



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE DE LORRAINE – UFR SCI F. A.

Ecole doctorale RP2E (Ressources, Procédés, Produits, Environnement)

Discipline Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux – UMR 7360

THESE

En vue de l'obtention du grade de Docteur

Présentée par

Tiffanie LESCURE

Influence de la Matière Organique sur la Mobilité et la Biodisponibilité de l'Arsenic liées aux Activités Bactériennes dans la Zone Non Saturée des Sols Pollués

Soutenue le 3 juillet 2015, devant un jury composé de :

Mme Béatrice LAUGA	Pr, IPREM (UMR CNRS 5254), Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
M Thierry LEBEAU	Pr, LPGN (UMR CNRS 6112), Université de Nantes	Rapporteur
Mme Hélène ROUSSEL	Chef de projet, ADEME, Angers	Examinateur
M Georges ONA NGUEMA	Maître de conférences, IMPMC, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)	Examinateur
Mme Fabienne BATTAGLIA-BRUNET	Chef de projet, HDR, BRGM, Orléans	Co-directrice de thèse
Mme Pascale BAUDA	Pr, LIEC Metz (UMR CNRS 7360), Université de Lorraine	Directrice de thèse

ADEME



Agence de l'Environnement
et de la Maîtrise de l'Energie

Remerciements

En premier lieu, j'exprime ma reconnaissance à mes parents qui m'ont « subventionnée » pendant toutes ces années et m'ont transmis leur curiosité. Vous m'avez donné le goût d'apprendre et la soif de découverte : un monde de saveurs ! Je vous dédie ce travail.

Je remercie mes co-financeurs : l'ADEME et le BRGM pour m'avoir donné l'opportunité et surtout les moyens de réaliser ce travail de recherche.

Un grand merci à Francis Garrido et Sébastien Dupraz, ancien et actuel responsables de l'Unité BioGéochimie Environnementale et qualité de l'Eau du BRGM pour leur disponibilité (même pour nous, petits doctorants) et pour avoir contribué au bon déroulement de cette thèse.

Ma profonde reconnaissance va à Fabienne Battaglia-Brunet qui m'a accompagnée, aidée, soutenue durant ces trois années et demie. Au-delà de vos talents -reconnus- de pédagogue et d'encadrante, vous possédez tant de qualités humaines que je te tenais, ici, à vous exprimer toute mon admiration et mon respect.

Un grand merci à Pascale Bauda pour avoir accepté de diriger ma thèse, pour m'avoir accordé sa confiance, et pour m'avoir aidée durant la rédaction du présent manuscrit.

Je remercie les Professeurs Béatrice Lauga de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour et Thierry Lebeau de l'Université de Nantes pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également Hélène Roussel et Georges Ona Nguema pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Merci à Catherine Joulian du BRGM pour m'avoir formée sur les aspects BioMol, ainsi que pour ses conseils et ses relectures attentives du manuscrit et de toutes les publications. Quel travail ! Merci beaucoup !

J'adresse également mes profonds remerciements aux autres membres du comité de pilotage de cette thèse pour leurs conseils, ainsi que pour les discussions scientifiques de grand intérêt. Merci donc à Isabelle Lamy de l'INRA de Versailles-Grignon, au Professeur Marie-Claire Lett de l'Université Louis Pasteur à Strasbourg et à Catherine Hénault de l'INRA d'Ardon.

Un coucou et un grand merci à tous les stagiaires qui m'ont aidée dans cette entreprise : Paul, Julie, Clément « stagiairounet », Taoikal. Je n'aurais pas eu tous ces résultats sans votre travail consciencieux. Bonne continuation et bonne réussite !

Merci à Stéphanie Coulon pour sa gentillesse et son aide pour les manips de microbiologie et de biologie moléculaire pendant mes premières années au BRGM. Bon vent dans ton « nouveau » travail.

Merci aux techniciens qui m'ont épaulée et en particulier à Dominique Breeze pour la multitude d'analyses d'arsenic et Mickaël pour la BioMol. Merci également à Clément Bojic de m'avoir formée à la pratique du Microtox. Merci Fabienne P. et Cécilia, pour votre gentillesse et pour nous avoir facilité le travail au quotidien.

Je remercie encore tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, par leur bienveillance ont été *l'air de rien* d'une aide précieuse dans l'accomplissement de cette thèse (et pas uniquement d'elle) : Monsieur Mabs, je pense à vous. Merci pour tout !

Amine, merci pour ta patience et merci pour ton aide, alors que toi-même es encore très pris par ta propre thèse. Nous allons ensemble en venir à bout. Une dernière ligne droite et bientôt : *en route !*

Enfin, et surtout, un immense merci au petit-amour-de-ma-vie qui, d'un sourire, a été capable de me redonner espoir et motivation lorsque ce fut difficile. Je t'aime mon fils : tu resteras le plus beau projet de ces dernières années, et des nombreuses qui viendront *si Dieu le veut*.

Table des matières

Remerciements	2
Introduction générale et objectifs	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	3
I.1. L'arsenic	4
I.1.1. Généralités	4
I.1.1. Propriétés physico-chimiques et spéciation dans les sols	5
I.1.2. Ecotoxicité	7
I.2. Transformation de l'As par les bactéries	8
I.2.1. Oxydation de l'arsénite (AsIII → AsV)	8
I.2.2. Réduction de l'arséniate (AsV → AsIII)	9
I.2.3. Méthylation et déméthylation	10
I.2.4. Gènes impliqués dans les réactions d'oxydation et de réduction de l'As	11
I.3. La matière organique des sols	17
I.3.1. Sols	17
I.3.2. Matières organiques des sols	19
I.3.3. Dynamique des communautés microbiennes des sols	21
I.4. Influence de substrats organiques sur l'oxydation de l'AsIII	24
I.4.1. Interactions abiotiques entre matières organiques et As	24
I.4.2. Effet de la matière organique sur les bactéries transformant l'As	25
I.5. Positionnement de la thèse dans la perspective de l'état de l'art	29
Introduction au Chapitre II.	33
Chapitre II. Influence d'un apport de substrats organiques sur l'expression du gène <i>aioA</i>, et sur l'oxydation de l'AsIII par <i>Thiomonas delicata</i> sp. <i>arsenivorans</i> et <i>Herminimonas arsenicoxydans</i>	35
II.1. Introduction	35
II.2. Matériel et Méthodes	38
II.2.1. Souches bactériennes	38
II.2.2. Milieux de culture	38
II.2.3. Conditions d'incubation et mesure de la croissance	39
II.2.4. Spéciation de l'arsenic : séparation par échange d'ions	43
II.2.5. Calcul de la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII	43
II.2.6. Extraction des ARN et synthèse des ADNc	43

II.2.7. Conditions de PCR _____	44
II.3. Résultats et discussion _____	46
II.3.1. Expression du gène <i>aioA</i> pendant la croissance des bactéries en présence de 75 mg.L ⁻¹ d'AsIII ____	47
II.3.2. Expériences à 2 mg.L ⁻¹ d'AsIII. _____	50
II.4. Conclusions _____	56
Introduction au Chapitre III. _____	57
Chapitre III. A synthetic standardized mixture to study the impact of added organic matter on soil bacterial communities _____	59
Summary _____	59
III.1. Introduction _____	60
III.2. Design of the synthetic model organic mixture (SMOM) _____	61
III.3. Preparation of the SMOM _____	64
III.4. Conclusion _____	65
Supplementary Material SM1: Composition of the organic compounds SMOM (for 3L or 100 g dry weight of mixture) _____	66
Introduction au Chapitre IV. _____	69
Chapitre IV. Influence of organic matters on AsIII oxidation by the microflora of polluted soils _____	71
Abstract _____	71
IV.1. Introduction _____	72
IV.2. Material and methods _____	73
IV.2.1. Soil sampling and characterization _____	73
IV.2.2. AsIII oxidizing activity tests _____	76
IV.2.3. Principal Component Analysis _____	77
IV.2.4. Soil incubations without addition of AsIII _____	77
IV.3. Results and discussion _____	78
IV.3.1. AsIII-oxidizing activity in relation to soil characteristics _____	78
IV.3.2. Soil incubations without added As _____	87
IV.4. Conclusions _____	90
ESM1. Correlation (Pearson) between soils parameters, rate constants and their ratios _____	91
ESM2. Influence of soil storage _____	94

ESM3. Evolution of AsV concentration in the AsIII oxidizing tests	95
ESM4. Complementary information about soil incubation experiments	96
Chapitre V. Conclusions générales et perspectives	99
Références bibliographiques	107
ANNEXES	127
Annexe 1 : Design d'amorces <i>arsC</i>	129
Annexe 2. Test de toxicité aigüe de la SMOM	131
Annexe 3 : Comparaison des compositions de l'extrait de levure et du mélange synthétique de matières organique (SMOM)	132
Annexe 4 : Expériences témoins	134
1. Méthodes	134
a. Témoins sans sol	134
b. Témoins avec sol autoclavé + extrait de levure	134
c. Témoins avec sol autoclavé + mixture	134
2. Résultats des expériences témoin	135
a. Témoins abiotiques sans sol	135
b. Témoins abiotiques avec sol	136
En présence d'extrait de levure	136
En présence de mixture	137

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Aio : Arsénite oxydase

Al : Aluminium

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

Arr : Arséniate réductase respiratoire

Ars : Arséniate résistance système

As : Arsenic

AsIII : Arsénite

AsV : Arséniate

CBS : Cystathionine- β -Synthase

CE-SSCP : Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism

EPS : ExoPolySaccharides

Fe : Fer

H.ars : *Herminiimonas arsenicoxydans*

MIBK : Méthyl IsoButyl Cétone

Mn : Manganèse

MO : Matière Organique

MOD : Matière Organique Dissoute

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDC : Pyrrolidine DithioCarbamate d'ammonium

PE : *Priming effect*

RBS : Ribosom Binding Sites

SAA-F : Spectroscopie par Absorption Atomique Flamme

SIP : Stable Isotope Probing

SMOM : Synthetic Model Organic Mixture

T. arsenivorans : *Thiomonas delicata* sp. *arsenivorans*

WEOM : Water-Extractable Organic Matter

Liste des figures

Figure 1. Schéma conceptuel représentant l'approche utilisée dans la synthèse bibliographique pour aborder l'effet d'un apport de matières organiques sur les transformations bactériennes de l'As dans les sols	3
Figure 2. Synthèses des systèmes bactériens d'oxydation et de réduction de l'arsenic, d'après Silver and Phung, 2005 .	11
Figure 3. Modèle de l'AsIII-oxydase hétérodimérique d' <i>A. faecalis</i> [Quéméneur (2008)] d'après Silver & Phung, 2005].	13
Figure 4. Organisation des gènes <i>aio</i> chez <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> et d'autres microorganismes bactériens et archéens (adapté de Muller et al, 2007) avec la nomenclature actuelle	13
Figure 5. Modèle de l'AsV réductase respiratoire [Quéméneur (2008)] d'après Silver & Phung, 2005].	15
Figure 6. Organisation génétique de deux clusters de résistance à l'arsenic chez <i>Ochrobactrum tritici</i> SCII24, d'après Branco et al (2008) .	17
Figure 7. Succession des différents groupes trophiques microbiens au cours de la dégradation de la MO dans les sols, d'après Pascaud, 2010 .	22
Figure 8. Contribution des <i>priming effect</i> (PE) « apparent » et « réel » au <i>priming effect</i> total, au cours du temps (Blagodatsky et al, 2010).	23
Figure 9. Etat des connaissances disponibles au démarrage de la thèse : influence de la matière organique sur la spéciation et la mobilité de l'As	28
Figure 10. Hypothèses permettant d'expliquer, au niveau cellulaire, l'effet de la matière organique sur la vitesse globale d'oxydation de l'AsIII, observé dans les études publiées avant cette thèse.	30
Figure 11. Protocole de détermination des vitesses spécifiques d'oxydation de l'AsIII : nature et concentration en matière organique identiques dans le milieu de croissance et au cours des déterminations de cinétiques d'oxydation de l'AsIII.	41
Figure 12. Protocole utilisé afin de déterminer l'influence de la présence de 0,2 g.L ⁻¹ d'AsIII sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII par des bactéries cultivées en présence de différentes concentrations en substrats organiques (données en g.L ⁻¹ dans les représentations des flacons)	42
Figure 13. (A) Courbe de croissance de <i>T. arsenivorans</i> en présence de deux concentrations en extrait de levure et histogramme représentant les ratios ARN <i>aioA</i> /ADN <i>aioA</i> ; à 0,2 g.L ⁻¹ (orange) et 1 g.L ⁻¹ (bleu) ; (B) Evolution de la concentration en AsV dans les cultures en présence de 0,2 et 1 g.L ⁻¹ d'extrait de levure.	47
Figure 14. (A) Courbe de croissance de <i>H. arsenicoxydans</i> en présence de deux concentrations en extrait de levure et histogramme représentant les ratios ARN <i>aioA</i> /ADN <i>aioA</i> ; à 0,2 g.L ⁻¹ (orange) et 1 g.L ⁻¹ (bleu) ; (B) Evolution de la concentration en AsV dans les cultures en présence de 0,2 et 1 g.L ⁻¹ d'extrait de levure.	48

Figure 15. Vitesse spécifique d'oxydation d'AsIII par les souches pures à concentration cellulaire normée, et à 2 mg.L ⁻¹ d'AsIII en présence de 0,05 ; 0,2 et 1 g.L ⁻¹ de source carbonée. (A) <i>T. arsenivorans</i> ; (B) <i>H. arsenicoxydans</i>	50
Figure 16. Vitesses spécifiques d'oxydation de l'AsIII à 2 mg.L ⁻¹ d'AsIII par <i>T. arsenivorans</i> et <i>H. arsenicoxydans</i> en présence (A) d'extrait de levure et (B) de substrats simples, pendant la pré-culture.	52
Figure 17. Evolution of AsV concentration in the AsIII oxidizing tests performed with (a) Cheni forest soil, (b) Cheni site soil, (c) Cheni meadow soil as inocula, in CAsO1 medium amended with 1 mM AsIII. Graphs for the other soils are given in ESM3. Error bars represent the standard deviation of the mean of three replicates	78
Figure 18. Principal Component Analysis of the soil characteristics (circles) with AsIII oxidation rate constants integrated as supplementary data (squares)	79
Figure 19. Evolution of AsIII oxidation rate constant ratio with soil respiration rate. a: ratio C ₀ /C _{0.08} ; b: ratio C _{0.08} /C _{0.4} . Open symbols: yeast extract. Closed symbols: SMOM. Diamonds: Salsigne ZE2. Small squares: Salsigne ZE1. Small circles: Cheni site. Average size circles: Cheni field. Big circles: Cheni meadow. Small triangles: Auzon 1. Big triangles: Auzon 2. Big squares: Cheni forest. Error bars represent the standard deviation of the ratios calculated with the Taylor expansion method, based on three replicates	82
Figure 20. Principal Component Analysis of the soil characteristics (circles) with the ratios of AsIII oxidation rate constants integrated as supplementary data (squares)	83
Figure 21. Incubations of soils with and without SMOM. (a) Concentrations in total As; (b) percentage of AsIII in the aqueous phase. (c) Concentration in total Fe.	88
Figure 22. Impact de la matière organique sur la biogéochimie de l'As dans les sols : apports de la présente thèse surlignés en jaune	102
Figure 23. Représentation « Logo » des dix séquences protéiques ArsC sélectionnées (généralisé sur le site de Block Maker : http://blocks.fhcr.org/).	129
Figure 24. Exemple d'amorces proposées par le programme CODEHOP et séquences d'acides aminés à partir desquelles elles ont été dessinées	130
Figure 25. Graphiques obtenus en conditions abiotiques.	136
Figure 26. Graphiques de comparaison entre témoins abiotiques et essais pour le sol Auzon 2. Concentrations en extrait de levure A : 0 g.L ⁻¹ ; B : 1 g.L ⁻¹ ; C : 10 g.L ⁻¹ .	137

Liste des tableaux et tables

Tableau 1. Séquence et source des amorces _____	45
Tableau 2. Couples d'amorces et conditions opératoires _____	45
Tableau 3. Evolution de la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII entre la condition « 0 substrat organique » et la condition « 0,2 g.L ⁻¹ de substrat organique » pendant la cinétique d'oxydation, à différentes conditions de pré-culture. _____	53
Tableau 4. Comparaison des vitesses spécifiques d'oxydation obtenues dans la présente étude et rapportées dans la littérature _____	54
Tableau 5. Exemple de résultats issus de Block Maker à partir des dix séquences <i>arsC</i> _____	129
Tableau 6. Résultats de l'expérience abiotique sans sol : concentrations en AsV analysées à t0 et t final. _____	135

Introduction générale et objectifs

La microflore des sols joue un rôle majeur dans le comportement des éléments métalliques et métalloïdes. La spéciation de l'arsenic, en particulier, est liée à l'activité de bactéries capables d'oxyder, de réduire ou de méthyler cet élément, et conditionne son degré de mobilité, de biodisponibilité et de toxicité. L'arsénite (AsIII) est plus toxique que l'arséniate (AsV) et plus mobile. L'activité bactérienne globale d'oxydation de l'AsIII tend à diminuer la toxicité de l'arsenic dans les sols et le risque de pollution de l'aquifère sous-jacent. Des données collectées dans le cadre de différentes expérimentations suggèrent un effet de la matière organique sur la vitesse ou la capacité d'oxydation de l'arsenic par les bactéries en présence d'oxygène. Cet effet et son impact potentiel sur le comportement de l'arsenic dans un sol réel n'ont pas été déterminés jusqu'à présent. La concentration et la nature de la matière organique d'un sol conditionnent sa qualité agronomique. Sur un site pollué, un apport de matière organique peut être préconisé pour améliorer la croissance des plantes dans le cadre d'une opération de phyto-stabilisation. Par ailleurs, dans un contexte de pollution diffuse, les pratiques agricoles d'amendement des sols pourraient avoir un impact sur le transfert d'arsenic, à travers les activités bactériennes, soit vers les eaux souterraines, soit vers les produits alimentaires.

L'objectif du présent projet de thèse était de quantifier l'influence de la matière organique sur la spéciation de l'arsenic par la microflore de sols pollués, et les conséquences de ce phénomène biogéochimique sur la mobilité, la biodisponibilité et l'écotoxicité de ce métalloïde.

Pour cela, l'étude précise et systématique de l'influence de divers types de matières organiques sur l'activité de bactéries AsIII-oxydantes, de microflores globales de sols réels et sur la mobilisation de l'As dans ces sols a été effectuée.

L'ensemble des données obtenues est présenté dans ce manuscrit qui comporte cinq chapitres.

Le chapitre 1 présente un état de l'art sur l'arsenic, sa transformation dans l'environnement par les microorganismes et les gènes associés à ces réactions, les interactions abiotiques de l'arsenic avec les composants du sol et en particulier avec la matière organique intrinsèque de ce compartiment environnemental ainsi que les premières études qui ont montré un effet de la matière organique sur les activités bactériennes liées à l'arsenic. Les chapitres 2, 3 et 4 sont présentés sous forme d'articles.

Le **chapitre 2** porte sur l'étude de l'influence de la nature et de la concentration en matière organique sur la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII et l'expression du gène *aiiA* par deux souches bactériennes, *Thiomonas delicata* sp. *arsenivorans* et *Herminiimonas arsenicoxydans*.

Le chapitre 3 est consacré à l'élaboration d'un mélange synthétique de molécules organiques représentatif de la matière organique naturelle des sols en termes de ratio C/N et fonctions carboxyliques / fonctions phénoliques. Cette mixture est proposée en tant que modèle reproductible des substances utilisées pour amender les sols pollués en laboratoire, afin de pallier aux inconvénients des substances complexes naturelles et des amendements constitués de simples molécules organiques utilisés jusqu'à présent.

