



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Master 2  
Géosciences Planète ressources Environnement  
Spécialité Sols, Eaux, Environnement

## **RAPPORT DE STAGE**

# **Quantification des molécules organo-chlorées dans les sols et suivi de leur formation et dégradation – rôle des microorganismes.**

Maîtres de stage : POSZWA Anne et LEYVAL Corinne  
Tuteur universitaire: BILLARD Patrick

**OSSWALD Aurélie**  
**Année 2011-2012**

## **RAPPORT DE STAGE**

# **Quantification des molécules organo-chlorées dans les sols et suivi de leur formation et dégradation – rôle des microorganismes.**

Maîtres de stage : POSZWA Anne et LEYVAL Corinne  
Tuteur universitaire: BILLARD Patrick

**OSSWALD Aurélie**  
**Année 2011-2012**

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadrante, Anne Poszwa, de m'avoir accompagnée tout le long de mon stage, et sans qui ce projet n'aurait pu aboutir.

Je remercie également Corinne Leyval de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et d'avoir été co-encadrante de ce stage. Son expérience et ses conseils m'ont été d'une aide bien précieuse.

Je pense aussi à Marie Stauffer, Thierry Beguiristain et Noémie Jean qui m'ont initiée à la biologie moléculaire.

Un merci également à David Billet, qui a accompli au mieux sa mission au Pays-Bas, apportant ainsi les connaissances nécessaires sur les analyses de chlore dans les sols.

Je n'oublie pas les collègues de l'OPE du site de l'ANDRA à Bure, du GISFI, du Conservatoire des sites Lorrains et du Parc naturel régional de Lorraine qui ont permis les prélèvements sur le terrain

Enfin un grand merci à Djihad, mon voisin de bureau, mais également à Romain, Damien, Patrick, Christian, Hervé, Christine et Jojo ainsi que tout le personnel du laboratoire pour leur joie et leur bonne humeur.

## LIMOS : Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols



Le limos, laboratoire des interactions microorganismes-minéraux-matière organique dans les sols, est une unité mixte de recherche du CNRS et de l'Université de Lorraine. Le laboratoire fait également partie de l'Observatoire Terre et Environnement de Lorraine (OTELo). Les recherches du laboratoire sont toutes axées sur (1) les interactions bio-physico-chimiques entre les principaux constituants des sols (2) La dynamique des éléments nutritifs ou polluants dans les sols (3) Le rôle des microorganismes sur ces constituants et les flux d'éléments.



Le laboratoire compte une trentaine de personnes environ, dont des chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs, techniciens, doctorants, administratifs et étudiants. Les grandes thématiques autour desquelles s'orientent les travaux au LIMOS sont :

- L'altération minérale, mobilité et biodisponibilité des éléments minéraux majeurs et en traces : réactivité des interfaces bio-organo-minérales et cinétiques d'altération, mécanismes, conséquences sur les organismes et procédés biologiques de traitement
- L'accessibilité, biodégradabilité et réactivité de composés organiques d'origine naturelle et anthropique: mécanismes et organismes impliqués, remédiation

Ces travaux permettent une meilleure compréhension des processus biologiques liés aux communautés microbiennes ainsi que des processus physico-chimiques qui leur sont associés. Plus globalement, les études menées permettent d'aider à établir des critères de qualité des sols, permettant ainsi de préserver leurs fonctions environnementales.

Il faut préciser que le LIMOS sera regroupé avec d'autres laboratoires de l'Université de Lorraine en janvier 2013 et portera alors le nom de LIEC

## Sommaire

Introduction générale .....	8
I. Contexte et objectifs de l'étude .....	8
1. Concentrations et stocks de chlore dans les environnements terrestres.....	8
A. Chlore organique.....	8
B. Chlore inorganique.....	9
C. Bilan chlore organique/chlore inorganique.....	10
2. Processus importants contrôlant le cycle du Cl et sa rétention dans les sols .....	10
A. Processus de chloruration.....	10
B. Processus de déchloruration.....	11
3. Conclusion sur l'état des connaissances du cycle du chlore .....	11
II. Objectifs de l'étude. ....	11
III. Matériels et méthodes .....	11
1. Sites et sols étudiés .....	11
A. Les sites.....	11
a) Sols forestiers ou cultivés sur roche carbonatée .....	12
b) Sol cultivé soumis à des amendements de lisier .....	12
c) Sol salé .....	12
d) Sol acide forestier.....	12
e) Sol de friche industrielle .....	13
B. Méthode d'échantillonnage et traitement préalable des échantillons .....	13
2. Incubations : dispositif expérimental .....	13
3. Analyses réalisées sur les sols.....	14
A. Microbiologie.....	14
a) Mesure de l'hydrolyse de la FDA .....	14
b) Extractions ADN.....	14
c) PCR.....	14
d) Migration sur gel.....	15
B. <i>Electrophorèse sur gel d'agarose</i> .....	15
C. Physico-chimie des sols .....	15
a) pH.....	15
b) Teneurs en carbone et azote totaux et rapport C/N.....	15
c) Chlorures.....	15
d) Autre paramètres physico-chimiques.....	16
e) Chlore.....	16
f) Traitement statistique.....	16
IV. Résultats.....	16
1. Caractéristiques physico-chimique des sols.....	16
A. Granulométrie .....	16
B. Teneurs en éléments chimiques totaux .....	17
C. pH.....	17
D. Teneurs en C et N.....	17
E. Chlorures.....	18
F. CEC.....	19
2. Formes de chlore dans les sols.....	19
A. Teneurs en chlore des sols .....	19
a) Chlore total.....	19
b) Chlore organique .....	20
c) Chlore inorganique.....	20
i. Chlore inorganique mesuré par AOX .....	20
ii. Comparaison aux teneurs en chlorures présents dans la solution de lavage des sols .....	20

d) Prédominances entre les formes organiques et minérales.....	21
3. Microbiologie.....	21
A. Activité bactérienne .....	21
a) Activité globale microbienne sur sols frais.....	22
b) Activité globale microbienne sur sols récativés.....	22
B. Biologie moléculaire .....	22
C. Incubations .....	23
V. Discussion .....	24
1. Microbiologie.....	24
A. Comparaison de l'activité mesurée par hydrolyse de la FDA sur sol frais et sur sol réhumidifié .....	25
B. Comparaison des activités mesurés par FDA et mesurés par la production de CO <sub>2</sub> ..	25
2. Facteurs qui influencent les teneurs en chlore dans les sols. ....	25
A. Cas particulier du sol salé.....	28
B. Autres sols. ....	29
3. Conclusion sur les facteurs de contrôle des teneurs en chlore dans les sols. ....	32
VI. Bibliographie .....	34
VII. ANNEXES .....	36

## Figures et Tableaux

Figure 1: Photographie du gel de migration après extraction de l'ADN des sols acides forestiers et des sols .....	1
Figure 2: Evolution de la production de CO <sub>2</sub> par les microorganismes des échantillons de sols en fonction du temps.....	24
Figure 3: ACP des propriétés des sols .....	26
Figure 4: Evolution des teneurs en azote N en fonctions des teneurs en chlore total TX pour l'ensemble des sols étudiés. ....	27
Figure 5: Evolution des teneurs en azote N en fonctions des teneurs en chlore total TX pour l'ensemble des sols étudiés. ....	27
Figure 6: Propriétés chimiques et activité bactérienne des sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3) .....	28
Figure 7: Teneurs en chlore total, organique et inorganique des sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3) .....	28
Figure 8: ACP (analyse en composante principale) des propriétés des sols.....	29
Figure 9: Diagramme radar représentant les teneurs moyennes en carbone et en chlore total pour les sols étudiés. ....	31

Tableau 1: Concentrations et stocks en chlore organique dans les différents compartiments de l'environnement rapporté par des études antérieures.....	9
Tableau 2: Concentrations et stocks en chlore inorganique dans les différents compartiments de l'environnement. ....	10
Tableau 3: Données de pH eau et pH KCl des échantillons de sols .....	17
Tableau 4: Teneurs en Carbone et en azote des divers échantillons de sol. ....	18
Tableau 5: Teneurs Cl <sup>-</sup> des échantillons de sols. ....	18
Tableau 6: CEC moyenne des sols.....	19
Tableau 7: Teneurs en chlore total, organique et inorganique des échantillons de sols. ....	19
Tableau 8: Teneurs en chlore inorganique mesurées par AOX et dans les solutions de lavage des sols .....	20
Tableau 9: Résultats des activités bactérienne des différents échantillons de sols pour les sols frais et pour les sols ré-humidifiés. ....	22
Tableau 10 : Facteurs qui influencent la présence de chlore dans les sols de cette étude et comparaison avec la littérature .....	32



# Introduction générale

Le chlore, élément chimique du groupe des halogènes (le plus abondant dans l'environnement), participe à un cycle biogéochimique complexe au sein des écosystèmes. Les chlorures, forme inorganique majoritaire dans les eaux, sont considérés inertes du fait de leur faible réactivité vis à vis des phases minérales des sols. Cependant, de récentes études démontrent que des quantités non négligeables de chlore sont retenues dans les sols, sous une forme organique (*Bastviken et al. 2006, Johanssen et al. 2003, Rodstedth et al. 2003*). La dynamique du chlore dans les écosystèmes et sa rétention dans les sols paraissent en fait régulées par la formation et la dégradation de molécules organo-chlorées via des processus naturels essentiellement issus de l'activité microbienne du sol (*Bastviken et al. 2009, Verhagen et al. 1998...*). Des études rapportent également la formation de molécules organochlorées par des processus abiotiques (*Keppeler et al. 2000*).

Les quantités de chlore retenues dans les sols et les processus à l'origine de ces changements de spéciation du chlore sont encore peu documentés. Par ailleurs les paramètres environnementaux contrôlant ces processus restent à identifier.

L'étude proposée ici contribuera d'une part à la description quantitative des formes organiques et inorganiques de chlore dans des sols d'écosystèmes contrastés à l'aide d'un analyseur de type AOX. Ces quantités seront reliées aux paramètres chimiques (CEC, C, N, pH, etc.) et microbiologiques (activités bactériennes) des différents sols étudiés. D'autre part, cette étude fournira des données sur la formation ou la dégradation de molécules organo-chlorées dans ces sols au cours du temps suite à l'ajout ou non d'exudats racinaires synthétiques. Cette étape consistera à suivre l'incubation de certains sols pendant 6 semaines et permettra de mesurer l'évolution des formes de Cl en début et en fin d'expérience. Elle précisera en particulier le rôle des microorganismes du sol dans les processus naturels de formation des composés organochlorés.

L'étude sera réalisée sur les horizons de surface (organo-minéraux) de sols très contrastés (a) : un sol sur roche sédimentaire carbonatée qui sera échantillonné sous 3 couverts végétaux différents (forêt, culture, prairie) (b) et (c): des sols ayant subi des apports de matières organiques particulières, soit de lisiers (sol de Bretagne), soit de HAP (sol de friche industrielle), (d) : un sol salé, (e) : un sol sur roche acide.

Les résultats obtenus seront traités statistiquement puis discutés. Cette étude permettra une première approche de la compréhension des quantités et formes de chlore retenues dans des sols courants sous climat tempéré, soumis à différentes occupations ainsi qu'une première estimation du rôle des microorganismes dans cette rétention.

## I. Contexte et objectifs de l'étude

### 1. Concentrations et stocks de chlore dans les environnements terrestres

#### A. Chlore organique

Le chlore organique est connu sous deux principales formes, soit aliphatique, soit aromatique. Sous la forme aliphatique, il est présent dans les plantes en vie et persiste après humification. Ses concentrations restent donc constantes dans l'humus. Le chlore organique aromatique, quant à lui, est insoluble pour des degrés de dégradation importants (*Leri et al, 2007*). Pendant ce processus, les concentrations en chlore organique sous forme aromatique augmentent (*Leri and Myneni, 2010*). Cette observation a été confirmée par les travaux de *Redon et al, 2011* et *Johansson et al, 2002* qui mettent en évidence une accumulation de chlore organique dans l'humus.

Les teneurs mesurées par de précédents travaux dans l'humus, les eaux, les dépôts secs, le compartiment minéral et biologique sont résumées dans le tableau 1 suivant :

**Tableau 1: Concentrations et stocks en chlore organique dans les différents compartiments de l'environnement rapporté par des études antérieures.**

Compartiment	Références	Localisation des sites	Concentrations en chlore organique	Stock de chlore organique	Flux de chlore organique
<b>Humus</b>	Redon et al, 2011	Forêt française de conifères	34 à 689 mg/kg		
	Oberg et al, 2005	Sites forestiers de la côte Sud de Suède			70 mg/m <sup>2</sup> /an
<b>Litière</b>	Johansson et al, 2002	Site forestier de Suède	45 à 1040 mg/kg		
<b>Atmosphère</b>	Oberg et al, 2005			0.1 mg/m <sup>2</sup>	
<b>Eaux de ruissèlement</b>					170 mg/m <sup>2</sup> /an
<b>Précipitations</b>			0.030 mg/L		
<b>Dépôts secs</b>			0.01 mg/L		
<b>Pluiolessivats</b>		Danemark			6 à 90 mg/m <sup>2</sup> /an
<b>Compartiment sol minéral</b>			25 à 210 mg/kg		
<b>Biomasse végétale</b>				104 mg/m <sup>2</sup>	

L'humus et la litière semblent effectivement être les compartiments les plus riches en chlore organique, avec des concentrations allant jusque 1000mg/kg. L'atmosphère et la biomasse végétale, avec des teneurs de 0.1 et 104mg/m<sup>2</sup>, respectivement, représentent également une part considérable de chlore organique. Le compartiment minéral contient également des valeurs non négligeables allant de 25 à 210mg/kg. Les précipitations et les dépôts secs, possédant des concentrations de l'ordre du dixième voire du centième de mg/L, sont relativement pauvres en chlore organique. Cependant, les pluiolessivats semblent procurer des flux de Chlore significatifs (6 à 90 mg/m<sup>2</sup>/an) (Oberg 2005) ce qui tend à montrer une récréation de chlore par les plantes lors du passage de la pluie sur les organes aériens.

En termes de flux de chlore organique, les eaux de ruissellement sont les plus riches avec une valeur de 170mg/m<sup>2</sup>/an. Ces valeurs élevées concernant des eaux circulant à l'interface atmosphère / biosphère/premières couches organiques du sol, sont cohérentes avec les flux non négligeables mesurés dans les pluiolessivats ainsi que les flux de chlore organique issus de l'humus, (70mg/m<sup>2</sup>/an, Oberg et al, 2005).

## **B. Chlore inorganique**

*Johansson et al, 2002* affirment que la source majeure de chlorures dans les sols correspond aux dépôts atmosphériques. Le chlore inorganique est au départ très présent dans les eaux de mer, conduisant ainsi à l'enrichissement des pluies en Cl- à proximité des côtes par rapport aux pluies à l'intérieur des terres. Les stocks observés dans les sols sont donc fortement influencés par la proximité à la mer.

Le compartiment microbiologique, et plus particulièrement les bactéries, sont quant à elles capables de retenir 24% du chlore inorganique total apporté en une semaine (sol forestier de Suède) (*Bastviken et al, 2007*). Le chlore ainsi retenu sera ensuite restitué aux sols pendant la dégradation des organismes. (*Kashparov et al, 2007, Leri and Myneni, 2010*).

Les stocks et flux en chlorures mesurés au cours de précédents travaux dans les différents compartiments de l'environnement sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2: Concentrations et stocks en chlore inorganique dans les différents compartiments de l'environnement.**

Compartiment	Références	Localisation des sites	Stock de chlore inorganique	Flux de chlore inorganique
Sol de forêts de conifères	Johansson et al, 2002	Suède (littoral)	30 à 50 kg/ha	
		Suède (dans les terres)	5 kg/ha	
Dépôts atmosphériques	Oberg et al, 2005	Suède		4.1 kg/ha/an
Biomasse			1.04kg/ha	
Eaux de ruissellement				4.9 kg/ha/an

Les sols de forêt, plus particulièrement de forêt de conifères, sont très riches en chlore inorganique, avec une réserve allant de 30 à 50kg/ha. Les chlorures sont également très présents dans les dépôts atmosphériques, avec un stock proche de 5kg/ha. La biomasse, quant à elle, a des teneurs en Cl<sup>-</sup> proches de 1.04kg/ha.

En termes de stocks de chlore inorganique, les dépôts atmosphériques et les eaux de ruissellement ont respectivement des valeurs de 4.1 et 4.9 kg/ha/an.

### C. Bilan chlore organique/chlore inorganique

Dans les écosystèmes forestiers, les principaux flux (entrées/sorties) de chlore sont inorganiques, tandis que les stocks sont majoritairement organiques (*Oberg et al, 2005*), témoignant ainsi du rapide turnover du chlore inorganique, ainsi que de la rapide formation de composés organiques chlorés (*Bastviken et al, 2007*). *Redon et al, 2011* estiment alors le temps de résidence du chlore total (22ans) comme étant 5 fois plus élevé que le chlore inorganique seul (4ans).

## 2. Processus importants contrôlant le cycle du Cl et sa rétention dans les sols

Divers paramètres peuvent affecter les stocks de chlore dans les écosystèmes. Par exemple, *Redon et al, 2011* rapportent que les quantités de chlore inorganique sont variables selon le climat. Ils constatent notamment que son stock est faible en climat montagnard. *Leri and Myneni, 2010* reportent également l'influence des saisons sur les teneurs de chlore organique. En effet, ces teneurs vont augmenter au printemps et en été (30 mg/kg), et baisser d'octobre à mars (12mg/kg de sol).

*Bastviken et al, 2009* précisent que, d'une manière générale, les teneurs en chlore organique augmentent avec le temps. Une évolution similaire est observée pour des températures allant de 2 et 20°C dans des conditions oxiques, ce qui laisse suggérer une influence microbienne sur la formation des composés organo-chlorés (*Bastviken et al, 2007*).

Le type de sol considéré peut également influencer sur ces stocks. *Kashparov et al, 2004* précisent notamment que la consommation de chlore organique est beaucoup plus importante sur sol calcaire que sur sol riche en matière organique.

### A. Processus de chloruration

*Matucha et al, 2006, Johansson et al, 2002* expliquent la formation de molécules organochlorées dans les écosystèmes par la chloruration de la matière organique. Ce phénomène est provoqué par les microorganismes et certains végétaux, le plus souvent des bactéries et des champignons qui, par leur activité enzymatique de chloroperoxydase, convertissent les chlorures en chlore. Le chlore ainsi formé réagit instantanément avec tout composé organique : C'est ainsi que se forment les composés organo-chlorés. Ce

phénomène de chloruration, produisant le chlore en concentrations mortelles, fait partie d'un mécanisme antagoniste visant à éliminer les compétiteurs d'une même ressource. *Oberg et al, 2005*, estiment le taux de chloruration de 0.065 à 0.04 g/m<sup>2</sup>/an pour la litière d'un sol forestier de Suède.

Des études rapportent également la formation de molécules organochlorées par des processus abiotiques (*Keppeler et al. 2000*) s'appuyant sur des réactions d'oxido-réduction reliées au cycle du fer.

La chloruration biotique de la matière organique reste cependant le processus dominant, plus précisément en conditions oxygènes où elle atteint son maximum à 20°C. *Redon et al, 2011* mettent en évidence une dépendance de la chloruration biotique au pH : optimum atteint à pH 4 et baisse pour des pH supérieurs.

## **B. Processus de déchloruration**

*Leri et al, 2010* mettent en évidence la possible déchloruration naturelle de la matière organique, favorisée par des conditions réductrices. Cette déchloruration se fait le plus souvent simplement par minéralisation du chlore organique. *Oberg et al, 2005*, estiment ce taux de minéralisation à 0.2g/m<sup>2</sup>/an.

*Leri et al, 2010* démontrent également la possible déchloruration de la matière organique par les bactéries Dehalococcoides, soit par des procédés biotiques.

## **3. Conclusion sur l'état des connaissances du cycle du chlore**

Différents travaux mettent en évidence la dynamique très variable des transformations du chlore. Cependant, les processus à l'origine des changements de spéciation sont peu documentés. Par ailleurs les paramètres environnementaux contrôlant ces processus restent à identifier.

