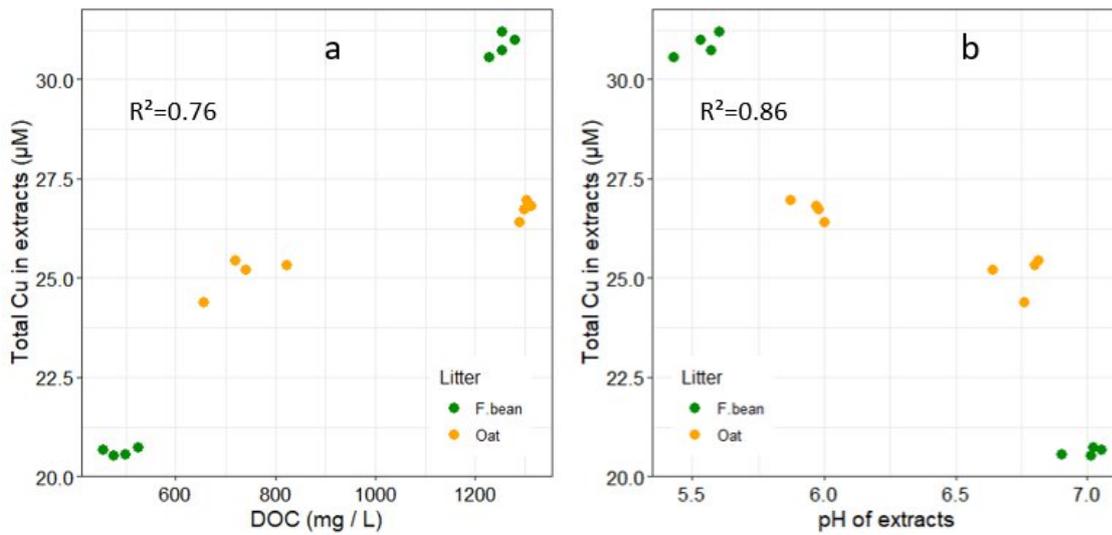


Fig. S 6: The total Cu concentrations in extracts in function of DOC concentrations (a) and pH of extracts (b) at day 0 and day 1 of the experiment

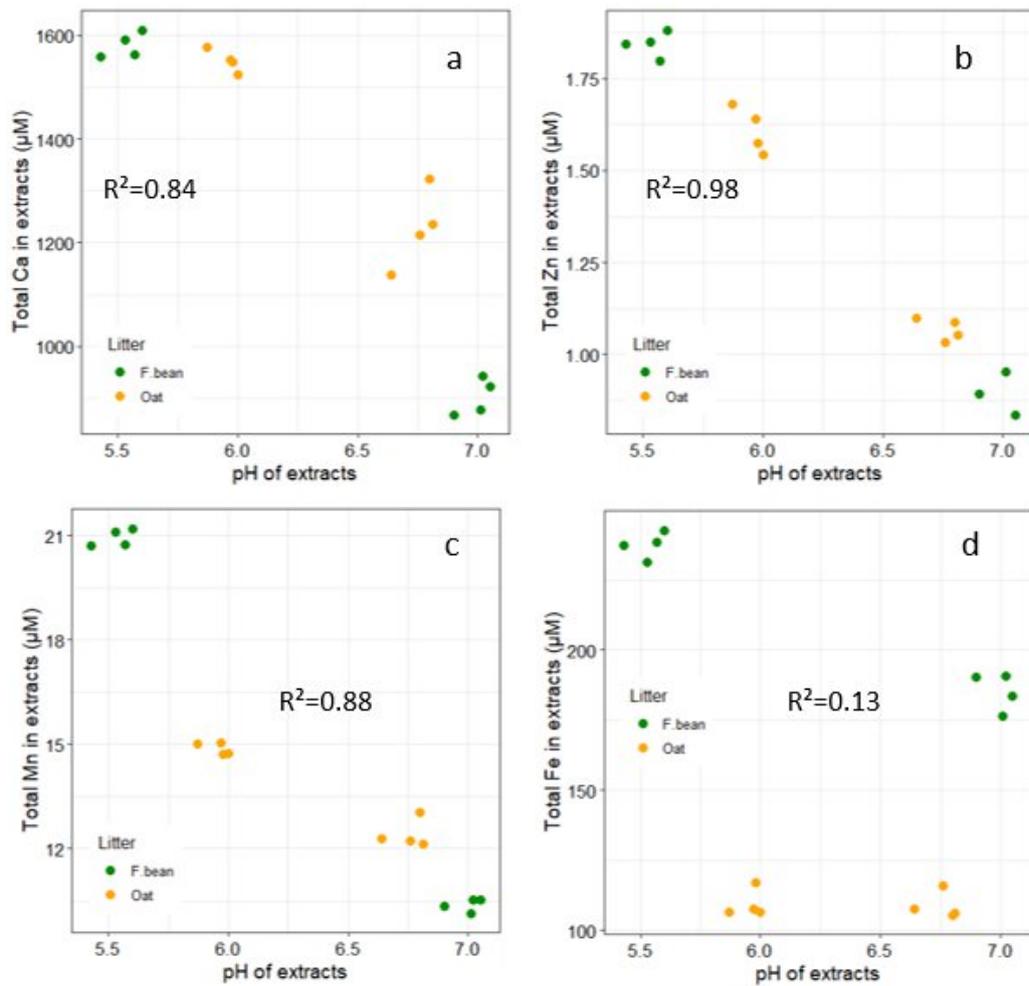


Fig. 5 7: Relationships between metals total concentrations in extracts and pH at day 0 and day 1 of the experiment

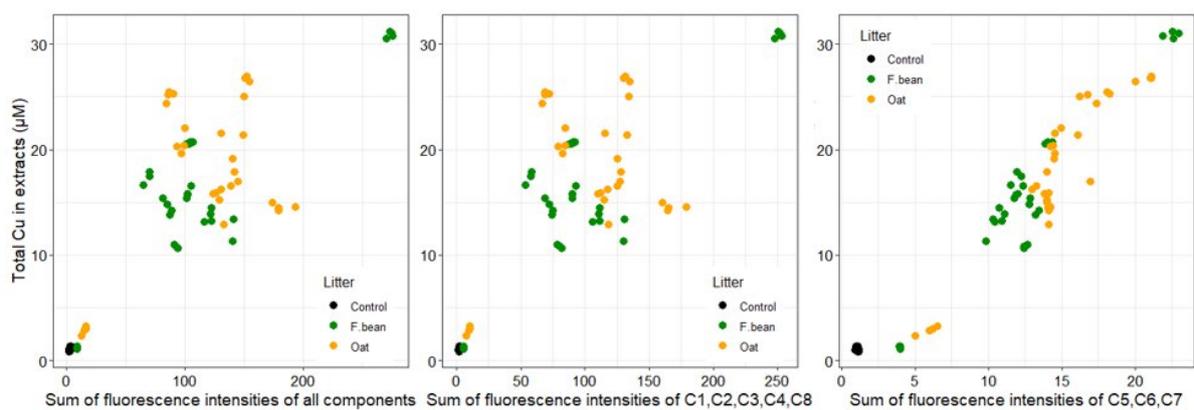


Fig. 5 8: Relationships between total Cu concentrations in extracts and total fluorescence intensity of DOM (a), of components 1, 2, 3, 4, 8 (b) and of components 5, 6 and 7 (c)