Le chapitre 4 décrit une étude de l'influence de la matière organique sur la spéciation de l'As et sur la mobilité du métalloïde toxique influencée par l'activité de microflore globales de sols pollués, ainsi que l'influence des caractéristiques des sols sur la constante de vitesse d'oxydation microbienne de l'As^{III}.

Le chapitre 5 présente les conclusions et perspectives de ce travail de thèse, tant au niveau fondamental que sous l'angle des implications environnementales.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

L'objectif de cette synthèse bibliographique est de situer notre travail dans le contexte scientifique actuel concernant l'influence des matières organiques des sols sur la mobilité de l'arsenic. Les principales questions posées par la problématique et les manques à combler au démarrage de cette thèse nous ont conduits à structurer l'état de l'art en quatre sections, figurées sous forme d'un schéma conceptuel (Figure 1). La section (I) présente de façon générale l'arsenic ainsi que ses propriétés physico-chimiques et toxicologiques ; la section (II) dresse l'état de l'art concernant les transformations microbiennes de ce métalloïde (oxydation, réduction et méthylation) ; la section (III) traite des sols et du rôle fonctionnel qu'y jouent les microorganismes dans le processus de dégradation de la matière organique ; enfin, la section (IV) fait un point sur la littérature rapportant une influence des substrats organiques sur l'oxydation abiotique et biologique de l'AsIII dans les sols. Cependant, alors que l'oxydation abiotique de l'AsIII par la matière organique est largement démontrée et étudiée, jusqu'à présent aucune étude n'avait porté sur l'influence de la concentration et de la nature de la matière organique sur l'oxydation bactérienne de l'AsIII en conditions aérobies. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette présente thèse.

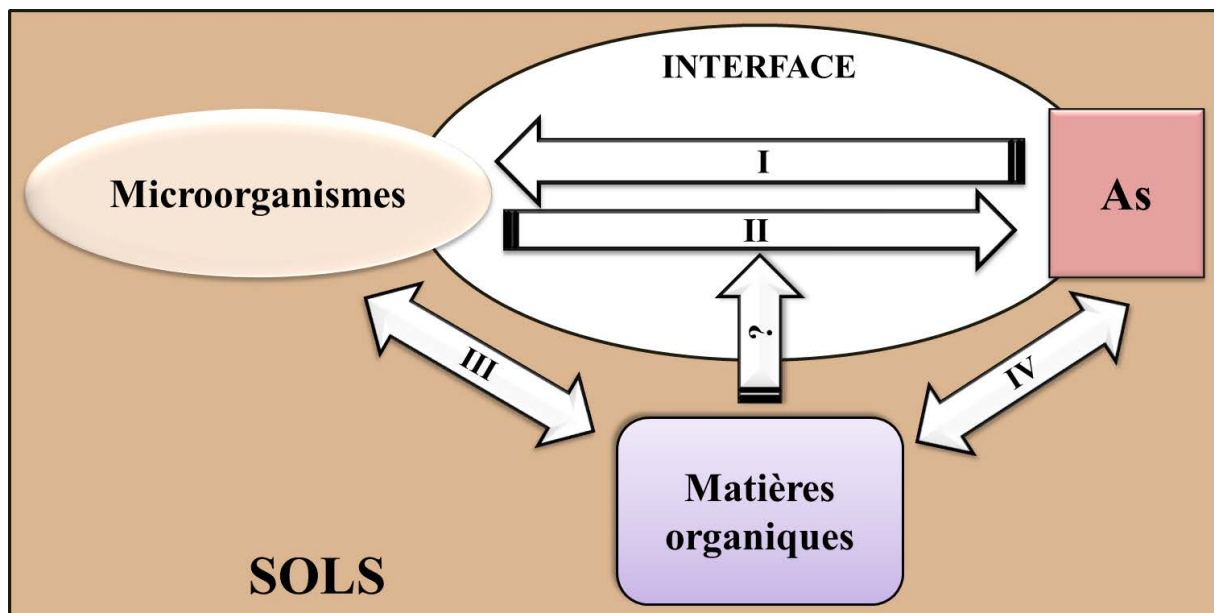


Figure 1. Schéma conceptuel représentant l'approche utilisée dans la synthèse bibliographique pour aborder l'effet d'un apport de matières organiques sur les transformations bactériennes de l'As dans les sols

I.1. L'arsenic

I.1.1. Généralités

L'arsenic (As) est un métalloïde appartenant au groupe Va de la classification périodique des éléments. Ubiquitaire, il est naturellement présent dans la croûte terrestre dans laquelle sa concentration moyenne varie entre 2 et 5 mg.kg⁻¹ (20^{ème} élément par ordre d'abondance). L'arsenic se retrouve très souvent associé à des minéraux porteurs de métaux ou des molécules soufrées ([Oremland & Stolz, 2003](#)). Dans certains sols, la concentration naturelle en arsenic peut atteindre plusieurs centaines de parties par millions (ppm). Ce métalloïde est largement répandu dans les roches qui renferment 99% de l'As total dans l'environnement ([Bhumba & Keefer, 1994](#)). L'altération naturelle de ces roches renfermant de l'As entraîne une redistribution de cet élément vers les autres compartiments environnementaux. D'importantes quantités d'As sont par ailleurs libérées par les éruptions volcaniques, les sources thermales et les fumées dues aux feux de forêt. Environ un tiers de l'As dans l'atmosphère proviendrait de ces sources naturelles, et le reste serait d'origine anthropique.

La dispersion d'As anthropogénique est principalement liée aux activités minières, industrielles et agricoles. Les activités minières sont une source significative d'apport d'As dans l'environnement. L'As est présent en fortes proportions dans des minéraux porteurs de métaux communément exploités, tels que le Cu, le Ni, le Co, le Pb, l'Ag, l'Au. Lors de l'extraction minière de ces éléments, l'As, en tant que produit secondaire, se retrouve dans les déchets (stériles miniers) ou les eaux de drainage des galeries minières ([Bodénan et al, 2001](#); [Casiot et al, 2003](#)).

Il existe plus de 200 minéraux contenant de l'arsenic qui correspondent à des arséniates, des sulfures et sulfosels, des arsénites, des arséniures ou encore des oxydes (tableau, [Laperche et al, 2003](#)).

Tableau : Caractéristiques et exemples des principales phases porteuses de l'arsenic dans les sols (d'après ([Laperche et al, 2003](#)))

Type	Présence	Exemple (nom, formule chimique)	
Arséniate	Représente 60% des minéraux riches en As	scorodite	FeAsO ₄ , 2 H ₂ O
		pharmacosidérite	Fe(AsO ₄) ₃ (OH) ₃ , 6 H ₂ O
		pharmacolite	CaHAsO ₄
Sulfure, sulfosel	Stabilisé en conditions réductrices, 20% des minéraux arséniés	arsénopyrite	FeAsS
		orpiment	As ₂ S ₃
		réalgar	AsS
Arsénite	Stabilisé en conditions thermodynamiques restreintes	armangite	Mn ₃ (AsO ₃) ₂
		finnemanite	Pb ₅ (AsO ₃) ₃ Cl
Arséniure	Surtout métallurgie extractive	skutterudite	CoAs ₃
		jöllingite	FeAs ₂
Oxyde	Forte solubilité, forme principale de commercialisation	claudetite	As ₂ O ₃
		arsenolite	As ₂ O ₃

L'arsenic est un élément chalcophile, il se combine facilement au soufre pour former des sulfarséniures de métaux. Il a été utilisé comme indicateur pour la prospection minière, de l'or en particulier. Les sols peuvent contenir des minéraux primaires issus de l'altération de la roche mère du sous-sol.

Les activités industrielles contribuent également à la libération d'As dans l'environnement. L'arsenic a été et est toujours très utilisé dans les industries, chimiques, pharmaceutiques et phytosanitaires, ainsi que dans celles du bois, du cuir, du verre, des peintures, de l'électronique et de l'armement. Les contaminations localisées près des fonderies de métaux indiquent que la plus grande partie de l'As contenu dans les fumées est recueillie rapidement sous forme de retombées sèches et dans les précipitations. Les activités agricoles, notamment la viticulture, la production fruitière et les cultures maraîchères intensives, ont largement utilisé des pesticides contenant de l'AsV (arséniate de plomb) et/ou de l'AsIII (arsénite de calcium). Depuis l'introduction des pesticides organochlorés puis organophosphorés (entre les années 1940 et 1970), leur utilisation a beaucoup diminué avant d'être interdite en France (en 2001 pour l'arsénite de sodium). L'arsenic reste en revanche utilisé sous forme de diméthylarsinate de sodium dans les insecticides.

Ces applications expliquent la contamination de nombreux sols agricoles et de sites industriels en arsenic. Aujourd'hui, on ne recense pas moins de 1103 sites pollués à l'arsenic en France (<http://basol.developpement-durable.gouv.fr/>).

I.1.1. Propriétés physico-chimiques et spéciation dans les sols

L'arsenic inorganique est trouvé dans l'environnement sous quatre états d'oxydation : l'arsine (As^{-III}), l'arsenic natif (As⁰), l'arsénite (As^{III}) et l'arséniate (As^V). La proportion relative de ces espèces est étroitement liée à des mécanismes de transformation microbiens et aux caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, potentiel d'oxydo-réduction Eh...).

Les principales espèces d'As présentes dans les eaux sont des oxyanions ou des composés neutres inorganiques. Dans le milieu aquatique, les espèces inorganiques prédominantes de l'arsenic sont l'arsénite et l'arséniate. L'As élémentaire est rarement détecté et le degré d'oxydation (-III) n'est présent que dans les environnements très réducteurs (Cullen & Reimer, 1989). L'arséniate (As^V), fréquemment noté AsO₄³⁻, a un pKa de 7,0 avec des formes HAsO₄²⁻ et H₂AsO₄²⁻ d'égales abondances à pH 7,0. L'As^{III} quant à lui est noté H₃AsO₃. Les formes d'arsenic organiques sont principalement trouvées dans les organismes vivants, sous formes méthylées.

Dans les sols non contaminés, la concentration moyenne globale est de l'ordre de 5 à 6 mg.kg⁻¹, avec des variations de plus d'un ordre de magnitude liées au type de sol considéré ([Chen et al, 2002](#)).

Les oxydes de fer jouent un rôle majeur dans le comportement biogéochimique de l'As. Les oxyhydroxydes de fer, comme la ferrihydrite sont les composants du sol les plus réactifs pour la sorption de l'arsenic : ils peuvent piéger plusieurs centaines de mg par kg d'arsenic, sous forme AsIII ou AsV (Goldberg, 2002). L'AsIII et l'AsV s'adsorbent à la surface des oxydes et des oxyhydroxydes de fer sous la forme de complexe de sphère interne. Des mécanismes de sorption bidentée et binucléée similaires ont été mis en évidence pour l'AsV et l'AsIII, et un complexe supplémentaire de type bidenté mononucléaire a été mis en évidence avec l'AsIII, en particulier dans le cas de l'hématite et de la ferrihydrite ([Ona-Nguema et al, 2005](#)).

La mobilité de l'arsenic dans l'environnement est donc dépendante de sa forme, de sa spéciation et de son interaction avec les phases minérales (sulfures, oxyhydroxydes métalliques, argiles et carbonates de calcium). Les phénomènes de précipitation/dissolution, d'adsorption/désorption et la volatilisation sont donc de première importance pour expliquer la mobilité de l'As dans l'environnement et son transfert dans les eaux interstitielles. Ainsi, à pH neutre, en conditions oxygénées, l'arsenic est majoritairement présent sous forme d'AsV, et immobilisé par les oxydes métalliques ([Smedley & Kinniburgh, 2002](#)). L'AsIII, plus mobile, persiste dans la solution du sol et risque donc de migrer plus rapidement vers les nappes phréatiques.

Le rôle des oxydes de fer en tant que pièges à arsenic a été mis en évidence à la fois sur des sites pollués et dans des sols contenant de l'arsenic d'origine géologique ([Morin & Calas, 2006](#)). Ainsi, sur le site d'Auzon, pollué par des opérations de grillage de sulfures d'arsenic, puis de synthèse de produits chimiques arséniés, les sols contiennent jusqu'à 1,2% d'arsenic. L'horizon de surface contient des minéraux arséniés hérités de la source de contamination, tels que l'arséniosidérite et la schultenite (arséniate de plomb). Cependant, une analyse détaillée de la spéciation de l'arsenic dans les profils de sols a révélé que la plus grande partie de l'arsenic présent sous forme d'arséniate était piégé sur des oxyhydroxydes de fer ([Cancès et al, 2005](#)). Ce phénomène de piégeage se produit après l'altération des minéraux sources. Au niveau d'une anomalie géochimique riche en arsenic, sur le site d'Echassière (Allier, France), les sols se sont développés sur des schistes riches en arsenic ([Morin et al, 2002](#)). Induisant des concentrations atteignant jusqu'à 900 mg.kg⁻¹ dans l'horizon de surface. Les minéraux primaires porteurs d'arsenic dans les roches sous-jacentes sont l'arsénopyrite, la löllingite (FeAs₂) et une solution solide de pharmacosidérite proche de la pharmacosidérite à baryum BaFe₄(AsO₄)₃(OH)₅·5 H₂O. Cependant, ces formes ne représentent plus que 20-30% de l'arsenic total dans l'horizon de surface, le sol étant progressivement enrichi en arsenic adsorbé sur des oxydes de fer peu cristallisés.

A pH acide à modérément acide, l'AsV est davantage adsorbé sur les oxyhydroxydes de fer que l'AsIII ([Morin & Calas, 2006](#)). Par conséquent, l'AsV est moins mobile que l'AsIII dans les sols de type minier ou sol de forêt acides.

I.1.2. Ecotoxicité

Chaque forme d'As présente des propriétés physico-chimiques différentes et donc des mécanismes de toxicité différents. La toxicité de l'As dépend de sa forme chimique, de son degré d'oxydation et de sa biodisponibilité, c'est-à-dire sa capacité à être libéré dans l'environnement et absorbé par un organisme ([Caussy, 2003](#)).

L'AsV est un analogue structurel du phosphate et se comporte comme tel : il pénètre dans la cellule *via* les systèmes de transport du phosphate, inhibant les processus de phosphorylation. Son mécanisme de toxicité est lié à leur capacité à remplacer les groupements phosphates de certaines molécules telles que l'adénosine triphosphate (ATP) ou à passer par les canaux sodium ([Choong et al, 2007](#); [Hughes, 2002](#)). Cette forme peut donc perturber la synthèse d'ATP et inhiber la glycolyse.

Parmi les formes inorganiques, la toxicité de l'AsIII est considérée comme 10 à 60 fois plus élevée que celle de l'AsV. L'AsIII présente une structure proche de celle du glycérol et est transporté à travers les membranes cellulaires par les aquaglycéroporines, protéines transmembranaires de transport du glycérol et de petites molécules non chargées. Sa toxicité est due à sa grande affinité pour les groupements soufrés tels que les thiols et les composés sulfhydriles constitutifs de nombreuses protéines ou enzymes (telles que la pyruvate déshydrogénase et la 2-oxoglutarate déshydrogénase, enzymes clés du cycle de Krebs). Ceci peut engendrer un dérèglement métabolique par inhibition compétitive d'enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. Cette voie de toxicité en fait une forme particulièrement toxique de l'arsenic ([Oremland & Stolz, 2003](#)).

Les composés arséniés méthylés d'AsIII sont cytotoxiques et génotoxiques et sont également de puissants inhibiteurs des activités enzymatiques ([Rossman, 2003](#)). Depuis quelques années, plusieurs auteurs ont montré que les espèces méthylées pouvaient être plus toxiques que les formes inorganiques, et plus particulièrement les formes méthylées d'AsIII (MMAsIII et DMAsIII) considérées comme plus toxiques que l'AsIII lui-même ([Dopp et al, 2004](#); [Drobna et al, 2008](#); [Hirano et al, 2004](#); [Lin et al, 1999](#); [Thomas et al, 2001](#)). [Hirano et al \(2004\)](#) ont proposé l'ordre de toxicité des espèces arséniées suivant : DMAsIII = MMAsIII > AsIII > AsV > DMAsV > MMAsV > TMAO.

En plus de ces mécanismes de toxicité directs, les différentes formes de l'arsenic peuvent également augmenter la formation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS), favorisant ainsi les dommages liés à l'ADN via le stress oxydatif ([Jomova et al, 2011](#); [Shi et al, 2004](#)).

I.2. Transformation de l'As par les bactéries

Le rôle majeur de la microflore des sols sur la spéciation, et donc sur la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité des éléments métalliques et métalloïdes n'est plus à démontrer. Des bactéries capables de modifier l'état d'oxydation de l'arsenic ont été mises en évidence ces dernières années dans la plupart des environnements terrestres et aquatiques ([Battaglia-Brunet et al, 2006](#); [Campos et al, 2010](#); [Duquesne et al, 2008](#); [Hoeft et al, 2004](#); [Quéméneur, 2008](#); [Quéméneur et al, 2010](#)).

I.2.1. Oxydation de l'arsénite (AsIII → AsV)

Certaines bactéries sont capables d'oxyder l'AsIII en AsV. Parmi elles, certaines oxydent l'AsIII à des fins de détoxification, alors que d'autres utilisent la transformation de l'As comme source d'énergie. L'existence de bactéries AsIII-oxydantes est connue depuis les travaux de [Green \(1918\)](#) qui, le premier, a isolé *Bacillus arsenoxydans*. De nombreuses souches bactériennes possédant cette capacité ont depuis lors été isolées d'environnements aussi variés que les eaux d'égouts, les lacs hypersalés, les sources géothermales, les sols et les sédiments contaminés ([Battaglia-Brunet et al, 2006](#); [Inskip et al, 2007](#); [Oremland et al, 2002](#); [Salmassi et al, 2002](#); [Turner & Legge, 1954](#)). Les bactéries AsIII-oxydantes sont physiologiquement diversifiées. Ce sont principalement des *Proteobacteria*, mais elles peuvent également appartenir aux *phyla* des *Firmicutes*, des *Actinobacteria*, des *Deinococcus-Thermus* et *Aquificae*, ainsi qu'au *phylum* archéen des *Crenarchaeota*. En condition aérobie, leur métabolisme peut être chimioorganotrophe, comme *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 ([Weeger et al, 1999](#)) et *Agrobacterium tumefaciens* 5A ([Macur et al, 2004](#)) ou chimiolithotrophe comme *Thiomonas arsenivorans* ([Battaglia-Brunet et al, 2010](#)) qui utilise l'AsIII comme seul donneur d'électrons pour produire de l'énergie.

En condition anaérobie, les souches *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 ([Oremland et al, 2002](#)), *Azoarcus* sp. DAO1 et *Sinorhizobium* sp. DAO10 ([Rhine et al, 2006](#)), sont également capables d'oxyder l'AsIII en utilisant le NO₃⁻ comme accepteur d'électrons.

Les microorganismes AsIII-oxydants autotrophes sont capables de se développer en utilisant l'arsénite comme donneur d'électron, l'oxygène comme accepteur d'électron et le CO₂ (ou le HCO₃⁻) comme source de carbone. Le premier microorganisme chimioautotrophe oxydant l'AsIII en AsV a été isolé des effluents d'une mine d'or ; il s'agissait d'une *Pseudomonas arsenitoxidans* ([Ilyaletdinov & Abdrashitova, 1981](#)).