De plus, la plupart des travaux sur le chlore concernent des études courtes réalisées sur le compartiment sol, en laboratoire, dans des écosystèmes forestiers. Il serait donc préférable d'améliorer la compréhension de cette dynamique sur le plus long terme, dans des milieux plus diversifiés, sur l'ensemble des compartiments et de tenter une approche en conditions *in situ*.

## **II. Objectifs de l'étude.**

L'étude proposée ici contribuera à la description quantitative des formes organiques et inorganiques de chlore dans des sols d'écosystèmes contrastés à l'aide d'un analyseur de type AOX. Ces quantités seront reliées aux paramètres chimiques (CEC, C, N, pH, etc.) et microbiologiques (activités bactériennes) des différents sols étudiés. D'autre part, cette étude fournira des données sur la formation ou la dégradation de molécules organo-chlorées dans ces sols au cours du temps suite à l'ajout ou non d'exudats racinaires synthétiques. Cette étape consistera à suivre l'incubation de certains sols pendant 6 semaines et permettra de mesurer l'évolution des formes de Cl en début et en fin d'expérience. Elle précisera en particulier le rôle des microorganismes du sol dans les processus naturels de formation des composés organochlorés.

L'étude sera réalisée sur les horizons de surface (organo-minéraux) de sols très contrastés (a) : un sol sur roche sédimentaire carbonatée qui sera échantillonné sous 3 couverts végétaux différents (forêt, culture, prairie) (b) et (c) : des sols ayant subi des apports de matières organiques particulières, soit de lisiers (sol de Bretagne), soit de HAP (sol de friche industrielle), (d) : un sol salé, (e) : un sol sur roche acide.

Les résultats obtenus seront traités statistiquement puis discutés.

## **III. Matériels et méthodes**

### **1. Sites et sols étudiés**

#### **A. Les sites**

L'étude a été réalisée sur 5 types de sols développés dans des contextes environnementaux contrastés (a) : un sol sur roche sédimentaire carbonatée, échantillonné sous 3 couverts végétaux différents (forêt, culture, prairie) (b) : un sol anthropisé ayant subi des apports répétés de lisiers sur plusieurs décennies, (c) : un sol naturel salé, (d) : un sol peu anthropisé sous forêt sur roche acide et (e) : un sol fortement anthropisé

de friche industrielle ayant subi une multicontamination historique de HAP et métaux. L'horizon prélevé dans ces sols correspond toujours à l'horizon organo-minéral de surface (0-20cm).

*a) Sols forestiers ou cultivés sur roche carbonatée*

Les échantillonnages ont été réalisés sur le site de l'OPE<sup>3</sup> de l'ANDRA<sup>4</sup> à Bure (55), en Meuse, près de la commune de Montier sur Saulx. Le site se situe à une altitude de 339 mètres. Le climat est continental pour une température moyenne annuelle de 10°C et une pluviométrie de 1050mm (Andra (2009)). Les sols ont été prélevés sur les calcaires du Barrois datant du Tithonien sous trois couverts végétaux : sous prairie et sous culture, où il s'agit alors de sols bruns calcaires ainsi que sous forêt, où il s'agit de sols bruns calciques voire de rendzines brunifiés. Le profil du sol correspondant est présenté en annexe 1.

*b) Sol cultivé soumis à des amendements de lisier*

Le site échantillonné, situé au Sud-Ouest de la Bretagne, fait partie d'un site expérimental de L'INRA de Rennes. Il se trouve près de la commune de Fougères, dans le département de l'Ille et Vilaine (35) à proximité de l'Océan Atlantique. Le climat est de type océanique avec une pluviométrie de 1161mm/an, et une température moyenne de 11.85°C (température maximale est de 17.6°C en Juillet et minimale de 6.1°C en Janvier).

Les sols ont été prélevés sur une roche leucogranitique datant du jurassique et correspondent à des sols bruns sablo-limoneux. Leur couvert végétal correspond alors à une prairie.

Ces sols ont été choisis du fait de leur proximité à la mer, qui devrait, d'après la littérature, conduire à des teneurs en chlore très importantes. Le profil du sol correspondant est présenté en annexe 2.

*c) Sol salé*

Le sol salé est un sol de la région de Marsal (57), situé dans le Parc naturel régional de Lorraine et faisant partie du Conservatoire des Sites Lorrains. Il a été prélevé à proximité des mares salées de la région, et se situe à une altitude de 252m pour une température moyenne de 10°C (climat continental) et une pluviométrie de 765mm (données de la station de Metz Frescaty).

Les sols correspondants se forment sur une formation argilo-silteuse datant du Norien, et correspondent en réalité à un redoxisol voire à un pseudogleys. Le profil du sol correspondant est présenté en annexe 3.

*d) Sol acide forestier*

Le sol sur roche acide a été prélevé dans les Vosges (88), à proximité du col du Haut Jacques. Le site se situe à une altitude de 605m, et son climat est continental avec une température moyenne annuelle de 10.4°C pour une pluviométrie de 1126mm.

Le substrat correspondant correspond au grès vosgien, datant du Permien-Trias. Les sols sont des sols bruns acides occupés par une forêt de conifères, essentiellement des sapins, des hêtres et des pins. Il s'agit de sol peu différencié riche en sable et en matière organique à pH très faible (environ 3). Le profil du sol correspondant est présenté en annexe 4.

---

<sup>3</sup> OPE : Observation pérenne de l'environnement

<sup>4</sup> ANDRA : Agence nationale de traitement des déchets radioactifs

### e) Sol de friche industrielle

Le sol de friche industrielle prélevé correspond à un sol de l'ancienne coquerie de Neuve-Maison, qui a été utilisé à Homécourt (54) dans une station expérimentale appartenant au GISFI<sup>5</sup> pour étudier la réhabilitation de sols contaminés en conditions *in situ*.

L'altitude du site est d'environ 229m, pour une température moyenne de 10°C sous climat continental et une pluviométrie de 763mm.

Il s'agit d'un sol riche en HAP. Plus précisément, ce sol est contaminé par du phénanthrène, du pyrène ou encore fluorenthène ainsi que par des métaux lourds tels que le Zinc et le plomb.

## B. Méthode d'échantillonnage et traitement préalable des échantillons

Sur chaque site, les sols ont été échantillonnés en trois points à quelques mètres de distance. Chacun de ces points résultent de trois prélèvements homogénéisés sur le terrain (annexe 5). Trois répétitions moyennes sont ainsi obtenues pour chaque sol afin de limiter tout effet de variabilité spatiale.

Dès le retour au laboratoire, l'humidité initiale est mesurée. Une partie des sols échantillonnés est stockée en chambre froide à -20°C pour les mesures d'activité bactérienne ultérieures. Le reste des sols est séché à l'air pendant plusieurs semaines, puis tamisé à 2mm avant les autres analyses.

La mesure des teneurs en chlorures des sols, quant à elle, nécessite le lavage des sols par 10mL d'une solution de nitrate. Les chlorures des sols sont alors mesurés dans cette solution.

## 2. Incubations : dispositif expérimental

Trois sols ont été sélectionnés pour les essais d'incubations: le sol brun calcaire cultivé (point 2), le sol salé (point 1) et le sol brun acide forestier (point 2). Un seul des trois points de prélèvement a donc été utilisé. Ces sols ont été choisis en raison de leur teneur en chlore très contrastée (teneurs très élevées pour le sol salé, moyennes pour le sol brun acide forestier et faible pour le sol brun calcaire cultivé), permettant ainsi d'observer l'influence du type de sol sur l'évolution de ces teneurs.

Les sols sont ainsi mis en incubation selon 2 modalités, avec et sans ajout initial d'exsudats racinaires synthétiques. Avant cela, les sols sont réhumidifiés à 80% de leur capacité au champ soit par ajout d'eau (modalité sans exsudat) soit par ajout d'eau + 2.5mL d'exsudats racinaires synthétiques pour la modalité avec exsudats (annexe 6).

Chacun de ces sols, selon les 2 modalités, a été incubé en 3 réplicas afin de limiter les erreurs de manipulation et de mesure (soit 18 échantillons). Pour cela, dix grammes de chaque échantillon de sol séché à l'air sont placés dans des flacons de 500 ml préalablement stérilisés. Dix-huit flacons au total sont mis en incubation dans une chambre à 24 °C. (Annexe 7)

La solution d'exsudats racinaires synthétiques est obtenue en diluant 9.007g de fructose, 9.908g de glucose, 17.114g de sucrose, 2.952g de succinate, 3.352g de malate, 2.177g d'arginine, 1.313g de serine, 1.512g de cystéine, 0.08g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> et 0.156g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1L d'eau distillée. La solution mère ainsi obtenue a une concentration en carbone de 18.6mgC/mL. La solution rajoutée initialement dans les flacons est une solution fille de 2mgC/mL obtenue en diluant 10.7527 mL de solution mère dans 100 mL d'eau distillée.

Tous les flacons sont ensuite bouchés et mis à incuber pendant 6 semaines en chambre d'incubation à 24°C. Une mesure du CO<sub>2</sub> libéré est réalisée tous les deux ou trois jours. Une étape d'aération des flacons est également réalisée pendant 15 min après chaque mesure de CO<sub>2</sub>, afin d'apporter l'oxygène nécessaire aux bactéries aérobies entre deux mesures.

Après les 3 premières semaines d'incubation, 0.5mL de solution mère d'exsudats racinaires (Soit 9mg de carbone) sont ajoutés aux flacons modalité « avec exsudat » afin de relancer l'activité bactérienne.

---

<sup>5</sup> GISFI : groupement d'intérêt scientifique sur les friches industrielles



Ces incubations ont été mises en place afin de suivre l'évolution des formes de chlore aux cours du temps. Plus précisément, les mesures de teneurs en chlore dans les sols avant et après incubations permettront de déterminer le rôle des microorganismes sur la dégradation du chlore.

### **3. Analyses réalisées sur les sols**

#### **A. Microbiologie**

##### *a) Mesure de l'hydrolyse de la FDA*

La mesure de l'hydrolyse de la FDA, ou fluorescéine diacetate, est une méthode qui permet de mesurer l'activité microbienne globale d'un échantillon de sol. Le principe repose sur l'apport de FDA dans le milieu de vie des microorganismes qui, sous l'action de différentes enzymes hydrolytiques microbiennes (lipases, protéases, estérases...), va être hydrolysé et va libérer de la fluorescéine. La quantité de fluorescéine libérée va être mesurée grâce aux propriétés de fluorescence de cette molécule par spectrofluorométrie. Plus l'intensité de fluorescence est importante, plus l'activité FDA hydrolase est importante et donc de manière générale, plus l'activité microbienne dans l'échantillon analysé est élevée.

Concrètement, les mesures de l'hydrolyse de la FDA sont réalisées en microplaque noire afin d'éviter les contaminations de fluorescence entre les puits et afin d'obtenir un grand nombre de réplicats qui permettront d'homogénéiser les résultats et de limiter les erreurs de mesure. Les microplaques sont ainsi remplies avec les solutions de sols, la solution tampon, la solution de FDA ou de l'eau comme décrit sur l'annexe 7. Les protocoles de préparation des solutions figurent en annexe 8.

Afin de suivre l'évolution de la réponse des microorganismes au cours du temps, les microplaques sont lues au spectrofluoromètre toutes les heures pendant 6 heures. Les données ainsi obtenues nécessitent ensuite un traitement informatique mais également la réalisation préalable d'une gamme étalon de fluorescéine (voir protocole en annexe 9).

Dans cette étude, les essais de FDA sont réalisés à la fois sur le sol frais quelques heures après prélèvement sur le terrain (Dates de prélèvement et conditions météorologiques différentes selon les sites) mais également sur les sols séchés puis réhumidifiés au même moment et dans les mêmes conditions. Pour cette étape, les sols sont réhumidifiés à humidité initiale. La réactivation de l'activité microbienne se fait ensuite par la mise en chambre d'incubation à 24°C pendant 48h.

##### *b) Extractions ADN*

Une des manières permettant d'avoir accès aux microorganismes présents dans un sol consiste à analyser l'ADN des ces microorganismes. Pour cela, une étape préliminaire d'extraction de l'ADN présent dans chaque échantillon de sol est nécessaire. Cette étape a pour but d'obtenir de grandes quantités d'ADN cible. Dans ce travail, la région ciblée lors de l'amplification par PCR est un fragment de la sous unité 16S de l'ADN ribosomique bactérien. L'analyse des produits PCR, ou amplicons, doit ensuite permettre d'analyser la diversité et la structure des communautés bactériennes présentes dans les différents échantillons de sol étudiés.

L'extraction d'ADN consiste à lyser les cellules bactériennes et à libérer leurs contenus cellulaires, dont les acides nucléiques, dans un tampon. Ces acides nucléiques sont séparés des protéines par une extraction de phase dans un mélange Phénol/chloroforme puis précipités dans l'isopropanol. Le protocole plus détaillé est présenté en annexe 10.

##### *c) PCR*

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, permet de répliquer une portion de taille connue d'ADN en très grande quantité. Pour cela, l'ADN est tout d'abord dénaturé, afin d'obtenir de l'ADN à l'état de simple brin. Les amorces viennent ensuite s'hybrider de manière spécifique à chacun des simples brins et délimitent ainsi la région d'ADN à amplifier. Finalement, l'ADN polymérase (Taq polymérase) va permettre de réaliser la réplification de l'ADN délimité par les amorces. (annexe 11) L'ensemble de ces étapes constitue un cycle. Une PCR se réalise sur un nombre de cycles choisis. Dans cette étude, la PCR fonctionne pour 33 cycles. La taille de la portion d'ADN répliquée est de 475 paires de bases. Cette étape de réplification des brins d'ADN est nécessaire avant chaque analyse en biologie moléculaire.

L'étape de PCR se fait par l'ajout d'un ensemble de réactifs à l'extrait d'ADN. L'ensemble est ensuite placé dans un thermocycleur pendant environ 2h30. Le protocole plus détaillé est présenté en annexe n°11.

*d) Migration sur gel*

**B. Electrophorèse sur gel d'agarose**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une étape qui permet de visualiser l'ADN. Elle sert à estimer la qualité (taille) et la quantité de l'ADN extrait ou amplifié par PCR. Pour cela, une première étape consiste à couler un gel d'agarose avec des puits. Le gel ainsi obtenu est placé dans une cuve contenant le tampon de migration (TAE) et les puits sont remplis avec les amplicons mélangés à un tampon de charge. Un puit est chargé avec un marqueur de taille (mélange de molécules d'ADN de tailles connues). Un courant électrique (125V) est ensuite appliqué au gel pendant 20min afin de faire migrer l'ADN (chargé négativement) présent dans les puits. Après cette étape, le gel est placé dans un bain de bromure d'éthidium puis rincé pour être enfin soumis à un rayonnement UV qui permet de visualiser l'ADN. En effet, le bromure d'éthidium vient s'intercaler entre les brins d'ADN et devient alors fluorescent lorsqu'il est soumis à un rayonnement UV. Une image numérique de gel est ensuite enregistrée grâce à une caméra reliée à un ordinateur (Geldoc, Biorad). Le résultat obtenu est une image présentant des bandes qui permettent de savoir si l'ADN a été correctement amplifié. Le protocole plus détaillé est présenté en annexe 12.

**C. Physico-chimie des sols**

*a) pH*

Le pH des sols est mesuré dans des solutions de sol à l'aide d'un pH-mètre (Choffel Electronique). Celles-ci sont préparées en mélangeant 10g de sol à 50mL d'eau déminéralisée. Le tout est alors agité et repose pendant 24h avant les mesures.

Le pH KCl des sols a également été mesuré. La mesure se fait alors de la même façon mais dans une solution de sol réalisée avec du KCl (1M 74.55g/L)

*b) Teneurs en carbone et azote totaux et rapport C/N*

La mesure des concentrations totales en carbone et en azote des échantillons de sol est réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire classique. (Flash EA 1112 Thermo)

Pour cela, 30mg de sol séché et broyé sont déposés dans une capsule en étain qui sera ensuite introduite dans l'analyseur. La capsule subit ensuite une combustion par pyrolyse. Les gaz issus de cette combustion sont alors analysés et les résultats obtenus permettent de déduire les concentrations en carbone et en azote des échantillons.

*c) Chlorures*

L'analyse des chlorures est réalisée sur des solutions de lavage de nitrate des sols après filtration de celles-ci à 0.2µm par chromatographie ionique (Dionex CS 3000).

L'échantillon est injecté dans une colonne de résine (alkyl d'ammonium) chargée positivement. Les chlorures de l'échantillon vont donc se fixer sur la colonne. Ils seront ensuite décrochés et transportés par un éluant (KOH) vers une cellule conductimétrique en fonction de leur vitesse, elle-même dépendant de leur charge et de leur taille. L'utilisation d'étalons permet ensuite d'accéder aux concentrations.



#### *d) Autre paramètres physico-chimiques.*

Les autres paramètres physico-chimiques analysés sur les échantillons de sols sont réalisés par le LAS<sup>6</sup> de l'INRA d'Arras. Ils correspondent à : la granulométrie 5 fractions, le calcaire (CaCO<sub>3</sub>), le phosphore (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) par la méthode Olsen, la capacité d'échange cationique par la Méthode Metson, le Fe par la méthode Mehra-Jackson, Ca, Mg, Mn, K et le Na échangeables par extraction à l'acétate d'ammonium.

#### *e) Chlore*

Les mesures de chlore sont réalisées à l'aide d'un appareil nommé AOX (Xplorer TE Instruments) chez TE Instruments, aux Pays Bas.

Il permet de déterminer les teneurs en halogènes totales d'un échantillon. Les halogènes correspondent alors ici au Brome, à l'Iode mais également au Chlore. Or, la somme des teneurs en Iode et en Brome est considérée comme négligeable car elle est généralement inférieure à 1%. Les teneurs en halogènes mesurées par AOX sont alors considérées comme égales aux teneurs en chlore. Pour cela, une prise d'essai de 2g de sol tamisé et broyé est nécessaire. Une portion de cette prise d'essai subit directement une combustion par pyrolyse. Les gaz issus de cette combustion sont analysés et permettent d'accéder aux concentrations en chlore total. Pour les teneurs en chlore organique, 20mg de sol tamisé et broyé sont mélangés à 30mg de charbon actif et à 10mL de solution de lavage de nitrate. Cette solution correspond à du NaNO<sub>3</sub>, 0.2mol/L. Le tout est ensuite filtré soit sur un filtre en polycarbonates (étape réalisée au Limos), soit sur un fritté (étape réalisée par TE Instruments aux Pays-Bas). La combustion du filtre et du sol restant sur le filtre permet alors de déterminer les teneurs en chlore organique. En effet, le chlore organique retenu dans la microporosité du charbon actif est recueilli et dosé lors de la combustion. Le chlore inorganique est ensuite déduit en utilisant la formule : chlore total – chlore organique

Les teneurs en chlorures obtenues par cette méthode pourront ensuite être comparées à celles observées dans la solution de nitrate, mesurées par chromatographie ionique.

#### *f) Traitement statistique*

Les données sur les activités bactériennes, les teneurs en chlore dans les sols et la chimie des sols ont été traitées à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2003 et plus particulièrement grâce à l'utilitaire d'analyse complémentaire que constitue XL Stat. Cette partie de traitement a fait intervenir certains outils statistiques tels que l'ACP (analyse en composante principale). Cet outil correspond à un système de projection complexe de variables. Il permet une analyse multi-variée qui met en évidence des corrélations entre variables.

## **IV. Résultats**

### **1. Caractéristiques physico-chimique des sols.**

Les codes des échantillons de sols utilisés dans cette partie sont explicités en annexe 13.

#### **A. Granulométrie**

Les résultats concernant la granulométrie des sols étudiés (terre fine < 2mm) sont présentés en annexe 14.

Le sol brun sous prairie fortement enrichi en lisier est riche en particules grossières, en particules en sables grossiers, qui représentent alors une teneur de 507 mg/kg. La teneur en sables grossiers du sol issu de la friche industrielle est de 523 mg/kg. Le sol brun acide forestier, quant à lui, est très riche en éléments

---

<sup>6</sup> LAS : Laboratoire des Analyses de Sol

grossiers comme les sables grossiers et les sables fins. (respectivement 430 et 25mg/kg). Ce sol est également pauvre en limons grossiers, avec une teneur de 47mg/kg. Les fractions des limons fins et des argiles sont cependant importantes, car proches de 100mg/kg. Le sol salé est riche en éléments fins, avec une teneur en argiles de 661 mg/kg. Le sol brun calcaire cultivé, a une concentration en argile relativement élevée de 353mg/kg. Enfin, les fractions prédominantes dans les sols bruns calcaire forestiers acides et dans les sols bruns calcaires de prairie correspondent à la fraction argileuse, avec des teneurs de 291 et 256mg/kg, respectivement.