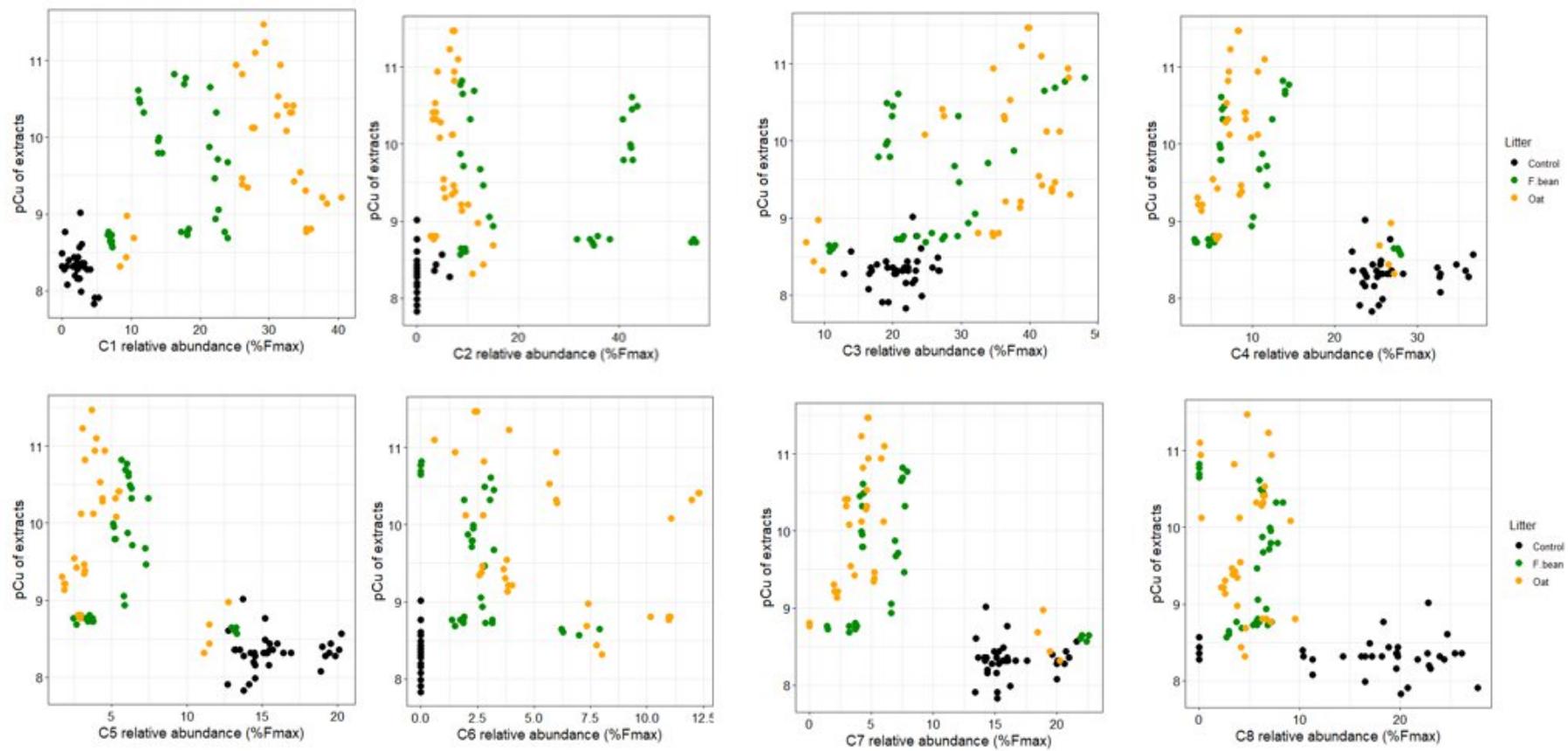


Fig. S 9: Relationships between ionic Cu activity proxy pCu and the relative abundances of the 8 PARAFAC components

Table S 1: Recapitulative report of the measured variables on samples during the experiment. The letters report significant differences between the mean values at different dates ($p < 0.001$). 'nd' stands for not measured data

		Day 0	1	3	7	14	23	38	60	92
pH _{KCl}	Control	6.17 bc	6.31 c	6.09 b	5.8875 a	5.89 a	5.76 a	5.82 a	5.86 a	5.85 a
	F.bean	5.53 a	6.99 d	6.39 ad	5.645 ab	5.46 bcd	6.18 bcd	5.77 ac	6.61 cd	5.75 ac
	Oat	5.95 ab	6.75 c	6.86 c	5.925 bc	5.78 a	6.42 c	5.93 a	6.72 c	5.72 a
Cu (µM)	Control	1.32 e	1.32 e	1.31 e	1.13 cd	1.33 e	1.04 b	1.16 c	1.04 bd	0.86 a
	F.bean	30.88 f	20.62 e	15.86 cd	13.69 c	12.35b	17.31 d	14.53 c	10.83 b	1.27 a
	Oat	26.74 d	25.09 d	20.60 c	18.10 ce	14.56 b	19.46 c	15.65 be	14.94 be	3.02 a
Ca (µM)	Control	1047.68 c	984.32 a	1013.65 b	1046.08 c	1093.55 d	1091.63 d	1054.5 c	1090.84 d	1154.13 e
	F.bean	1581.23 c	902.08 a	1146.03 ac	1497.81 bc	1741.44 ac	944.53 ab	1356.16 ac	1018.31 ac	2352.43 d
	Oat	1550.83 bd	1227.7 abc	1101.9 abc	1120.7 abc	1717.33 d	873.81 a	1505.81 cd	938.93 ac	2076.02 d
Fe (µM)	Control	37.5 ac	56.5 f	54.3 ef	46.9 de	59.5 f	31.3 ab	43.1 cd	39.2 bcd	29.9 a
	F.bean	237.6 f	185.3 e	119.5 d	103.7 bd	88.4 ab	97.3 bc	108.9 cd	77.8 a	7.1 g
	Oat	109.4 d	108.8 d	89.1 cd	66.8 bc	51.6 b	86 cd	57.5 b	77 bc	13.3 a
Zn (µM)	Control	0.59 e	0.49 bc	0.49 bc	0.45 cde	0.52 ce	0.49 ce	0.4 abd	0.39 ab	0.39 a
	F.bean	1.84 d	0.89 bc	0.9 bc	1.03 c	0.82 b	0.82 b	0.8 b	0.54 a	0.54 a
	Oat	1.6 e	1.06 d	0.89 cd	0.87 bd	0.87 bd	0.68 abc	0.6 a	0.51 a	0.51 ab
pCu	Control	8.39 bc	8.66 d	8.19 b	8.33 bc	7.91 a	8.33 bc	8.47 cd	8.41 bd	8.26 bc
	F.bean	8.73 a	10.46 c	9.88 bc	8.77	8.72 bc	9.82 bc	9.23 ab	10.73 c	8.61 a
	Oat	8.8 a	10.3 b	10.52 b	9.48 b	9.22 a	10.46 b	9.35 a	11.06 b	8.6 a
DOC (mg L ⁻¹)	Control	13.28 a	11.93 a	12.41 a	20.61 ab	21.39 a	16.83 a	39.47 b	108.34 c	46.1 b
	F.bean	1252.46 d	487.35 bc	543.15 bc	673.96 c	711.98 b	645.94 bc	543.91 bc	591.4 bc	98.52 a
	Oat	1299.7 f	734.19 cd	484.64 b	679.34 c	983.65 e	631.75 c	762.34 cd	872.78 de	125.66 a
HIX	Control	3.99 c	3.50 d	3.98 ab	3.78 a	3.63 a	4.02 a	4.18 ab	5.05 ab	4.72 b
	F.bean	1.14 d	1.71 d	1.45 d	1.10 c	0.82 f	1.92 g	1.74 a	2.26 b	6.41 e
	Oat	1.01 cd	1.58 b	1.26 a	0.96 cd	0.63 c	1.17 c	1.28 d	1.51 d	5.64 e

BIX	Control	0.69 c	0.68 bc	0.66 bc	0.72 c	0.66 bc	0.54 a	0.59 ab	0.59 ab	0.60 ab
	F.bean	0.57 a	0.63 b	0.63 bc	0.69 e	0.63 bd	0.65 be	0.66 cde	0.69 de	0.65 bd
	Oat	0.41 a	0.40 a	0.53 b	0.58 c	0.53 b	0.59 c	0.61 cd	0.62 cd	0.65 d
S₂₇₅₋₂₉₅	Control	0.0079 a	0.0078 a	0.0077 a	0.0079 a	0.0078 a	0.008 a	0.0083 a	0.0081 a	0.009 b
	F.bean	0.0171 cd	0.0131 b	0.0143 bc	0.0158 bd	0.0196 bd	0.0183 d	0.0178cd	0.0147 bd	0.006 a
	Oat	0.0255 d	0.0137 b	0.0143 b	0.0156 b	0.0186 c	0.016 b	0.0185 c	0.0141 b	0.009 a
C - related enzyme activities	Control	0.443 b	0.324 a	0.334 a	nd	nd	nd	0.445 b	nd	0.499 b
	F.bean	0.702 a	1.902 b	3.005 c	nd	nd	nd	1.967 b	nd	1.586 b
	Oat	0.325 a	0.46 a	2.217 c	nd	nd	nd	1.499 b	nd	2.467 c
N - related enzyme activities	Control	0.179 b	0.126 a	0.109 a	nd	nd	nd	0.166 b	nd	0.182 b
	F.bean	0.444 a	1.033 b	0.782 ab	nd	nd	nd	0.539 a	nd	0.821 ab
	Oat	0.29 a	0.29 a	0.504 b	nd	nd	nd	0.299 a	nd	1.344 c

Synthèse du chapitre

Les résultats de ce chapitre montrent que l'apport des résidus impacte la dynamique de la MOD et du Cu en deux phases.

D'abord, l'apport des résidus a provoqué une forte augmentation de la concentration en carbone organique dissout (COD). Cette forte quantité de MOD, provenant principalement des résidus, était caractérisée par un faible degré d'aromaticité et une abondance en composés hydrophiles, tels que montré par la décomposition PARAFAC. Les résidus ont aussi acidifié le sol, avec une baisse de pH, plus importante avec les résidus de feuilles de vigne. Les changements observés durant cette phase étaient donc reliés aux propriétés chimiques initiales des résidus. L'augmentation de COD et la baisse de pH a entraîné une désorption importante de Cu, aboutissant à une augmentation des concentrations de Cu en solution (total et Cu^{2+}). Aussi, la minéralisation forte de la MO dans cette phase a pu dégrader les complexes MO-Cu du sol et les auraient entraînés en solution.