Une souche bactérienne chimiolithotrophe (NT-26) capable d'oxyder l'arsénite en arséniate a aussi été isolée d'un résidu issu d'une mine d'or en Australie ([Santini et al, 2002](#)). Elle est apparentée à la branche des *Agrobacterium/Rhizobium* de la famille des α -Protéobactéries, et présente un métabolisme

autotrophe facultatif. *Thiomonas arsenivorans* a été isolée du site minier de Cheni en Haute-Vienne ([Battaglia-Brunet et al, 2010](#); [Battaglia-Brunet et al, 2006](#)). Cette γ -protéobactérie est également capable de se développer en utilisant l'arsenic comme unique source d'énergie et le CO₂ comme source de carbone. Sa croissance est néanmoins optimale lorsque des substrats inorganiques et organiques sont simultanément disponibles : elle présente un métabolisme mixotrophe. Plusieurs autres bactéries capables d'utiliser l'énergie issue de l'oxydation de l'As^{III} ont été isolées. Cependant toutes sont des autotrophes facultatives, c'est-à-dire qu'elles peuvent également utiliser des substrats organiques comme sources d'énergie ([Dong et al, 2014](#); [Garcia-Dominguez et al, 2008](#); [Inskip et al, 2007](#); [Santini et al, 2002](#)). Elles sont apparentées aux genres *Hydrogenobaculum* ([Donahoe-Christiansen et al, 2004](#)), *Ancylobacter*, *Thiobacillus*, *Hydrogenophaga* ([Garcia-Dominguez et al, 2008](#)) et *Thermus* ([Gihring & Banfield, 2001](#); [Gihring et al, 2001](#)).

I.2.2. Réduction de l'arséniate (As^V → As^{III})

La réduction microbienne directe de l'arséniate en arsénite est connue chez les bactéries, les algues et les champignons ([Cullen & Reimer, 1989](#)).

Certaines bactéries réduisent l'As^V au cours d'un mécanisme d'excrétion de l'arsenic, qui leur permet de résister à cet élément. Plusieurs études ont montré que de très nombreuses bactéries possèdent un ou plusieurs systèmes de résistance à l'arsenic ([Cebren et al, 2014](#); [Cordi et al, 2015](#); [Halter et al, 2011](#)), les opérons de type *ars*, qui confèrent aux microorganismes la capacité d'expulser l'arsenic qui a pénétré dans les cellules. Seul l'As^{III} est expulsé des cellules. L'As^V est donc réduit par une arséniate réductase avant d'être pris en charge par le système de transport. Certains auteurs ont également suggéré que la réduction d'As^V libre en As^{III}, via le système de résistance à l'arsenic *Ars*, serait très répandue chez les bactéries et pourrait contribuer à la mobilisation d'arsenic dans l'environnement ([Macur et al, 2004](#)). Un autre processus de réduction de l'As^V, la réduction dissimilatrice (couplée au métabolisme de croissance des bactéries réduisant l'As^V) est réalisée par des bactéries endogènes aux sédiments marins et d'eau douce. Ce type de métabolisme anaérobie est très largement distribué. Les bactéries sont alors capables d'utiliser l'As^V comme accepteur d'électrons en présence d'une source de carbone comme le lactate.

La réduction de l'As^V en As^{III} a aussi été observée au niveau de la zone de transition aérobie-anaérobie dans les sédiments des lacs et dans les sols ([Dowdle et al, 1996](#)). Les donneurs d'électrons suivants accélèrent la réduction de l'arsenic par les sédiments : l'hydrogène moléculaire, le lactate, le glucose, et l'acétate dans une moindre mesure. La réduction de l'As^V est réalisée préférentiellement par rapport à celle du sulfate. Par contre, lorsqu'il est présent, NO₃⁻ est utilisé préférentiellement à l'As^V. Une dizaine de microorganismes respirant l'arséniate ont été isolés d'environnements

contaminés aux USA et en Australie ([Ahmann et al, 1994](#); [Laverman et al, 1995](#); [Macy et al, 1996](#); [Newman et al, 1997](#); [Oremland et al, 1994](#)).

I.2.3. Méthylation et déméthylation

Différents microorganismes bactériens et fongiques sont capables de méthyler l'arsenic, c'est-à-dire de convertir l'arsenic inorganique en formes méthylées organiques et volatiles comme le diméthylarsine (DMA) et le triméthylarsine (TMA) ([Rosen et al, 2014](#)). Les voies de méthylation des bactéries et des champignons sont différentes. La biométhylation par les bactéries aura comme produit final le diméthylarsine (DMA) qui est un composé stable en absence d'oxygène. Par contre, les champignons sont capables de transformer les composés arséniés inorganiques et organiques en arsines méthylés de type triméthylarsine (TMA).

Certaines études suggèrent que la méthylation se produit lorsque les concentrations en phosphates dans le milieu sont faibles et le rapport As/PO_4^{2-} environ égal à 1. Dans ces conditions, les microorganismes mettent en œuvre un mécanisme de détoxification pour exclure l'arsenic et ainsi éviter une interférence avec l'utilisation des phosphates nécessaires au métabolisme ([Anderson & Bruland, 1991](#)).

[Walsh and Keeney \(1975\)](#) ont mis en évidence que les formes trivalentes méthylées de l'arsenic ne persistent pas longtemps dans des sols bien aérés. Ainsi, les microorganismes capables de méthyler l'arsenic en méthylarsines jouent un rôle crucial dans la volatilisation de l'arsenic des sols de surface ([Shariatpahani et al, 1981](#)).

En anaérobiose, l'arsenic inorganique peut être méthylyé par les bactéries méthanogènes. La méthylation de l'arsenic inorganique est alors couplée à la biosynthèse du méthane et se trouve être un des mécanismes de détoxification de l'arsenic ([Tamaki & Frankenberger, 1992](#)). En conditions aérobies, des bactéries isolées de l'environnement (*Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp.) sont capables de réduire l'arséniate en arsénite puis de le méthyler en méthylarsine volatile. Les bactéries *Serratia marinorubra*, *Aeromonas* sp., *Escherichia coli* et *Flavobacterium* sp. sont capables de transformer l'arsenic accumulé dans leurs cellules en formes arséniées mono- et diméthylées ([Shariatpahani et al, 1983](#); [Shariatpahani et al, 1981](#)).

Bien que la méthylation microbienne de l'As^{III} ait été observée depuis longtemps, le mécanisme moléculaire impliqué dans cette transformation n'a que récemment été identifiée. Ce processus est catalysé par l'As^{III} S-adénosylméthionine méthyltransférase (ArsM) impliquant le transfert de groupement méthyl de la S-adénosyl méthionine (SAM) à l'As^{III} ([Qin et al, 2006](#)).

[Huang et al \(2012\)](#) ont mis en évidence une volatilisation d'arsenic sous forme de méthylarsines à partir d'un sol de rizière pollué. La méthylation bactérienne dans le sol pourrait être à l'origine de l'accumulation de formes méthylées d'arsenic dans les végétaux, et en particulier dans les grains de riz ([Jia et al, 2013](#)). Des amorces ont été mises au point pour la détection de séquences de deux gènes *asrM* bactériens dans des matrices environnementales, et ont permis de mettre en évidence une grande diversité de microorganismes portant ce gène dans le sol et la rhizosphère de plants de riz ([Jia et al, 2013](#)).

Des bactéries isolées de sédiments côtiers et appartenant au groupe *Vibrio-Aeromonas* sont capables de dégrader l'arsénobétaïne en DMA en aérobiose. Ces bactéries nécessitent la présence d'une source de carbone autre que l'arsénobétaïne pour être actives ([Hanaoka et al, 1991](#)).

A l'inverse, le processus de déméthylation des composés organo-arséniés peut se produire dans les sols. Ces composés se trouvent minéralisés pour former de l'arsenic inorganique et du gaz carbonique.

I.2.4. Gènes impliqués dans les réactions d'oxydation et de réduction de l'As

Le fonctionnement des systèmes Aio d'oxydation de l'AsIII, et Arr et Ars de réduction de l'AsV sont schématisés sur la Figure 2.

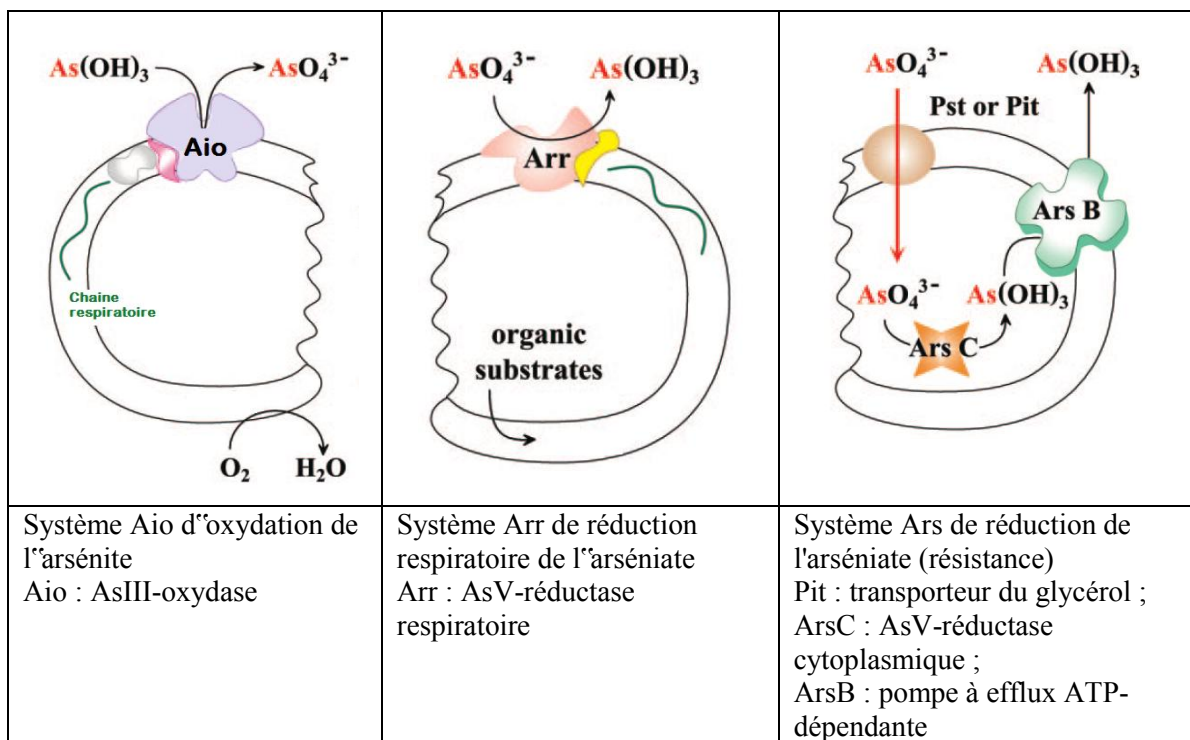


Figure . Synthèses des systèmes bactériens d'oxydation et de réduction de l'arsenic, d'après [Silver and Phung, 2005](#).

I.2.4.1. Oxydation

a. Enzyme impliquée

[Turner et al \(1954\)](#) découvrent, chez *Achromobacter arsenoxydans* isolée d'un bac à bétail, que l'oxydation de l'arsénite est liée à la synthèse d'une enzyme, qu'ils nomment arsénite déshydrogénase. Cette enzyme est inductible (sa synthèse est stimulée en présence d'arsenic) et son activité semble couplée au transport des électrons jusqu'à l'oxygène.

L'arsénite oxydase a été purifiée pour la première fois en 1991 ([Anderson & Bruland, 1991](#)) chez *A. faecalis*. Il s'agit d'une protéine hétérodimérique composé d'une petite sous-unité (AioB) d'environ 134 résidus de type Rieske à centre [2Fe-2S] et d'une grande sous-unité catalytique (AioA) de 825 résidus possédant un cofacteur à molybdène et un centre [3Fe-AS] (Figure 3).

La structure cristalline de cette enzyme a également été étudiée par [Ellis et al \(2001\)](#), qui ont proposé le mécanisme suivant pour le fonctionnement de cette enzyme : l'As^{III} atteint le site catalytique de l'enzyme grâce à une ouverture en entonnoir portée par la sous-unité AioA. L'As^{III} cède deux électrons au molybdène, réduisant le Mo^{VI} en Mo^{IV}, puis l'As^V est libéré. Le Mo^{IV} est ensuite réoxydé en Mo^{VI} cédant ainsi deux électrons au centre [3Fe-AS] qui les cède au centre Rieske de AioB. Ce dernier sera ré-oxdé en cédant à son tour deux électrons à des protéines. Différentes études suggèrent que le cycle d'oxydation de l'arsenic est lié à la réduction de cytochromes c solubles ([Lieutaud et al, 2010](#)). Ainsi, chez *Ralstonia* sp. 22, l'enzyme est réduite par des cytochromes c552 et c554 ([Lieutaud et al, 2010](#)).

L'enzyme Aio a été trouvée soit dans le périplasma ([Santini et al, 2000](#)), soit associée à la membrane cytoplasmique ([Anderson & Bruland, 1991](#); [Duquesne et al, 2008](#)), à laquelle elle pourrait être attachée par l'intermédiaire d'une autre protéine ([Lieutaud et al, 2010](#)).

Jusqu'en 2010, plusieurs nomenclatures étaient utilisées pour désigner les unités de l'arsénite oxydase et les gènes associés : *aroB* ou *asoB* et *aroA* ou *asoA* pour la petite et la grande sous-unités des souches NT-26 ([Santini et al, 2000](#)) et *A. faecalis* NCBI8687 ([Silver & Phung, 2005](#)), respectivement. Cependant [Lett et al \(2012\)](#) ont proposé d'harmoniser la nomenclature de tous les gènes impliqués dans l'oxydation de l'arsénite, qui seront dorénavant appelés *aio*. Désormais, les deux gènes codant pour la petite et la grande sous-unité de l'arsénite oxydase sont respectivement désignés par *aioB* et *aioA*.

Bien que la grande majorité des bactéries réalisant l'oxydation de l'As^{III} possèdent un système Aio, un autre type d'arsénite oxydase, nommé ArxA, est trouvé chez certains microorganismes, tels que la

bactérie alcalinophile *Alkalilimnicola ehrlichii* str. MLHE-1, qui couple l'oxydation de l'AsIII à la réduction du nitrate, et chez la bactérie pourpre photosynthétique *Ectothiorhodospira* sp. strain PHS-1 ([Zargar et al, 2012](#)).

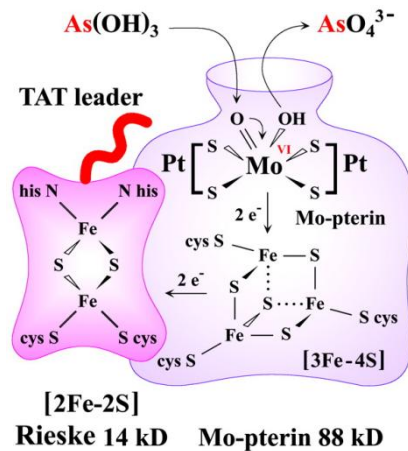


Figure . Modèle de l'AsIII-oxydase hétérodimérique d'*A. faecalis* [[Quéméneur \(2008\)](#) d'après [Silver & Phung, 2005](#)].

AioA est la grosse sous-unité catalytique et AioB est la petite sous-unité

L'enzyme Aio est largement retrouvée chez des bactéries hétérotrophes [*Herminiimonas arsenicoxydans* ULPA : [Muller et al \(2003\)](#) ; *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14 : [Vanden Hoven and Santini \(2004\)](#)] et autotrophes [souche NT-26 : [Santini et al \(2000\)](#)], ainsi que chez des *Archaea* [*Aeropyrum pernix* K1 : [Kawarabayasi et al \(1999\)](#)].

b. Gènes

L'opéron *aioAB* est situé à proximité des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic (système *ars*) chez *H. arsenicoxydans* et *A. faecalis*. Chez celles-ci, ainsi que chez *A. tumefaciens*, ces gènes sont associés au système de régulation *aioRS*. L'organisation des gènes codant pour l'arsénite oxydase chez plusieurs espèces bactériennes et une espèce d'archée (*Aeropyrum pernix*) est représentée sur la Figure 4, adaptée de [Muller et al \(2007\)](#).

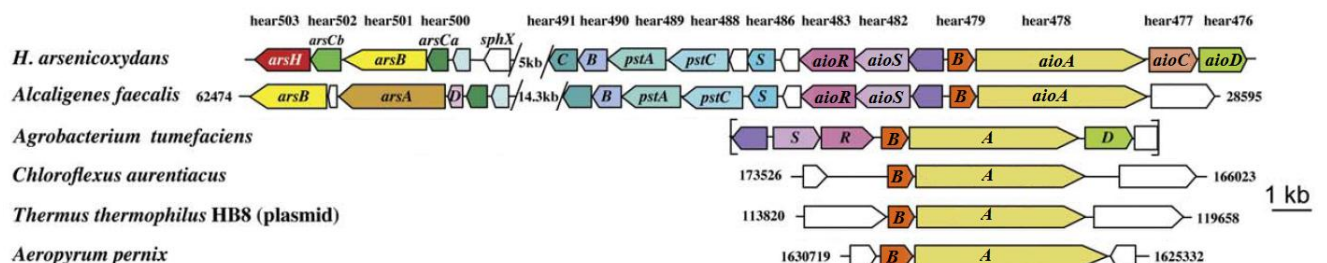


Figure . Organisation des gènes *aio* chez *Herminiimonas arsenicoxydans* et d'autres microorganismes bactériens et archéens (adapté de Muller et al, 2007) avec la nomenclature actuelle

La régulation de l'expression des gènes *aioBA* a été étudiée chez plusieurs bactéries et implique des déterminants multiples qui diffèrent d'une souche à l'autre ([Slyemi & Bonnefoy, 2012](#)). Dans la plupart des microorganismes étudiés, l'expression des gènes codant pour l'arsénite oxydase est plus élevée en présence d'arsenic, et plusieurs facteurs jouent un rôle dans la régulation de la transcription de l'opéron *aio*, par exemple la protéine périplasmique AioX liée à l'AsIII, le signal de transduction à deux composants AioRS, le facteur sigma alternatif de l'ARN polymérase RpoN ([Kashyap et al, 2006](#); [Koechler et al, 2010](#); [Liu et al, 2012](#)). L'expression du gène *aioA* en absence d'arsenic a été observée chez quelques souches, comme *Thiomonas* sp. 3AS ([Duquesne et al, 2008](#)), *Ralstonia* sp. 22 ([Lieutaud et al, 2010](#)) et *Agrobacterium tumefaciens* 5A, souche pour laquelle l'oxydation de l'AsIII semble régulée par *quorum sensing* en fin de croissance ([Kashyap et al, 2006](#)), ainsi que pour certaines souches de *Pseudomonas* ([Poirel et al, 2013](#)). Chez *H. arsenicoxydans* ([Koechler et al, 2010](#)), l'expression de gènes appartenant à l'opéron *aio* serait liée à la présence d'AsIII et à l'expression de gènes impliqués dans la mobilité. Une expression constitutive d'*aioBA* a été identifiée chez deux souches, *Polaromonas* sp. str. GM1 ([Osborne et al, 2013](#)) et *Pseudomonas xanthomarina* str. S11 ([Koechler et al, 2015](#)).

c. Répartition et expression dans l'environnement

Bien que les séquences de gènes *aioA* ne soient pas hautement conservées dans les divers *phyla* bactériens, des amorces dégénérées ont été utilisées avec succès pour caractériser de très nombreuses séquences *aioA* (plus de 160, [Inskip et al, 2007](#)) issues de sites très divers à partir d'approches de clonage et de séquençage ([Inskip et al, 2007](#); [Quéméneur, 2008](#)). Ces résultats suggèrent que les gènes de l'oxydation aérobie de l'arsenic sont très largement distribués dans le domaine des bactéries, et répandues dans tous les milieux de l'environnement : sols, eaux, sédiments, système géothermaux, milieux aérobies et anaérobies. Des approches complémentaires de qPCR et de DGGE ont permis de suivre la dynamique de la diversité des gènes *aioA* dans un bassin versant impacté par un site minier ([Quéméneur et al, 2010](#)).