## B. Teneurs en éléments chimiques totaux

Le tableau correspondant aux résultats des analyses chimique réalisées sur les sols est présenté en annexe 15.

Le sol brun à forts apports en lisier a des teneurs faibles en de nombreux éléments. Il est en effet pauvre en calcium (4mg/kg), en magnésium (0.05mg/kg), en potassium (0.05mg/kg), en manganèse (2mg/kg) ou encore en Fer (0.7mg/kg). A l'inverse, le sol de friche industrielle est riche en calcium et en fer, pour des concentrations de 27.4 et 9mg/kg. Le sol salé, quant à lui, est riche en Sodium et en magnésium (27 et 1.3mg/kg). Aucune tendance particulière n'est visible pour les autres sols, exceptés pour le sol brun calcaire cultivé, qui est pauvre en manganèse, avec une teneur de 4mg/kg.

## C. pH

Les pH des différents sols sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

**Tableau 3: Données de pH eau et pH KCl des échantillons de sols**

échantillon	pH eau	pH KCl
NM1	7,24	6,83
NM2	7,05	6,89
NM3	7,13	6,73
OPE F1	5,89	4,64
OPE F2	5,7	4,7
OPE F3	5,69	4,8
OPE C1	7,45	6,78
OPE C2	7,49	6,81
OPE C3	7,37	6,84
OPE P1	5,41	4,38
OPE P2	5,42	4,37
OPE P3	5,26	4,3
V1	3,73	2,81
V2	3,86	2,82
V3	3,9	2,82
HJ1	6,69	6,13
HJ2	6,24	5,71
HJ3	5,32	4,87
KF5B	5,76	4,94
KF2	5,15	4,14
KF4	5,37	4,5

Comme attendu, les pH KCl (acidité d'échange) correspondant à l'acidité potentielle, sont très légèrement inférieurs aux pH eau correspondant à leur teneur en ion H<sup>+</sup> présents librement dans les solutions de sol.

Les pH des sols de friche industrielle (NM1, NM2, NM3) et ceux du sol brun calcaire cultivé (C1, C2, C3) sont neutres à légèrement basiques avec des valeurs proches de 7.

Sur roches acides, comme nous pouvions le supposer les pH des sols sont acides. C'est plus particulièrement le cas pour le sol brun acide forestier (V1, V2, V3) dont les pH avoisinent une valeur de 4.

Les autres sols (F1, F2, F3, P1, P2, P3, HJ1, HJ2, HJ3, KF5B, KF2, KF4) ont des pH proches de 6.

## D. Teneurs en C et N

Concernant les données sur le carbone et l'azote, les résultats sont bien plus hétérogènes (tableau 4).

échantillon	N (mg/g)	C (mg/g)	C/N
HJ1	17,80	186,13	10,46
HJ2	4,67	37,50	8,03
HJ3	17,45	249,61	14,31
KF2	3,84	32,53	8,46
KF4	5,14	42,92	8,35
KFB	4,48	43,43	9,70
NM1	3,33	71,56	21,51
NM2	4,13	88,60	21,43
NM3	3,01	59,64	19,83
OPE F1	9,90	66,90	6,76
OPE F2	3,61	42,86	11,87
OPE F3	6,60	33,96	5,15
OPEC1	3,05	29,55	9,69
OPEC2	2,58	21,14	8,21
OPEC3	2,85	21,17	7,44
OPEP1	3,56	31,74	8,92
OPEP2	4,89	39,08	7,99
OPEP3	4,32	34,65	8,02
V1	6,67	108,38	16,25
V2	4,86	79,09	16,26
V3	5,89	85,30	14,47

## E. Chlorures

Les teneurs en chlorures mesurées sur des eaux de lavage des différents sols, sont présentées dans le tableau 5 ci-dessous,

**Tableau 5: Teneurs Cl<sup>-</sup> des échantillons de sols.**

Les teneurs en ions Cl<sup>-</sup> sont très élevées (environ 1mg/g de sol) dans le sol salé (HJ1, HJ2 et HJ3). La moyenne des concentrations en Cl<sup>-</sup> dans les autres sols est d'environ 0.25 mg/g de sol.

**Tableau 4: Teneurs en Carbone et en azote des divers échantillons de sol.**

Les sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3) semblent être les plus riches en azote total, avec des teneurs dépassant les 17mg/g de sol. La répétition 2 fait cependant exception, avec des valeurs sensiblement plus faibles (4.67mg/g). Les teneurs sont plus basses, de 8.5mg/g en moyenne dans le sol brun acide forestier (V1, V2 et V3). Les autres sols ont des concentrations en azote à peu près similaires, avoisinant les 3-4mg/g de sol en moyenne. Cependant, ces teneurs moyennes sont différentes du sol brun calcique forestier (F1, F2 et F3), car les différents points donnent des résultats très variables. En effet les répétitions 1, 2 et 3 ont des teneurs en azote de 10, 3.6 et 6.6mg/g, respectivement.

De façon générale, la répartition des teneurs en azote total et en carbone total est la même sur l'ensemble des échantillons. Les sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3) ont des teneurs en carbone élevées, autour des 200mg/g de sol. La répétition 2 fait toujours exception, avec une concentration basse d'environ 40mg/g. Les teneurs en carbone total du sol brun acide forestier ont une teneur moyenne de 90mg/g (les répétitions (F1, F2 et F3) sont encore très hétérogènes). Les sols bruns calcaires sous prairie et calcique forestier ont une concentration en carbone à hauteur de 40 mg/g, Les valeurs sont légèrement plus élevées (moyenne de 70mg/kg) dans les sols de friche industrielle (NM1, NM2 et NM3). Les teneurs sont plus faibles, avoisinant les 20mg/g dans le sol brun calcaire cultivé (C1, C2 et C3)

échantillon	Cl <sup>-</sup> (mg/g de sol)
OPE F1	0,4
OPE F2	0,35
OPE F3	0,2
NM 1	0,7
NM 2	0,25
NM 3	0,25
OPE P1	0,2
OPE P2	0,3
OPE P3	0,25
V1	0,95
V2	0,25
V3	2
OPE C1	0,25
OPE C2	0,3
OPE C3	0,25
KFB	0,25
KF2	0,25
KF4	0,25
HJ1	1
HJ2	0,8
HJ3	0,9

## F. CEC

Le tableau 6 résumant les CEC moyennes des différents sols étudiés est représenté ci-dessous.

**Tableau 6: CEC moyenne des sols.**

Les CEC correspondent au CEC moyennes calculées sur les 3 points de chaque sol.

Echantillon	CEC (cmol/Kg)	Ecart-type
F	17,7	0,97
C	17,0	0,19
P	14,5	0,31
V	16,8	3,19
HJ	37,1	6,59
NM	15,0	0,53
K	8,7	1,46

La capacité d'échange cationique, de 37cmol/kg, est très importante pour le sol salé. A l'inverse, le sol brun à apport élevés en lisier a une CEC très faible, soit de 8.7cmol/kg. Les autres sols ont une CEC se situant entre 15 et 18cmol/kg. Ces données sont globalement cohérentes avec les données granulométriques et de teneurs en carbone : les sols à fractions minérales les plus grossières et/ou à teneurs en carbone faibles sont aussi ceux avec une CEC faible, alors que les sols les plus riches en argiles et/ou carbone (et matière organique) sont ceux qui possèdent une capacité d'échange élevée.

## 2. Formes de chlore dans les sols

### A. Teneurs en chlore des sols

Les teneurs en chlore organique et inorganique des échantillons de sols sont présentées dans le tableau 7 ci-dessous.

échantillon	TX (mg/kg)	TOX filtre(mg/kg)	TX-TOX (mg/kg)	TOX fritté (mg/kg)	TX-AOX (mg/kg)
KF5B	64,41	76,13	-11,72	84,15	-19,74
KF2	49,6	83	-33,4	40,84	8,76
KF4	72,83	222,58	-149,75	79,09	-6,26
OPE C1	31,88	76,68	-44,8	30,15	1,73
OPE C2	35,55	80,54	-44,99	35,94	-0,39
OPE C3	31,22	104,61	-73,39	54,59	-23,37
OPE F1	34,62	315,98	-281,36	34,56	0,06
OPEF2	89,98	55,46	34,52	17,31	72,67
OPE F3	39,9	102,16	-62,26	25,02	14,88
OPE P1	31,08	82,15	-51,07	14,34	16,74
OPE P2	25,34	56,19	-30,85	15,17	10,17
OPE P3	34,29	62,17	-27,88	31,72	2,57
HJ1	8550	77,69	8472,31	594,53	7955,47
HJ2	6500	430,51	6069,49	133,08	6366,92
HJ3	10930	273,39	10656,61	553,34	10376,66
NM1	59,04	105,53	-46,49	36,66	22,38
NM2	45,82	152,44	-106,62	30,36	15,46
NM3	42,05	87,38	-45,33	34,58	7,47
V1	131,65	112,82	18,83	140,52	-8,87
V2	149,62	175,88	-26,26	129,44	20,18
V3	104,56	116,7	-12,14	120,73	-16,17

**Tableau 7: Teneurs en chlore total, organique et inorganique des échantillons de sols.**

TX : halogènes ≈ chlore total

TOX : chlore organique

TX-TOX : chlore inorganique

Les TOX sont obtenus de deux façons : après filtration sur un filtre en polycarbonates quelques jours avant analyses et après utilisation d'un fritté juste avant analyse.

l'ordre de la dizaine de g/kg. Le sol brun acide forestier (V1, V2 et V3) se démarque également, avec des concentrations supérieures à 100mg/kg. Les sols de friche industrielle (NM1, NM2 et NM3) et les sols bruns calciques forestiers (F1, F2 et F3), sont moins riches avec des concentrations moyennes de 46 et 61 mg/kg, respectivement. Les autres sols ont des teneurs moyennes en chlore total plus faibles avoisinant les 30mg/kg,

### *b) Chlore organique*

La méthode de mesure du chlore organique par filtration sur filtre en polycarbonate donne des résultats assez peu cohérents. En effet dans ce cas, les teneurs en chlore organique dépassent celles du chlore total. Ces observations sont probablement dues à une adsorption de chlore inorganique atmosphérique sur les échantillons à analyser pendant leur temps de stockage avant analyse. Ces résultats ne seront donc plus pris en compte pour la suite de l'étude. Les résultats sont plus cohérents avec la seconde méthode utilisant un fritté juste avant analyse. Cependant, l'utilisation d'un fritté pour la détermination des teneurs en chlore organique aboutit encore à des teneurs en chlore organique parfois supérieures à celle en chlore total, suggérant encore un peu de pollution par du chlore atmosphérique et/ou des différences la précision de la mesure.

Les sols les plus riches en chlore organique correspondent aux sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3), avec des teneurs atteignant presque les 600mg/kg. Les sols bruns acides forestiers sont également riches en chlore organique, avec une concentration moyenne de 130 mg/kg. Les autres sols ont des teneurs en chlore sensiblement similaires, proches de 30mg/kg.

### *c) Chlore inorganique*

#### *i. Chlore inorganique mesuré par AOX*

Les teneurs en chlore inorganique sont calculées ici en utilisant la formule suivante :

$$\text{Chlore total} - \text{chlore organique} = \text{chlore inorganique}$$

Soit

$$\text{TX} - \text{TOX} = \text{chlore inorganique}$$

Les teneurs en chlore mesurées dans les différents sols sont soit très variables pour un même type de sol, soit négatives (comme décrit précédemment). Il est donc difficile de comparer les résultats.

La seule tendance observée correspond aux teneurs très importantes en chlore inorganique dans les sols salés, pouvant dépasser les 10 000mg/kg.

#### *ii. Comparaison aux teneurs en chlorures présents dans la solution de lavage des sols*

Le tableau 8 qui permet la comparaison des teneurs en chlore inorganique déduites des teneurs mesurées par AOX et obtenues dans les solutions de lavage des sols est présentée ci-dessous.

échantillon	Cl- (mg/kg)	TX-AOX (mg/kg)
<b>KF5B</b>	0,25	-19,74
<b>KF2</b>	0,25	8,76
<b>KF4</b>	0,25	-6,26
<b>OPE C1</b>	0,25	1,73
<b>OPE C2</b>	0,3	-0,39
<b>OPE C3</b>	0,25	-23,37
<b>OPE F1</b>	0,4	0,06
<b>OPEF2</b>	0,35	72,67
<b>OPE F3</b>	0,2	14,88
<b>OPE P1</b>	0,2	16,74
<b>OPE P2</b>	0,3	10,17
<b>OPE P3</b>	0,25	2,57
<b>HJ1</b>	1	7955,47
<b>HJ2</b>	0,8	6366,92
<b>HJ3</b>	0,9	10376,66
<b>NM1</b>	0,7	22,38
<b>NM2</b>	0,25	15,46
<b>NM3</b>	0,25	7,47
<b>V1</b>	0,95	-8,87
<b>V2</b>	0,25	20,18
<b>V3</b>	2	-16,17

**Tableau 8 : Teneurs en chlore inorganique mesurées par AOX et dans les solutions de lavage des sols**

Les teneurs en chlore mesurées par AOX et mesurées par chromatographie ionique dans les solutions de lavage des sols sont sensiblement différentes. En effet les teneurs mesurées sur les solutions de lavage des sols sont très largement inférieures à celles mesurées par AOX.

De plus, les données souvent négatives en chlore inorganique mesuré par AOX ne permettent pas de comparaison entre les différentes mesures.

La seule tendance cohérente observée pour les mesures de chlore inorganique par AOX et dans les solutions de lavage des sols est que le sol salé est le plus riche en chlorures.

#### *d) Prédominances entre les formes organiques et minérales*

Les teneurs en chlore organique correspondent à celles en chlore total pour le sol brun calcaire cultivé (C1, C2, C3), le sol brun acide forestier (V1, V2 et V3) ainsi que pour le sol brun à apport en lisier (KF5B, KF2, KF4). Le chlore inorganique représente alors une forme négligeable.

A l'inverse le chlore inorganique est prédominant chez les sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3). La situation intermédiaire est observée pour le sol issu de friche industrielle (NM1, NM2 et NM3) ainsi que pour le sol brun calcaire de prairie (P1, P2 et P3). En effet la proportion de chlore organique reste prédominante chez ces 2 types de sols, mais avec une part de chlore inorganique qui est importante.

### **3. Microbiologie**

#### **A. Activité bactérienne**

La mesure de l'activité bactérienne est réalisée sur les échantillons de sol frais ainsi que sur les sols secs tous ré-humidifiés et analysés au même moment et dans les mêmes conditions. Le suivi de l'activité se fait alors sur 6 heures.

Le résultat des activités bactériennes pour l'ensemble des sols frais et ré-humidifiés sont présentés ci-dessous (tableau 9). Le détail des calculs est présenté sur l'annexe 16.

**Tableau 9: Résultats des activités bactériennes des différents échantillons de sols pour les sols frais et pour les sols ré-humidifiés.**

C : moyenne des activités OPE C1, OPE C2, OPE C3  
 F : moyenne des activités OPE F1, OPE F2, OPE F3  
 HJ : moyenne des activités HJ1, HJ2 et HJ3  
 K : moyenne des activités KF5B, KF2, KF4  
 NM : moyenne des activités NM1, NM2 et NM3  
 P : moyenne des activités OPE P1, OPE P2 et OPE P3  
 V : moyenne des activités V1, V2 et V3

**Sols frais**

Echantillon	moy ( $\mu$ U)	Ecart-type
<b>C</b>	12,6347	0,00204
<b>F</b>	15,1977	0,00060
<b>HJ</b>	19,2045	0,00529
<b>K</b>	22,1921	0,00363
<b>NM</b>	4,6068	0,00251
<b>P</b>	18,0181	0,00350
<b>V</b>	19,8806	0,00120

**Sols ré-humidifiés**

Echantillon	moy ( $\mu$ U)	Ecart-type
<b>C</b>	1,0431	0,00016
<b>F</b>	0,9974	0,00045
<b>HJ</b>	0,7247	0,00078
<b>K</b>	0,8246	0,00011
<b>NM</b>	0,2825	1,754E-05
<b>P</b>	1,4222	0,00018
<b>V</b>	0,6684	0,00012

*a) Activité globale microbienne sur sols frais*

Le sol le plus actif (avec une activité de 22.2 $\mu$ U/g de sol mesurées par l'activité enzymatique de FDA), est le sol brun sous prairie fortement anthropisé, où des apports de lisier ont été réalisés pendant de nombreuses années (KF5B ; KF2, KF4). Le sol forestier acide et le sol salé sous prairie ont des activités bactériennes également très importantes, proches de 19 $\mu$ U. Enfin sur roche calcaire les microorganismes sont plus actifs dans les sols sous prairie (18 $\mu$ U) puis sous forêt (15 $\mu$ U), les sols sous culture ayant des activités globales plus faibles (12 $\mu$ U). Le sol de friche industrielle (NM1, NM2 et NM3) a une activité très faible, de seulement 4.6 $\mu$ U.

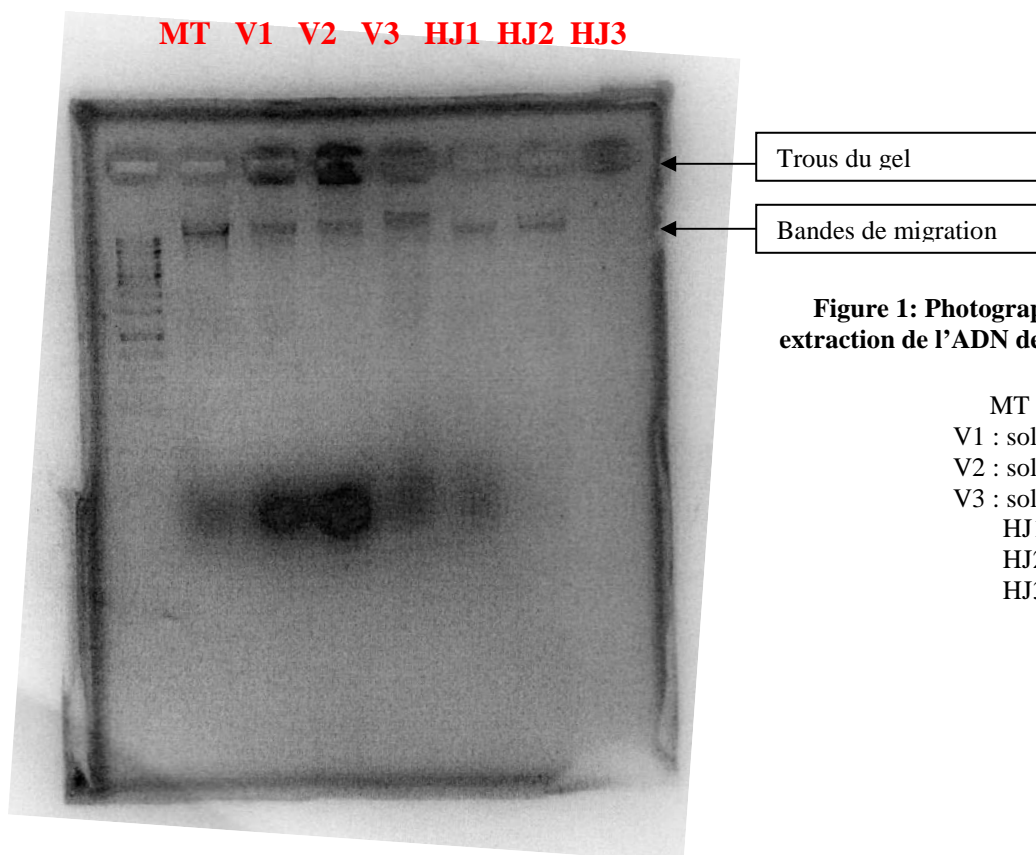
*b) Activité globale microbienne sur sols réactivés*

Les activités des sols ré-humidifiés sont beaucoup plus faibles que celles mesurées initialement sur les mêmes sols, frais. Par ailleurs, l'ordre des activités selon les types de sols sont sensiblement différentes de celles observées sur sol frais.