La deuxième phase consiste en une transformation et une maturation de la MO apportée. Dans cette phase, la MOD augmente en degré d'aromaticité et devient de plus en plus abondante en composés humifiés. La concentration de COD et de Cu baissent concomitamment, indiquant une dynamique conjointe de la MOD et du Cu. En effet, cette disparition de MOD et de Cu seraient liés à des phénomènes de sorption dans le sol. La minéralisation des résidus provoque une augmentation du pH, qui entraîne une diminution des concentrations de Cu^{2+} . Les dynamiques étaient plus exacerbées avec les résidus les plus facilement dégradables (féverole et avoine) et dans le sol qui avait le ratio C :N le plus élevé.

En conclusion, l'apport de MOF entraîne des changements évidents sur la dynamique de la MOD et du Cu disponible. A long terme, ces apports pourraient diminuer la disponibilité du Cu. Le Cu en solution a été impacté par les changements opérés sur la MOD, tandis que le Cu^{2+} était tributaire du pH, ce qui confirme les résultats des Chapitres 4 et 5. Cependant, les intensités des dynamiques observées dépendent de la nature des MOF apportées et plus fortement des propriétés du sol étudié.

Les deux figures ci-dessous reprennent les principaux mécanismes engagés au moment de l'apport des résidus, et pendant leur transformation dans le sol.

Chapitre 7 : Synthèse générale des résultats obtenus et perspectives

Rappel du contexte, des objectifs et des hypothèses

La forte accumulation du cuivre dans certains sols viticoles renvoie à des enjeux d'écotoxicité, de santé environnementale et de production agronomique. Le cuivre via ses formes disponibles peut affecter la vie du sol et les rendements agricoles. Le Cu présente une forte affinité pour la MOD. La capacité de la MOD à interagir avec le Cu peut être étudiée via sa qualité, évaluée à travers des indices spectroscopiques. Dans les sols agricoles, la MO subit des perturbations, ce qui affecte la dynamique de la MOD et pourrait ainsi modifier la disponibilité du Cu.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'impact de la dynamique de la MOD sur la disponibilité du cuivre.

L'étude a porté sur des sols viticoles conduits en agriculture biologique. La démarche scientifique globale a consisté à étudier des sols maintenus à l'équilibre, puis à les perturber par des variations de température et des apports de MO fraîches, en les incubant avec un suivi cinétique. Ces perturbations avaient pour but d'exacerber la minéralisation de la MO afin d'en étudier les réponses sur la MOD et sur le Cu.

Des mesures ont été réalisées sur les sols et les solutions de sol (extraits KCl) pour évaluer les changements opérés sur la MO, la MOD, le Cu et les paramètres du sol (tels que le pH). La disponibilité du cuivre a été estimée via la concentration du cuivre total présent en solution et sa fraction libre ionique Cu^{2+} (évaluée via sa concentration ou la valeur pCu).

Le Chapitre 4 a ainsi porté d'une part sur la caractérisation de la disponibilité du Cu dans des sols à l'équilibre, et d'autre part sur l'évaluation de la contribution des paramètres de qualité de la MOD pour expliquer la disponibilité du Cu dans ces sols. Cette étude a porté sur 18 sols avec des caractéristiques contrastées. L'hypothèse était que la prise en compte des propriétés optiques de la MOD permettrait d'améliorer la prédiction du cuivre disponible.

Le Chapitre 5 a porté sur l'effet de la température sur la disponibilité du cuivre. Nous avons travaillé sur deux sols viticoles avec des propriétés différentes qui ont chacun été incubés à deux températures (20°C et 30°C). L'hypothèse était que l'augmentation de la température, favoriserait la minéralisation de la MO du sol, y compris celle associée au cuivre dans les complexes MO-Cu, entraînant une libération de Cu et une augmentation de sa concentration en solution. La dégradation incomplète de la matière organique du sol pourrait produire des molécules organiques plus petites et solubles, qui favoriseraient la complexation du Cu^{2+} , entraînant la diminution de sa concentration. Nous avons cherché à savoir si ce théorique effet ambivalent (augmentation de la concentration totale mais diminution de la fraction libre) impliquerait une évolution du Cu disponible et si cette évolution était à relier avec la qualité de matière organique dissoute.

Le Chapitre 6 a porté sur l'effet de l'apport de MO fraîches sur la disponibilité du cuivre. Plus spécifiquement, le sous-chapitre 6.1 portait sur l'effet de la minéralisation de résidus de feuilles de vigne sur la disponibilité du cuivre dans deux sols contrastés. Le sous-chapitre 6.2 concernait l'effet de la minéralisation de résidus de deux plantes de couverture sur la disponibilité du cuivre dans un même sol. Nous avons fait l'hypothèse que l'apport de MO fraîches provoquerait une production de matières organiques solubles complexantes, pouvant s'associer en solution avec le Cu, provoquant la diminution de la concentration en Cu^{2+} . Ces réponses seraient d'autant plus importantes que les résidus apportés sont facilement dégradables par les microorganismes des sols.

1 Analyse du lien entre dynamique temporelle de la MOD et dynamique du Cu

D'abord, nous avons étudié les relations entre paramètres de la MOD et disponibilité du cuivre dans des sols à l'équilibre.

1.1 Liens entre dynamique de la MOD et Cu disponible dans des sols à l'équilibre

Nos travaux du Chapitre 4 ont montré que la prise en compte des paramètres de la MOD (concentrations et propriétés optiques) permettait de mieux prédire la disponibilité du cuivre dans une collection de sols contrastés à l'équilibre. Cela a permis préalablement de conforter l'importance et la pertinence de la prise en compte de la qualité de la MOD, évaluée via ses indices spectroscopiques pour expliquer la disponibilité du cuivre. Lorsque les indices de la MOD étaient considérés, plus de 83% de la variance du Cu total en solution était expliquée, contre 70% lorsqu'on ne considère que le cuivre total dans le sol et le pH des extraits. Dans les équations de régression linéaire réalisées, les indices HIX et FI de la MOD se sont montrés les plus significatifs, indiquant l'importance du degré d'aromaticité et de l'origine de la MOD dans sa capacité à interagir avec le Cu. Tel qu'attendu, la mise en solution du Cu ne dépendrait donc pas uniquement d'échanges ioniques contrôlés par le pH, mais aussi de la capacité de la MOD à complexer le Cu et à l'entraîner en solution (Amery et al. 2007). En revanche, les pourcentages de variance expliquée indiquent aussi que l'essentiel de la mise en solution du Cu dépend du stock de cuivre dans le sol et du pH, la contribution de la MOD ne serait donc que complémentaire (Sauvé et al. 1997 ; 2000). Dans les sols étudiés à l'équilibre, la concentration de COD ne s'est pas avérée être un critère significatif dans les équations établies sur le Cu total en solution, contrairement à d'autres études (Amery et al. 2007 ; Araújo et al. 2019). Malgré les différences de mode de gestion organique de ces sols (apports, labour, plantes de couverture), la gamme de concentrations en COD s'est montrée relativement homogène (15 - 28 mg L^{-1}), ce qui a pu affaiblir la contribution du COD pour expliquer la disponibilité du Cu. Dans le même sens, une étude récente a montré que la mobilité du Cu est plus dépendante de la solubilité de la MOS que de la concentration de COD (Blotevogel et al. 2022). Ainsi, nos résultats indiquent que

la quantité de la MOD serait un critère secondaire pour étudier la disponibilité du Cu, et renforce l'importance de la prise en compte de la qualité de la MOD pour satisfaire ce but.

Le cuivre libre Cu^{2+} est le deuxième indice de disponibilité du Cu pris en compte dans cette thèse et évalué à travers ses concentrations dans le Chapitre 4, et à travers les valeurs pCu dans les Chapitres 5 et 6. Les équations de régressions linéaires ont montré que les différences de concentrations de Cu^{2+} dans les sols étaient expliquées à 88% par le pH uniquement, la prise en compte d'aucun des paramètres de la MOD ne s'est montrée significative (Chapitre 4). Ce résultat suggère que l'influence de la MOD sur la disponibilité du Cu dans des sols à l'équilibre ne se limiterait qu'au Cu total en solution et serait moins importante sur la spéciation du Cu (Temminghoff et al. 1994). Le postulat auquel ces résultats ramènent est le suivant : la MOD via ses propriétés de complexation (aromaticité, taille moléculaire, origine etc.), exacerberait la mobilisation du Cu en solution. Mais une fois que le Cu est présent en solution, son partitionnement géochimique serait gouverné principalement par la dynamique du proton. Ce résultat s'est montré partiellement différent de notre hypothèse initiale, dans le sens où la prise en compte des propriétés de la MOD a été vaine pour expliquer le Cu^{2+} . Il est aussi probable que ce résultat soit lié à la composition même du groupe de sols étudiés. *A priori*, dans une collection de sols suffisamment contrastés au niveau du pH (6.3 - 8.3), le pH prendrait le pas sur les caractéristiques de la MOD quant à l'explication de la dynamique du Cu^{2+} . Par contre, il est à noter que le pH peut modifier la configuration de la MOD et son interaction avec le Cu^{2+} . Lorsque le pH augmente, la MOD subit une déprotonation, ce qui accroît sa capacité de complexation avec le Cu^{2+} et la réduction de la concentration de Cu^{2+} en solution (Ren et al. 2015). Il apparaît ainsi que la capacité de la MOD à pouvoir interagir avec le Cu^{2+} libre en solution dépendrait plus de facteurs extrinsèques (pH) que des propriétés intrinsèques à la MOD évaluée via les indices spectroscopiques.