L'expression du gène *aioA* a pu être mise en évidence dans certains échantillons environnementaux. Ainsi, *aioA* est exprimé dans des tapis microbiens de source géothermale ([Inskip et al, 2007](#)), dans un sol de rizière ([Huang et al, 2012](#)), et dans un sol industriel d'une ancienne cokerie, contaminé par des HAP, des métaux lourds et de l'arsenic ([Poirel et al, 2013](#)).

Sur un site minier en cours de phyto-stabilisation, une concordance entre des activités bactériennes AsIII-oxydantes élevées, une grande diversité de gènes *aioA* et la présence d'AsV très majoritaire dans l'eau interstitielle du sol a pu être mise en évidence ([Battaglia-Brunet et al, 2010](#)). La détection de 78 séquences de gènes *aioA* dans les sédiments modérément pollués par l'arsenic de l'ancien site minier

de Sainte-Marie-aux-Mines et de souches isolées de ces sédiments a confirmé que ces séquences appartiennent à deux sous-familles (groupes I et II) présentant des caractéristiques différentes ([Heinrich-Salmeron et al, 2011](#)). L'étude de ces séquences et de celles disponibles dans les bases de données suggère que le transfert horizontal entre espèces a pu jouer un rôle important dans la large distribution du gène *aioA* dans l'environnement.

d. Rôle physiologique

L'arsénite oxydase est impliquée dans le métabolisme énergétique de certaines bactéries, leur permettant ainsi de se développer de façon autotrophe en fixant le CO₂ ([Battaglia-Brunet et al, 2006](#); [Bryan et al, 2009](#); [Santini et al, 2000](#)). Chez les souches hétérotrophes strictes, un rôle lié à la résistance des bactéries à l'arsenic a été proposé. Ainsi, chez *H. arsenicoxydans*, des mutants déficients pour la production d'arsénite oxydase sont moins résistants à l'arsenic que la souche sauvage ([Muller et al, 2003](#)). Cependant, chez des bactéries résistantes à l'arsenic isolées de sédiments de Sainte-Marie aux Mines ([Cordi et al, 2015](#)), aucune corrélation entre le niveau de résistance à l'arsenic et la présence de *aioA* n'a pu être mise en évidence. La question du rôle physiologique de l'arsénite oxydase chez les bactéries hétérotrophes strictes demeure donc en suspens pour l'instant.

I.2.4.2. Réduction

a. Réduction respiratoire

La respiration de l'AsV est réalisée par une AsV réductase respiratoire composée de deux sous-unités (Figure 5). La régulation des gènes *arrAB* codant cette enzyme et organisés en opéron est peu connue.

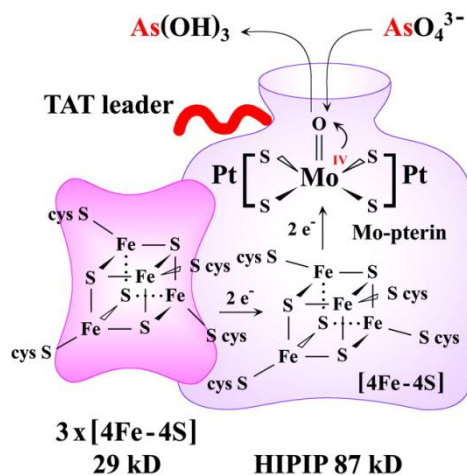


Figure . Modèle de l'AsV réductase respiratoire [[Quéméneur \(2008\)](#) d'après [Silver & Phung, 2005](#)].

ArrA est la grosse sous-unité catalytique et ArrB est la petite sous-unité servant au transfert des électrons.

b. Réduction liée au mécanisme de résistance

Le système bactérien de résistance à l'arsenic le plus connu est le système Ars. Il permet aux bactéries de résister aux deux espèces de l'arsenic en réduisant l'arséniate en arsénite qui est ensuite expulsé hors de la cellule. Les gènes *ars* sont largement répandus chez les bactéries et les Archées. Ils sont localisés sur des plasmides ou sur le chromosome ([Rosen, 2002\(a\)](#)). Les gènes *ars* sont souvent agencés en opérons, comportant un minimum de trois gènes nommés *arsB*, *arsC* et *arsR*.

ArsB est une protéine membranaire qui pompe l'arsénite hors de la cellule, comme un uniporteur, en utilisant le potentiel membranaire ([Rosen, 1999](#); [Tisa & Rosen, 1990](#)).

L'arséniate n'est pas reconnu par les transporteurs d'arsénite. Une arséniate réductase cytoplasmique codée par *arsC* catalyse d'abord la réduction de l'AsV en AsIII en utilisant la thiorédoxine ou la glutarédoxine comme donneur d'électrons ([Silver & Phung, 2005](#)).

ArsR est un répresseur transcriptionnel.

Deux gènes supplémentaires, moins connus, peuvent aussi se trouver sur l'opéron *ars* :

- *ArsA*, une ATPase associée à *ArsB*
- *ArsD*, une métallochaperonne qui conduit l'AsIII vers *ArsA*, afin de réduire la concentration intracellulaire en arsénite ([Silver & Phung, 2005](#)).

ArsH pourrait être une NADPH:FMN oxydoréductase produisant de l'H₂O₂, mais ce rôle demeure mal connu ([Branco et al, 2008](#)).

La seconde famille de transporteurs d'arsénite est celle des protéines *Acr3* (*arsenical compound resistance-3*), identifiées pour la première fois chez *Bacillus subtilis* ([Sato & Kobayashi, 1998](#)) mais ubiquitaires chez les procaryotes et les champignons. Il a été montré que les transporteurs *Acr3* sont spécifiques de l'arsénite. Cependant, des homologues d'*Acr3* identifiés chez *Synechocystis* sp. confèrent aux cellules une résistance à l'arsénite et à l'antimoine ([López-Maury et al, 2003](#)), alors que chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Acr3p* permet l'efflux du SbIII et une tolérance vis-à-vis de ce métalloïde ([Maciaszczyk-Dziubinska et al, 2010](#)). Sur le site de Carnoulès très pollué par l'arsenic, 16 types de séquences protéiques différentes de transporteurs (5 *ArsB* and 11 *Acr3p*) ont été détectés dans les sédiments ([Fahy et al, 2015](#)).

Une grande diversité d'opérons *ars* a été décrite pour des espèces bactériennes très diverses ([Branco et al, 2008](#); [Butcher & Rawlings, 2002](#); [López-Maury et al, 2003](#); [Neyt et al, 1997](#); [Sato & Kobayashi, 1998](#); [Yang et al, 2005](#)). La Figure 6 montre comme exemple deux opérons *ars* identifiés chez une souche d'*Ochrobactrum* isolée d'un sol.

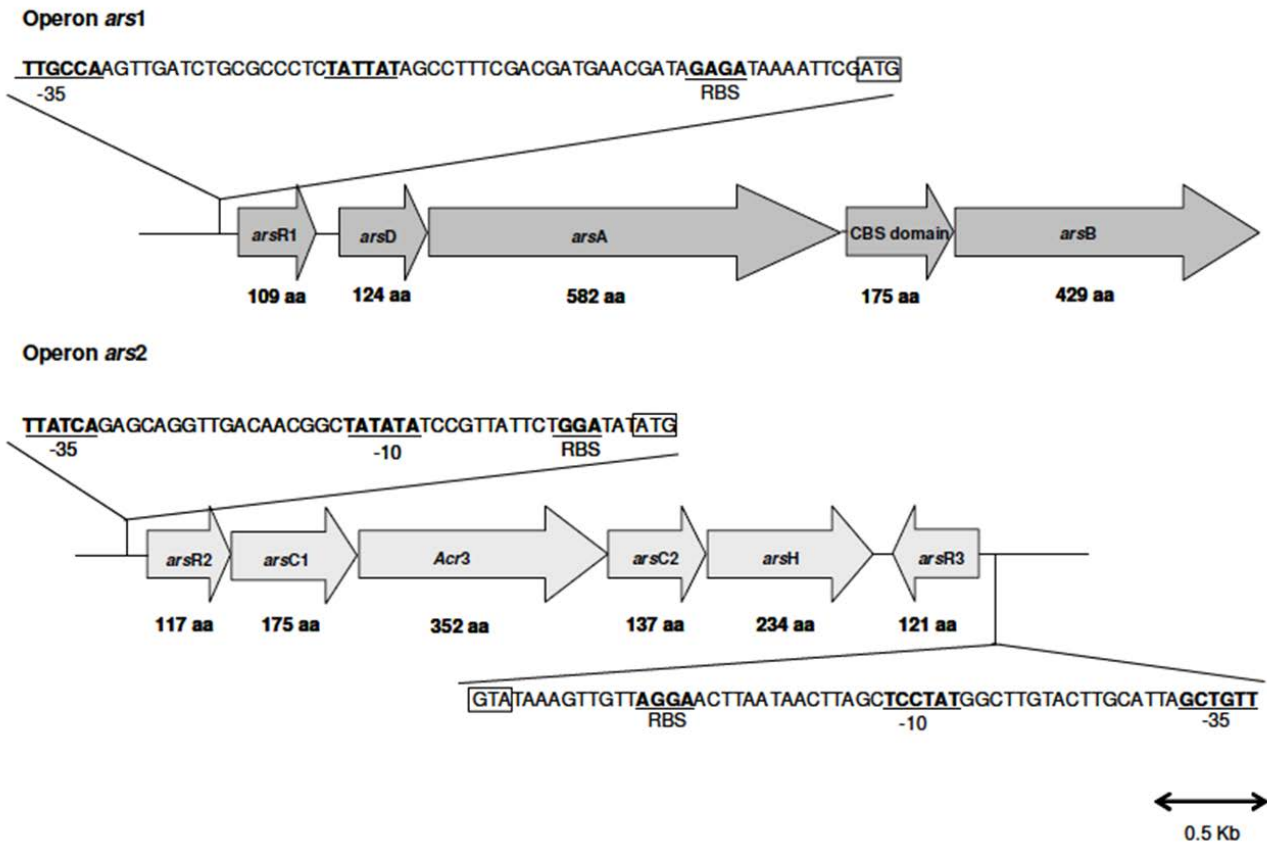


Figure . Organisation génétique de deux clusters de résistance à l'arsenic chez *Ochrobactrum tritici* SCII24, d'après [Branco et al \(2008\)](#).

Le RBS est une séquence d'ARNm en amont du codon *start* d'un gène sur laquelle se lie le ribosome, afin de débiter la traduction en protéine. Le domaine CBS (pour Cystathionine- β -Synthase) est un domaine protéique conservé et retrouvé dans une grande variété de protéines et chez des organismes appartenant à tous les domaines du vivant (Archées, procaryotes et eucaryotes). Les domaines CBS sont des régulateurs d'activité enzymatiques ou de transporteurs cellulaires ([Baykov et al, 2011](#)) lorsqu'il sont liés à des groupes adénosyl (tels que AMP, ATP, ou s-adénosylméthionine).

I.3. La matière organique des sols

I.3.1. Sols

[Demolon and Leroux \(1952\)](#) ont défini le sol comme étant « la formation naturelle de surface, à structure meuble et d'épaisseur variable, résultant de la transformation de la roche-mère sous-jacente sous l'influence de divers processus, physiques, chimiques et biologiques, au contact de l'atmosphère et des êtres vivants ».

Le sol est une matrice complexe et hétérogène, formée d'une phase liquide (la solution du sol), d'une phase solide contenant les particules minérales, la matière organique et les organismes vivants, et d'une phase gazeuse contenue dans les pores des sols et comprenant des gaz atmosphériques et des gaz libérés lors des réactions chimiques et biologiques ([Gobat et al, 1998](#)).

Le sol rend différents services écosystémiques. C'est avant tout un écosystème abritant de nombreuses espèces. Il permet aussi le stockage des eaux de pluie et de ruissellement, l'immobilisation ou la dispersion des polluants, et sert de support à la production agricole et aux activités anthropiques. Il participe à la régulation des flux de carbone et d'azote et atténue les effets du changement climatique. Les sols stockent au moins trois fois plus de carbone que ce qui est retrouvé à la fois dans l'atmosphère et les végétaux ([Fischlin et al, 2007](#)).

Les sols sont constitués d'une fraction minérale et d'une fraction organique. La fraction minérale est issue de la dégradation physique et chimique de la roche-mère et est composée d'une fraction grossière et d'une fraction fine. La fraction grossière représente les particules dont le diamètre est supérieur à 2 µm : les graviers et cailloux (> 2 mm), les sables (20 µm-0,2 mm), les limons (2 µm-20 µm). La fraction fine contient les particules dont le diamètre est inférieur à 2 µm. Elle est composée de colloïdes minéraux et est biologiquement et chimiquement active. La matière organique du sol provient de la décomposition et du métabolisme des organismes eucaryotes et procaryotes.

Le sol est un compartiment très hétérogène des points de vue texturaux, structuraux et physico-chimiques. Le sol peut être perçu comme une mosaïque de micro- et de macro-environnements (agrégat, motte, parcelle, champ, paysage...) qui représentent une multitude d'habitats pour les organismes indigènes ([Girard et al, 2005](#)).

Dans les environnements anthropisés, les sols sont souvent pollués et dégradés aussi bien au niveau de leur structure, de leur composition que de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.

Des procédés de re-fonctionnalisation des sols impactés par des activités minières ou industrielles (friches) sont proposés afin d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques et leur fonctionnement biologique, et de minimiser les transferts de pollution ([Benfeldt et al, 2001](#); [Pérez-de-Mora et al, 2006](#)). Ces technologies sont basées sur des amendements de matières organiques (déchets agricoles ou agro-alimentaires par exemple). Ces apports de matières organiques ont tendance à améliorer la structure du sol ([Huang et al, 2005](#)).

Dans le cas de l'ancienne mine d'or de la Combe du Saut, sur la commune de Salsigne (Aude), les formations géologiques meubles, mises à nues lors des travaux de décontamination, ont fait l'objet d'un amendement par de la grenaille d'acier suivi d'une végétalisation depuis 2007. Les performances de ce procédé de phyto-stabilisation ont été évaluées sur ce site (projet PHYTOPERF, Battaglia-

Brunet et al., 2010). Cette technique permet de réduire la dispersion du polluant par envol, infiltration et ruissellement, car les plantes ont pour effet d'arrêter l'envol de poussières contaminées en As. La grenaille d'acier piège les arsénates afin de limiter leur transfert vers les eaux et les plantes. Le consortium en charge de ce programme a fait le choix de ne pas apporter de matière organique afin d'éviter la formation éventuelle de complexes organiques arséniés mobiles et une possible réduction des arsénates en arsénites, plus mobile et plus toxique. La matière organique, grâce à ses propriétés fertilisante et agrégante, permettrait d'améliorer la croissance des plantes sur des sites pollués et pauvres en matière organique intrinsèque, de limiter l'érosion et d'augmenter la capacité de rétention d'eau du sol.

I.3.2. Matières organiques des sols

Les matières organiques jouent des rôles importants dans les sols. Elles constituent une source considérable de carbone, d'énergie et de nutriments pour les organismes vivants du sol : avec la biomasse végétale, la matière organique du sol (MOS) est un des principaux réservoirs de carbone. De plus, les matières organiques participent de la qualité des sols.

La MOS peut représenter jusqu'à 98% du carbone organique total d'un sol. Selon les auteurs, la définition de la MOS varie : certains considèrent la MOS comme l'ensemble de la matière organique vivante et de la matière organique morte ([Shibu et al. 2006](#)) alors que d'autres limitent la MOS au produit non vivant de la décomposition de plantes et d'animaux ([Manlay et al. 2007](#)).

La MOS est composée de :

- matière organique non altérée ou matière organique fraîche (MOF) : cadavres et excréments d'animaux, débris végétaux
- produits transformés : substances non humiques ou humiques.

La matière organique fraîche peut être plus ou moins biodégradable selon sa composition. Les facteurs favorables à la décomposition sont : un rapport C/N faible et une haute teneur en sucres et en tannins hydrolysables. En revanche, un rapport C/N élevé, de fortes teneurs en lignine, en lipides et en tannins condensés sont des facteurs qui limitent la décomposition de la MO fraîche. Des matières organiques présentant des forts C/N (>30) favoriseraient la colonisation par les champignons alors que celle à faible C/N (<30) favoriseraient celle des bactéries ([Lundquist et al. 1999](#); [Moore et al. 2004](#)).

Dans un sol, la MOF peut subir deux types de décomposition :

- une minéralisation primaire, c'est-à-dire la transformation d'éléments organiques en composés inorganiques solubles ou gazeux (CO_2 , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NH_4^+ , NO_3^- , ...)

- une humification, soit la transformation de la MOF en composés humiques amorphes et complexes de nature colloïdale, l'humus ([Zech et al., 1997](#)). Cet humus sera lentement minéralisé. Ce qui correspond à une minéralisation secondaire.

Les substances non humiques comprennent des molécules plus ou moins complexes issues de la dégradation des débris organiques et des substances néoformées par les microorganismes (acides aminés, glucides, lipides, polymères phénoliques).

Les substances humiques sont formées par des réactions secondaires de synthèse. Il s'agit des acides fulviques (les plus simples et les plus solubles), des acides humiques (solubles uniquement en milieu alcalin) et de l'humine, phase rassemblant les composés les plus stables, non dispersables à tous les pH ([Girard et al., 2005](#)). Les substances humiques représentent 60 à 70 % de la fraction organique des sols ([Griffith & Schnitzer, 1976](#)). Ces molécules, de poids moléculaires élevés, présentent de nombreux sites de fixation, qui les rendent réactives avec de nombreuses molécules, en particulier avec les métaux ([Rocha et al., 2003](#)). Il a été montré en particulier que les acides humiques peuvent servir d'accepteurs d'électrons aux microorganismes du sol en conditions anaérobies. La réduction des acides humiques pourrait permettre la réduction des oxydes de FeIII car les acides humiques agiraient comme des « navettes » d'électrons (*electron shuttle*) entre les microorganismes qui les réduisent et les oxydes de fer. Ce transfert d'électrons serait réalisé au niveau des acides humiques par des groupements quinones/hydroquinones ([Lovley et al., 1996](#)).

La matière organique dissoute (MOD) est la fraction de MO qui va jouer un rôle important dans les sols, en particulier au niveau de la mobilité des métaux. Elle est définie comme la matière organique présente dans la solution de sol et passant par les filtres de porosité 0,4–0,6 µm. Dans les sols agricoles, plusieurs stratégies d'amendements organiques existent telles que l'incorporation d'engrais « verts », l'épandage d'effluents d'élevage, et l'incorporation de résidus de culture. La plupart des études ont mis en évidence une augmentation (transitoire) de la concentration en MOD par rapport à la concentration en matière organique extractible à l'eau (WEOM) dans le sol quel que soit le type d'amendement organique ([Chantigny et al., 2000](#); [Chantigny et al., 2002](#); [Franchini et al., 2001](#))

Ces molécules sont des mélanges complexes et hétérogènes qui peuvent donner lieu à des phénomènes d'adsorption, des liaisons hydrogènes, des échanges ioniques ou des complexes par le biais de réactions d'oxydo-réduction de surface ([L'Hopitault & Pommery, 1982](#)). Elles sont impliquées dans le transport d'un grand nombre d'éléments chimiques sous forme de complexes ou de colloïdes ([Van Der Lee et al., 1997](#)). À l'inverse, ces molécules peuvent immobiliser ces éléments soit par précipitation du complexe organique (agrégation) soit parce qu'elles sont associées à une phase minérale immobile.

I.3.3. Dynamique des communautés microbiennes des sols

Lors de la minéralisation de la matière organique, trois stades de dégradation interviennent : le stade précoce au cours duquel l'activité de dégradation est maximale, le stade moyen pour lequel l'activité diminue et le stade tardif de décomposition lente. Ces intensités de minéralisation sont principalement expliquées par des modifications dans la composition de la MO. En effet, les composés facilement dégradables (molécules solubles, cellulose, hémicellulose) sont en règle générale rapidement dégradés pendant la phase précoce de minéralisation. Les composés plus récalcitrants tels que la lignine sont dégradés beaucoup plus lentement. L'apport de matière organique fraîche entraîne une stimulation de la biomasse microbienne dans les sols dès le début de sa minéralisation.