Le sol le plus actif correspond au sol calcaire sous prairie (P1, P2 et P3), avec une activité de 1.4 $\mu$ U. Ce même sol sous culture (C1, C2 et C3) a également des activités très importantes, de 1 $\mu$ U environ. Les activités du sol salé (HJ1, HJ2, HJ3), du sol brun a apport en lisier (KF5B, KF2, KF4) et du sol brun acide (V1, V2 et V3) sont très similaires, proches de 0.7 $\mu$ U. Enfin le sol le moins actif reste le sol d'ancienne friche industrielle (NM1, NM2 et NM3) avec une activité de 0.2 $\mu$ U.

## **B. Biologie moléculaire**

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet d'estimer la qualité et la quantité d'ADN extrait ou amplifié par PCR. L'image du gel est numérisée et les résultats obtenus se présentent sous la forme de la figure 1, ci-dessous.



**Figure 1: Photographie du gel de migration après extraction de l'ADN des sols acides forestiers et des sols**

MT : Marqueur de taille  
 V1 : sol acide forestier, point 1  
 V2 : sol acide forestier, point 2  
 V3 : sol acide forestier, point 3  
 HJ1 : sol salé, point 1  
 HJ2 : sol salé, point 2  
 HJ3 : sol salé, point 3

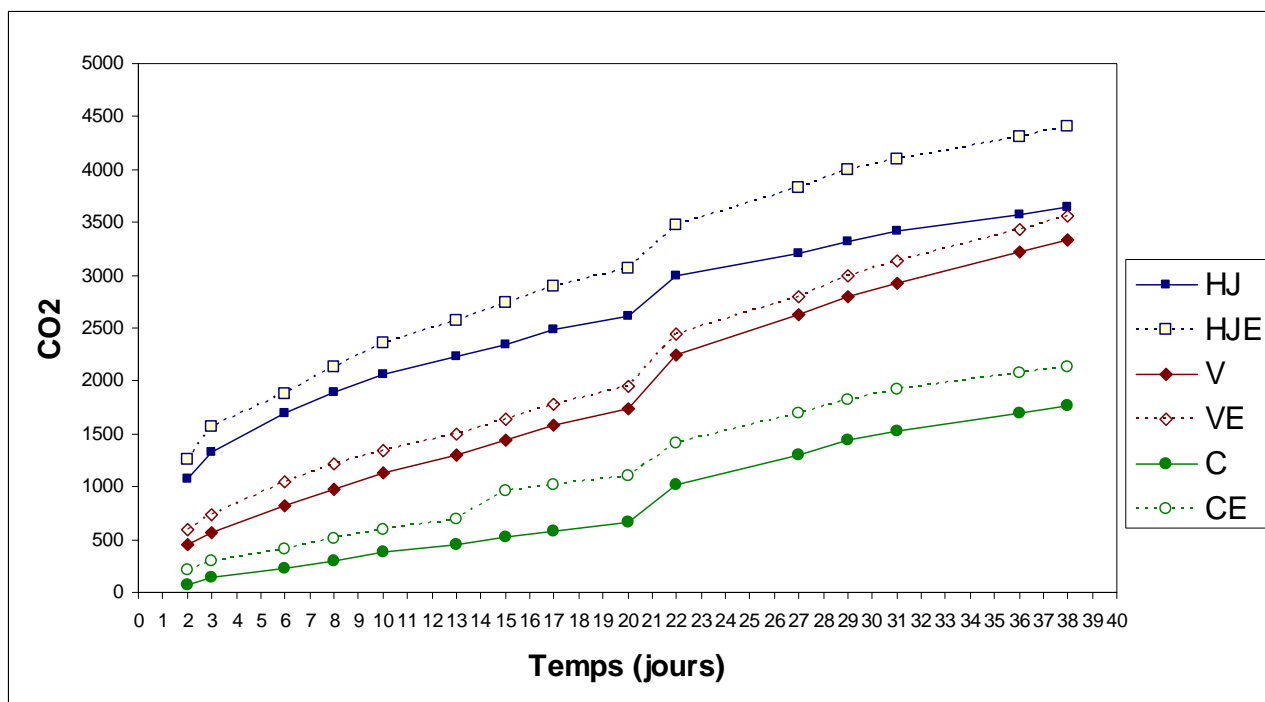
Les bandes noires observées indiquent la présence d'ADN. Plus l'intensité de couleur des bandes est importante (noire foncée), plus il y a d'ADN. Dans ce cas l'étape d'extraction d'ADN a fonctionné correctement. La comparaison avec les bandes détectées dans le puits contenant le marqueur de taille permet de dire que les molécules d'ADN extraites sont de grande taille (> 10000pb) ce qui correspond à l'ADN génomique des microorganismes présents dans les sols étudiés.

L'étape suivante de PCR, quant à elle, a été nettement moins bien réussie (annexe 17). Les bandes noires sont faiblement visibles voir inexistantes. L'amplification des brins d'ADN n'a donc pas correctement fonctionné.

### C. Incubations

Les incubations ont été mises en place pendant une quarantaine de jours pendant lesquels le CO<sub>2</sub> produit par l'activité respiratoire des microorganismes a été régulièrement mesuré. Les résultats obtenus sont représentés sur le graphique ci-dessous (Figure 2).





**Figure 2: Evolution de la production de CO<sub>2</sub> par les microorganismes des échantillons de sols en fonction du temps.**

(Les sols tels que HJE, VE et CE ont subi des ajouts d'exsudats racinaires initialement. Au jour 20, des exsudats sont à nouveau apportés, mais sur l'ensemble des sols (HJ, VE et CE compris)).

La production de CO<sub>2</sub> par les microorganismes des sols augmente de façon régulière avec le temps dans toutes les modalités (type de sols, avec ou sans exsudats apportés). Cette augmentation se fait de la même manière quel que soit le sol considéré. Un palier correspondant à une augmentation de la production de CO<sub>2</sub> est constaté au jour 20. Ce jour, correspond à la moitié du temps total d'incubation, jour où ont été réalisés des ajouts d'exsudats racinaires.

Le sol le plus productif en CO<sub>2</sub> correspond au sol salé (HJ et HJE). Le sol intermédiaire, quant à lui, est le sol brun acide (V et VE). Enfin le sol brun calcaire de culture (C et CE) est le moins actif en termes de CO<sub>2</sub> produit.

Les sols ayant subi initialement des ajouts d'exsudats racinaires (HJE, VE et CE) produisent toujours plus de CO<sub>2</sub> que les sols sans ajouts (HJ, V et C), quel que soit le sol considéré.

La qualification et la quantification des formes de chlore présent dans les sols avant et après incubations auraient permis de caractériser l'influence microbienne sur les teneurs en chlore. Cependant, les teneurs en chlore organique et inorganique avant et après incubations ne sont pas présentés ici car les résultats correspondants n'ont pas encore été fournis par le laboratoire qui a procédé aux analyses mais devront l'être très prochainement.

## V. Discussion

### 1. Microbiologie.

L'étape de PCR n'ayant pas pu aboutir dans le cadre de ce stage, la structure des communautés bactériennes par TTGE n'a pas pu être réalisée. En effet, la PCR est une étape délicate et la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ADN sont vraisemblablement à l'origine de ces résultats négatifs. Afin d'améliorer ces résultats, une phase d'optimisation est souvent nécessaire. Cette phase consiste à diluer les extraits d'ADN ce qui permet de diluer également les inhibiteurs. Ces ajustements futurs devraient permettre une amplification par PCR permettant l'analyse des structures des communautés bactériennes présentes dans nos sols par TTGE.

Du fait de l'absence de résultats, la reconnaissance des microorganismes présents dans les sols ne sera plus abordée dans cette étude.

### A. Comparaison de l'activité mesurée par hydrolyse de la FDA sur sol frais et sur sol réhumidifié

Comme décrit précédemment (partie résultats), les activités microbiennes sont sensiblement différentes si elles ont été mesurées sur sols frais ou sur sols réhumidifiés et réactivés. Les activités mesurées sur sols réhumidifiés sont, de façon générale, toujours largement inférieures à celles mesurées sur sols frais. De plus, cette diminution de l'activité sur sol réhumidifié par rapport au sol frais ne se fait pas de la même manière sur tous les sols. Il n'existe donc pas de proportionnalité entre-elles. Quelle activité est alors la plus représentative de l'activité réelle des sols ?

Pour les activités mesurées sur sol frais, le biais principal concerne la très grande variabilité des facteurs climatiques (température, précipitations...) qui influencent les propriétés hydriques des sols et donc l'activité des microorganismes. Les échantillonnages, réalisés sur différents jours, sous différentes conditions météorologiques, vont être sensiblement différents d'un site à l'autre. Les activités des microorganismes sont donc difficilement comparables entre-elles.

C'est la raison pour laquelle les activités ont aussi été mesurées sur sols réhumidifiés. En effet les sols sont initialement séchés et perdent ainsi leur activité initiale. Ils sont ensuite réhumidifiés et réactivés en chambre d'incubation. Cette étape se fait donc de la même façon pour l'ensemble des sols et les activités mesurées sont indépendantes de tous facteurs environnementaux. Cependant, en procédant ainsi et en effaçant toute influence de l'écosystème considéré, le risque est de mesurer des activités bactériennes très peu représentatives de celles réellement présentes sur les sites, en conditions *in situ*.

Certains auteurs (Rao MA, 2003, AAM, 2011) ont réalisés des mesures d'activité enzymatiques sur sols frais et sur les mêmes sols. Les résultats de leurs travaux sont similaires aux nôtres : l'activité mesurée sur sol réhumidifié est nettement à inférieure à celle sur sol frais et aucune proportionnalité n'existe entre les deux.

D'après les auteurs, les activités mesurées sur sol réhumidifié semblent alors trop aléatoires et ne permettent pas de conclure sur les activités réelles. La mesure des activités sur les sols frais, étant plus représentative des activités réelles, est donc préférable (Rao MA, 2003).

### B. Comparaison des activités mesurés par FDA et mesurés par la production de CO<sub>2</sub>.

Les mesures du CO<sub>2</sub> produit par les microorganismes des sols pendant la période d'incubation sont intimement liées à l'activité bactérienne : plus les teneurs en CO<sub>2</sub> produit sont importantes, plus les microorganismes sont présents et actifs dans le sol. Les observations faites sur les teneurs en CO<sub>2</sub> produites par les sols peuvent être mises en relation avec les estimations d'activité microbienne globale des sols par hydrolyse de la FDA.

Ainsi, les résultats de dégagement de CO<sub>2</sub> pendant les incubations sont cohérents avec les résultats des mesures de FDA (activité globale) réalisées sur sol frais (tout de suite après échantillonnage). En effet, le sol le plus actif est le sol salé avec une activité globale de 21μU, ce qui est le plus fort dégagement de CO<sub>2</sub> lors des incubations. Le sol brun acide forestier garde sa position intermédiaire (20.8μU) et le sol brun calcaire cultivé est le moins actif avec une activité globale de 13.4μU.

Lors des mesures d'activité microbienne globale sur les sols réactivés, le sol le plus actif reste le sol salé avec une activité de 2.7μU mais le sol intermédiaire correspond cette fois-ci au sol brun calcaire cultivé (1.28μU). Le sol le moins actif devient donc le sol brun acide forestier, avec une activité de 0.54μU.

L'estimation des activités microbiennes des différents sols par la mesure du CO<sub>2</sub> au cours du temps lors d'incubations et par la technique de mesure de l'hydrolyse de la FDA sur sols frais converge. Ceci n'est plus toujours le cas lorsque les FDA sont mesurées sur sols réhumidifiés, et les valeurs d'activité chutent. La technique de mesure de l'hydrolyse de la FDA sur sol frais semble la plus représentative de l'activité réelle du sol.

## 2. Facteurs qui influencent les teneurs en chlore dans les sols.

Selon la littérature (Oberg *et al*, 2005), la matière organique, l'activité bactérienne et la proximité à la mer influence les teneurs en chlore dans les sols. De plus, d'après Oberg *et al*, 2005, le chlore inorganique apporté aux sols est rapidement transformé en chlore organique. Ces observations vont être comparées aux résultats obtenus dans cette étude.

Afin d'observer au mieux les effets de corrélation et d'anti-corrélation entre les données mesurées sur les sols, une ACP (analyse en composante principale) a été réalisée. Elle prend en compte les résultats sur les activités bactériennes mesurées par FDA, les propriétés chimiques des sols et les teneurs en chlore des différents sols étudiés. Le résultat est présenté sur la figure 3 ci-dessous.

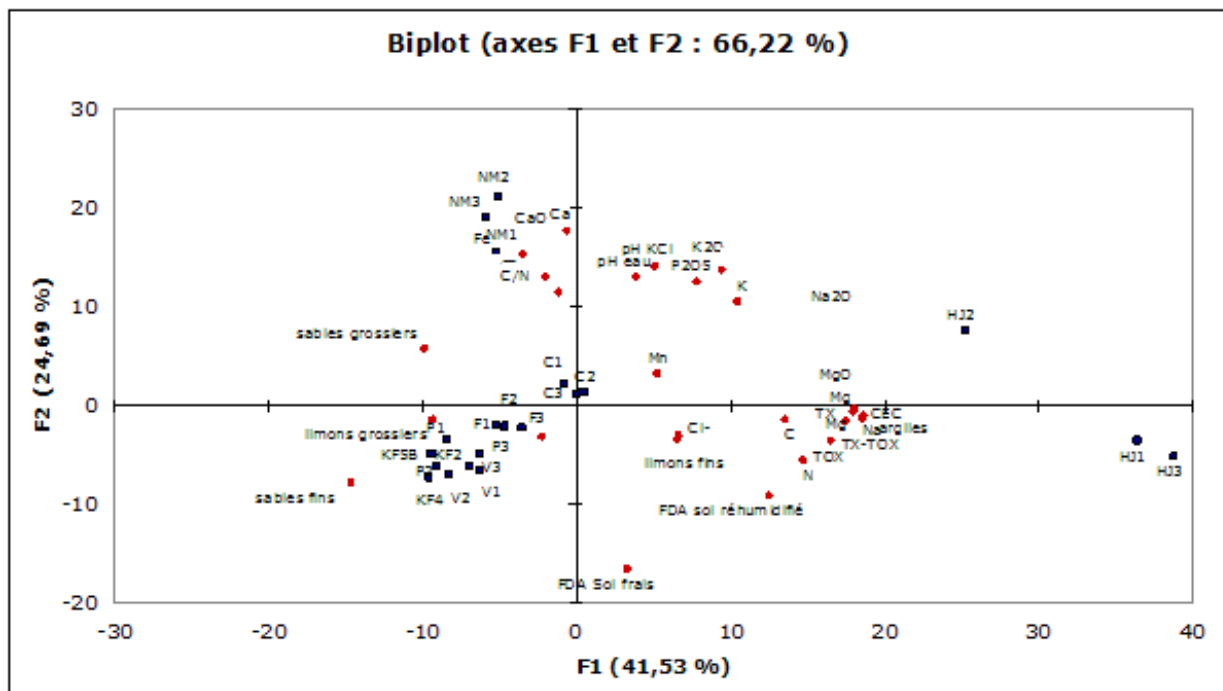


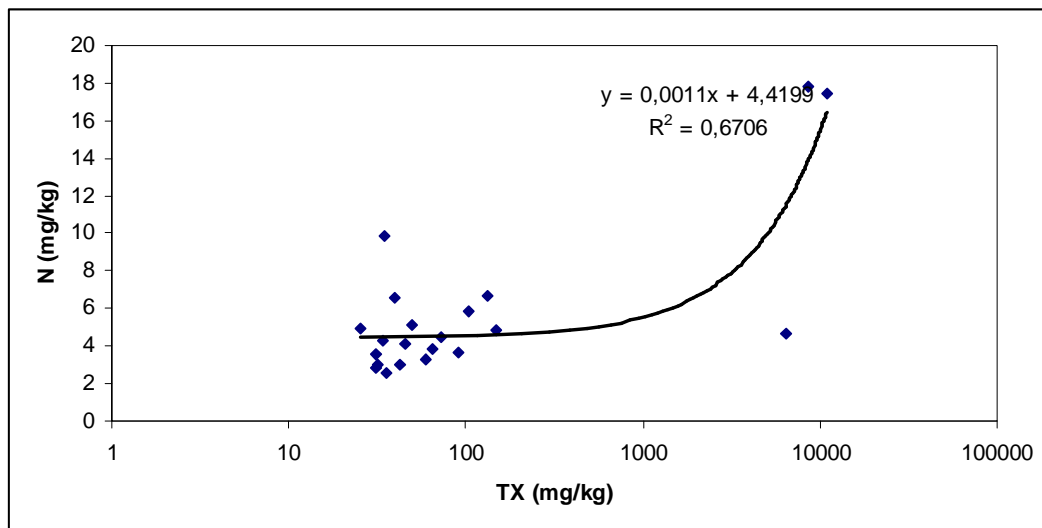
Figure 3: ACP (analyse en composante principale) des propriétés des sols.

Cette ACP prend en compte les activités bactériennes, les propriétés chimiques et les teneurs en chlore des différents sols étudiés.

Sur une ACP, les points proches les uns des autres sont en corrélation. A l'inverse, pour être en anti-corrélation, les points doivent être éloignés les uns des autres mais ils doivent également se situer sur une droite virtuelle passant par l'origine. Aucune tendance ne peut être détachée pour les points se trouvant dans une autre configuration ainsi que pour les points proches de l'origine.

Il faut cependant préciser qu'une ACP possède un pourcentage de réussite. Sur la figure 3, l'ACP avec nos données fonctionne à 66.22%. Ce pourcentage moyen ne permet pas d'affirmer si les corrélations et anti-corrélations qui y sont observées seront validées.

Pour cela, les effets de corrélation et d'anti-corrélation observés dans cette ACP sont vérifiés par les graphiques de corrélation correspondants, prenant chacun en compte deux variables. Par exemple, sur l'ACP, les teneurs en azote N et celles en chlore total TX semblent corrélées. La figure 4 ci-dessous, qui correspond à l'évolution des teneurs en azote en fonction des teneurs en chlore total, permet d'illustrer cette corrélation.

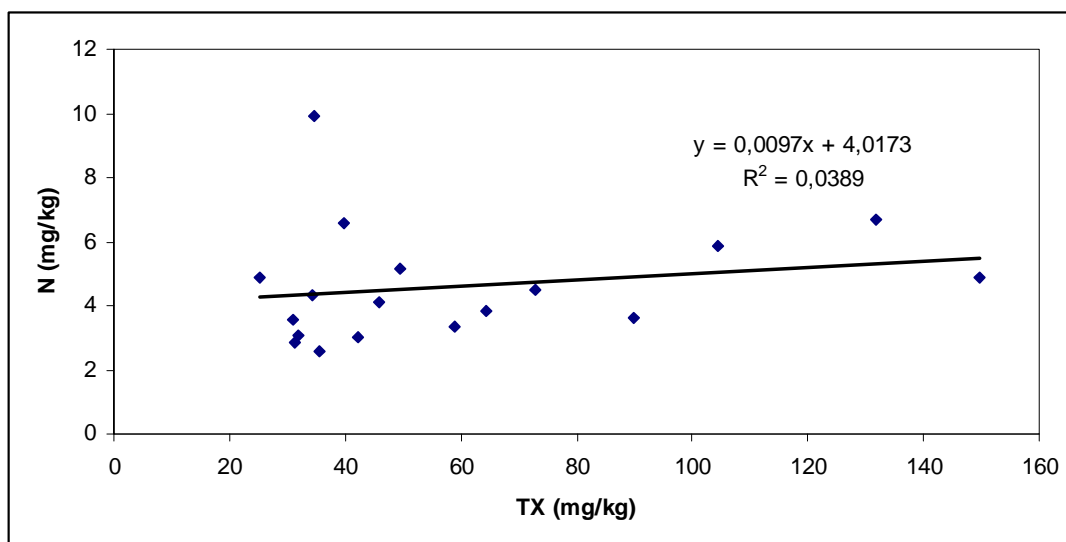


**Figure 4: Evolution des teneurs en azote N en fonctions des teneurs en chlore total TX pour l'ensemble des sols étudiés.**

Une échelle logarithme est utilisée pour représenter l'axe des abscisses, car les teneurs en chlore total pour un des sols étudié sont très largement supérieures aux autres. La courbe de tendance utilisée ici pour mettre en évidence la corrélation n'apparaît donc pas comme une droite mais comme une courbe.