Il semble ainsi que la dynamique du cuivre libre Cu^{2+} soit relativement indépendante de celle du cuivre complexé, alors que nous pensions qu'il y avait un équilibre entre ces deux formes. Cela est peut-être aussi lié à la complexité des formes complexées. En effet, le terme globalisant « Cu-MO » recouvre en fait différents complexes avec différentes molécules organiques de taille et composition chimique très variables.

Le Chapitre 4 nous a permis d'établir certaines relations entre MOD et disponibilité du Cu. Nous avons voulu savoir si ces relations restaient pertinentes lorsque les sols étaient perturbés, soit par des variations de température, soit par des apports de résidus végétaux.

1.2 Liens entre dynamique de la MOD et Cu disponible dans des sols perturbés

La température est l'un des facteurs importants qui influencent la minéralisation de la matière organique et affectent de ce fait aussi la dynamique de la MOD (Kalbitz et al. 2000). Les résultats du Chapitre 5 montrent que la minéralisation de la MO s'est effectivement avérée plus importante à 30°C qu'à 20°C mais que la différence de température (20°C et 30°C) n'a pas significativement affecté les indices de qualité de MOD produite, ni le cuivre ionique en solution, évalué à travers les

valeurs de pCu. Mais la température à 30°C a entraîné un peu plus de désorption de Cu, augmentant ainsi sa concentration totale en solution. L'effet de la température (écart de 10°C) sur le Cu disponible est finalement considéré comme étant relativement faible. Cependant, les dynamiques observées sont différentes suivant les sols et suivant le temps d'incubation. Dans le sol au ratio C:N le plus élevé (sol 2) et à l'activité biologique la moins forte, la concentration de COD a augmenté de façon importante pendant l'incubation. Mais, cette augmentation de quantité n'était pas suivie de modifications de qualité de la MOD fluorescente. L'accumulation de ce COD aurait fini par provoquer une acidification de la solution de sol 60 jours après l'incubation. De même, contrairement aux résultats du Chapitre 4, les résultats du Chapitre 5 soulignent l'importance significative de la concentration en COD pour expliquer le Cu total en solution. Les hypothèses initiales sont confortées pour le sol 1 : la MOD lors de sa libération en solution pendant l'expérience, désorberait le Cu et le mobiliserait en solution et/ou les complexes initiaux Cu-MO sont dégradés par l'activité biologique et passent directement en solution. Cependant, dans le sol 2, les résultats du Chapitre 5 indiquent un autre processus qui s'opère entre la MOD et le Cu : pendant que la MOD est mobilisée en solution, la concentration du Cu total des extraits diminue. Les comportements de la MOD et du Cu dans le sol 2 (faible activité biologique) semblent donc antinomiques et mécaniquement décorrélés. Nous avons proposé l'explication suivante : le Cu en solution évolue vers un état d'équilibre de répartition dans le sol en se sorbant sur les phases minérales, après s'être complexé avec les oxydes métalliques de Fe et de Mn (Liu et al. 2020), tandis que la MOD se mobilise en solution via des mécanismes qui ne semblent pas liés à l'activité biologique telle qu'évaluée dans ce travail (taux de minéralisation du carbone, activités enzymatiques). Pour la fraction libre Cu^{2+} , les valeurs de pCu se sont montrées fortement liées au pH dans les deux sols. Cela confirme les observations du Chapitre 4 sur le rôle capital du pH pour expliquer la dynamique du cuivre libre Cu^{2+} . Cependant, nous présumons un effet indirect de la MOD sur le Cu^{2+} , lors de l'acidification à la fin de l'incubation, qui a entraîné une baisse significative de la valeur pCu.

Une autre façon de perturber l'état biologique et géochimique des sols est de leur apporter de la MO fraîche.

L'apport de MO fraîche entraîne généralement une stimulation de la vie biologique, avec une activité exacerbée de minéralisation de la MO pouvant provoquer des modifications sur la dynamique de la MOD (Gao et al. 2018 ; Błońska et al. 2021). En effet, les résultats du Chapitre 6 illustrent que l'apport des résidus végétaux (feuille de vigne, féverole et avoine) ont aux premiers jours de l'incubation induit une considérable augmentation de la concentration de COD dans les sols. Cette MOD produite provient d'une part de la mise en solution des composés organiques solubles présents dans les résidus et caractérisés par un faible degré d'aromaticité (Chen et al. 2010 ; Dan-na et al. 2017) et d'autre part du passage en solution des molécules organiques de plus petites tailles issues de la dégradation de la matière organique solide des résidus ou du sol, suite au phénomène de « priming effect ». L'augmentation de la concentration de COD dès l'apport des résidus est concomitante avec une baisse de pH, d'intensité plus importante avec les feuilles de vigne qu'avec les résidus de plantes de couverture. Cette acidification de la solution du sol a été attribuée aux propriétés chimiques des

résidus, qui comporteraient des protons en solution ou la présence de composés organiques acidifiants. Cette MOD produite en forte quantité et à caractère hydrophile en début d'expérimentation est rapidement consommée par l'activité microbienne (Kalbitz et al. 2000), cela entraîne une diminution rapide de la concentration de COD. Au fil de l'incubation, nous imaginons la consommation intense de la MOD simple et préférentielle par les microorganismes et une production quantitativement moindre de MOD de plus en plus aromatique et complexante. Contrairement à l'étude sur la température (Chapitre 5), la dynamique du cuivre disponible a été fortement impactée par les apports de résidus végétaux (Chapitre 6). Le cuivre total en solution était étroitement lié à la concentration de COD, pour les deux sols étudiés, et pour l'ensemble des 3 résidus apportés. Tout comme le COD, le Cu en solution augmente fortement pendant les premiers jours après apport des résidus et tend à disparaître ensuite. Ainsi, la MOD apportée en forte quantité et ayant acidifié le sol au début de l'incubation, aurait contribué à désorber le Cu et l'aurait entraîné en solution (Araújo et al. 2019). Il est aussi probable que la forte minéralisation de la MO à cette phase ait dégradé les complexes Cu-MO et ait favorisé leur passage en solution. Contrairement aux résultats du Chapitre 4, la concentration de COD s'est avérée capitale pour expliquer le Cu en solution suite aux apports de résidus. Pourtant, la MOD produite en forte quantité en début d'expérience était peu aromatique, et de faible taille moléculaire (féverole et vigne surtout), et donc avec a priori peu de capacité d'interaction avec le Cu. Néanmoins, nous pensons que ces petites molécules hydrophiles (en l'occurrence des acides aminés) qui composent la MOD à cette phase de l'incubation ont une affinité non négligeable pour le Cu du fait de leur fortes concentration et mobilité, tel que reporté dans plusieurs études (Hu et al. 2019 ; Chen et al. 2020). Cette observation corrobore les résultats du Chapitre 4 qui montrait un effet négatif de l'indice d'aromaticité HIX pour expliquer la concentration du Cu total en solution dans des sols contrastés à l'équilibre.

Deux mécanismes sont envisagés pour expliquer la diminution concomitante du COD et du Cu en solution lors de la phase avancée de l'incubation (Chapitre 6) : en considérant les complexes MOD-Cu néoformés, la MOD sera consommée par les bactéries tandis que le Cu, lui, sera sorbé de nouveau sur le sol du fait de sa concentration importante. Il est aussi envisageable que le complexe MOD-Cu se sorbe directement sur le sol, surtout dans les stades avancés de l'incubation, où la MOD produite était de plus en plus aromatique (avec les résidus de féverole et d'avoine) et donc plus vulnérables à la sorption minérale (Zhou and Wong 2000). Tout comme observé avec l'effet de la température (Chapitre 5), le cuivre libre Cu^{2+} a été indirectement affecté par la dynamique de la MOD après l'apport des résidus végétaux (Chapitre 6). De même, une forte relation a été illustrée entre le pH et la pCu, pour les deux sols et les 3 résidus apportés. L'acidification initiale provenant de l'apport des résidus a provoqué une augmentation des concentrations de Cu^{2+} , illustrée par une diminution des pCu des extraits. Puis, quand l'activité biologique atteint un pic, la dégradation des résidus produit des ions OH^- (Ritchie and Dolling 1985), qui font augmenter le pH des sol et les valeurs pCu.