[Bernard et al \(2007\)](#), [Bastian et al \(2009\)](#), [Baumann et al \(2009\)](#) et [Poll et al \(2010\)](#) se sont intéressés à la dynamique des communautés microbiennes au cours de la dégradation de la MO et ont mis en évidence des successions de populations bactériennes et fongiques. [Bastian et al \(2009\)](#) et [Bernard et al \(2007\)](#), en particulier, ont déterminé la diversité des microorganismes indigènes du sol, permettant d'identifier des *phyla* dominants associés aux différents stades de la décomposition des résidus de culture, et ils ont tenté de les relier avec des caractéristiques écologiques type stratégies-r et stratégies-K. Les stratégies-r sont décrits comme présentant un taux de croissance optimal quand les ressources sont abondantes, alors que les stratégies-K sont adaptés à survivre quand les ressources sont limitées. Les termes de microorganismes zymogènes (stratégies-r) et autochtones (stratégies-K) sont plus couramment utilisés dans le domaine de la microbiologie des sols.

Dans le contexte du sol et du turn-over du carbone organique, les microorganismes stratégies-r consommeraient préférentiellement les pools de carbone organique labile du sol et donc seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique fraîche. En cas de faible disponibilité en nutriments dans les sols, les microorganismes appartenant aux stratégies écologiques -r et -K seraient en compétition. Les microorganismes stratégies-K qui présentent des taux de croissance plus faibles que les stratégies-r seraient donc de ce fait désavantagés et par conséquent plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique récalcitrante du sol ([Fierer et al, 2007](#)). Il en résulte que les organismes appartenant à l'une ou l'autre des stratégies écologiques se succèderaient au cours de la dégradation de la matière organique du sol : les organismes stratégies-r intervenant préférentiellement au stade précoce, alors que les stratégies-K seraient plus actifs au stade tardif de la décomposition de la matière organique fraîche ([Bastian et al, 2009](#); [Liebich et al, 2006](#)).

[Song et al \(2015\)](#) ont montré comment évolue la diversité bactérienne d'un sol au cours du temps et en fonction de la concentration en nutriments apportés par du Tryptic Soy Agar. La diversité est plus faible aux concentrations les plus élevées en substrat. Au cours du temps, la diversité bactérienne

évolue selon une courbe en cloche, le maximum étant atteint 56 jours après le début de l'expérience, ce qui correspondrait à une phase de coexistence des espèces zymogènes et autochtones. La succession de composition de la communauté bactérienne avec une dominance initiale de population zymogène, suivie par une augmentation graduelle de population plus spécialisée et autochtone est un exemple de succession hétérotrophe endogène telle que définie par [Fierer et al \(2010\)](#).

[Fierer et al \(2007\)](#), en ajoutant du sucrose comme source de C dans le sol, ont pu relier des *phyla* bactériens aux taux de minéralisation du carbone. L'abondance de β -Protéobactéries et de *Bacteroidetes* serait positivement corrélée avec le taux de minéralisation du carbone contrairement aux *Acidobacteria*, dont l'abondance est négativement corrélée avec le taux de minéralisation du carbone. [Bernard et al \(2007\)](#) ont utilisé une approche de SIP au ^{13}C afin d'identifier les différentes populations microbiennes stimulées au cours de la dégradation de résidus de blé marqués. Les auteurs ont montré que les β -protéobactéries et les γ -protéobactéries intervenaient dans le stade précoce de minéralisation de la MO et étaient impliquées dans la dégradation des résidus de blé marqués. Ces populations arborent donc des comportements de stratégies-r (zymogènes). D'autres *phyla* comme *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes* et *Planctomycetes* étaient impliqués dans les stades plus tardifs de dégradation de la MO et étaient présents dans les fractions de ^{12}C . Ces populations se comportent donc comme des stratégies-K (autochtones). La Figure 7 récapitule les *phyla* bactériens impliqués aux différents stades de minéralisation de la MOS.

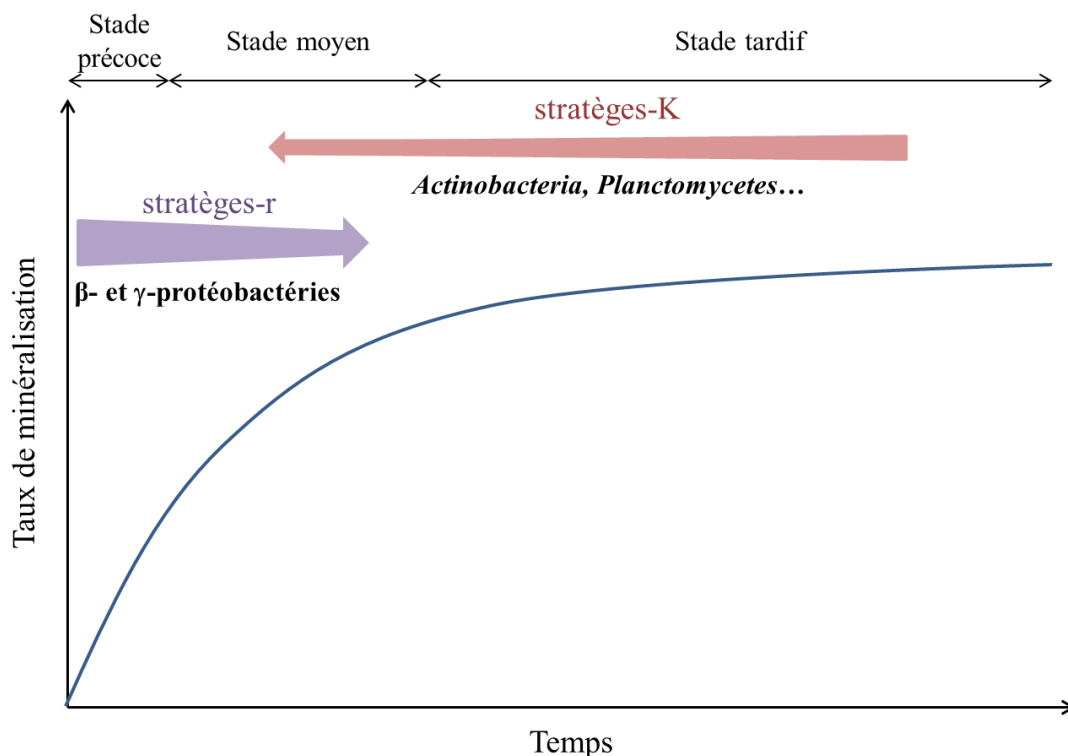


Figure . Succession des différents groupes trophiques microbiens au cours de la dégradation de la MO dans les sols, d'après [Pascaud, 2010](#).

[Bernard et al \(2007\)](#) ont montré une augmentation significative du relargage de $^{12}\text{CO}_2$ lors d'un apport de matière organique fraîche, résultant de la sur-minéralisation de la matière organique native du sol. Ce processus est communément appelé *priming effect* et a été défini par [Bingemann et al \(1953\)](#). Le *priming effect* aurait principalement lieu dans la rhizosphère, mais aussi au niveau de la détritosphère et la drillosphère ([Nannipieri et al, 2003](#)).

[Blagodatsky et al \(2010\)](#) ont montré que le *priming effect* est en fait composé d'un *priming effect* « apparent » qui intervient peu de temps après un apport de matière organique et qui correspond à une première stimulation de la croissance bactérienne, et d'un *priming effect* « réel », plus tardif lors duquel a lieu la dégradation des matières organiques du sol. La Figure 8 présente les résultats de [Blagodatsky et al \(2010\)](#) concernant la contribution relative des différentes composantes du *priming effect* suite à un ajout de glucose sur un sol.

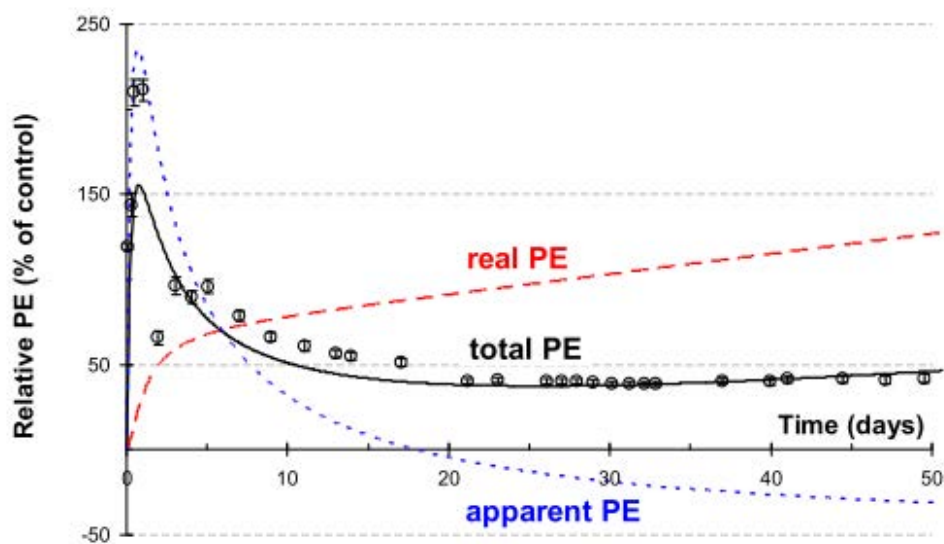


Figure . Contribution des *priming effect* (PE) « apparent » et « réel » au *priming effect* total, au cours du temps (Blagodatsky et al, 2010).

Le *priming effect* « apparent » serait principalement dû à l'action de bactéries stratèges-r, alors que les microorganismes responsables du *priming effect* « réel » restent encore incertaines, mais seraient des organismes stratèges-K ([Blagodatskaya et al, 2007](#); [Fontaine et al, 2003](#); [Kuzyakov, 2010](#)).

I.4. Influence de substrats organiques sur l'oxydation de l'AsIII

I.4.1. Interactions abiotiques entre matières organiques et As

La littérature est abondante concernant l'influence potentielle de la matière organique sur la spéciation de l'As et donc sa mobilité. Cependant, elle fournit des hypothèses contradictoires. Alors que [Cao and Ma \(2004\)](#) ont observé une adsorption de l'As par la matière organique issue de compost dans des expériences de remédiation de sols contaminés au CCA, [Fitz and Wenzel \(2002\)](#) ont conclu qu'il n'y avait aucune preuve d'une contribution de la matière organique à l'immobilisation d'arsenic dans les sols pollués. [Mench et al \(2003\)](#), quant à eux, ont observé une augmentation drastique du relargage d'As dans des sols amendés avec du compost. Le comportement de l'arsenic lors d'un apport de matière organique dépendrait vraisemblablement de plusieurs paramètres, tels que le pH et le type de matière organique ajoutée. [Shiralipour et al \(2002\)](#) ont conclu que l'effet d'un apport de compost sur la mobilisation de l'As et son absorption par les végétaux était dépendant du pH. A pH légèrement acide (pH 5,5), le relargage d'As et son absorption auraient été faibles en raison d'une adsorption aux matières organiques. A pH neutre, l'AsV aurait été réduit en AsIII, ce qui aurait induit un relargage d'As.

La matière organique pourrait influencer la mobilité de l'arsenic dans les sols de différentes façons :

- en formant avec cet élément, des complexes solubles maintenant l'arsenic en solution dans la phase aqueuse ([Redman et al, 2002](#); [Saada et al, 2003](#)),
- en modifiant sa spéciation : [Redman et al \(2002\)](#) ont mis en évidence qu'un ajout de matières organiques naturelles (NOM) avait pour conséquence de modifier l'état d'oxydation de l'arsenic, principalement dans le sens d'une réduction de l'arséniate en arsénite, augmentant ainsi la mobilisation d'arsenic des oxydes de fer vers les eaux interstitielles,
- en entrant en compétition avec l'arsenic pour les sites de sorption sur les matériaux du sol, et sur les oxydes de fer en particulier. [Bauer and Blodau \(2006\)](#) ont ainsi montré qu'un apport de matière organique induisait une mobilisation de l'arsenic du sol vers les eaux interstitielles. Ce phénomène a été observé avec différents types de matières organiques, à différentes concentrations et sur plusieurs sols contaminés en arsenic.

[Grafe et al \(2002\)](#) ont étudié l'adsorption de l'As sur de la ferrihydrite synthétique en présence de trois types de matières organiques : des acides humiques de tourbe (Pahokee peat), des acides fulviques et de l'acide citrique. D'après leurs résultats, il y aurait une compétition des acides fulviques et de l'acide

citrique vis-à-vis de l'AsIII pour les sites de sorption. L'acide citrique était par ailleurs capable de réduire l'adsorption de l'AsV sur la ferrihydrite. Les acides humiques ne semblaient pas interférer avec l'adsorption de l'As.

Ainsi, la matière organique pourrait modifier la spéciation de l'arsenic en réduisant l'AsV en AsIII. Des études réalisées sur des sols contaminés au CCA ont révélé que 92 % de l'As était sous forme d'AsV dans les sols les plus minéraux, alors que dans les sols riches en matière organique, la proportion d'AsIII augmentait de façon significative jusqu'à une concentration d'environ 30% ([Balasoïu et al, 2001](#)).

D'autre part, la matière organique est capable d'influencer de façon indirecte la mobilité de l'arsenic, en réduisant les oxydes de FeIII et de MnIII ou IV sur lesquels l'As est souvent adsorbé.

I.4.2. Effet de la matière organique sur les bactéries transformant l'As

Jusqu'à présent, la plupart des études de l'influence de la matière organique du sol sur la mobilité de l'arsenic n'a porté que sur des processus abiotiques. Cependant, l'influence des microorganismes sur le devenir des polluants inorganiques dans le sol est significative. Elle peut être directe ou indirecte et résulte des métabolismes bactériens et de leurs propriétés de biosorption, bioaccumulation et biominéralisation.

Il est donc crucial de pouvoir déterminer dans quelle mesure la concentration et la nature de la matière organique pourraient influencer la mobilité et la biodisponibilité de l'arsenic dans les sols *via* l'activité des microorganismes, et d'appréhender ainsi son impact dans l'environnement et au niveau sanitaire de façon plus complète.

Des travaux effectués avec des souches bactériennes AsIII-oxydantes dans le cadre de différents projets indiquent un effet très significatif de la matière organique sur l'activité de ces microorganismes en présence d'oxygène. Des expériences réalisées dans le but d'étudier la colonisation d'un support (de la pouzzolane) par une communauté bactérienne AsIII-oxydante, dans l'objectif de développer des procédés de traitement d'eau, ont montré que le taux d'oxydation de l'AsIII diminuait de façon significative, de 100 % à 34 % en présence de 4 g.L⁻¹ d'extrait de levure ([Challan-Belval et al, 2009](#)). L'étude récente de souches bactériennes isolées d'un sédiment marin pollué riche en arsenic a montré que l'ajout de glycérol dans le milieu de culture ralentit l'oxydation de l'AsIII (résultats encore non publiés). [Bachate et al \(2012\)](#) ont étudié l'influence de l'apport de substrats organiques sur l'oxydation de l'AsIII par deux bactéries hétérotrophes aérobies isolées de sols de jardin, et apparentées du point de vue phylogénétique aux genres *Bordetella* et *Achromobacter*. Ces auteurs ont

observé que les conditions de croissance ont un effet sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII : cette dernière était maximale quand les souches étaient cultivées en présence de seulement 0,4 g.L⁻¹ d'extrait de levure, réduite de 25 à 50 % quand les cellules s'étaient développées en présence de 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure, et diminuée de 85 % quand elles s'étaient développées avec 0,4 g.L⁻¹ d'extrait de levure additionné de 20 mM (1,18 g.L⁻¹) d'acétate. [Bachate et al \(2012\)](#) ont également observé une diminution de l'activité enzymatique arsénite-oxydase des deux souches avec l'augmentation de la concentration totale en substrats organiques dans le milieu de croissance.

La matière organique apparaît donc comme ralentissant la transformation de l'AsIII en AsV par les bactéries en condition aérée, c'est-à-dire dans les conditions physico-chimiques classiques d'un sol de surface. Or, dans de telles conditions, il est pour l'instant admis que la réaction biogéochimique prépondérante serait l'oxydation de l'AsIII en AsV. Cette réaction a une importance écologique significative car elle conduit à une stabilisation de l'As dans l'environnement par la formation d'AsV, dont la capacité à s'adsorber sur des phases porteuses telles que les oxydes de fer est bien connue ([Fuller et al, 1993](#)). Certains auteurs ont cependant suggéré que les gènes de résistance à l'arsenic, gènes *ars* pourraient contribuer à la mobilisation d'arsenic dans l'environnement. [Macur et al \(2004\)](#) ont isolés diverses bactéries hétérotrophes d'un sol non saturé, et ont montré qu'en présence de 5 mM (0,9 g.L⁻¹) de glucose, la moitié des microorganismes oxydait l'AsIII et l'autre moitié réduisait l'AsV dans les mêmes conditions aérobies. Deux des souches isolées, apparentées à *Agrobacterium tumefaciens*, très proches du point de vue phylogénétique, avaient même des comportements opposés vis-à-vis de l'arsenic : l'une oxydait l'AsIII, et l'autre réduisait l'AsV.

[Hartley et al \(2009\)](#) ont montré, par des essais en pots, une augmentation de la concentration en As mobile en solution lors d'amendements de composts de déchets verts. Cette augmentation de concentration en As était corrélée à une augmentation de la concentration en carbone organique dissout et de la concentration en fer. [Cao et al \(2003\)](#) ont aussi observé une augmentation de l'As soluble dans l'eau ainsi qu'une réduction de l'AsV corrélées à un apport de compost dans un sol pollué par du CCA.

[Huang et al \(2012\)](#) ont d'ailleurs étudié l'effet d'amendements organiques « verts » sur la mobilisation de l'arsenic, sa méthylation et sa volatilisation dans un sol de rizière en condition « inondée », donc peu ou pas oxygénée. Ils ont recherché les gènes fonctionnels bactériens liés à l'arsenic dans leurs microcosmes. Ces auteurs ont mis en évidence un effet significatif de la concentration et du type de matières organiques sur les activités d'oxydation de l'AsIII et de réduction de l'AsV à travers l'abondance et l'expression des gènes *aioA* et *arsC*. Leurs résultats suggèrent que l'amendement du sol par de la luzerne ou des grains d'orge de distillerie a pour effet de stimuler l'expression des gènes *aioA*, la luzerne induisant une diminution du nombre de copies du gène alors que les grains d'orge n'affectent pas ce paramètre. En revanche, les deux types d'amendement induisent une augmentation

significative du nombre de copies du gène *arsC*. Le niveau d'expression de ce gène par les bactéries est diminué par les amendements organiques. Cependant, étant donné que le nombre de copies de ce gène est fortement accru, l'expression globale d'*arsC* (exprimée en copies du gène exprimé par g de sol) est augmentée. L'ajout de matière organique a eu par ailleurs pour conséquence d'augmenter la méthylation et la volatilisation de l'arsenic dans le sol testé (majoritairement anoxique).

Toutes ces études montrent que les bactéries capables d'oxyder, de réduire ou de méthyler l'arsenic coexistent, et que leur abondance relative et leur activité métabolique jouent un rôle fondamental sur la spéciation de l'arsenic et sa mobilité dans les sols.