Le coefficient de corrélation  $R^2$  de la droite de tendance est de 0.6706. Il permet donc d'affirmer que les variables N et TX sont corrélées entre-elles.

Cependant, la corrélation repose sur trois points aux valeurs beaucoup plus élevées que les autres, correspondants aux sols salés. Ces trois points, très originaux vis-à-vis des autres, sont donc mis de côté afin d'observer si la corrélation entre chlore total et azote est toujours vraie pour les autres sols. Le résultat est présenté dans la figure 5 ci-dessous.



**Figure 5: Evolution des teneurs en azote N en fonctions des teneurs en chlore total TX pour l'ensemble des sols étudiés.**

L'échelle logarithme pour l'axe des abscisses, représentatif des teneurs en chlore total, n'est plus nécessaire car ces teneurs sont suffisamment similaires pour les sols considérés.

Le coefficient de corrélation  $R^2$  n'est ici plus que de 0.0389. Il n'existe donc plus de corrélation claire entre le chlore total TX et l'azote N.

La prise en compte du sol salé perturbe donc ici les résultats.

Cette démarche a été appliquée pour l'ensemble des corrélations observées sur l'ACP prenant en compte l'ensemble des sols. Dans un second temps, le sol salé a été traité à part, comme détaillé dans la partie ci-dessous.

#### A. Cas particulier du sol salé

Les formes de chlore dans ce type de sol n'ont à notre connaissance jamais été étudiées. En considérant uniquement le sol salé, les corrélations sont difficiles à mettre en évidence, puisqu'il n'y a que trois points. Les figures 6 et 7 ci-dessous permettent de voir quelles sont les variables les plus spécifiques chez ce sol salé.

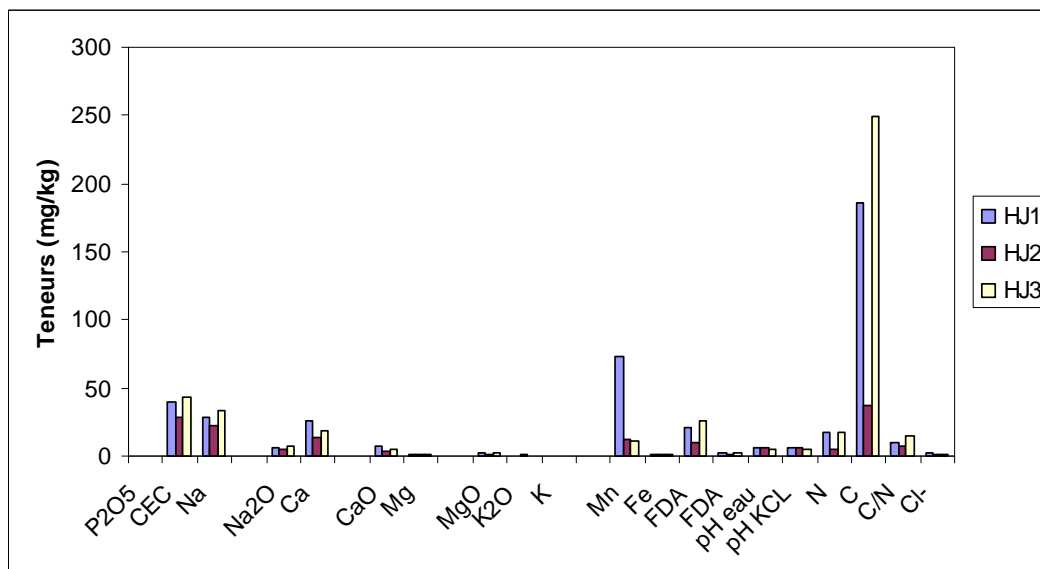


Figure 6: Propriétés chimiques et activité bactérienne des sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3)

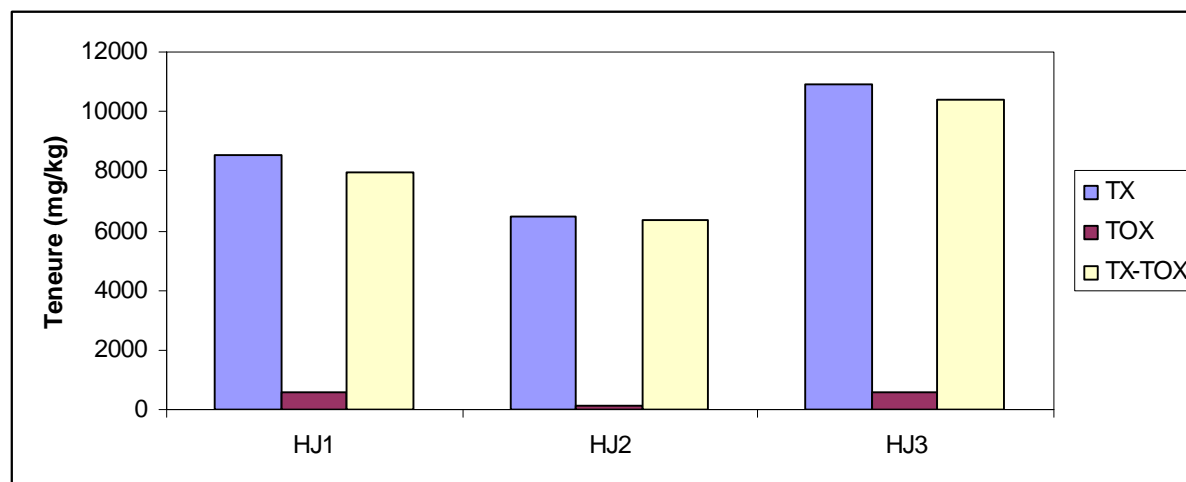


Figure 7: Teneurs en chlore total, organique et inorganique des sols salés (HJ1, HJ2 et HJ3)

Les 3 points correspondants au sol salé (HJ1, HJ2, HJ3) ont des teneurs en chlore sensiblement similaires. Ainsi, le sol salé est très riche en chlore total. Le chlore inorganique représente par ailleurs la quasi-totalité du chlore total. Le sol salé possède également des teneurs en carbone très importantes, de l'ordre de la centaine de mg/g de sol. La CEC et les teneurs en Sodium (proches des 50mg/kg) sont également élevés. Les autres variables significativement importantes dans le sol sont le calcium, le magnésium, le manganèse ou encore l'activité bactérienne.

Les apports en chlore inorganique proviennent ici du substratum géologique, qui correspond à des argiles du Keuper avec des intercalations de faciès évaporitiques (roches salines). Ce chlore inorganique apporté en très grande quantité semble ici très peu mobile et retenu dans les sols. Les faibles teneurs en chlore organique de ces sols salés témoignent du faible taux de transformation du chlore inorganique en

chlore organique. En quantités, ces transformations Cl inorganique => Cl organique sont toutefois très élevées.

Les données concernant les autres sols peuvent à présent être étudiées et mises en relation avec les résultats obtenus dans la littérature.

### B. Autres sols.

Une ACP sur les autres sols a été réalisée et est représentée sur la figure 8 ci-dessous. Cette ACP prend donc en compte l'ensemble des sols, excepté le sol salé.

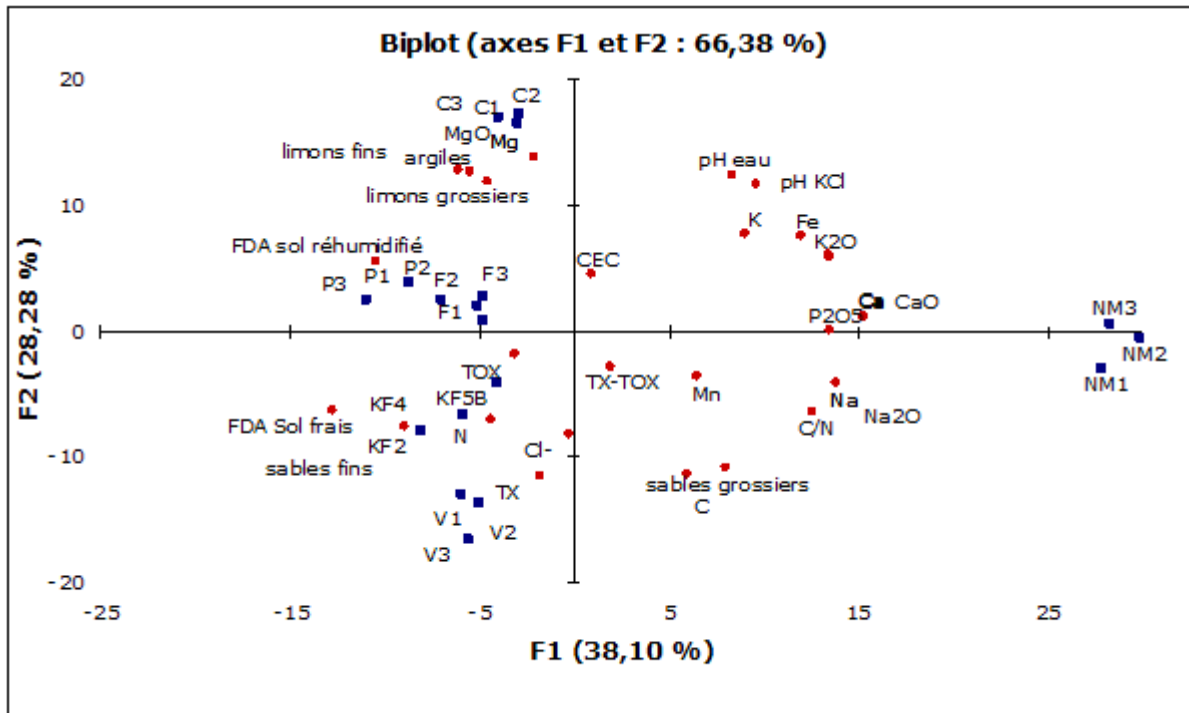


Figure 8: ACP (analyse en composante principale) des propriétés des sols.

Cette ACP prend en compte les activités bactériennes, les propriétés chimiques et les teneurs en chlore des différents sols étudiés.

Les effets de corrélations et d'anti-corrélation observée dans cette ACP sont traités dans les parties ci-dessous.

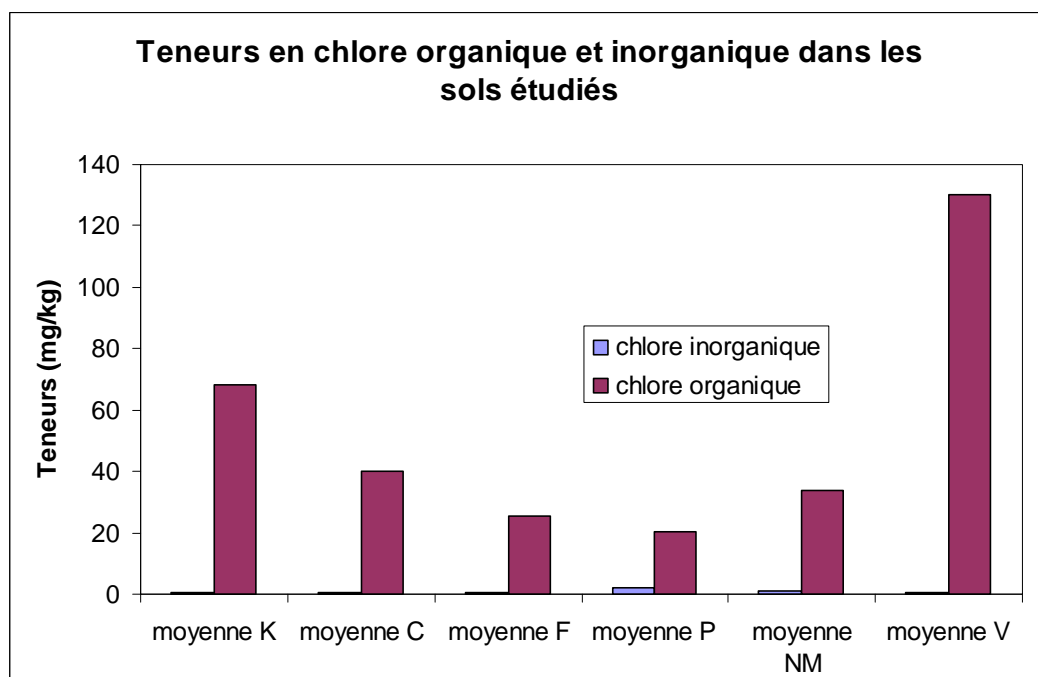
- *Influence des apports marins de chlore inorganique sur les teneurs en chlore*

Le sol brun breton à apports importants en lisier est situé à proximité de l'océan atlantique. Ce sol ne semble pas riche en chlore total, d'après comparaison de teneurs mesurées ou d'après l'ACP. Les forts apports atmosphériques de chlore inorganique dus à la proximité de la mer ne sont donc pas retrouvés dans les sols. Ces résultats sont donc originaux vis-à-vis de ceux observés dans la littérature (Johansson et al, 2002)

Cependant, sur l'ACP, ces sols sont considérés riches en chlore organique. L'observation plus détaillée des teneurs en chlore organique confirme cette observation (voir partie résultats).

En résumé, si les apports en chlore inorganique sur les sols proches du bord de mer sont importants mais que les teneurs en chlore total sont faibles dans les sols et que sa forme majoritaire correspond à du chlore organique, c'est que le chlore inorganique apporté est soumis à une rapide transformation en chlore organique.

Les apports en chlore dans les écosystèmes correspondent majoritairement à du chlore inorganique. La rapide utilisation du chlore inorganique ainsi que sa transformation en chlore organique peut donc être la source initiale de chlore apporté aux sols. La figure 9 ci-dessous représente les teneurs en chlore organique et inorganique moyennes observées sur les différents sols étudiés.



**Figure 9: Teneurs en chlore organique et inorganique pour les sols étudiés.**  
Les teneurs en chlore correspondent à des moyennes réalisées sur les 3 points de chaque sol

Le chlore organique TOX est majoritaire et largement supérieure au chlore inorganique, quelque soit le sol considéré.

Bien que la source externe majoritaire de chlore dans les écosystèmes soit du chlore inorganique provenant des dépôts atmosphériques, la forme de chlore la plus présente dans les sols correspond à du chlore organique. Ces résultats suggèrent que le chlore inorganique est donc utilisé et transformé en chlore organique.

Ces résultats sont identiques à ceux observés dans la littérature (Redon et al, 2011)

- *Influence des teneurs en calcium et du pH sur les teneurs en chlores.*

Le sol acide forestier est très riche en chlore, comme observé sur l'ACP (figure 9). Ces résultats ne sont cependant pas observés pour le sol brun calcique forestier, qui possède des teneurs en chlore moyennes.

Les teneurs en chlore sont donc plus importantes sur sol acide que sur sol calcique, pour des couverts végétaux identiques. La nature du sol, et plus particulièrement la présence de calcium, semble donc avoir une influence sur les teneurs en chlore.

Sur l'ACP, le calcium n'est cependant pas anti-corrélé avec les teneurs en chlore. L'observation plus approfondie des teneurs en calcium et en chlore ne montre pas de corrélation claire. La présence de calcium, n'influe donc pas la présence de chlore dans les sols.

Concernant les pH, les pH eau et KCl semblent anti-corrélées avec les sols bruns à apport en lisier et les sols acides forestiers. Ces observations n'ont cependant pas pu être mises en évidence avec les graphiques de corrélation correspondant.

Les sols acides forestiers et bruns calciques forestiers sont choisis afin de voir les effets éventuels du pH sur les teneurs en chlore dans les sols. Ces sols qui ont des pH très différents et qui se développent sous le même couvert végétal sont idéaux pour cette étude. En effet, les sols bruns calciques sous forêt ont des pH proches de 6 soit presque basiques, tandis que les pH des sols acides forestiers sont très acides, soit proches de 3.

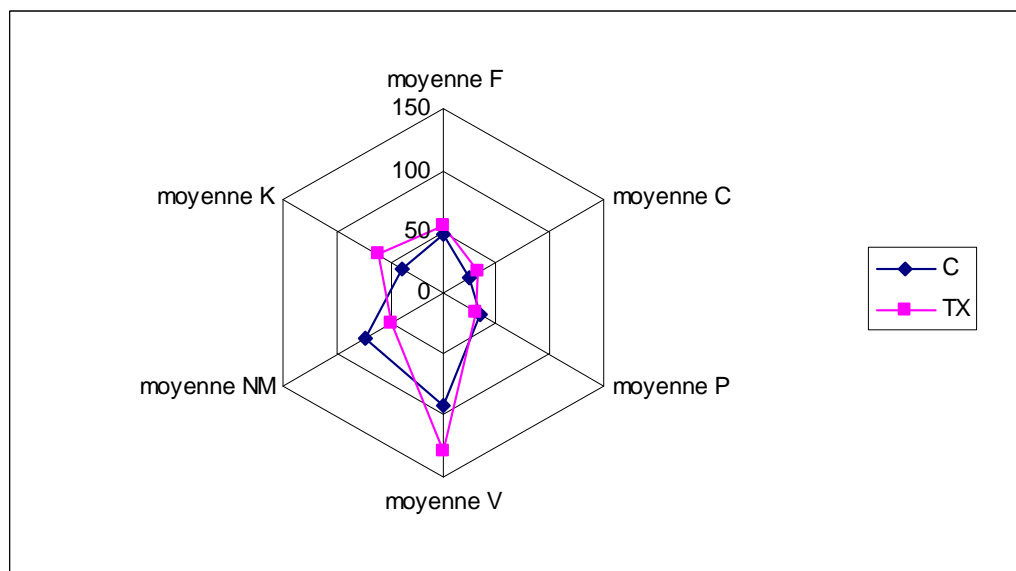
Comme démontré précédemment, le sol acide forestier est très riche en chlore, à l'inverse du sol brun calcique forestier. Le pH des sols semble donc avoir une influence sur les teneurs en chlore. Ce paramètre, n'a encore jamais été testé dans la littérature.

- *Influence de la matière organique sur les teneurs en chlore*

Les sols riches en matière organique tels que les sols acides forestiers, bruns calciques forestiers et les sols de friche industrielle, sont riches en carbone, bien que l'ACP ne montre pas de corrélation évidente.

Le sol acide forestier est également riche en chlore total, comme observé sur l'ACP. Pour le sol brun calcique forestier et pour le sol de friche industrielle, la corrélation semble moins évidente. Les teneurs en chlore total dans ces sols sont cependant également importantes. Les sols riches en carbone et donc en matière organique quelle que soit leur nature (litière feuille, lisier, HAP) semblent favoriser la rétention de chlore (figure 10).

Le graphique de corrélation correspondant est présenté en annexe 18 (coefficient de corrélation  $R^2 = 0.4405$ ).



**Figure 10: Diagramme radar représentant les teneurs moyennes en carbone et en chlore total pour les sols étudiés (mg/kg)**

Les teneurs en carbone et en chlore total correspondent à des moyennes réalisées sur les 3 points de chaque sol

A l'inverse, les sols pauvres en carbone, et donc en matière organique, tels que les sols bruns calcaires cultivés et sous prairie ont des teneurs faibles en chlore total. La gestion des sols en culture ou en prairie qui conduit à la perte en matière organique provoque donc indirectement la perte, la non transformation ou la non rétention de chlore.

Les teneurs en carbone, et plus généralement la matière organique des sols influencent donc la présence de chlore. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans la littérature. (Oberg et al, 2005).

De plus, l'anthropisation des sols traduite ici par la mise en culture ou en pâturage, facteur peu étudié dans de précédents travaux, joue également un rôle sur les teneurs en chlore dans les sols.

- *Influence de l'activité bactérienne sur les teneurs en chlore*

L'ACP permet de mettre en évidence une corrélation entre teneurs en chlore organique et activité bactérienne. L'activité globale des microorganismes des sols semble donc favoriser la formation de et la rétention de chlore organique. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans la littérature.

- *Influence du couvert végétal sur les teneurs en chlore*

Les sols bruns calcaires et calciques sont étudiés sous forêt, culture et prairie. Comme les sols sont identiques, l'influence de trois couverts végétaux a pu être testée dans cette étude.

Sur l'ACP, le sol brun calcique forestier sont corrélés au chlore total, à l'inverse du sol brun calcaire cultivé et du sol brun calcique sous prairie. L'étude plus approfondie des teneurs en chlore total sur ces sols aboutit aux mêmes conclusions.