Nos résultats ont aussi montré que pour le sol qui avait le plus l'habitude de recevoir des apports de MO fraîche (sol 1), une sorte de retour à l'état d'équilibre se manifestait après 92 jours d'incubation par rapport à l'évolution de la MOD. Cependant, pour le sol 2 qui avait l'activité biologique initiale la

plus faible, la perturbation semble plus étalée dans le temps, avec des différences plus prononcées entre sol amendé et sol contrôle. Les deux résidus de plantes de couvertures, malgré leurs différences qualitatives, ont globalement montré des comportements similaires sur la dynamique de la MOD et celle du Cu disponible.

2 Evaluation globale de la pertinence des propriétés optiques de la MOD dans cette étude

L'une des originalités de ce travail réside en l'utilisation des paramètres spectroscopiques de la MOD pour étudier ses interactions avec le Cu dans le sol. La MOD dans ce travail a été caractérisée via ses propriétés optiques d'absorbance et de fluorescence, ce qui est généralement fait dans les études en milieu aquatique.

Ainsi, l'exploitation des propriétés optiques de la MOD a été un point central au cours de cette thèse. Plusieurs indices ont été déterminés et la décomposition PARAFAC a été réalisée afin d'avoir une caractérisation la plus exhaustive possible sur la qualité spectroscopique de la MOD produite dans les sols étudiés.

Les propriétés optiques de la MOD ont permis d'établir que sa qualité était essentielle quant à la prédiction de la disponibilité du cuivre dans une collection de sols (Chapitre 4). Le SUVA est l'indice d'aromaticité de la MOD qui est le plus classiquement utilisé dans la littérature s'intéressant aux sols (Amery et al. 2007 ; Amery et al. 2008 ; Araújo et al. 2019). Cet indice a été mesuré mais a finalement été écarté de l'analyse. En effet, il a été reporté que la mesure du SUVA pouvait être fortement biaisée par des particules dans le sol (colloïdes, oxydes dissouts...) (Yang and Hur 2014). Nous avons ainsi jugé pertinent de considérer le HIX ici comme l'indicateur d'aromaticité. Les indices HIX et FI étant ressortis dans les équations de régression linéaire (Chapitre 4), cela souligne l'importance du degré d'aromaticité et de la source de la MOD pour expliquer la concentration du cuivre total en solution. A l'opposé, la taille moléculaire (S_R) et la contribution biologique (BIX) n'ont pas été significatifs pour prédire la disponibilité du Cu. Cependant, l'ensemble des paramètres optiques ont permis de mettre en évidence une diversité des sols étudiés sur le plan qualitatif de la MOD, quoique ayant présenté des concentrations similaires en COD. Ce résultat a ainsi montré qu'au sein d'une collection de sols viticoles, tous en agriculture biologique, la quantité de MOD peut être similaire mais avec des qualités différentes. La pente spectrale $S_{275-295}$ a été préférée au rapport de pentes spectrales S_R pour évaluer la taille moléculaire de la MOD (Chapitre 5, 6), car cet indice s'avérait plus sensible aux perturbations effectuées. Dans ces expériences d'incubation, les indices HIX, BIX, et $S_{275-295}$ n'ont pas montré de relations tangibles avec la concentration de Cu total en solution ni avec les valeurs de pCu. Cependant, le Cu en solution était fortement corrélé à l'intensité de fluorescence de certains des composants PARAFAC (Chapitre 6). Ce résultat a indiqué que les composants constitutifs de la MOD fluorescente n'auraient pas tous la même contribution vis-à-vis de

la mobilisation du Cu en solution. Il ne faudrait donc pas considérer la matière organique dissoute comme une entité homogène. Les composants les plus humifiés de la MOD ont montré les corrélations les plus fortes avec le Cu total en solution (Chapitres 5, 6). Ainsi, la mise en solution du Cu serait globalement liée à la dynamique de la MOD, et spécifiquement conduite par les molécules les plus aromatiques et les plus humifiées qui composent cette MOD.

Les deux sols étudiés dans les expériences des Chapitres 5 et 6 ont montré initialement des différences au niveau de la qualité de leurs MOD respectives. Comparé au sol 1, le sol 2 qui présentait l'activité biologique la plus faible avait une MOD caractérisée par un plus fort degré d'aromaticité (HIX), une taille moléculaire plus importante ($S_{275-295}$) et une plus faible contribution des molécules provenant de l'activité biologique récente (BIX). Ensuite, l'analyse PARAFAC a mis en évidence les différences entre les deux sols étudiés en termes de distribution des composants fluorescents déterminés. Comparé au sol 2, le sol 1 a montré des proportions plus importantes en composants de faible degré de condensation, ce qui est cohérent avec ses faibles valeurs de l'indice HIX.

Les spectres de fluorescence des extraits de sol juste après apport des résidus montrent une forte présence de la bande protéinique Υ , surtout pour la féverolle et l'avoine, qui témoigne d'une forte abondance en composés type acides aminés. Comparée aux sols contrôles, les sols amendés (des 3 résidus) à t0 se sont caractérisés par de faibles HIX, indiquant un faible degré d'aromaticité de leur MOD. Ce résultat s'est montré cohérent avec la réponse des sols en termes de minéralisation de la MO, qui était plus importante en début d'expérimentation avec les résidus de féverole et d'avoine. En effet, l'intensité de minéralisation de la MOD est généralement plus importante quand elle est composée de petites molécules faciles à dégrader (Ghimire et al. 2017). Les réponses des résidus de féverolle et d'avoine sur le Cu étaient similaires. Pourtant, ces deux résidus se différencient par leur ratio C:N (10 pour féverolle et 15 pour avoine), indicateur de dégradabilité souvent utilisé dans la littérature pour caractériser les apports organiques (Hassan 2013; Asghar and Kataoka 2021). Pour comprendre les réponses en termes de minéralisation de la MO, de dynamiques de la MOD et du Cu, il apparaît ici que la qualité de la fraction soluble des apports est au moins aussi importante que celle de la fraction solide (évaluée ici via le ratio C:N).

Les propriétés optiques de la MOD ont permis de suivre les processus qui s'opèrent dans le sol suite aux perturbations liées à la variation de température et à l'apport des résidus. Via les indices HIX, BIX, $S_{275-295}$ et les composants PARAFAC déterminés pour chacune des expérimentations, nous avons montré que la différence de température (Chapitre 5) n'affectait pas la qualité ni la composition de la MOD. En plus, la forte production de COD dans le sol 2 dans cette expérience n'était pas accompagnée de modifications des intensités d'absorbance et de fluorescence. Ce résultat nous a suggéré que cette MOD produite n'était probablement pas de nature chromophorique ni fluorescente. D'ailleurs, c'est ce qui a pu être à l'origine du manque de relation positive entre le COD et Cu en solution dans le sol 2 au cours de cette expérience. La décomposition PARAFAC a permis de faire l'hypothèse que la MOD dans les sols amendés à t0 provenait principalement de la solubilisation des résidus (Chapitre 6). En effet, un enrichissement en fluorophores de faible degré de condensation s'est manifesté dès l'apport des résidus aux sols. Puis, au fil de la transformation de ces résidus, la

MOD analysée était de plus en plus abondante en composés aromatiques, tandis que les composés type protéinique disparaissaient. Nous avons aussi montré que l'acidification des sols constatée lors de l'apport des résidus était concomitante de la présence de fluorophores spécifiques à la fraction soluble de ces résidus (Chapitre 6). Tandis que la MOD provenant des résidus est consommée par l'activité microbienne, sa qualité change au cours du temps. La décomposition PARAFAC a montré une disparition rapide des fluorophores spécifiques aux résidus durant la première phase de l'incubation. Puis, les différences de qualité entre la MOD des sols amendés et celle des sols contrôle s'estompent de plus en plus, ce qui manifeste un retour à l'équilibre initial. En effet, les intensités de fluorescence totale de la MOD dans les sols amendés tendaient à se rapprocher de celles dans le sol contrôle à la fin des 3 mois d'incubation (sous-chapitre 6.2). Pour les expériences des Chapitres 5 et 6, les valeurs de l'indice BIX augmentent durant les premiers jours de l'incubation dans les sols amendés, indiquant une contribution de plus en plus importante de substances liées à l'activité bactérienne (Parlanti 2000; Huguet et al. 2009). En effet, cette augmentation de BIX coïncidait avec les valeurs les plus élevées d'activités enzymatiques et de taux de minéralisation du carbone. Les résultats du Chapitre 6 (avoine + féverolle) ont montré que dans les sols amendés, le HIX augmentait tandis que le $S_{275-295}$ de la MOD diminuait au fil de l'incubation. Cela indique que la MOD devenait de plus en plus humifiée, avec la présence de composés de taille moléculaire de plus en plus importante (Zsolnay et al. 1999 ; Helms et al. 2008). Ces résultats confirment l'occurrence de mécanismes de maturation et de complexification de la MO dans le sol en lien avec l'activité biologique.