Plusieurs équipes ont réalisé en laboratoire des incubations de sols pollués ou enrichis en arsenic en suspension de sol et en conditions aérobies, avec ajout de substrats organiques comme le glucose, le lactate ou l'acétate ([Lee et al, 2005](#); [Quéméneur, 2008](#); [Yamamura et al, 2009](#)). Ces auteurs ont observé une mobilisation de l'arsenic en solution. Cependant, l'influence de la concentration et de la nature de la matière organique sur les activités d'oxydation de l'AsIII ou de réduction de l'AsV en condition aérobie n'a pas été étudiée de façon systématique.

La Figure 9 récapitule toutes les informations disponibles dans l'état de l'art, à ce jour, concernant le domaine des interactions entre arsenic, phases minérales et organiques des sols, et compartiment microbien. L'analyse de la bibliographie a révélé que l'influence de la matière organique sur les processus microbiens liés à l'arsenic est peu connue dans les sols non saturés.

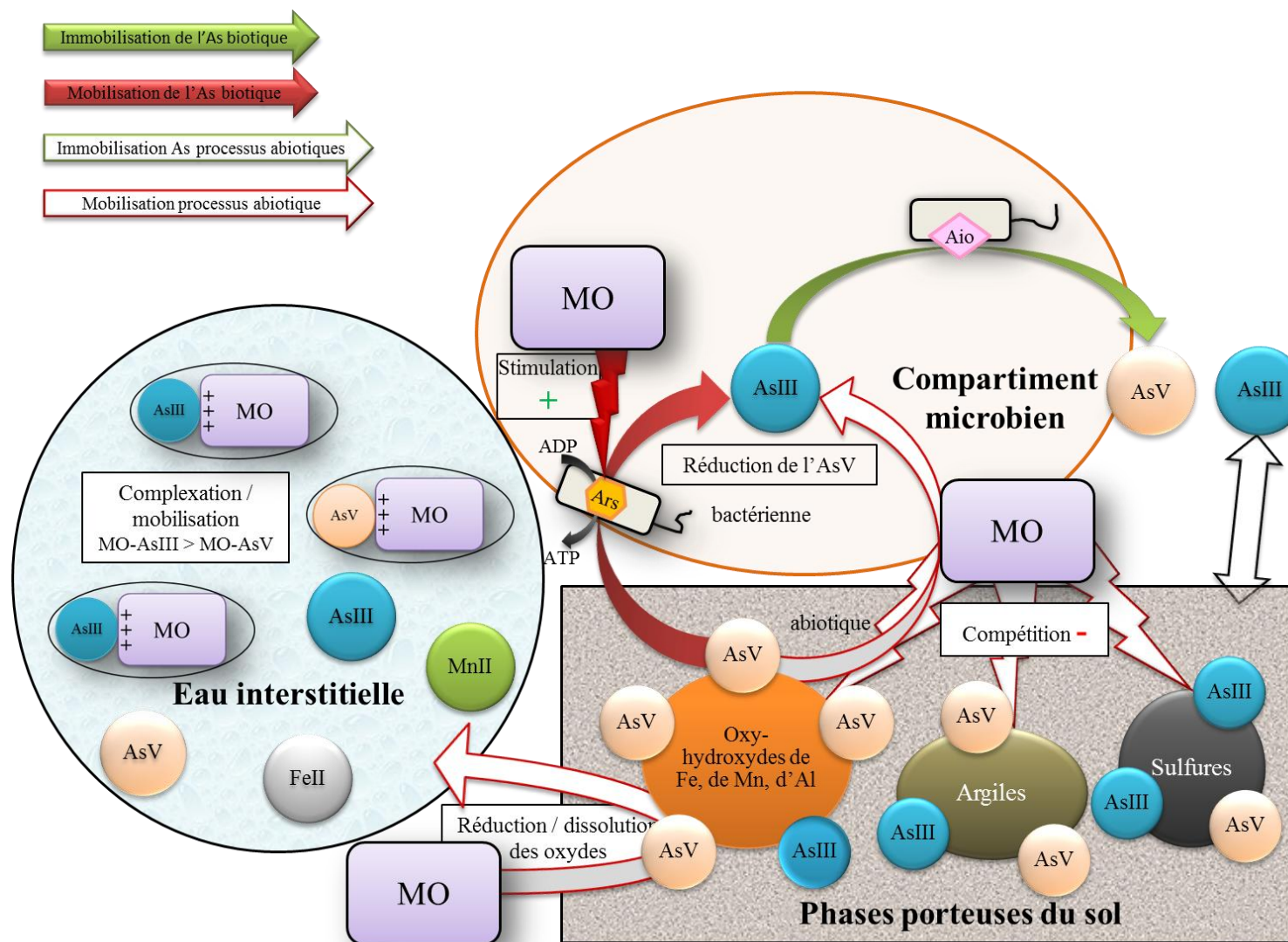


Figure . Etat des connaissances disponibles au démarrage de la thèse : influence de la matière organique sur la spéciation et la mobilité de l'As

I.5. Positionnement de la thèse dans la perspective de l'état de l'art

Ce projet de thèse s'inscrit dans le contexte de la gestion des sites pollués par de l'arsenic. Ce métalloïde toxique peut être trouvé en concentrations élevées sur certains sites impactés par d'anciennes activités minières ou industrielles, comme Salsigne et Auzon. Des apports en matière organique ont été testés dans le but de phyto-stabiliser des parcelles sur le site de Saint-Laurent-Le-Minier, ancienne mine de plomb et de zinc située dans le Gard ([Escarré et al, 2011](#); [Frérot et al, 2002](#)). Le développement du couvert végétal est en effet fortement susceptible d'être limité par la mauvaise texture du sol et sa faible teneur en matière organique. Il apparaît donc pertinent de connaître l'influence potentielle d'un apport de matière organique dans ces sols sur la biogéochimie de l'arsenic.

Cette problématique intéresse également de nombreux terrains agricoles, affectés par l'arsenic sous forme de pollution diffuse, soit parce qu'ils se trouvent dans une zone impactée par des activités industrielles (arsenic transporté par des envols de particules ou des fumées), soit à travers l'utilisation ancienne de pesticides contenant de l'arsenic. Il serait donc utile de connaître l'influence des amendements organiques liés aux pratiques agricoles sur la biogéochimie de l'arsenic.

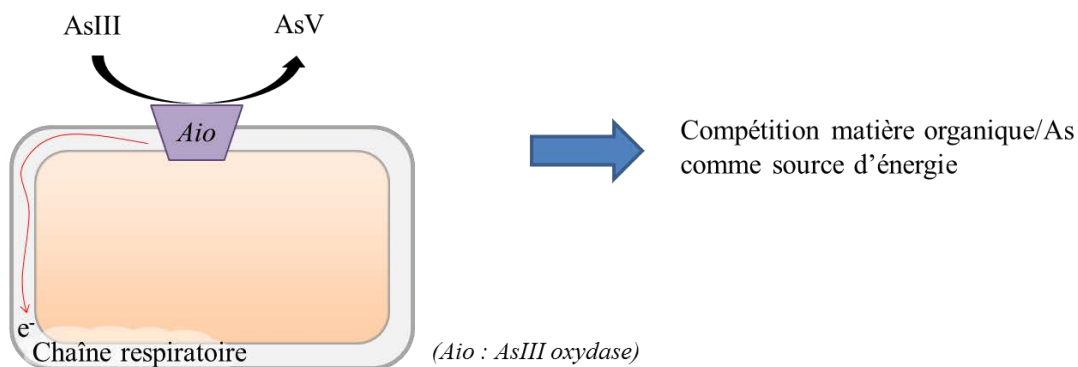
Enfin, certains sols de forêt devront également faire l'objet d'études et de stratégies de gestion des risques liés à l'arsenic. Ainsi, le site « Place à gaz » de la forêt de Spincourt, au Nord-Est de la commune de Gremilly (55), a été le lieu de destruction par incinération d'un stockage de munitions chimiques allemandes à la fin de la Première Guerre Mondiale. Plusieurs études ont été effectuées sur ce site, qui ont révélé des concentrations très élevées (jusqu'à 17 %) en arsenic inorganique dans le sol de surface sur le lieu d'incinération, ainsi que des teneurs assez fortes dans les horizons inférieurs et dans les eaux interstitielles ([Baubron, 2004](#); [Bausinger et al, 2007](#)). Or, les sols de forêt sont particulièrement riches en matière organique, dont l'influence sur la mobilité et la biodisponibilité de l'arsenic n'a pas été quantifiée.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'influence de la matière organique sur l'activité globale d'oxydation de l'As^{III} par la microflore d'un sol (Figure 10) :

- L'arsenic est une source d'énergie potentielle pour les bactéries. Il est possible que la présence de matière organique en tant que substrat énergétique facilement utilisable inhibe le processus d'oxydation tout simplement parce que les bactéries préfèrent métaboliser les substrats les plus intéressants du point de vue énergétique. La perte par délétion des gènes *aio* par des bactéries cultivées durant de longues périodes en milieu riche est même soupçonnée.

- La plupart des bactéries AsIII-oxydantes possèdent à la fois le système Aio de l'oxydation de l'AsIII et le système Ars qui confère une capacité de résistance à l'arsenic. Or, l'activité du système Ars induit une réduction de l'AsV ayant pénétré passivement dans la cellule par des transporteurs du phosphate en AsIII qui en est alors expulsé. Le système Ars est consommateur d'énergie, à l'inverse du système Aio qui fournit de l'énergie chez certaines bactéries. Il est donc possible qu'en présence de matière organique, le système Ars soit plus actif pour réduire l'AsV en AsIII, réaction inverse de celle qui est liée au système Aio, induisant ainsi une vitesse d'oxydation globale de l'AsIII plus faible, voire nulle ou négative (réduction).

Oxydation de l'arsénite : source d'énergie potentielle



Réduction de l'arsénate : consommatrice d'énergie

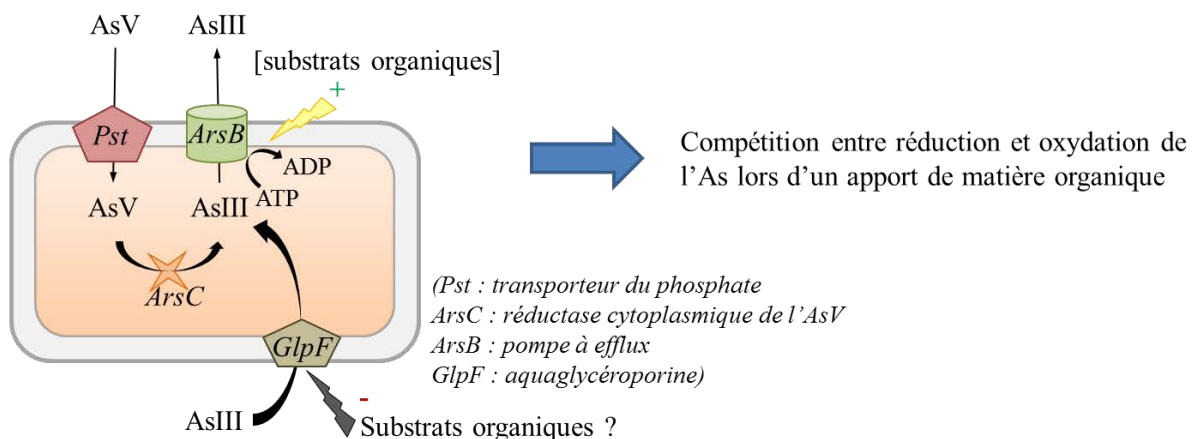


Figure . Hypothèses permettant d'expliquer, au niveau cellulaire, l'effet de la matière organique sur la vitesse globale d'oxydation de l'AsIII, observé dans les études publiées avant cette thèse.

L'analyse de la bibliographie a révélé que l'influence de la matière organique sur les processus microbiens liés à l'arsenic est peu connue dans les sols non saturés. Afin de répondre aux questions scientifiques liées à ce manque de données, la présente thèse propose une stratégie expérimentale déclinée en trois articles visant à étudier de façon précise et systématique l'influence de divers types

de matières organiques sur l'activité de bactéries AsIII-oxydantes (Chapitre II), de microflores globales de sols réels et sur la mobilisation de l'As dans ces sols (Chapitre IV). Lors de l'élaboration des programmes expérimentaux, nous avons recherché dans la littérature un mélange de substrats organiques qui pourrait être utilisé en laboratoire afin de mimer les amendements de matière organique fraîche apportés aux sols. Ayant relevé un manque de données dans ce domaine, nous avons élaboré une mixture modèle et synthétique de matières organiques, représentative de la matière organique des sols (Chapitre III).

Introduction au Chapitre II.

Influence d'un apport de substrats organiques sur l'expression du gène *aioA*, et sur l'oxydation de l'AsIII par deux souches pures

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article en préparation en vue d'une publication dans un journal scientifique de rang A. Il porte sur l'étude de l'influence de la nature et de la concentration en matière organique sur la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII et l'expression du gène *aioA* par deux souches bactériennes pures, *Thiomonas delicata* sp. *arsenivorans* et *Herminiimonas arsenicoxydans*. Il permet d'aborder la problématique de la thèse de façon simplifiée par rapport au milieu naturel des sols. Les deux souches utilisées possèdent des métabolismes différents, l'une utilisant l'AsIII comme source d'énergie et l'autre pas, ceci devait nous permettre d'étudier l'impact d'un apport de matière organique sur les deux types d'utilisation du système *aioA*, énergétique ou non.

Chapitre II. Influence d'un apport de substrats organiques sur l'expression du gène *aioA*, et sur l'oxydation de l'AsIII par *Thiomonas delicata* sp. *arsenivorans* et *Herminimonas arsenicoxydans*

Lescure T.^{1,2,3}, Joulian C.¹, Charles C.¹, Ben Ali Saanda T.¹, Charron M.¹, Breeze D.¹, Bauda P.³, Battaglia-Brunet F.^{1,2}

¹BRGM, 3 avenue Claude Guillemin, 45060 Orléans, France

²BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France

³LIEC UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

II.1. Introduction

L'oxydation microbienne de l'arsénite en arséniate peut être réalisée pour détoxifier un milieu ou pour apporter de l'énergie à la cellule. L'AsV est moins toxique et plus facilement adsorbé que l'AsIII par les oxydes de fer FeIII ou de manganèse MnIII et MnIV, souvent présents dans les sols ([Smedley & Kinniburgh, 2002](#)). La fonction d'oxydation de l'AsIII est codée chez les bactéries par l'opéron *aio* ([Lett et al, 2012](#)), qui comprend 5 gènes (*aioB*, *aioA*, *aioS*, *aioR* et *aioX*), dont deux codent pour les deux sous-unités de l'enzyme arsénite oxydase : *aioB* code pour la petite sous-unité contenant un centre Rieske [2Fe-2S] et *aioA* code pour la grande sous-unité catalytique contenant une molybdoptérine et un cluster [3Fe-4S]. Ces gènes codant pour l'arsénite oxydase n'avaient été initialement identifiés et isolés que chez deux β -protéobactéries : *Alcaligenes faecalis* ([Anderson & Bruland, 1991](#)) et *Herminiimonas arsenicoxydans* ([Muller et al, 2003](#)). Les trois autres gènes correspondent aux fonctions suivantes : *aioS* code pour une histidine kinase senseur, *aioR* pour un régulateur transcriptionnel, et *aioX* pour une protéine ligand des oxy-anions.

Au fil du temps, de nombreuses bactéries furent identifiées comme portant un gène analogue à celui codant pour l'arsénite oxydase ([Oremland et al, 2002](#); [Santini et al, 2002](#)). C'est le cas notamment de la souche *Thiomonas arsenivorans*, bacille acido-tolérant mobile Gram négatif chimiolithoautotrophe ([Battaglia-Brunet et al, 2006](#)). Il fut prouvé que cette bactérie pouvait à la fois détoxifier le milieu et créer de l'énergie par oxydation de l'arsénite en arséniate ([Battaglia-Brunet et al, 2006](#); [Santini et al, 2002](#)). [Santini and van den Hoven \(2004\)](#) ont étudié une autre bactérie chimiolithoautotrophe, NT26. Lorsque le gène *aioA* de cette souche est inactivé, elle ne peut pousser sur milieu minimum en présence d'arsenic. Si ce même gène est activé, cette bactérie peut oxyder l'AsIII afin d'en retirer de

l'énergie. Cette expérience a démontré l'utilisation de l'arsenic par certaines bactéries comme source d'énergie.

Des bactéries capables d'oxyder l'arsenic et des organismes pouvant le réduire ont été détectées dans de nombreux environnements terrestres et aquatiques ([Battaglia-Brunet et al, 2006](#); [Campos et al, 2010](#); [Duquesne et al, 2008](#); [Hoefl et al, 2004](#); [Quéméneur, 2008](#); [Quéméneur et al, 2010](#)). Certaines bactéries possèdent à la fois des gènes permettant l'oxydation et d'autres leur conférant la capacité de réduire l'arsenic. Le système de résistance *Ars* confère aux microorganismes la capacité de réduire l'AsV en AsIII. Bien que consommatrice d'énergie, cette réaction de détoxification est très largement réalisée par les communautés microbiennes, car l'AsIII ainsi obtenu va pouvoir être excrété hors de la cellule, sous forme d'AsIII ou de formes méthylées, ou bien séquestré sous forme conjuguée avec du glutathione réduits GSH ou d'autres thiols, par exemple chez des levures ([Rosen, 2002\(a\)](#)). Une autre voie, minoritaire toutefois, est la réduction dissimilatrice de l'arséniate en arsénite afin de créer de l'énergie par respiration anaérobie, en utilisant l'arséniate en tant qu'accepteur final d'électrons ([Silver & Phung, 2005](#)).

Des travaux effectués avec des souches bactériennes AsIII-oxydantes suggèrent un effet très significatif de la matière organique sur l'oxydo-réduction de l'AsIII en présence d'oxygène. [Challan-Belval et al \(2009\)](#) ont montré qu'un apport d'extrait de levure diminuait fortement la vitesse d'oxydation de l'AsIII par des bactéries organisées en biofilms. La matière organique apparaît donc comme ralentissant la transformation de l'AsIII en AsV par les bactéries en condition aérée. Cette réaction a une importance écologique significative car elle conduit à une stabilisation de l'As dans l'environnement par la formation d'AsV, dont la capacité à s'adsorber sur des phases porteuses telles que les oxydes de fer est bien connue ([Fuller et al, 1993](#)). Certains auteurs ont cependant suggéré que les gènes *ars* pourraient contribuer à la mobilisation d'arsenic dans l'environnement. [Macur et al \(2004\)](#) ont isolé diverses bactéries hétérotrophes d'un sol non saturé, et ont montré qu'en présence de 5 mM (0,9 g.L⁻¹) de glucose, la moitié des microorganismes oxydait l'AsIII et l'autre moitié réduisait l'AsV dans les mêmes conditions aérobies. Deux des souches isolées, apparentées à *Agrobacterium tumefaciens* et très proches du point de vue phylogénétique, avaient même des comportements opposés vis-à-vis de l'arsenic : l'une oxydait l'AsIII, et l'autre réduisait l'AsV. Au niveau du système de résistance *Ars*, la plupart des études portant sur l'expression ont été jusqu'à présent focalisées sur les gènes codant pour les transporteurs *ArsB* et *Acr3* ([Achour-Rokbani et al, 2010](#); [Achour et al, 2007](#); [Poirel et al, 2013](#)). Cependant, l'expression de ces gènes n'est pas obligatoirement liée au phénomène de réduction de l'AsV, contrairement à celle du gène *arsC* dont l'expression est moins documentée. La régulation des gènes *aiOAB* par la matière organique ferait intervenir un contrôle multiple, contrairement au système *ars* dont l'expression est contrôlée uniquement par la concentration en arsenic.