Les sols sous forêt semblent donc plus riches en chlore que les sols sous prairie ou sous culture. Le couvert végétal a donc une influence sur les teneurs en chlore.

Ces résultats apportent de nouvelles données par rapports aux précédents travaux réalisés car le couvert végétal et ou le type d'occupation des terres et son influence sur les teneurs en chlore ont peu été étudiées encore.

### 3. Conclusion sur les facteurs de contrôle des teneurs en chlore dans les sols.

Le tableau 11 ci-dessous résume les observations faites sur les facteurs qui influencent la présence ou non de chlore dans les sols de cette étude en les comparant à celles de la littérature.

**Tableau 11: Facteurs qui influence la présence de chlore dans les sols de cette étude et comparaison avec la littérature**

Facteurs	Etude	Littérature
Corrélation du chlore avec la matière organique	Oui	Oui (Redon et al, 2011)
Activité bactérienne	Oui	Oui (Bastviken et al. 2009)
Teneurs en chlore importantes dans les sols de bord de mer	Non	Oui (Johansson et al, 2002)
Rapide transformation du chlore inorganique en chlore organique	Oui	Oui (Oberg et al, 2005)
Calcium/pH	Oui	Pas testé
Influence Couvert végétal	Oui	Pas testé

## Conclusion

Cette étude permet d'apporter de nouvelles données sur les quantités de chlore retenues dans des sols sur substrats et occupations variées. Elle permet également de discuter des facteurs qui semblent le plus influencer la présence de chlore dans les sols. Elle souligne notamment le lien entre le type de sol, la pédogenèse, le turnover de la matière organique et les teneurs en chlore. Plus précisément :

- Les résultats obtenus mettent en évidence l'influence des teneurs en carbone des sols sur la présence de chlore. Plus le sol est riche en carbone, plus les teneurs en chlore dans le sol considéré sont importantes.
- Par ailleurs, les formes de chlore organique prédominent toujours sur les formes inorganiques, exceptés dans les sols salés. Ceci suggère que l'unique source externe, atmosphérique, qui apporte du chlore inorganique, subit une transformation rapide vers une forme organique.
- L'influence des apports atmosphériques élevés en chlore inorganique sur les teneurs totales en chlore des sols à proximité des mers, constatée dans la littérature, n'a pas pu être vérifiée dans cette étude.
- Le pH semble jouer un rôle et est inversement corrélé avec les teneurs en chlore. En effet, l'alcalinité du sol, et en particulier la présence de calcium, permet le bon recyclage de la matière organique, et une bonne qualité des humus. Ceci empêche donc l'accumulation de matières organiques et avec elle la rétention de chlore dans les sols.
- Enfin, sur sols équivalents, le chlore est présent en plus grandes quantités dans des sols forestiers comparés à des sols agricoles (prairies et surtout cultures). Le couvert végétal a donc bien une influence sur les teneurs en chlore dans les sols.

D'un point de vue méthodologique, cette étude apporte des informations pour caractériser au mieux l'activité bactérienne totale des sols. La comparaison des résultats de mesure d'activité sur des sols frais, sur des sols séchés, réhumidifiés puis réactivés et enfin sur des activités bactériennes mesurées lors d'incubations de certains de ces sols, nous permet de suggérer la mesure sur des sols frais comme l'activité la plus représentative de l'activité réelle des sols.

Cette étude préliminaire complète les résultats obtenus lors de précédents travaux. Elle n'aborde cependant pas la dynamique du chlore dans les écosystèmes ni les processus de transformation du chlore

d'une forme inorganique vers une forme organique. Cette étude a été réalisée sur une courte période, une seule saison et sur un seul compartiment de l'environnement : le sol.

Afin d'améliorer la compréhension actuelle du cycle biogéochimique du chlore, une étude doit être réalisée sur une plus longue période, afin de voir les variations temporelles et saisonnières des teneurs en chlore. Les divers compartiments des écosystèmes devront également être abordés, comme par exemple les végétaux ou encore les apports atmosphériques. La caractérisation plus précise des microorganismes et de leur activité sur l'évolution des formes de chlore reste également à terminer dans nos dispositifs expérimentaux et à étudier dans le cadre de futures expériences en conditions contrôlées. Enfin, le suivi par un traceur isotopique tel que le Cl 36 serait une bonne approche pour comprendre les transferts du chlore dans l'environnement.

## VI. Bibliographie

### Articles scientifiques

Andres Abellan M, Wic Baena C, Garcia Morote FA, Cordoba Picazo MI, Perez Candel D, Luca-Borja ME (2011), Influence of the soil storage method on soil enzymatic activities in Mediterranean forest soils, *Forest systems*, 20. 379-388.

Bastviken D, Thomsen F, Svensson T, Karlsson S, Sander P, Shaw G, Matucha M, Oberg G (2007) Chloride retention in forest soil by microbial uptake and by natural chlorination of organic matter, *Geochimica and Cosmochimica Acta* 71. 3182-3192

Bastviken D, Svensson T, Kralsson S, Sander P, Oberg G (2009) Temperature Sensitivity indicates that chlorination of organic matter in forest soil is primary biotic, *Environ.Sci. Technol*, 43. 3569-3573

Eddo J, De Leer WB, Brinkman UA(1998) Natural formation of chloroform and brominated trihalomethanes in soil, *Environ.Sci. Technol*, 32. 3724-3729

Johansson E, Sanden P, Oberg G (2002) Spatial patterns of organic chlorine and chloride in Swedish forest soil, *Chemosphere*, 52. 391-397

Joner E.I, Corgié SC, Amellal N, Leyval C(2001), Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere, *Soil biology and biochemistry*, 34. 859-864.

Kashparov V, Colle C, Zvarich S, Yoschenko V, Levchuk S, Lundin S (2007) Radiochlorine concentration ratio for agricultural plants in various soil conditions, *Journal of environmental Radioactivity*, 95. 10-22

Lavastre V, Jendrzewski N, Agrinier P, Javoy M, Evrard M (2005) Chlorine transfer out of a very low permeability clay sequence (Paris Basin, France): <sup>35</sup>Cl and <sup>37</sup>Cl evidence, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol 69, No.21, pp. 4949-4961

Leri A-C and Myneni Satish C-B, (2010) Organochlorine turnover in forest ecosystems: The missing link in the terrestrial chlorine cycle, *Global Biogeochemical Cycles*, Vol24, GB 4021

Matucha M, Gryndler M, Forkzek ST, Schroder P, Bastviken D, Rohlenova J, Uhlirova H, Fuksova K (2006) A chlorine-36 and carbon -14 study of the role of chlorine in the forest ecosystem, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 50. 437-439

Rao MA, Sannno F, Nocerino G, Puglisi E, Gianfreda L (2003) Affect of air-drying treatment on enzymatic activities of soils affected by anthropogenic activites, *Biology and fertility of soils*, 38. 327-332.

Redon P-O, Abdelouas A, Bastiken D, Cecchini S, Nicolas M, Thiry Y (2011) Chloride and organic chlorine in forest soils: storage, residence times, and influence of ecological conditions, *environ.Sci.Technol*, 45, 7202-7208.

Svensson T and Lovett Gary M, (2010) Is chloride a conservative ion in forest ecosystems?, *Biogeochemistry*, DOI 10.1007/s10566-010-9538-y

Wassenaar LI and Koehler G, (2004) On Line technique for the determination of the  $\Delta^{37}\text{Cl}$  of inorganic and total organic Cl in environmental Samples, Analytical Chemistry, 10.1021/ac0490200

### **Rapports ANDRA**

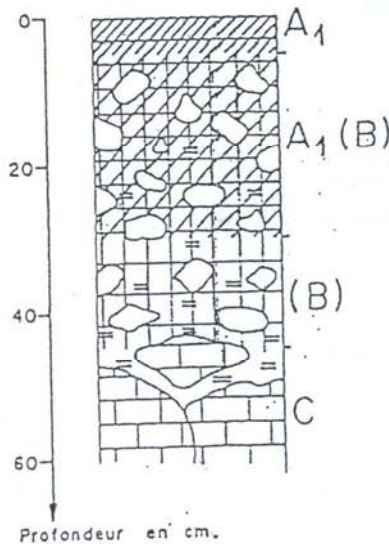
Andra (2009). Mise en place de l'Observatoire Pérenne de l'Environnement (OPE): Bilan 2007/2008 de l'environnement - Jalon 2009 - niveau 5. Rapport Andra n° C.RP.ASTR.09.0010, 351 p.

Andra (2010), Etat de référence de la qualité des sols.

## VII. ANNEXES

### Annexe 1 : Profil de Rendzine brunifié et sol brun calcique

#### Rendzine brunifié



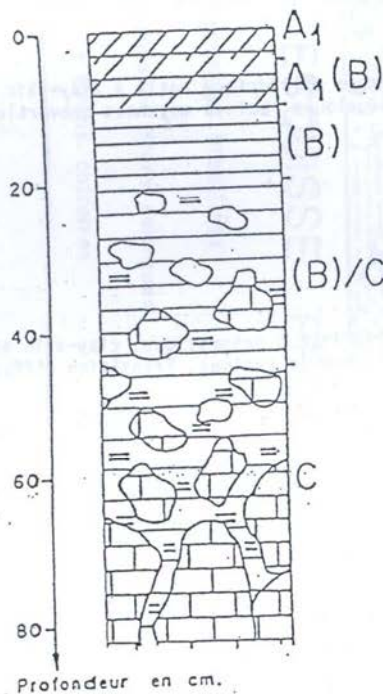
Mull brun noirâtre (7,5 YR 5/4) riche en matière organique. Structure en grumeaux anguleux, bien aérée. Pas d'effervescence à HCl. Pas de cailloux. Racines abondantes et fines. Transition progressive.

Horizon brun foncé (7,5 YR 6/6) moins riche en matière organique. Structure grumeleuse à polyédrique. Texture limono-argileuse à argilo-limoneuse. Nombreux cailloux calcaires. Faible effervescence à HCl dans la terre fine. Racines moins nombreuses.

Brun rougeâtre (10 YR 6/8). Structure à petits polyèdres anguleux. Texture argilo-limoneuse. Nombreux cailloux calcaires (50 %). Effervescence à HCl moyenne à forte. Quelques racines assez grosses.

Calcaire bajocien en plaquettes.

#### Sol brun calcique



Brun foncé (10 YR 3/4). Mull eutrophe. Structure grumeleuse assez bien développée. Porosité forte. Texture argilo-limoneuse. Nombreuses racines. Transition progressive.

Brun jaunâtre foncé (7,5 YR 4/4). Horizon de transition. Structure polyédrique subangulaire moyennement développée. Porosité moyenne. Argilo-limoneux. Nombreuses racines.

Brun rougeâtre (5 YR 4/6). Structure polyédrique subangulaire. Argilo-limoneux. Porosité moyenne. Assez forte densité de racines. Transition nette.

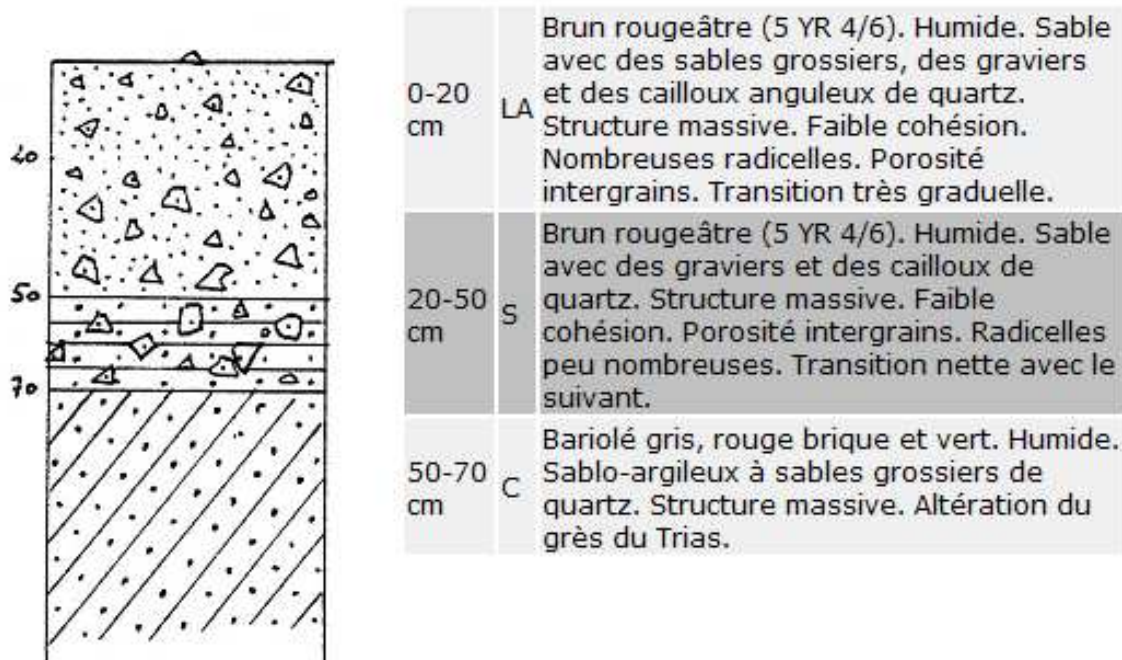
Brun (7,5 YR 5/6). Structure polyédrique faiblement développée. Forte porosité. Texture limono-argileuse. Faible enracinement. Forte effervescence à HCl. 30 % de cailloux et blocs. Transition progressive.

Jaune brunâtre (2,5 Y 6/8). Structure particulière. Porosité moyenne. Texture sablo-graveleuse. Forte effervescence à HCl. Cailloux et blocs entourés d'éléments venant de l'altération du calcaire oolithique.

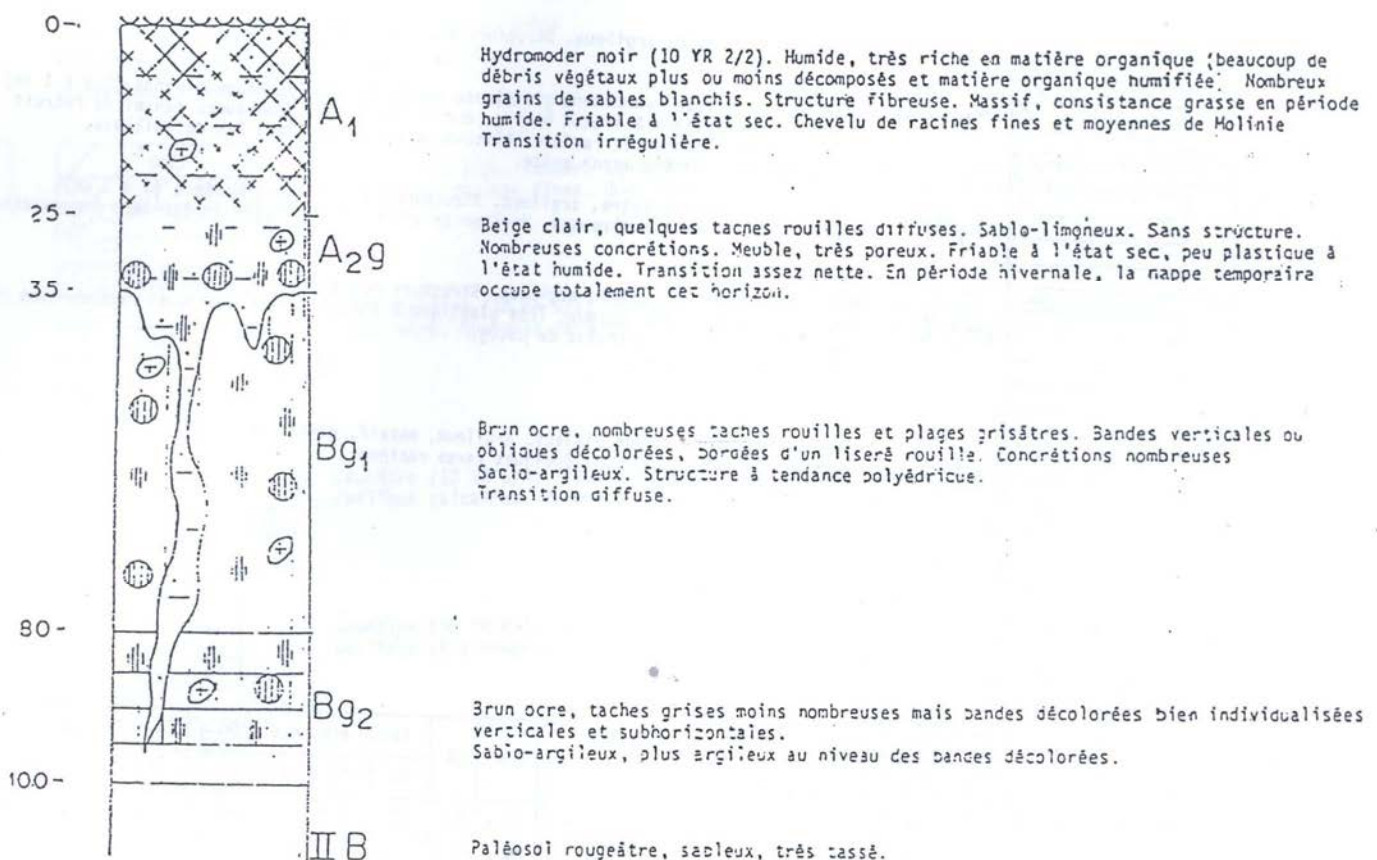


## Annexe 2 : Profil de sol brun sablo-limoneux

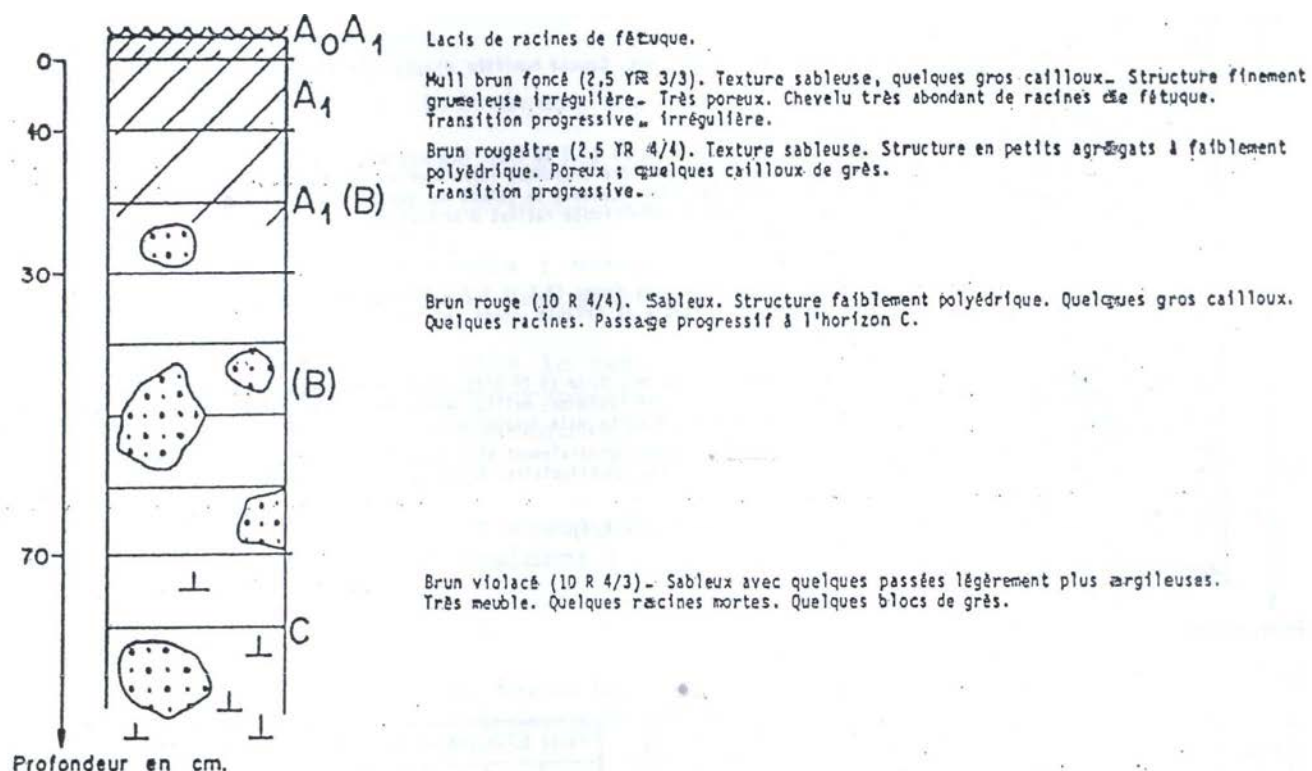
(www.mp.chambagri.fr)