Au final, la prise en compte de la qualité de la MOD évaluée par absorbance et par fluorescence a été significative dans cette thèse. Cela nous a permis de suivre les processus engagés dans le sol en lien avec la dynamique de la MOD, et aussi d'établir des éléments d'interprétations quant à l'effet de la MOD sur le Cu disponible. La quantité de la MOD n'est donc pas suffisante pour étudier sa dynamique et ses effets sur le Cu, l'étude de sa qualité s'avère tout autant nécessaire.

3 Indicateurs de disponibilité et potentiels effets écotoxiques

La raison ultime pour laquelle des études s'intéressent à la disponibilité des métaux dans le sol est de pouvoir prédire et contrôler leurs effets écotoxiques. La toxicité du Cu est une conséquence directe de sa biodisponibilité et est liée à une certaine mesure à sa disponibilité environnementale.

Dans la littérature, plusieurs indicateurs de biodisponibilité du Cu sont utilisés. Le cuivre total présent en solution serait un proxy pertinent de biodisponibilité du Cu, si le cuivre dissout est majoritairement sous forme de petits complexes MOD-Cu labiles, qui sont capables de se dissocier au contact des racines végétales (Michaud et al. 2008). Des études en hydroponie ont montré que des concentrations de Cu total en solution supérieures à 7,5 μM pourraient provoquer une diminution de 50% de la biomasse racinaire du maïs (EC_{50}) (Ouzounidou 1995). Cette EC_{50} est de 7,7 μM pour la biomasse

racinaire du blé dur (Michaud et al. 2008), de 3,9 μM pour la croissance racinaire de la vigne (Juang et al. 2012) et de 9.6 μM pour le tournesol (Kolbas et al. 2014). Ait Ali et al. (2002) ont relevé que la longueur racinaire de plants de maïs diminuait de 90% lorsque ceux-ci séjournèrent pendant 2 semaines dans une solution à 16 μM de Cu.

Pourtant, la plupart des autres études avancent plutôt les concentrations ou l'activité de la fraction libre Cu^{2+} comme l'indicateur le plus fin de biodisponibilité du cuivre. Des concentrations de Cu^{2+} au-delà de 5 μM en solution ont provoqué une baisse importante de la résistance de bactéries face à la pollution de Cu (García-Villada et al. 2004). Des valeurs d' EC_{50} (50% de mortalité) ont été trouvées pour une daphnie (*Ceriodaphnia dubia*) et un ver de terre (*Eisenia fetida*), exposés respectivement à des concentrations de Cu^{2+} de 3×10^{-3} μM et de 2.2 μM (Kim et al. 1999 ; Qiu et al. 2013). Pour les plantes, Garcia (2004) donne une EC_{50} pour la croissance racinaire de la vigne de 0,5 μM en Cu^{2+} alors que Bravin et al. (2010) ont estimé ces concentrations toxiques en Cu^{2+} pour la croissance racinaire du blé dur entre 0,015 μM (EC_{10}) et 0,063 μM (EC_{50}).

Les concentrations observées dans la gamme des sols étudiés à l'équilibre étaient comprises entre 0.1 et 2.6 μM pour le Cu total, et entre 2×10^{-4} et 1 μM pour le Cu^{2+} en solution (Chapitre 4). Ainsi, tous les sols avaient des concentrations de Cu total plus faibles que les seuils de toxicité évoqués dans les études ci-dessus. Cependant, quelques-uns des sols de la collection étudiée (4 sur 18) présentaient des concentrations de Cu^{2+} plus importantes que ces seuils d'écotoxicité. Les deux sols étudiés dans les Chapitres 5 et 6 ne faisaient pas partie de ces sols fortement concentrés en Cu^{2+} . Dans le cadre des incubations, les concentrations maximales que nous avons trouvées sont de 31 μM pour le cuivre total (sol 2 + résidus de féverolle, t0, Chapitre 6) et de 53×10^{-3} μM pour le cuivre libre Cu^{2+} ($\text{pCu}=7.46$, sol 2, t60, Chapitre 5). *A priori*, ces concentrations indiquent de potentiels risques écotoxiques dans les conditions étudiées. En effet, ces concentrations obtenues sont supérieures à la plupart des seuils écotoxiques mentionnés dans les études ci-dessus. Mais il est important de relativiser ces observations car les plus fortes concentrations de Cu dans cette thèse ont été obtenues de manière ponctuelle, soit à la fin de l'incubation avec l'effet température (Chapitre 5), soit dès l'apport des résidus (Chapitre 6). Le reste du temps dans nos expériences, les concentrations de Cu sont beaucoup plus faibles que les maximas et sont généralement inférieures à 10 μM pour le Cu total et à 1.5×10^{-3} μM ($\text{pCu}>9$) pour le Cu^{2+} en solution.

4 Perspectives scientifiques

Les résultats de ce travail de thèse ouvrent la voie à nombreuses perspectives de recherches futures pour affiner la compréhension des liens entre dynamique de MOD et Cu.

D'abord, les résultats statistiques obtenus de cette thèse pourraient être validés sur un jeu de données plus large, en prenant en compte la diversité des sols nationaux. Dans le cadre du projet

BASIC (stage de master de Pierre B., INRAE, 2021), une collection de sols viticoles conduits en agriculture biologique répartis sur les différentes régions viticoles françaises et suffisamment contrastés par leurs propriétés chimiques a été constituée. Tester nos modèles de régression linéaire (Chapitre 4) sur cette collection de sols pourrait avoir un réel intérêt pour confirmer l'importance de la prise en compte de la qualité optique de la MOD, et aussi pour étudier si ce sont les mêmes indices qui sont significatifs (HIX et FI).

Dans les Chapitres 5 et 6, nous avons choisi de travailler sur des sols acides à neutre, car les carbonates contenus dans les sols alcalins pouvaient perturber les mesures de respiration du sol. En effet, les modifications de pH liées aux apports de résidus pourraient induire une digestion des carbonates et une production de CO₂ qui ne serait pas d'origine organique. Par contre, malgré cette difficulté, il s'avère nécessaire de tester nos conclusions du Chapitre 6 sur des sols calcaires, afin de renforcer leur pertinence. En effet, nous avons montré que la prise en compte de l'activité de minéralisation de la MO est importante pour étudier les dynamiques de MOD et de Cu. Pour contourner la difficulté liée aux carbonates, il serait intéressant de réfléchir à une méthodologie qui peut différencier le CO₂ lié à la dynamique des carbonates de celle liée à la MO. Des mesures isotopiques sur l'air du sol pourraient ainsi être bénéfiques.

Aussi, il serait intéressant d'adjoindre des études écotoxicologiques au suivi des mécanismes géochimiques. Les résultats de cette thèse ont montré que certains sols présentaient des concentrations en Cu total et Cu²⁺ proches des seuils théoriques d'écotoxicité. Il serait intéressant de valider cela en mesurant sur une gamme de sols, à la fois les indicateurs de disponibilités (Cu total, Cu²⁺ mais peut-être aussi la réponse de capteurs passifs comme la DGT) et la réponse écotoxique de différentes cibles (plantes, vers de terre). Nos résultats ont aussi montré que les perturbations du sol par incubation impactent la disponibilité du Cu, et évoquent à certains moments des risques d'écotoxicité. Pour confirmer ces constatations, les sols pourraient être incubés avec des cibles biologiques afin d'étudier si les changements opérés sur le Cu disponible se répercutent directement sur sa biodisponibilité et sa toxicité. De même, cela permettra de hiérarchiser d'un point de vue « réponse écotoxicologique » les deux indicateurs de disponibilité testés dans cette thèse, à savoir le Cu total en solution et le Cu libre Cu²⁺.

Les résultats de cette thèse montrent que, lors des incubations avec variations de température ou apports de résidus, la dynamique du Cu est variable, avec une solubilisation du cuivre ou une sorption de cet élément sur les phases solides. Mais nous ne savons pas réellement de quel(s) compartiment(s) du sol provient ce cuivre. Nous avons présumé que les complexes MO-Cu stabilisés dans le sol seraient les principales sources de Cu en solution. Cependant, les phases minérales du sol ont aussi pu contribuer à des mécanismes de solubilisation abiotiques, surtout dans l'expérience température (Chapitre 5) où les réponses en termes d'activité biologique étaient plus limitées dans le sol 2 notamment. Il serait donc pertinent d'analyser la spéciation solide du Cu, avant d'étudier les dynamiques de mise en solution. Cela permettrait d'identifier les phases du sol les fournissant le plus de Cu disponible, et celles qui le fixent le plus. Aussi, via des mesures isotopiques, il sera possible de cerner la provenance du Cu mobilisé en solution. Dans ce même objectif de mieux comprendre les

processus d'échanges sol-solution du cuivre, il serait aussi intéressant de pouvoir tracer le cuivre, en utilisant par exemple des isotopes stables. En fait, cette manipulation s'inscrit dans la continuité des travaux de cette thèse et est incluse dans le projet INTRIGUE (INSU-EC2CO, 2020-2021). La manipulation a été effectuée au CEREGE, Aix-en-Provence (Centre Européen de Recherche et d'Enseignement en Géosciences de l'Environnement) et les résultats obtenus sont en cours de traitement.