Les hypothèses pouvant expliquer un effet potentiel de la matière organique sur la vitesse d'oxydation de l'arsenic sont (1) que la présence de substrat organique pourrait inhiber le processus d'oxydation *via* les gènes *aio*, parce que les bactéries métaboliseraient des substrats plus énergétiques que l'AsIII, (2) que la matière organique pourrait aussi induire une diminution de la biodisponibilité de l'AsIII par des réactions de complexation ([Spuches et al, 2005](#)), et (3) qu'en présence de matière organique, le système Ars de réduction de l'AsV soit stimulé, induisant une vitesse d'oxydation globale plus faible, cette vitesse globale étant la résultante de l'oxydation de l'AsIII et de la réduction simultanée de l'AsV.

Cependant, jusqu'à présent, l'influence de la concentration et de la nature de la matière organique sur les activités d'oxydation de l'AsIII ou de réduction de l'AsV en condition aérobie n'a pas été étudiée de façon systématique.

L'objectif du présent travail était de mettre en relation, en présence ou non de matière organique :

- La cinétique d'oxydation en batch de l'AsIII,
- La croissance bactérienne,
- L'expression du gène *aioA* (oxydation de l'AsIII).

L'extrait de levure est le substrat complexe de référence dans les études de laboratoire. Afin de comparer les résultats entre eux, il est donc important d'étudier l'effet de ce substrat. En parallèle, des substrats organiques simples ne contenant pas d'azote ont été choisis, l'acétate et le succinate. Ces substrats peuvent être utilisés par les bactéries comme sources de carbone et/ou d'énergie, mais pas comme source d'azote, contrairement à l'extrait de levure.

Dans un premier temps, l'influence directe de substrats organiques sur l'expression du gène *aioA* a été explorée, permettant ainsi de progresser dans l'évaluation des deux premières hypothèses. Au cours de la présente étude, l'oxydation de l'AsIII au cours de la croissance bactérienne a été étudiée en batch, à une concentration en arsenic relativement élevée (75 mg.L⁻¹ soit 1 mM). Par ailleurs, des cinétiques d'oxydation de l'AsIII à une faible teneur en AsIII, plus compatibles avec les concentrations potentiellement trouvées dans les eaux interstitielles d'un sol (0,5-2 mg.L⁻¹ d'AsIII) ont été déterminées avec des cellules bactériennes pré-cultivées en présence de différentes concentrations et natures de substrats organiques. L'étude de cinétiques d'oxydation de l'AsIII par des cellules placées dans différentes conditions a ensuite permis d'acquérir des informations concernant l'hypothèse (2) focalisée sur l'effet de la matière organique sur la biodisponibilité de l'AsIII.

II.2. Matériel et Méthodes

II.2.1. Souches bactériennes

Les microorganismes choisis comme modèles sont :

- la souche autotrophe facultative et mixotrophe *Thiomonas delicata* souche *arsenivorans* (DSM 16361) capable de se développer sur AsIII seul. Il est donc certain qu'elle utilise ce substrat comme source d'énergie. Cette souche possède *aioA* et *arsB*,
- la souche hétérotrophe *Herminiimonas arsenicoxydans* (DSM 17148), parfaitement caractérisée, qui possède les gènes *aioA* et *arsB*, et dont le génome a été séquencé.

Ces deux souches font partie de la sous-division β des protéobactéries. *T. arsenivorans* a été isolée par le BRGM : cette souche est disponible dans la banque de microorganismes du laboratoire. La souche *H. arsenicoxydans* ([Weeger et al, 1999](#)) a été aimablement fournie pour cette étude par le laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, qui a isolé cette bactérie.

II.2.2. Milieux de culture

Les deux souches ont été cultivées sur milieu minimum CAsO1.

Le milieu liquide CAsO1 est un mélange de deux solutions de 500 mL chacune. La solution A contient 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g NaCl , 0,05 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 1 mL de solutions d'oligo-éléments. Le pH de cette solution est ajusté avant autoclavage, à pH 6,0 pour une culture ultérieure de *T. arsenivorans* et à pH 7,2 pour une culture ultérieure de *H. arsenicoxydans*. La composition de la solution d'oligo-éléments est donnée dans [Battaglia-Brunet et al \(2006\)](#). La solution B (500 mL) contient 0,1 g de CaCl_2 et 0,1 de MgSO_4 . Les deux solutions ont été autoclavées séparément et mélangées après refroidissement. 10 mL d'une solution à 10 g.L^{-1} d'AsIII, filtrée à $0,22 \mu\text{m}$, ont été ajoutés au milieu de culture.

Une solution concentrée à 50 g.L^{-1} d'extrait de levure a été préparée et filtrée sur $0,22 \mu\text{m}$ avant d'être stockée au réfrigérateur.

II.2.3. Conditions d'incubation et mesure de la croissance

II.2.3.1. Expériences à 75 mg.L⁻¹ d'As^{III} : Influence de la concentration en substrat organique sur la cinétique d'oxydation de l'As^{III}

La souche de *T. arsenivorans* est repiquée chaque semaine sur milieu CAsO1. La souche *H. arsenicoxydans* est aussi repiquée chaque semaine sur milieu LB. La pureté est vérifiée par des étalements sur boîte de Pétri et par des observations à l'état frais par microscopie.

Les vitesses d'oxydation de l'As^{III} liées aux activités bactériennes sont déterminées sur des cultures en batch, avec suivi de la transformation de l'As^{III} en As^V au cours de la croissance.

T. arsenivorans a tout d'abord été cultivée en flacon pénicilline à partir d'une culture en milieu liquide à 10% (volume/volume), dans 20 mL de milieu CAsO1 sans ajout de matière organique. Pour *H. arsenicoxydans*, qui est une bactérie hétérotrophe, l'inoculum a été obtenu sur milieu CAsO1 (pH 7,2) contenant 75 mg.L⁻¹ d'As^{III} et 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Dix mL de préculture ont été prélevés et repiqués dans 6 erlenmeyers contenant 100 mL de milieu de base à 75 mg.L⁻¹ d'As^{III}. Trois de ces erlenmeyers ont été amendés avec 0,4 mL d'extrait de levure concentré, alors que les trois autres ont été amendés avec 2 mL d'extrait de levure concentré. Les concentrations finales en extrait de levure étaient respectivement de 0,2 et 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure, concentrations pour lesquelles un effet de la matière organique sur les cinétiques d'oxydation avait été mis en évidence dans des expérimentations antérieures. Le mode opératoire est sensiblement le même pour *H. arsenicoxydans* que pour *T. arsenivorans*, excepté pour le pH du milieu (7,2 pour *H. arsenicoxydans* contre 6,0 pour *T. arsenivorans*).

Tous les flacons ont été incubés à 25°C sous agitation. A T0 puis 2 fois par jour, les deux premiers jours, la croissance bactérienne a été suivie par des observations au microscope et par des mesures de densité optique à 620 nm. Les prélèvements ont été ensuite filtrés à 0,22 µm dans des flacons stériles, pour l'analyse ultérieure de l'As^V.

II.2.3.2. Expériences à 2 mg.L⁻¹ d'As^{III}

Le but de ces expériences était de quantifier la vitesse d'oxydation de l'As^{III} lorsque la concentration en As^{III} est si faible que la cinétique doit être réalisée sur un intervalle de temps court, c'est-à-dire inférieur à une heure. Pour cela, il est préférable de travailler avec une concentration en cellules normalisée, ce qui permet de comparer plus facilement les résultats obtenus dans différentes conditions.

H. arsenicoxydans, souche hétérotrophe, a été pré-cultivée en milieu CASO1 additionné d'extrait de levure, alors que *T. arsenivorans* a été pré-cultivée en milieu CASO1 minimum. Afin de déterminer dans quelle mesure la concentration en matière organique dans le milieu de croissance a un impact sur les capacités AsIII-oxydantes des deux souches, et pour éliminer un biais potentiel dû à la présence de substrat organique lors de la croissance de *H. arsenicoxydans*, deux types d'expériences ont été comparés :

- Des expériences avec une concentration en substrat identique pendant la phase de croissance des cellules et pendant la phase de mesure de la vitesse d'oxydation (cinétique) ;
- Des expériences au cours desquelles l'effet de la présence de substrat pendant la phase de cinétique a été dissocié de l'effet de la concentration pendant la croissance ; pour cela, deux conditions différentes, absence ou présence de substrat pendant la cinétique, ont été comparées.

Les substrats choisis pour ces expériences étaient les suivants : pour *T. arsenivorans*, l'extrait de levure ou le succinate ont été utilisés comme source de carbone et d'énergie, alors qu'*H. arsenicoxydans* a été cultivée sur extrait de levure ou acétate. L'acétate est la seule molécule carbonée simple utilisée par *H. arsenicoxydans* comme unique source de carbone et d'énergie ([Muller et al. 2003](#)), mais pour *T. ars.*, qui n'utilise pas l'acétate, un autre substrat simple utilisé de façon efficace par cette souche, le succinate, a été choisi. L'extrait de levure est un substrat complexe utilisé par les deux souches, ce qui permet d'avoir des résultats avec un substrat commun pour les deux organismes. Ainsi, pour chaque souche, l'influence d'un substrat complexe et d'une molécule carbonée simple a été déterminée.

a. Matière organique en concentration identique dans le milieu de croissance et dans le milieu de cinétique.

Le protocole de cette série d'expériences est détaillé dans la

Figure 11. La nature et la concentration en substrat dans le milieu de croissance des cellules ont été conservées à l'identique dans le milieu de cinétique au cours de laquelle les vitesses spécifiques d'oxydation de l'AsIII ont été déterminées.

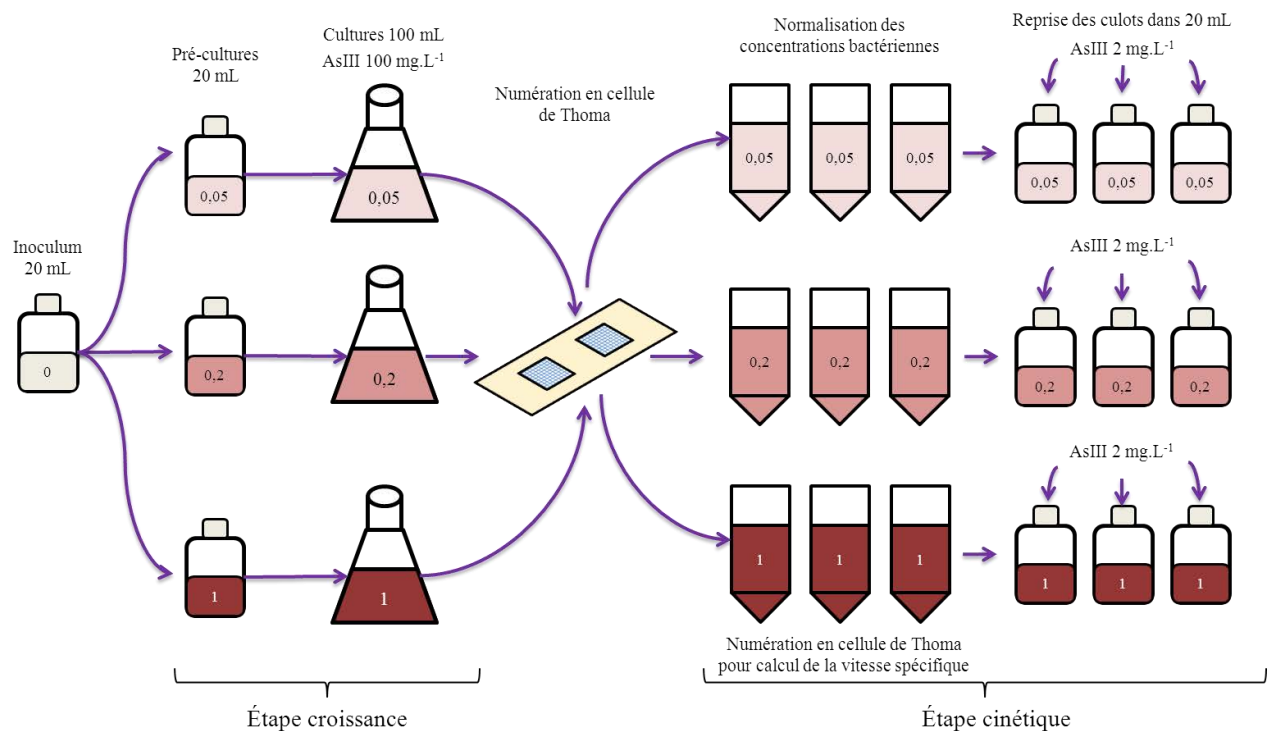


Figure . Protocole de détermination des vitesses spécifiques d'oxydation de l'AsIII : nature et concentration en matière organique identiques dans le milieu de croissance et au cours des déterminations de cinétiques d'oxydation de l'AsIII.

Les bactéries ont été pré-cultivées pendant 3 jours en milieu CASO1 contenant 100 mg.L^{-1} d'AsIII, au pH adéquat (pH 6,0 pour *T. arsenivorans* et pH 7,2 pour *H. arsenicoxydans*) et différentes concentrations en matière organique (0,05 ; 0,2 ou 1 g.L^{-1} d'extrait de levure pour les deux souches, ou de succinate pour *T. arsenivorans* ou d'acétate pour *H. arsenicoxydans*). Chacune de ces pré-cultures a ensuite été repiquée dans 100 mL de milieu de culture contenant 2 mg.L^{-1} d'AsIII et à la concentration en matière organique dans laquelle elle avait été pré-cultivée. Les incubations ont été réalisées pendant 3 jours, à 25°C , en condition statique.

A l'issue de cette étape de croissance, les bactéries de chaque condition ont été dénombrées après homogénéisation par comptage au microscope en cellules de Thoma. Les volumes de culture à prélever pour obtenir la même quantité de cellules pour chaque condition ont été calculés. Une première centrifugation des cultures, de 30 minutes à $8\,500 \text{ g}$, a été réalisée. Le surnageant a été soigneusement éliminé et les culots rincés avec 20 mL de milieu CASO1 sans arsenic.

Un second cycle de centrifugation de 30 minutes à 8 500 g, de lavage des culots cellulaires par ajout de 20 mL de CAsO1 sans arsenic et de re-suspension des culots, a été réalisé. Le volume de suspension bactérienne a ensuite été ajusté, pour chaque condition à 130 mL par ajout de milieu sans arsenic. Les suspensions bactériennes ainsi obtenues ont été distribuées à raison de 20 mL par flacon cotonné stérile de 60 mL. Tous les flacons ont été échantillonnés (1 mL), et les prélèvements ont été placés en tubes à hémolyse et conservés à 4 °C pour numération en cellule de Thoma. Les culots ont été repris chacun dans 20 mL de milieu CAsO1 neuf, contenant la concentration initiale de matière organique. Chaque cinétique a été réalisée sur des cultures en triplicat. A T0, 400 µL de solution à 100 mg.L⁻¹ d'AsIII ont été ajoutés dans les flacons de façon à obtenir une concentration finale de 2 mg.L⁻¹ d'AsIII. Une cinétique d'oxydation a été réalisée durant 45 minutes, avec un prélèvement de 2,5 mL toutes les 15 minutes. Les échantillons prélevés ont été immédiatement filtrés à 0,2 µm dans des microtubes stériles. Entre chaque prélèvement, les cultures ont été remises à incuber à 25 °C en condition statique.

b. Effet de la présence de matière organique durant la cinétique d'oxydation de l'AsIII par les souches pures cultivées à différentes concentrations en substrat organique

La cinétique d'oxydation a été réalisée sur 45 min avec des suspensions de cellules des deux souches pures (*T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans*) préalablement cultivées en présence de différentes concentrations en substrat organique. Pour toutes les conditions, les cultures ont été réalisées en présence de trois concentrations (0,05 ; 0,2 et 1 g.L⁻¹) en matières organiques. Ensuite, les cinétiques ont été réalisées en absence ou en présence de 0,2 g.L⁻¹ de matière organique (Figure 12). Ceci devait permettre de distinguer l'effet de la concentration en matière organique pendant la croissance de l'effet de la matière organique au moment de la cinétique d'oxydation.

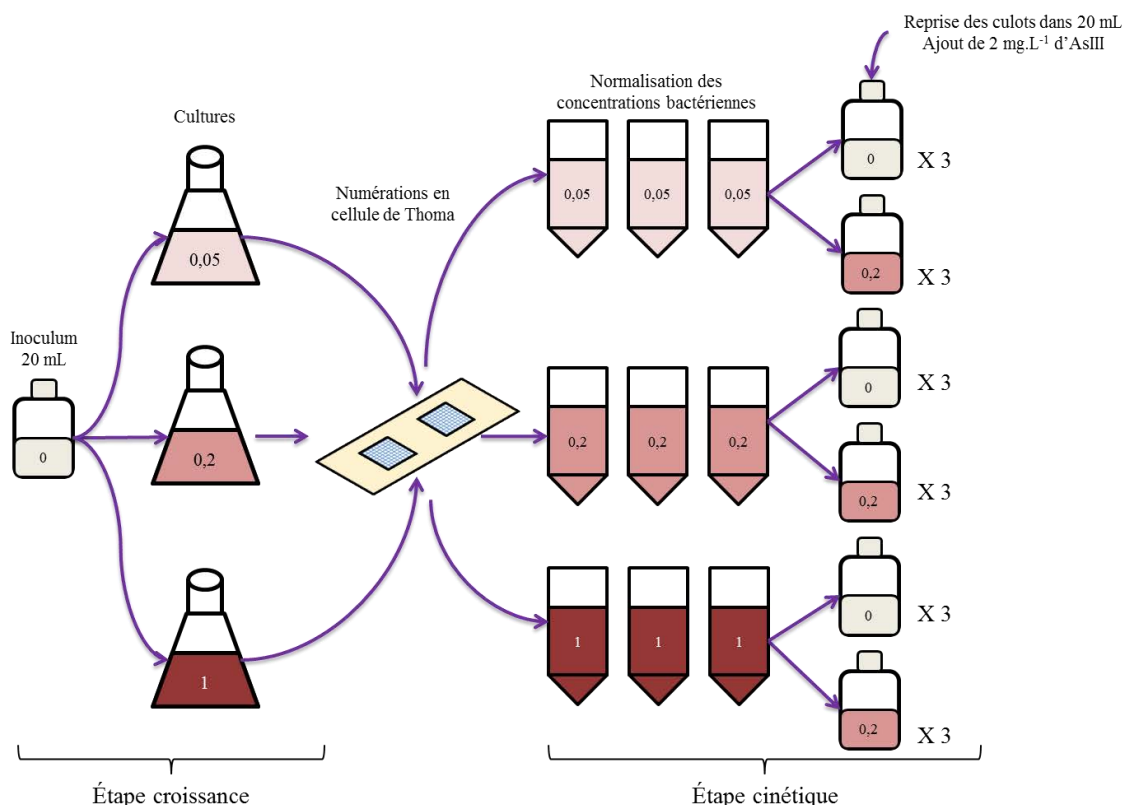


Figure . Protocole utilisé afin de déterminer l'influence de la présence de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ d'AsIII sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII par des bactéries cultivées en présence de différentes concentrations en substrats organiques (données en g.L^{-1} dans les représentations des flacons)

Après croissance des bactéries, les cellules ont été récupérées et remises en suspension de façon à normaliser la concentration cellulaire comme décrit dans le paragraphe II.2.3.2. a.

Pour les cultures à $0,05 \text{ g.L}^{-1}$, $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ et 1 g.L^{-1} de matière organique, deux sous-conditions ont été testées lors des cinétiques : (1) sans matière organique et (2) avec $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de matière organique. Pour cela, $400 \mu\text{L}$ de solution concentrée à 10 g.L^{-1} de chaque matière organique ont été ajoutés dans une moitié des flacons, correspondant à la condition « $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de substrat organique pendant la cinétique ». Une cinétique d'oxydation a été réalisée durant 45 minutes comme décrit dans le paragraphe II.2.3.2. a.