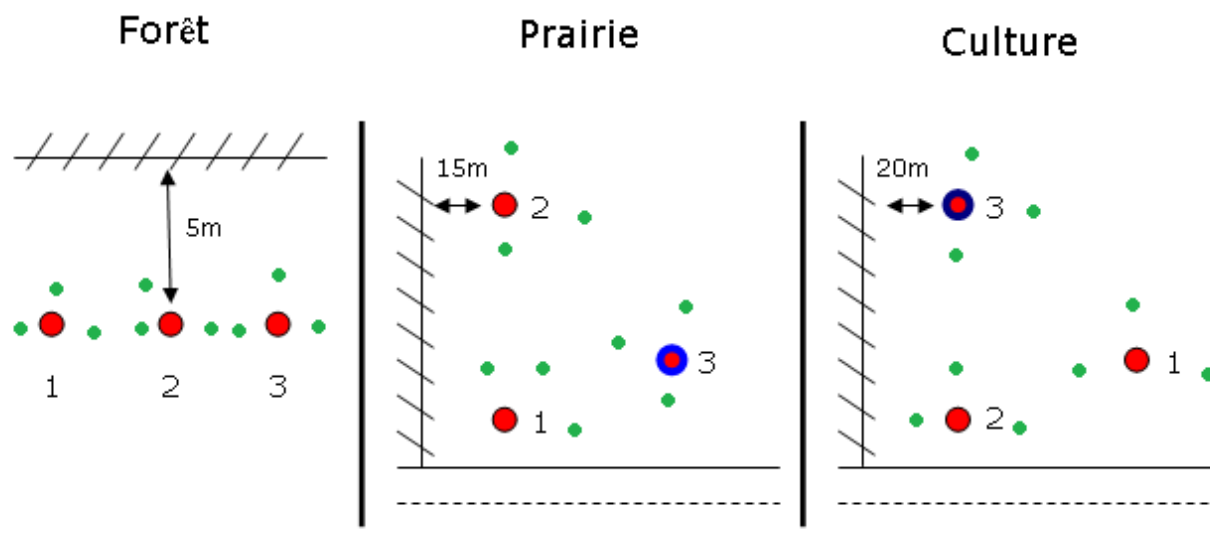
## Annexe 3 : Profil de pseudogleys



#### Annexe 4 : Profil de sol brun acide



#### Annexe 5 : Plan de prélèvement pour les sols bruns calcaires et calcique sous prairie, cultivé et forestier



Légende :

- ##### Clôture
- Points de prélèvement
- Route
- Altitudes les plus élevées
- Répétitions

## Annexe 6 : Capacité au champs des sols (CC) et poids en eau rajoutés initialement dans les flacons utilisés lors des expériences d'incubation (modalités avec et sans ajouts d'exsudats).

Les modalités « avec exsudats ont été humidifiées par ailleurs avec 2,5g de solutions d'exsudats synthétiques).

Ces valeurs sont obtenues en faisant la différence de poids entre sol sec et sol ayant été ré-humidifiés pendant une nuit

	Détermination préalable humidité des sols			Poids d'eau ajoutés dans flacons	
	Poids sols sec (g)	Poids sols après réhumidification(g)	CC = Différence (g)	Modalité sans exsudats 80% de la CC	modalité avec exsudats (80%CC – 2,5)
Sol brun calcaire - culture	9.6	14.9	5.2	4.1	1.6
Sol sur roche acide	5	9.2	4.2	3.36	0.86
Sol salé	5	8.7	3.7	2.96	0.46

## Annexe 7 : Représentation schématiques des échantillons utilisés et modalités testées dans les expériences d'incubations

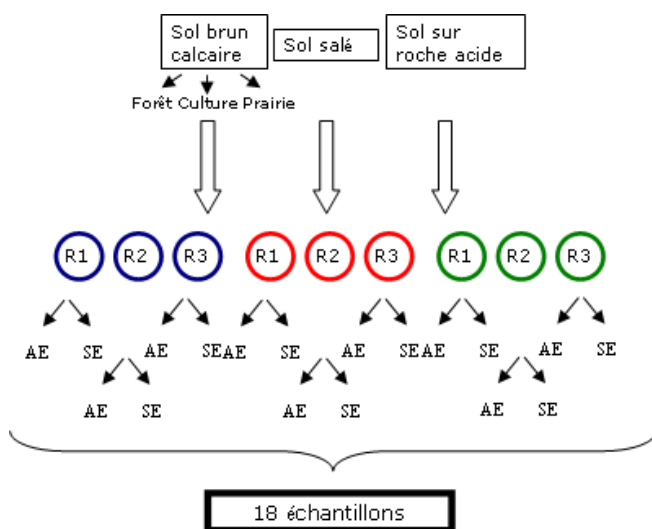
R1 : répétition 1

R2: répétition 2

R3: répétition 3

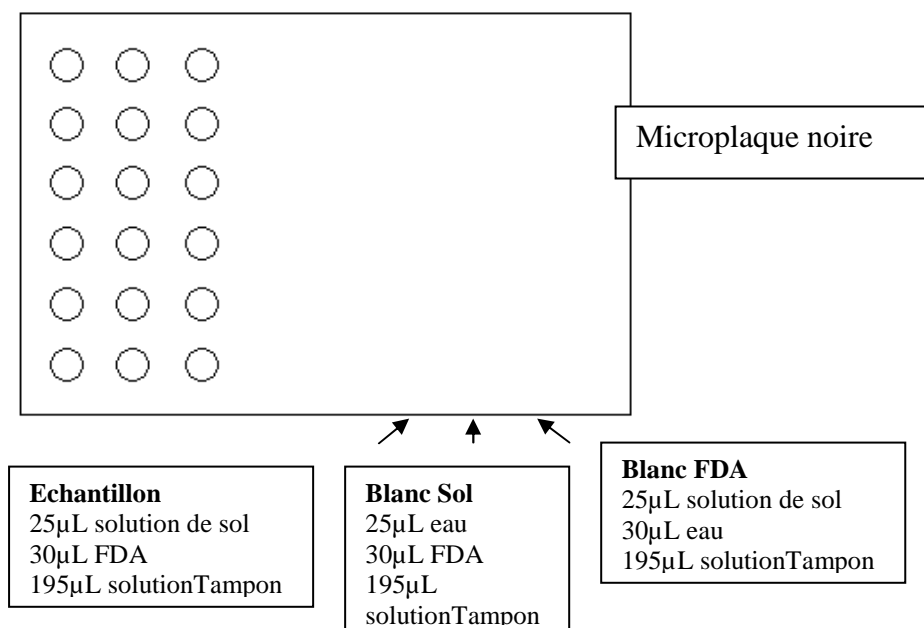
AE : avec ajout d'exsudats

SE : sans ajout d'exsudat





## Annexe 8 : Plan de microplaque noire pour une analyse en FDA.



**Solution tampon pH 7.6 :** Dissoudre 8.7g de  $K_2HPO_4$  et 1.3g de  $KH_2PO_4$  dans 800mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7.6 avec du NaOH. Compléter à 1L.

**Solution de sol :** Placer 2g de sol dans 40mL de solution tampon. Agiter pendant 10 min sur un agitateur rotatif puis pendant 3 min par sonication.

**Solution FDA :** Diluer 50mg de fluorescéine diacétate dans 10mL d'acétone. La solution obtenue est à une concentration de 5mg/mL. La solution de travail est à 400µg/mL.

**Gamme étalon :** Solution de fluorescéine à 50µg/mL et 10µg/mL.

### Préparation des solutions de fluorescéine :

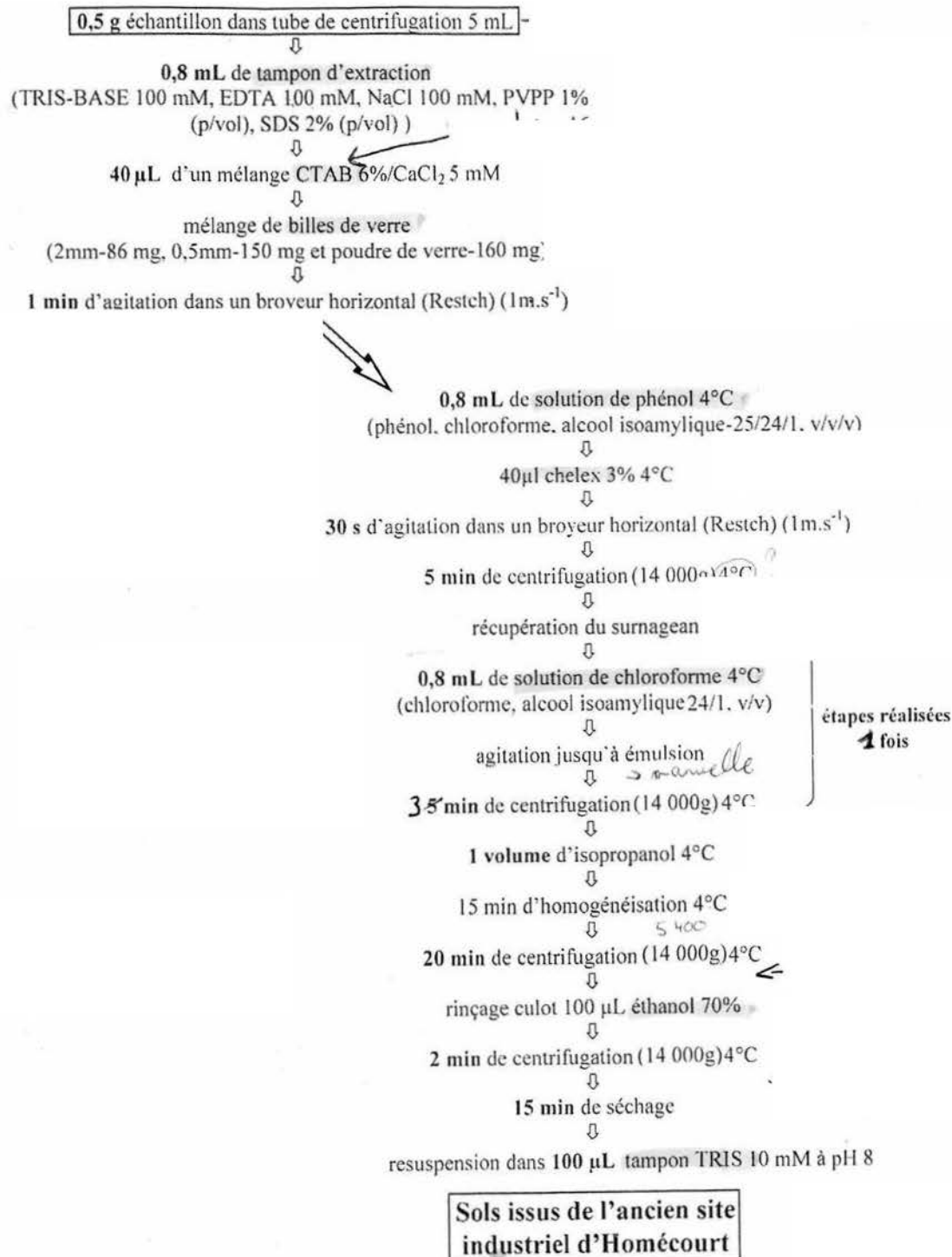
- solution mère à 5 mg/mL : 50 mg de fluorescéine (F7505 sigma) dans 5 mL d'éthylène glycol monométhylether.
- Solution fille à 500µg/mL : 1mL de la solution mère + 9mL d'éthylène glycol monométhylether / Tampon (1v:1v)
- Solution fille à 50µg/mL (diluer la 500 au 1/10 dans du tampon phosphate)
- Solution fille à 10µg/mL (diluer la 50 au 1/5 dans du tampon)

## Annexe 9 : Préparation la gamme étalon

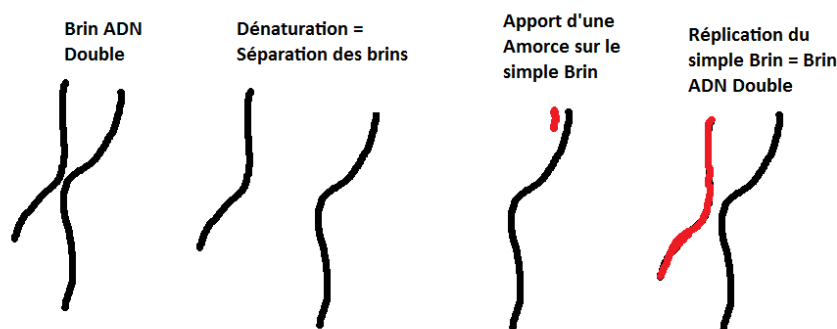
concentrations FDA ( $\mu\text{g}$ / puit)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4
vol tpon phosphate (0,1M, pH 7,6)	250	225	200	235	230	225	220	210
vol FDA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	25	50	-	-	-	-	-
vol FDA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	-	-	-	15	20	25	30	40

vol tpon (phosphate (0,1M, pH 7,6)	200	175	150	185	180	175	170	160
vol extrait de sol	50	50	50	50	50	50	50	50

## Annexe 10 : Protocole d'extraction de l'ADN



## Annexe 11 : Schéma explicatif du fonctionnement de la PCR.



tampon	5
MgCl <sub>2</sub>	3
dNTP	1
BSA	2
DMSO	1,5
GC 968f	0,5
1401r	0,5
Taq	0,4
H <sub>2</sub> O	35,1

ADN extrait 1

Le tableau ci-dessus résume les quantités en  $\mu\text{L}$  de réactifs nécessaires à la fabrication du mix PCR, solution permettant l'amplification d'ADN. 49 $\mu\text{L}$  de mix PCR sont ensuite ajoutés à 1 $\mu\text{L}$  d'extrait d'ADN dans des flacons eppendorf. Ceux-ci sont ensuite passés dans le réacteur pendant 2h30. (Feslke et al, 1998 et Heuer et al, 1999).

## Annexe 12 : Protocole migration sur gel

Préparation du gel d'agarose :

Peser 0,7g d'agarose dans un erlen de 100 ml et ajouter 70 mL de TAE 1X

Passer au four à micro-ondes pendant environ 3 minutes pour faciliter la dissolution de l'agarose :  
Obtention d'une solution limpide.

Couler le gel dans le support : plaque de maintien, peigne.

Laisser prendre le gel pendant environ 10 minutes : le gel devient blanc une fois pris.

Placer le gel dans la cuve à électrophorèse remplis de TAE 1X

Préparation des dépôts dans les trous du gel :

Préparation du marqueur de taille :

Ajouter : 2 $\mu\text{L}$  de tampon de charge, 1 $\mu\text{L}$  de Marqueur de taille : GeneRuler 1kb DNA Ladder  
0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  et 9 $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure.

Préparation des extraits :

Ajouter pour les différents extraits : 2 $\mu\text{L}$  de tampon de charge et 10 $\mu\text{L}$  d'un extrait.

Déposer les extraits préparés dans chaque puits.

Lancement de la migration :

Programmer la machine, 125 voltes pendant 25 minutes

Attention, vérifier que la cathode et l'anode soit placé du bon côté, au risque d'avoir une migration dans le mauvais sens.

### Annexe 13 : Codes échantillons utilisés pour désigner les différents sols étudiés

Codes échantillon	Type de sol
NM1	Sol de friche industrielle, point 1
NM2	Sol de friche industrielle, point 2
NM3	Sol de friche industrielle, point 3
OPE F1	Sol brun calcique forestier , point 1
OPE F2	Sol brun calcique forestier , point 2
OPE F3	Sol brun calcique forestier , point 3
OPE C1	Sol brun calcaire cultivé, point 1
OPE C2	Sol brun calcaire cultivé, point 2
OPE C3	Sol brun calcaire cultivé, point 3
OPE P1	Sol brun calcique sous prairie, point 1
OPE P2	Sol brun calcique sous prairie, point 2
OPE P3	Sol brun calcique sous prairie, point 3
V1	Sol forestier brun acide, point 1
V2	Sol forestier brun acide, point 2
V3	Sol forestier brun acide, point 3
HJ1	Sol salé, point 1
HJ2	Sol salé, point 2
HJ3	Sol salé, point 3
KF5B	Sol brun riche en lisier, point 1
KF2	Sol brun riche en lisier, point 2
KF4	Sol brun riche en lisier, point 3

### Annexe 14 : Granulométrie des sols étudiés.

La granulométrie a été mesurée sur un point de chaque type de sol, pour limiter le nombre de mesures. Pour les autres points, la granulométrie est considérée comme étant identique à celle réellement mesurée.

De plus, les mesures de granulométrie sur sols trop riches en calcaire risquent d'être erronées par l'enrobage des grains considéré par le calcaire. Pour éviter ces erreurs, le degré de calcaire présent dans les sols est initialement évalué par le test HCl classiquement utilisé dans ce cas. Les sols faisant effervescence correspondent alors aux sols bruns calciques cultivés et aux sols d'ancienne friche industrielle.

éch	argiles (g/kg)	limons fins (g/kg)	limons grossiers (g/kg)	sables fins (g/kg)	sables grossiers (g/kg)	argiles (g/kg)	limons fins (g/kg)	limons grossiers (g/kg)	sables fins (g/kg)	sables grossiers (g/kg)
	sans décarbonatation					après décarbonatation				
F3	291	245	121	236	107					
C2	353	288	153	152	54	353	282	158	130	66
P2	256	285	172	258	29					
V2	137	101	47	285	430					
HJ1	661	241	42	44	12					
NM2	119	122	94	142	523	115	103	88	136	527
KF2	84	119	121	169	507					