Lors de l'apport de matière organique fraîche, nous avons supposé que l'augmentation de la minéralisation du sol était très majoritairement expliquée par la minéralisation de cette MO fraîche mais nous savons que ces apports entraînent aussi une surminéralisation de la MO initiale présente dans les sols, par priming-effect. En effet, l'apport de MO facilement dégradable entraîne plus de capacité aux bactéries pour dégrader la MO ancienne du sol. Le priming-effect est couramment étudié dans la littérature portant sur les écosystèmes forestiers et parfois sur les sols agricoles (Kuzyakov 2010). Dans notre cas, des mesures isotopiques permettraient de suivre le carbone minéralisé et d'évaluer la part du priming-effect dans la respiration globale du sol. Cela s'avère intéressant d'autant plus que les deux sols incubés dans cette thèse avaient des propriétés très différentes concernant la dégradabilité de leurs MO respectives, caractérisées par des ratio C:N contrastés (11.7 pour le sol 1 et 15.3 pour le sol 2).

Dans la continuité des travaux de cette thèse, il serait intéressant de modéliser mathématiquement les capacités d'interactions de la MOD avec le Cu en se servant de ses propriétés spectroscopiques. Dans des études précédentes (Djae et al. 2017), il a été montré que la réactivité de la MOD vis-à-vis du Cu était liée à sa composition, et qu'il était possible de prédire efficacement le Cu^{2+} en ajustant mathématiquement les paramètres de réactivité de la MOD (coefficient de stabilité $\log K_{\text{Cu}}$, pourcentage de réactivité %r). Une recherche future pourrait faire le lien entre ces paramètres de réactivité de la MOD et les paramètres spectroscopiques tels que mesurés dans cette thèse (aromaticité HIX, contribution biologique BIX, taille moléculaire S_R , composants fluorophores etc.).

Enfin, pour valider ces nombreuses observations sur le terrain, il faudrait réaliser un suivi *in situ* sur toute une saison viticole, avec les mêmes sols de cette thèse. Un dispositif similaire à celui mis en place par Pierdet (2020) pourrait être exploité pour étudier les mêmes variables que celles analysées dans cette présente thèse. Des sondes de température et d'humidité permettraient de considérer les variations de ces facteurs dans le sol. Nous imaginons que sur le terrain, le sol peut être récolté à chaque temps de mesure, et ramené en laboratoire pour les extractions et les analyses. Cependant, il pourrait être délicat de mesurer la respiration du sol dans un espace ouvert. Aussi, dans ce scénario, il faudrait tenir compte du fait que les bocal dans nos travaux restaient hermétiquement fermés pendant les expériences, ce qui a pu limiter les quantités et les flux d'oxygène. Cette observation devra être considérée si des manipulations sont opérées sur le terrain.

5 Implications agronomiques et environnementales des résultats obtenus

Plusieurs implications découlent des résultats obtenus dans cette thèse.

D'abord, sur le plan agronomique, il est connu que l'apport des résidus frais ravive la vie biologique du sol à travers l'augmentation des activités enzymatiques. Ce résultat est d'autant plus important que les sols viticoles sont généralement pauvres en MO et peu actifs sur le plan biologique. Nous avons montré que cet apport bien qu'il augmentât la concentration en Cu total, avait tendance au travers son effet sur le pH, à faire diminuer la concentration en cuivre libre. Ainsi, la culture et l'enfouissement des plantes de couverture cultivées dans certaines parcelles viticoles ont tout leur intérêt car cela participe à augmenter l'activité microbienne et donc à améliorer les propriétés agronomiques du sol (Abad et al. 2021) mais aussi à réguler la disponibilité du cuivre, ce qui est particulièrement intéressant pour les sols en vigne depuis longtemps. Cependant, nos résultats ont montré que les réponses sont intenses lors des apports puis se dissipent au cours du temps. Il faudrait donc que les apports soient réguliers et avec des quantités suffisantes. Les résidus de féverole et d'avoine ont provoqué des réponses assez similaires sur l'activité biologique. Sur le court terme (1 mois), ce sont les résidus de féverolle qui impactent le plus l'activité biologique, mais les résidus d'avoine prennent le pas quand des temps plus longs sont considérés (> 3 mois).

Sur le plan environnemental, le pH est un facteur essentiel qui influence la dynamique du Cu. La concentration du Cu en solution et celles du Cu^{2+} baissent lorsque le pH augmente. Modifier le pH dans les sols viticoles acides représente donc un levier efficace pour réduire les risques d'écotoxicité. Des amendements alcalinisants, organiques ou minéraux, seraient donc intéressants pour mitiger la disponibilité du Cu. D'ailleurs, dans certaines parcelles, de la chaux, des fumiers de champignonnières alcalins, sont apportés pour élever le pH du sol. Cependant, ces pratiques doivent être encadrées afin de ne pas nuire à la disponibilité des autres éléments du sol et à la nutrition des plantes. La différence de température a faiblement affecté la disponibilité du cuivre. L'implication est que le stock de cuivre dans les sols viticoles contaminés ne serait pas sensible aux hausses probables de la température dans les années à venir. L'hypothèse d'une « bombe à retardement » constituée par le cuivre fixé sur la matière organique qui pourrait rapidement se minéraliser et libérer cet élément n'a pas été validée. Certes, notre expérimentation est simpliste et cela nécessite des analyses sur un plus grand nombre de sols, et également des mesures sur le terrain pour émettre des conclusions étayées. Mais nos résultats, représentent un premier constat optimiste concernant le devenir du Cu dans les sols contaminés.

En agriculture biologique, de nombreux types de MO différents sont apportés au sol. Nos résultats impliquent qu'il serait possible d'identifier les MO qui peuvent le plus facilement complexer le Cu et faciliter sa sorption sur le sol. Cela passerait par des études préalables sur les fractions solubles de ces MO apportées. En effet, notre étude a souligné l'importance de la qualité de la fraction soluble des résidus pour étudier leur capacité d'interaction avec le Cu. Comparés aux résidus de feuilles de vigne, les résidus de féverolle et d'avoine sont ceux qui ont provoqué le plus de sorption de Cu à la fin de l'expérience, dû à l'humification importante qui s'opérait au fil de l'incubation. Nous pensons aussi que ces deux résidus se sont montrés aussi réactifs parce que leur fraction soluble était plus abondante en composés de petite taille, ce qui a exacerbé l'activité biologique et entraîné

l'humification rapide et la sorption du Cu. Ainsi, il devrait être possible, sur la base de la qualité des fractions solubles, de sélectionner les MO qui pourraient le plus sorber le Cu et diminuer sa concentration en solution. Dans le même sens, nous pouvons envisager que d'autres types de MO puissent exacerber à moyen ou long terme la disponibilité du Cu. Cela présenterait un intérêt pour la phytoextraction, qui nécessite des concentrations importantes de Cu disponible.

6 Conclusions finales

En définitive, cette étude nous a permis d'apporter de nouveaux éléments de compréhension sur l'effet de la dynamique de la matière organique dissoute (MOD) sur la disponibilité du cuivre (Cu) dans des sols viticoles. La qualité de la MOD, analysée via ses propriétés optiques, s'est avérée importante pour expliquer la disponibilité du Cu dans des sols viticoles à l'équilibre, ou perturbés par des modifications de température ou des apports organiques. La qualité de la MOD est modifiée par des apports de résidus végétaux. Ainsi, la MOD produite dans le sol est d'abord constituée de molécules simples, puis qui s'humifient au fil de la transformation des résidus apportés. Schématiquement, la MOD influencerait directement la concentration de Cu total en solution, et indirectement la fraction libre Cu^{2+} via sa capacité à modifier le pH. Le pH émerge comme le facteur primordial pour expliquer la concentration en cuivre libre en solution, et comme un facteur aussi important que la MOD pour expliquer la dynamique du Cu total, aussi bien dans des sols à l'équilibre que dans des sols perturbés par un changement de température ou d'apport de matière organique fraîche. La capacité de mobilisation du Cu en solution par la MOD serait facilitée lorsque le pH baisse, et exacerbée lors des apports de résidus. Les deux indices de disponibilité du Cu ne sont pas soumis aux mêmes mécanismes et présentent des comportements différents, dans des sols à l'équilibre ou modifiés. Le Cu total en solution semble directement affecté par la dynamique de la MOD, tandis que le Cu^{2+} est lui expliqué par les variations de pH. En termes d'activité biologique et de dynamiques de la MOD et du Cu, les modifications induites par l'apport des résidus ont été plus importantes que celles liées aux variations de température. Les trois résidus apportés ont provoqué dans le sol des réponses similaires, mais avec des intensités différentes. Pour l'effet « température », les réponses sont différentes suivant les sols. Globalement, les réactions observées dans cette thèse ont été fortement tributaires de la nature des sols, selon leur mode de gestion organique initiale. Suite aux perturbations liées à l'apport des résidus, le sol avec l'activité biologique la plus importante semble le plus rapide à retrouver son état d'équilibre initial. Cette étude souligne l'importance de la gestion des apports organiques dans les sols afin de mieux contrôler leurs effets sur la disponibilité du cuivre.