## Annexe 15 : Chimie des sols étudiés

	P2O5	CEC	Na	Na	Na2O	Ca	Ca	CaO	Mg	Mg	MgO	K2O	K	K	Mn	Fe
Unité	g/kg	cmol/kg	cmol/kg	g/kg	g/kg	cmol/kg	g/kg	g/kg	cmol/kg	g/kg	g/kg	g/kg	cmol/kg	g/kg	g/kg	g/100g
F1	0,016	18,7	0,0623	0,0193	0,0143	13,4	2,68	3,75	0,121	0,996	0,201	0,203	0,169	0,431	31,8	5,93
F2	0,024	18,1	0,0578	0,0179	0,0133	14,3	2,87	4,02	0,12	0,99	0,2	0,189	0,157	0,4	26,8	5,53
F3	0,021	16,4	0,0583	0,0181	0,0134	12,2	2,43	3,4	0,13	1,07	0,216	0,209	0,173	0,443	23,6	5,47
F	0,0203 3333	17,7333 3333	0,0594 6667	0,0184 3333	0,0136 6667	13,3	2,66	3,72333 333	0,1236666 7	1,0186 6667	0,2056 6667	0,2003 3333	0,1663 3333	0,4246 6667	27,4	5,6433 3333
C1	0,027	16,8	0,0315	0,0097 7	0,0072 5	15,7	3,13	4,38	0,672	5,53	1,12	0,244	0,202	0,517	3,86	6,11
C2	0,035	17,2	0,0556	0,0172	0,0128 0,0074 8	17,5	3,49	4,89	0,717	5,89	1,19	0,271	0,225	0,575	4,15	4,45
C3	0,038 0,0333 3333	17,2 17,0666 6667	0,0325 0,0398 6667	0,0101 0,0123 5667	0,0091 0,0091 7667	15,6 16,266 6667	3,12 3,2466 6667	4,37 4,54666 667	0,684 0,691	5,63 5,6833 3333	1,14 0,2586 6667	0,261 0,2146 6667	0,217 0,2146 6667	0,555 0,549	3,68 3,8966 6667	4,6 5,0533 3333
P1	0,018	15	0,0682	0,0211	0,0157	9,81	1,96	2,75	0,174	1,43	0,288	0,125	0,104	0,265	28,8	3,07
P2	0,018	14,4	0,0844	0,0262	0,0194	8,77	1,75	2,46	0,194	1,59	0,321	0,135	0,112	0,287	25,5	3,49
P3	0,016 0,0173 3333	14,3 14,5666 6667	0,0481 0,0207 6667	0,0149 0,0207 3333	0,0111 0,0154	8,08 8,8866 6667	1,62 1,7766 6667	2,26 2,49	0,154 0,174	1,26 1,4266 6667	0,255 0,288	0,112 0,124	0,0931 0,1030 3333	0,23 0,2606 6667	31,7 28,666 6667	3,15 3,2366 6667
V1	0,021	21,1	0,0817	0,0253	0,0188	0,17	0,034	0,0475	0,0251	0,206	0,0417	0,139	0,115	0,294	13,8	0,859
V2	0,013	16,1	0,0691	0,0214	0,0159	0,26	0,0591	0,0729	0,0206	0,169	0,0342	0,126	0,104	0,267	27,3	0,681
V3	0,017	13,4	0,0753	0,0233	0,0173	0,2	0,0401	0,0561	0,019	0,156	0,0315	0,124	0,103	0,262	24,7	0,602
V	0,017	16,8666 6667	0,0753 6667	0,0233 3333	0,0173 3333	0,21	0,0444	0,05883 333	0,0215666 7	0,177	0,0358	0,1296 6667	0,1073 3333	0,2743 3333	21,933 3333	0,714
HJ1	0,039	39,3	28,5	8,82	6,55	26,4	5,27	7,38	1,51	12,4	2,5	0,249	0,207	0,529	73	1,62
HJ2	0,162	28,2	22,4	6,96	5,16	13,4	2,68	3,75	1,07	8,78	1,77	0,728	0,604	1,55	12,6	1,6
HJ3	0,067 0,0893 3333	43,9 37,1333 3333	33 27,966 6667	10,2 8,66	7,59 6,4333 3333	18,8 19,533 3333	3,76 3,9033 3333	5,26 5,46333 333	1,48 1,3533333 3	12,2 11,126 6667	2,46 2,2433 3333	0,295 0,424	0,245 0,352	0,626 0,9016 6667	11 32,2	1,78 1,6666 6667
NM1	0,09	14,4	0,271	0,084	0,0623	110	22	30,8	0,0914	0,752	0,152	0,424	0,352	0,209	34,7	8,82
NM2	0,086	15	0,175	0,0542	0,0402	139	27,8	38,9	0,078	0,642	0,129	0,4	0,332	0,849	31,6	8,41
NM3	0,08	15,7	0,207	0,0643	0,0477	121	24,2	33,9	0,0838	0,689	0,139	0,369	0,306	0,783	33,2	9,38
NM	0,0853 3333	15,0333 3333	0,2176 6667	0,0675	0,0500 6667	123,33 3333	24,666 6667	34,5333 333	0,0844	0,6943 3333	0,3976 6667	0,14	0,33	0,6136 6667	33,166 6667	8,87
KF5B	0,06	10,2	0,0882	0,0273	0,0203	5,44	1,09	1,52	0,0761	0,626	0,126	0,116	0,0965	0,247	1,7	1,09
KF2	0,035	6,72	0,0996	0,0309	0,0229	2,54	0,509	0,712	0,0337	0,277	0,0559	0,0433	0,0359	0,0919	2,8	0,475
KF4	0,058	9,18	0,0869	0,0269	0,02	3,92	0,783	1,1	0,0578	0,476	0,0959	0,0475	0,0394	0,101	2,51	0,688
K	0,051	8,7	0,0915 6667	0,0283 6667	0,0210 6667	3,9666 6667	0,794	1,11066 667	0,0558666 7	0,4596 6667	0,0926	0,0689 3333	0,0572 6667	0,1466 3333	2,3366 6667	0,751

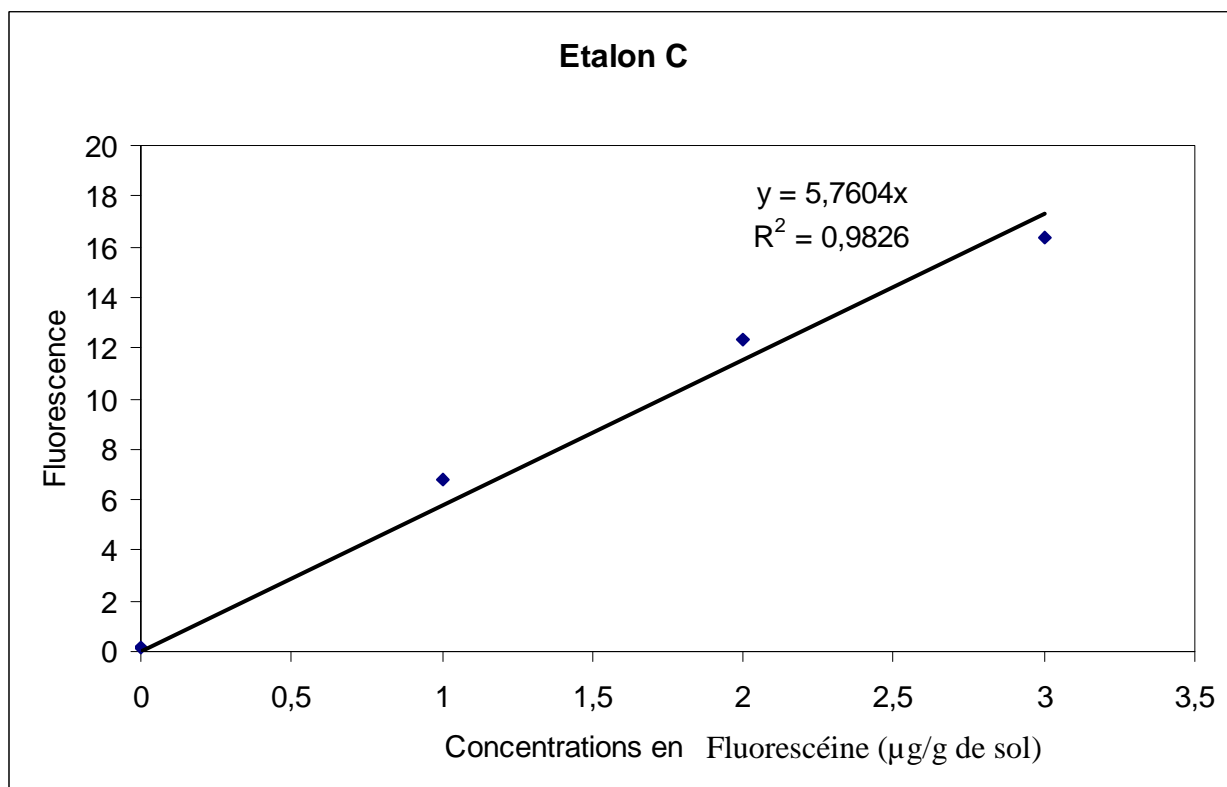
**Annexe 16 : Résultats de mesure de fluorescence pour les 3 répétitions des échantillons du sol de culture sur roche calcaire**

Les résultats obtenus sur les microplaques après passage au spectrofluoromètre sont similaires à celui présenté ci-dessous :

13h33			
		Fluorescence	
	C1	C2	C3
réplicat microplaque 1	0,481	0,656	0,699
réplicat microplaque 2	0,435	0,512	0,438
réplicat microplaque 3	0,462	0,458	0,463
réplicat microplaque 4	0,51	0,519	0,481
réplicat microplaque 5	0,477	0,579	0,49
réplicat microplaque 6	0,393	0,56	0,503
réplicat microplaque 7	0,316	0,52	0,519
réplicat microplaque 8	0,464	0,536	0,583
moyenne	0,44225	0,5425	0,522

Les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes pour les 3 points (C1, C2, C3) ainsi que pour les réplicas obtenus grâce à la microplaque. La fluorescence mesurée est ainsi d'environ 0.5 RFU

Ces données de fluorescence sont ensuite traitées grâce une droite d'étalonnage.

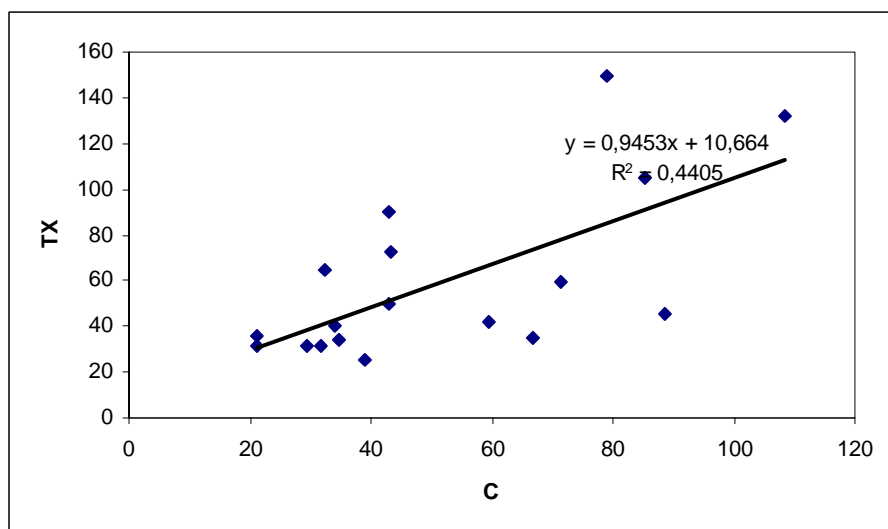


La droite d'étalonnage est obtenue par passage au spectrofluoromètre d'une gamme étalon de concentrations en fluorochromes croissantes et connues. Ces concentrations en flurochromes sont fortement corrélées avec la fluorescence (figure X), avec un coefficient de corrélation  $R^2$  de 0.9826. L'équation de droite,  $y = 5.7604x$  permet ensuite de trouver la concentration en flurochromes des échantillons de sol, à l'aide des valeurs de fluorescence. Pour cela, la formule utilisée est :  $x = y / 5.7604$  avec  $x$  : la concentrations en flurochromes et  $y$  : la fluorescence.

Les résultats pour le sol C sont présentés dans le tableau ci-dessous.

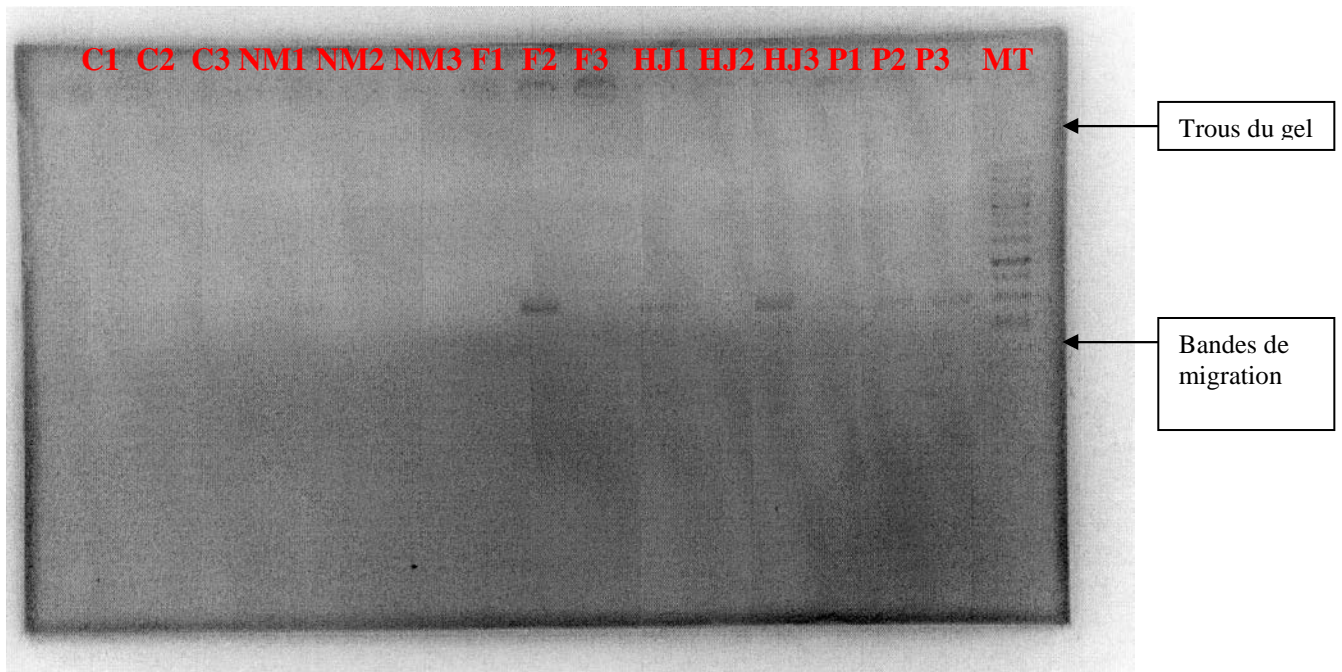
<b>Poids sol sec (g)</b>	2,13	2,13	2,13
<b>pente</b>	0,0284021	0,038612	0,0423557
<b>Fluo/puits/(g*min)</b>	0,0133343	0,0181277	0,0198853
<b>coef étalon</b>	5,7604	5,7604	5,7604
<b>(µg/puit)/ (g*min)</b>	0,0023148	0,003147	0,0034521
<b>Facteur dilution</b>	1600	1600	1600
<b>µg/g/min</b>	3,7037187	5,0351228	5,5233094
<b>µmol/g/min = U</b>	0,0098433	0,0133817	0,0146792
<b>moy (U)</b>		<b>0,0126347</b>	
<b>Ecart-Type</b>		0,0020437	

L'activité moyenne du sol brun calcaire sous culture est de 0.013 U, soit 13mU pour un écart type de 0.002.





## Annexe 17 : Résultats de PCR



**Figure 3 : Photographie du gel de migration après amplification par PCR de l'ADN des sols bruns calcaires cultivé, d'ancienne friche industrielle, bruns calciques forestiers, salés, bruns calciques sous prairie.**

MT : marqueur de taille

C1 : sol brun calcaire cultivé, point 1

C2 : sol brun calcaire cultivé, point 2

C3: sol brun calcaire cultivé, point 3

NM1: sol d'ancienne friche industrielle, point 1

NM2: sol d'ancienne friche industrielle, point 2

NM3: sol d'ancienne friche industrielle, point 3

F1: Sol brun calcique forestier, point 1

F2: Sol brun calcique forestier, point 2

F3: Sol brun calcique forestier, point 3

HJ1 : sol salé, point 1

HJ2 : sol salé, point 2

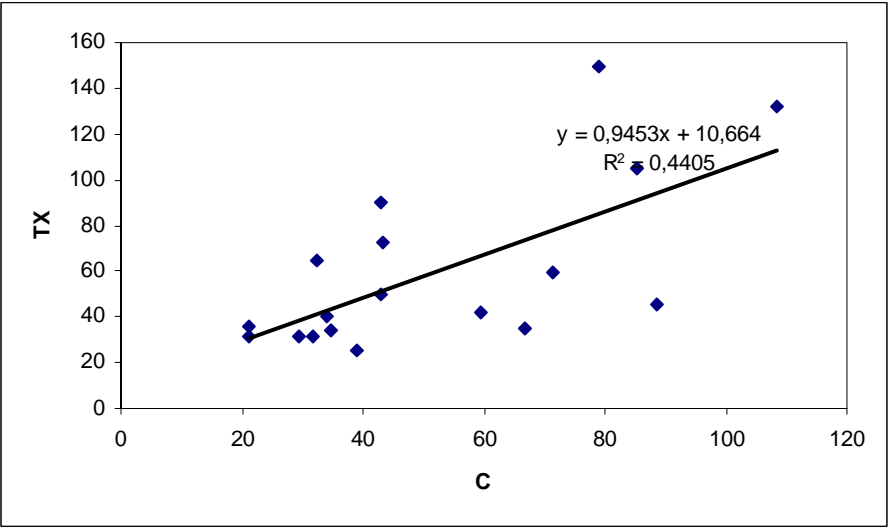
HJ3 : sol salé, point 3

P1 : sol brun calcaire sous prairie, point 1

P2: sol brun calcaire sous prairie, point 2

P3: sol brun calcaire sous prairie, point 3

**Annexe 18 : Corrélation Carbone/chlore total**



# Quantification des molécules organo-chlorées dans les sols et suivi de leur formation et dégradation – rôle des microorganismes.

## Résumé

Le chlore participe à un cycle biogéochimique complexe au sein des écosystèmes. Cependant, les quantités de chlore retenues dans les sols et les processus à l'origine de des changements de spéciation du chlore sont encore peu documentés.

Les objectifs de l'étude étaient d'estimer les formes organiques et inorganiques de chlore dans des sols d'écosystèmes contrastés. et de relier ces teneurs aux paramètres environnementaux (apports atmosphériques, caractéristiques des sols) et aux activités bactériennes globales des différents sols étudiés. L'étude a été réalisée sur les horizons de surface (organo-minéraux) de sols très contrastés (a) : un sol sur roche sédimentaire carbonatée, échantillonné sous 3 couverts végétaux différents (forêt, culture, prairie) (b) et (c): des sols ayant subi des apports de matières organiques particulières, soit de lisiers (sol de Bretagne), soit de HAP (sol de friche industrielle), (d) : un sol salé, (e) : un sol sur roche acide.

Nos résultats permettent d'apporter de nouvelles données sur les quantités de chlore retenues dans des sols sur substrats et occupations variées. Ils soulignent l'importance des formes organiques par rapport aux formes inorganiques retenues dans la majorité des sols. Ceci suggère la rapide transformation du chlore inorganique apporté par les dépôts atmosphériques en chlore organique. Les résultats permettent également de discuter des facteurs qui semblent influencer la présence de chlore dans les sols : (1) relation positive avec la matière organique des sols (2) relation négative avec le pH (3) influence de l'occupation des sols (végétaux pérennes ou non). (4) influence positive de l'activité bactérienne. A l'inverse, les apports atmosphériques élevés en chlore inorganique présumés à proximités de la mer ne semblent jouer aucun rôle sur les teneurs en chlore retenu dans les sols,

Cette étude apporte par ailleurs des informations méthodologiques pour caractériser au mieux l'activité bactérienne totale des sols. Elle permet de suggérer la mesure sur des sols frais comme l'activité la plus représentative de l'activité réelle des sols.

Des études complémentaires doivent maintenant être menées pour (1) caractériser plus précisément les microorganismes et leur activité sur l'évolution des formes de chlore (2) améliorer la compréhension de la dynamique du chlore entre les différents compartiments des écosystèmes et à différentes saisons.

Mots clés : Chlore (Cl), spéciation, sols, biogéochimie, activités bactériennes globales, incubations

---

## Abstract

Chlorine, a chemical element of the halogen group, has a complexe biogeochemical cycle in ecosystems. . However, amounts of chlorine in soils and processes controlling chlorine speciation have been still poorly documented.

Aims of this study were to estimate organic and inorganic forms of chlorine in different soils and to link Cl amounts with environmental parameters (soils characteristics, Cl external sources...) and global bacterial activity of soils.

Measurements were made from the surface organo-mineral horizons of soils chosen for their contrasting environments and land use (a): located on a calcareous rock under three different vegetation covers (forest, crop, pasture) (b) and (c) soils with high organic inputs as manure (soil of Brittany) or soil rich in polycyclic Aromatic Hydrocarbon, (d): a saline soil (Marsall, 57) (e): an acid soil (Vosges mountains).

Our results provide new data on the quantities of chlorine retained in soil developped on various substrates and under various occupations. They underline the importance of organic forms of chlorine retained. This suggests the quick transformation of inorganic Cl brought with atmospheric deposition to an oragnic form in soils. Factors that appear to influence the chlorine storage in soils were discuss : (1) positive link with organic matter content, (2) negative link with soil pH, (3) influence of land use and vegetation cover (4) Link with bacterial global activity. These parametrs are all linked, they determinate soil types, pedogenetic processes, organic matter turnover and chlorine contents.

In contrast, high atmospheric inputs of inorganic chlorine known to appear near the sea have no clear influence on the chlorine contents in brittany surface soil horizon.

This study provides methodological informations, our results suggest that the measure of global bacterial activity on fresh soils is more representative of the current microbial activity of soils.

More studies should be done now to (1) characterise microorganisms and their influence on chlorine forms and evolution in soils (2) to estimate the dynamic of chlorine and identify processes that control it in natural ecosystems

Keywords: Chlorine, organic chlorine, soils, biogeochemistry, global bacterial activity, incubations.