Références

Abad J, Hermoso de Mendoza I, Marin D, Orcaray L, Gonzaga Santesteban L (2021) Cover crops in viticulture. A systematic review (1): Implications on soil characteristics and biodiversity in vineyard. *OENE One* 55(1):295-312. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.1.3599>

Ait Ali N, Bernal MP, Ater M (2002) Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil* 239(1):103-111. <https://doi.org/10.1023/A:1014995321560>

- Amery F, Degryse F, Cheyns K, De Troyer I, Mertens J, Merckx R, Smolders E (2008) The UV-absorbance of dissolved organic matter predicts the fivefold variation in its affinity for mobilizing Cu in an agricultural soil horizon. *European Journal of Soil Science* 59(6):1087-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01078.x>
- Amery F, Degryse F, Degeling W, Smolders E, Merckx R (2007) The Copper-Mobilizing-Potential of Dissolved Organic Matter in Soils Varies 10-Fold Depending on Soil Incubation and Extraction Procedures. *Environmental Science & Technology* 41(7):2277-2281. <https://doi.org/10.1021/es062166r>
- Araújo E, Strawn DG, Morra M, Moore A, Ferracciú Alleoni LR (2019) Association between extracted copper and dissolved organic matter in dairy-manure amended soils. *Environmental Pollution* 246:1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.070>
- Asghar W, Kataoka R (2021) Green manure incorporation accelerates enzyme activity, plant growth, and changes in the fungal community of soil. *Arch Microbiol* 204(1):7. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02614-x>
- Błońska E, Piaszczyk W, Staszek K, Lasota J (2021) Enzymatic activity of soils and soil organic matter stabilization as an effect of components released from the decomposition of litter. *Applied Soil Ecology* 157:103723. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103723>
- Blotevogel S, Oliva P, Denaix L, Audry S, Viers J, Schreck E (2022) Stable Cu Isotope Ratios Show Changes in Cu Uptake and Transport Mechanisms in *Vitis vinifera* Due to High Cu Exposure. *Frontiers in Plant Science* 12
- Bravin MN, Le Merrer B, Denaix L, Schneider A, Hinsinger P (2010) Copper uptake kinetics in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) as compared with soil's ability to supply copper. *Plant Soil* 331(1):91-104. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0235-3>
- Chen B, Zhao M, Liu C, Feng M, Ma S, Liu R, Chen K (2020) Comparison of copper binding properties of DOM derived from fresh and pyrolyzed biomaterials: Insights from multi-spectroscopic investigation. *Science of The Total Environment* 721:137827. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137827>
- Chen H-L, Zhou J-M, Xiao B-H (2010) Characterization of dissolved organic matter derived from rice straw at different stages of decay. *J Soils Sediments* 10(5):915-922. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0210-x>
- Dan-na C, Wei-dong C, Jin-shun B, Song-juan G, Xue-cui W, Nao-hua Z, Katsuyoshi S (2017) Effects of Green Manures on Soil Dissolved Organic Matter in Moisture Soil in North China. *Spectrosc Spectr Anal* 37(1):221-226. [https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2017\)01-0221-06](https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2017)01-0221-06)
- Djae T, Bravin MN, Garnier C, Doelsch E (2017) Parameterizing the binding properties of dissolved organic matter with default values skews the prediction of copper solution speciation and ecotoxicity in soil: Heterogeneity in reactive DOM impacts soil Cu ecotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(4):898-905. <https://doi.org/10.1002/etc.3622>
- Gao J, Lv J, Wu H, Dai Y, Nasir M (2018) Impacts of wheat straw addition on dissolved organic matter characteristics in cadmium-contaminated soils: Insights from fluorescence spectroscopy and environmental implications. *Chemosphere* 193:1027-1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.112>
- Garcia O (2004) Accumulation du cuivre dans quelques sols viticoles du Languedoc-Roussillon et seuil de toxicité sur vigne, mémoire de fin d'études Diplôme d'Agronomie Approfondi, Spécialisation Viticulture-Œnologie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 31 p.
- García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez-Martín L, López-Rodas V, Costas E (2004) Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and

- future implications in the use of copper sulphate as algaecide. *Water Research* 38(8):2207-2213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.036>
- Ghimire B, Ghimire R, VanLeeuwen D, Mesbah A (2017) Cover Crop Residue Amount and Quality Effects on Soil Organic Carbon Mineralization. *Sustainability* 9(12):2316. <https://doi.org/10.3390/su9122316>
- Hassan W (2013) C and N mineralization and dissolved organic matter potentials of two contrasting plant residues: effects of residue type, moisture, and temperature. *Acta Agric Scand Sect B-Soil Plant Sci* 63(7):642-652. <https://doi.org/10.1080/09064710.2013.846398>
- Helms JR, Stubbins A, Ritchie JD, Minor EC, Kieber DJ, Mopper K (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.3.0955>
- Hu B, Wang P, Wang C, Qian J, Bao T, Shi Y (2019) Investigating spectroscopic and copper-binding characteristics of organic matter derived from sediments and suspended particles using EEM-PARAFAC combined with two-dimensional fluorescence/FTIR correlation analyses. *Chemosphere* 219:45-53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.113>
- Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E (2009) Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40(6):706-719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Juang K-W, Lee Y-I, Lai H-Y, Wang C-H, Chen B-C (2012) Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environ Sci Pollut Res Int* 19(4):1315-1322. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0657-3>
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review
- Kim SD, Ma H, Allen HE, Cha DK (1999) Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: Effect of complexation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11):2433-2437. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181108>
- Kolbas A, Marchand L, Herzig R, Nehnevajova E, Mench M (2014) Phenotypic seedling responses of a metal-tolerant mutant line of sunflower growing on a Cu-contaminated soil series: potential uses for biomonitoring of Cu exposure and phytoremediation. *Plant Soil* 376(1):377-397. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1974-8>
- Kuzyakov Y (2010) Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42(9):1363-1371. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003>
- Liu G, Yu Z, Liu X, Xue W, Dong L, Liu Y (2020) Aging Process of Cadmium, Copper, and Lead under Different Temperatures and Water Contents in Two Typical Soils of China. *Journal of Chemistry* 2020:e2583819. <https://doi.org/10.1155/2020/2583819>
- Michaud AM, Chappellaz C, Hinsinger P (2008) Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant Soil* 310(1):151-165. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9642-0>
- Ouzounidou G (1995) Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress—I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environmental and Experimental Botany* 35(2):167-176. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)00049-B](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)00049-B)
- Parlanti E (2000) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* :17
- Pierdet M (2020) Evolution spatiale et temporelle de la mobilité des contaminants organiques et inorganiques dans des sols viticoles contrastés. PhD Thesis, Université de Bordeaux

- Qiu H, Vijver MG, He E, Peijnenburg WJGM (2013) Predicting copper toxicity to different earthworm species using a multicomponent Freundlich model. *Environ Sci Technol* 47(9):4796-4803. <https://doi.org/10.1021/es305240n>
- Ren Z-L, Tella M, Bravin MN, Comans RNJ, Dai J, Garnier J-M, Sivry Y, Doelsch E, Straathof A, Benedetti MF (2015) Effect of dissolved organic matter composition on metal speciation in soil solutions. *Chemical Geology* 398:61-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.01.020>
- Ritchie G, Dolling P (1985) The Role of Organic Matter in Soil Acidification. *Australian Journal of Soil Research* 23(4):569-576. <https://doi.org/10.1071/SR9850569>
- Sauvé S, Hendershot W, Allen HE (2000) Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ Sci Technol* 34(7):1125-1131. <https://doi.org/10.1021/es9907764>
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH (1997) Copper Solubility and Speciation of In Situ Contaminated Soils: Effects of Copper Level, pH and Organic Matter. *Water, Air, & Soil Pollution* 100(1):133-149. <https://doi.org/10.1023/A:1018312109677>
- Temminghoff EJM, Van Der Zee SE a. TM, Keizer MG (1994) The influence of pH on the desorption and speciation of copper in a sandy soil. *Soil Science* 158(6):398-408
- Yang L, Hur J (2014) Critical evaluation of spectroscopic indices for organic matter source tracing via end member mixing analysis based on two contrasting sources. *Water Research* 59:80-89. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.018>
- Zhou LX, Wong JWC (2000) Microbial decomposition of dissolved organic matter and its control during a sorption experiment. *J Environ Qual* 29(6):1852-1856. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900060017x>
- Zsolnay A, Baigar E, Jimenez M, Steinweg B, Saccomandi F (1999) Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00166-0)