II.2.4. Spéciation de l'arsenic : séparation par échange d'ions

Tous les prélèvements ont été préalablement dilués au $1/10^{\text{ème}}$ et stockés à 4°C . Les fractions AsIII et AsV des échantillons issus des cinétiques ont été obtenues par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (AG® 1-X8 Resin, Cat. #140-1431, Biorad).

Cinq mL d'échantillon ont été déposés sur la résine. La fraction d'AsIII a été recueillie d'un premier rinçage de la colonne avec 5 mL d'eau ultrapure et acidifiée avec une goutte d'HCl concentré à 37 %. L'AsV a été élué deux fois avec 5 mL d'HCl 1 M. Les flacons contenant les 5 mL restant d'As total ont à leur tour été acidifiés et le tout a été conservé à 4 °C avant dosage. La quantification de l'arsenic, AsV, AsIII et As total, a été réalisée par spectrophotométrie d'absorption atomique four (Varian SPECTRAA).

II.2.5. Calcul de la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII

La vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII par les souches pures a été calculée en divisant la vitesse d'oxydation de l'AsIII linéaire sur 45 min d'expérience par la concentration en cellules mesurée au début de l'expérience. Cette concentration ne varie pas significativement au cours des 45 minutes d'expérience.

II.2.6. Extraction des ARN et synthèse des ADNc

Les extractions d'ARN et d'ADN ont été réalisées sur les culots de cellules conservés à -80°C, au moyen du kit NucleoSpin® RNA II de Macherey-Nagel suivant les recommandations du fabricant.

Une étape d'éluion séparée des ADN et des ARN a été intercalée dans le protocole avant les éluions des ARN, afin d'extraire conjointement les ADN. Cette étape a été réalisée avec le set Nucleospin® DNA/RNA Buffer de Macherey-Nagel.

La colonne a ensuite été placée sur un nouveau tube de collection de 1,5 mL et le protocole du fabricant a été poursuivi, avec la digestion des ADN jusqu'à l'éluion des ARN.

Il a été nécessaire de rajouter une nouvelle étape de digestion des ADN résiduels après l'éluion des ARN, au moyen de la Turbo DNase (Ambion). Pour ce faire, les ARN extraits ont été mélangés à 7 µL de tampon et 1 µL de DNase à 2U, puis incubés à 37°C pendant 10 min.

Enfin, une nouvelle étape de lavage des ARN au moyen du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) a été réalisée. Les ARN ont finalement été élués dans 60 µL et dosés au spectrophotomètre BioPhotometer (Eppendorf).

La qualité des ARN extraits a été vérifiée sur gel à 1 % d'agarose (25 min à 100 V). Ils ont été stockés dans des microtubes LoBind (Eppendorf), à -80°C, jusqu'à l'étape de RT-PCR.

II.2.7. Conditions de PCR

a. PCR

Le mélange réactionnel utilisé en RT-PCR était constitué de 1 µL de iScript™ reverse transcriptase, d'un volume variable de solution d'ARN extrait de façon à obtenir 50 ng par tube, de 4 µL de 5X iScript™ reaction mix, et d'eau (ultrapure nucléase free) qsp 20 µL. La RT-PCR a consisté en une succession de quatre étapes : une étape de 5 min à 25°C, une étape de 30 min à 42°C, une étape de 5 min à 85°C et une étape finale à 15°C.

Le gène *aioA* impliqué dans l'oxydation de l'AsIII et le gène de l'ARNr 16 S ont été amplifiés par PCR à partir des ARN et des ADNc des cultures de *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans*. Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur Bio-Rad iCycler.

Dans ce travail, nous avons souhaité corréler l'activité d'oxydation de l'arsenic à la détection et la quantification des gènes codant l'ARNr 16S (en relation avec la croissance des souches pures) et du gène *aioA* codant la sous-unité catalytique de l'AsIII-oxydase.

Les Tableau 1 et Tableau 2 listent les amorces utilisées dans cette étude ainsi que leurs principales caractéristiques.

Tableau . Séquence et source des amorces

Amorces	Séquence (de 5'' à 3'')	Références
Amorces ciblant les gènes <i>aioA</i>		
m2-1R	GGAGTTGTAGGCGGGCCKRTRTGDAT	(Quéméneur, 2008)
m4-1F	GCCGGCGGGGGNTWYGARRAYA	(Quéméneur, 2008)
Amorces ciblant les gènes codant l'ARNr 16S		
w49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG TTACCGCGGCTGCTGGCAC	(Delbès et al, 1998) (Zumstein et al, 2000)
w34-marqué FAM en 5''		
1406R	GACGGGCGGTGTGTRCA	(Lane et al, 1985)
Fd1deg	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Weisburg et al, 1991)

B = C ou G ou T ; H = A ou C ou T ; N = G ou A ou T ou C ; R = A ou G ; V = A ou C ou G ; W = A ou T ; Y = C ou T.

Tableau . Couples d'amorces et conditions opératoires

Couples d'amorces	Température d'hybridation (°C)	Taille du produit (pb)
m4-1F/m2-1R	54	~ 110
Amorces ciblant les gènes codant l'ARNr 16S		
Fd1deg/1406R	55	~ 1 500

Pour les PCR ciblant l'ADNr16S, les réactions ont été réalisées dans un volume total de 15 μL , contenant : 8,6 μL d'eau stérile, 3 μL de Tampon 5X, 1,5 μL de MgCl_2 25mM, 0,15 μL de dNTP 10mM, 0,3 μL d'amorces W49 *forward* et W34 *reverse* à 50 $\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,15 μL d'enzyme GoTaq polymérase (Promega, 5 U.L⁻¹), et 1 μL d'ADN, d'ADNc, d'ARN, ou bien d'eau distillée stérile (témoin négatif). Le témoin positif était de l'ADN de *Pseudomonas* (PA2-T4).

Les conditions de PCR étaient les suivantes : 5 min de dénaturation à 95 °C, suivie de 27 cycles de 30 s de dénaturation à 95 °C, de 30 s d'hybridation des amorces à 61°C, de 30 s d'élongation à 72 °C et d'une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C.

Pour les PCR ciblant *aioA*, les réactions ont été réalisées dans un volume total de 20 μL , contenant : 13 μL d'eau stérile, 4 μL de Tampon 5X, 1,2 μL de MgCl_2 , 0,2 μL de dNTP, 0,2 μL de chacune des amorces M4-1F et M2-1R, 0,2 μL d'enzyme GoTaq polymérase, et 1 μL d'ADN, d'ADNc, d'ARN ou d'eau distillée stérile (témoin négatif). Le témoin positif était de l'ADN de *H. arsenicoxydans*.

Les conditions de PCR étaient les suivantes : 5 min de dénaturation à 95 °C, suivie de 40 cycles de 30 s de dénaturation à 95 °C, de 30 s d'hybridation des amorces à 54°C, de 30 s d'élongation à 72 °C et d'une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C.

L'amplification des ADNr 16S et *aioA* a été vérifiée par électrophorèse sur gel (à 1 % et 3 % d'agarose respectivement), à 100 V pendant 25 et 30 min respectivement, et visualisée par fluorescence aux UV à l'aide de l'imageur GeneGenius et du logiciel GeneSnap (SynGene) après coloration au bromure d'éthidium.

b. PCR quantitative

La PCR en temps réel permet de détecter et de quantifier un émetteur fluorescent durant le processus d'amplification. L'agent fluorescent, le SYBRGreen I, est un agent intercalant qui se lie à l'ADN double-brin lors des phases d'hybridation et d'élongation de la PCR. Durant l'étape d'élongation, une augmentation du signal d'émission est associée à la quantité de SYBRGreen I se fixant à l'ADN double-brin naissant.

Les concentrations en ADNc ont été quantifiées par spectrophotométrie.

Les qPCR des gènes *aioA* and ARNr 16S ont été réalisées comme décrit par [Quéméneur et al \(2010\)](#).

II.3. Résultats et discussion

Pour rappel, les hypothèses initialement émises pour expliquer un effet potentiel de la matière organique sur la vitesse d'oxydation de l'arsenic sont (1) que les bactéries utiliseraient préférentiellement la matière organique comme source d'énergie par rapport à l'AsIII, (2) que l'AsIII serait moins biodisponible en présence de matière organique, et (3) que la vitesse globale d'oxydation serait plus faible parce que le système Ars de résistance, consommateur d'énergie, serait stimulé par la matière organique. Dans un premier temps, l'influence directe de substrats organiques sur l'expression du gène *aioA* a été explorée, permettant ainsi de progresser dans l'évaluation des deux premières hypothèses. L'étude de cinétiques d'oxydation de l'AsIII par des cellules placées dans différentes conditions a ensuite permis d'acquérir des informations concernant l'hypothèse (2) focalisée sur l'effet de la matière organique sur la biodisponibilité de l'AsIII.

II.3.1. Expression du gène *aioA* pendant la croissance des bactéries en présence de 75 mg.L⁻¹ d'AsIII

La Figure 13 montre que l'expression du gène *aioA* par *T. arsenivorans* n'est détectable qu'en début de croissance et d'oxydation de l'AsIII. Cette expression est plus élevée en présence de 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure que de 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Le maximum d'expression à T24 h correspond à environ 60 mg.L⁻¹ d'AsIII oxydé.

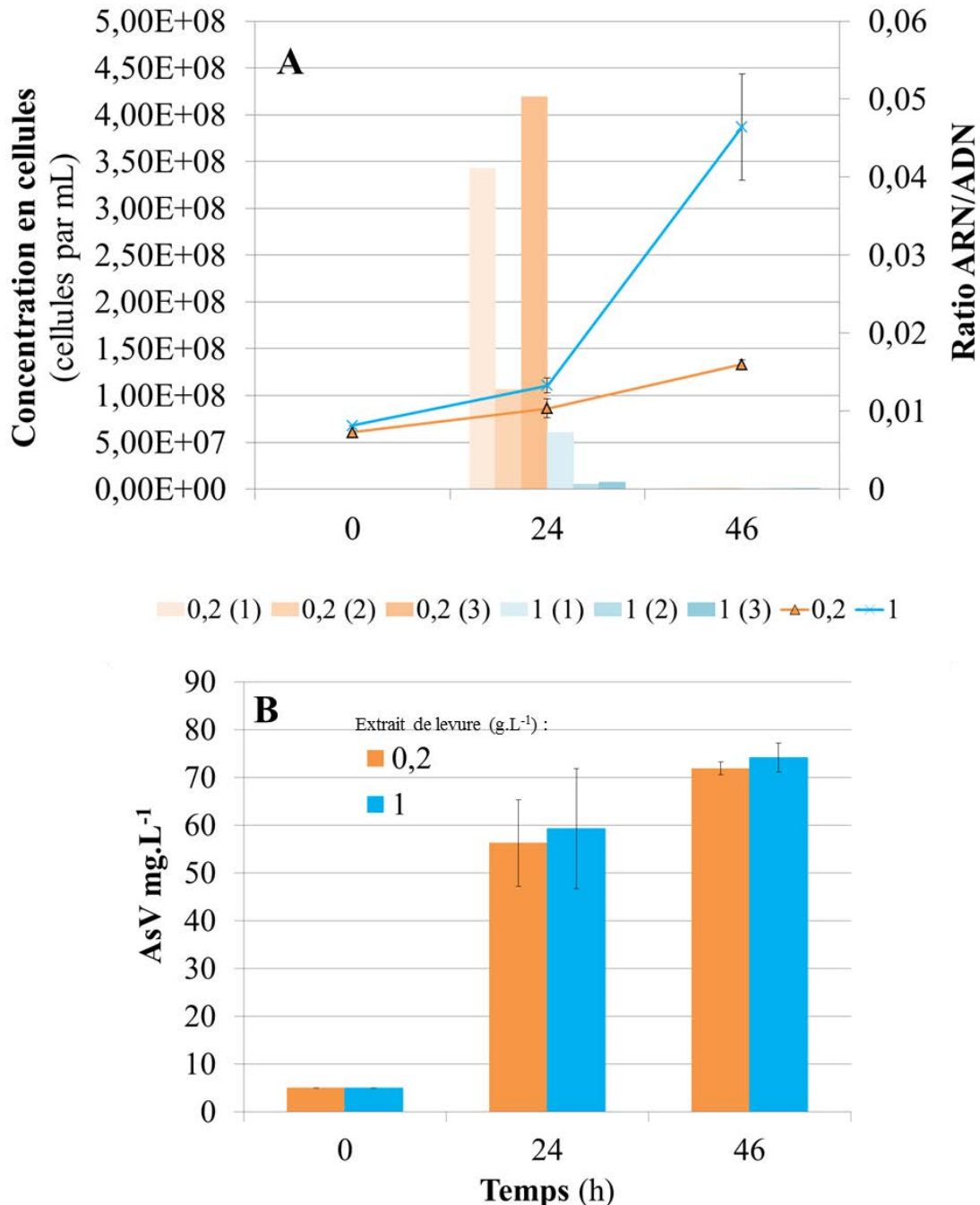


Figure . (A) Courbe de croissance de *T. arsenivorans* en présence de deux concentrations en extrait de levure et histogramme représentant les ratios ARN *aioA*/ADN *aioA* ; à 0,2 g.L⁻¹ (orange) et 1 g.L⁻¹ (bleu) ; (B) Evolution de la concentration en AsV dans les cultures en présence de 0,2 et 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure.

La Figure 14 montre une expression du gène *aioA* par *H. arsenicoxydans* détectable sur toute la durée de l'expérience, cependant l'expression maximale est détectée, comme avec *T. arsenivorans*, en début de croissance et d'oxydation de l'AsIII. L'expression est également plus élevée pour la concentration en extrait de levure la plus faible.

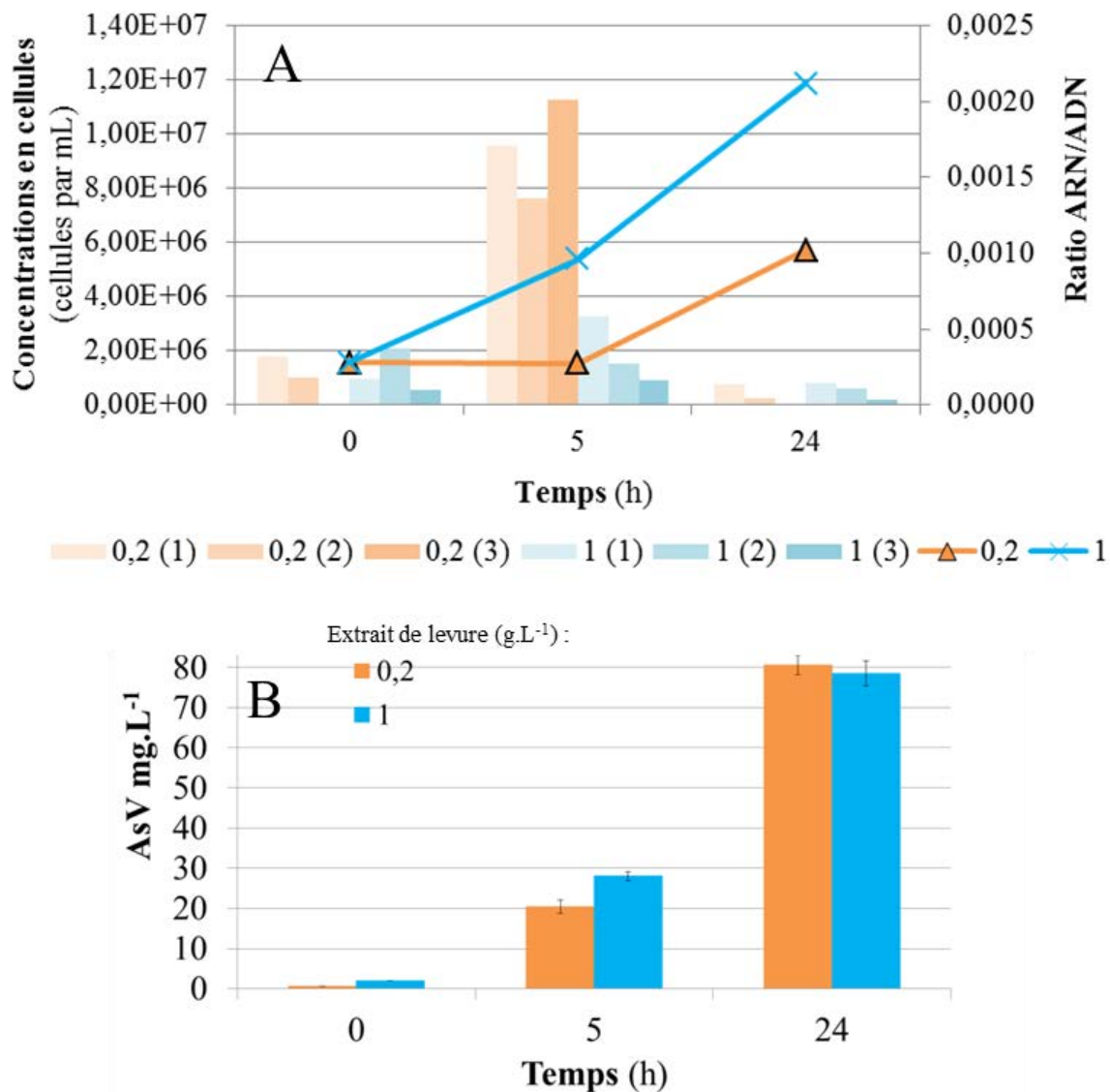


Figure . (A) Courbe de croissance de *H. arsenicoxydans* en présence de deux concentrations en extrait de levure et histogramme représentant les ratios ARN *aioA*/ADN *aioA* ; à 0,2 g.L⁻¹ (orange) et 1 g.L⁻¹ (bleu) ; (B) Evolution de la concentration en AsV dans les cultures en présence de 0,2 et 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure.

Le maximum d'expression est obtenu à 5 h, correspondant à 20-30 mg.L⁻¹ d'AsIII oxydé. Pour les deux souches bactériennes, l'expression est importante en début de croissance. L'expression est faible en fin de croissance.

Pour les deux souches, dans la phase d'expression du gène *aioA*, cette expression est plus forte à 0,2 qu'à 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure.

Jusqu'à présent, le seul facteur étudié ayant une influence sur l'expression du gène *aioA* était la présence et la concentration en arsenic III ou V. L'expression du gène *aioA* est induite par la présence d'As chez la plupart des bactéries oxydant l'AsIII ([Slyemi & Bonnefoy, 2012](#)). Cependant, chez quelques souches, l'expression du gène a également été observée en absence d'arsenic : *Thiomonas* sp. 3AS ([Duquesne et al, 2008](#)), *Ralstonia* sp. 22 ([Lieutaud et al, 2010](#)) et *Agrobacterium tumefaciens* 5A, souche pour laquelle l'oxydation de l'AsIII semble régulée par *quorum sensing* en fin de croissance ([Kashyap et al, 2006](#)), ainsi que pour certaines souches de *Pseudomonas* ([Poirel et al, 2013](#)). L'expression de gènes appartenant à l'opéron *aio* serait liée à la présence d'AsIII et à l'expression de gènes impliqués dans la mobilité chez *H. arsenicoxydans* ([Koechler et al, 2010](#)). La présente étude montre pour la première fois un effet d'un apport de matière organique dans le milieu de croissance sur l'expression du gène *aioA* lié à l'oxydation bactérienne de l'AsIII.

II.3.2. Expériences à 2 mg.L⁻¹ d'AsIII.

Ces expériences ont été conçues afin d'obtenir des résultats dans des conditions plus proches de celles des sols.

II.3.2.1. Concentration en matière organique identique dans le milieu de croissance et dans le milieu de cinétique.

Une diminution de la vitesse d'oxydation de l'AsIII est observée lorsque la concentration en substrat dans le milieu augmente. Ceci est observé pour les deux souches, à la fois avec des substrats simples et avec l'extrait de levure qui est un substrat complexe (Figure 15).

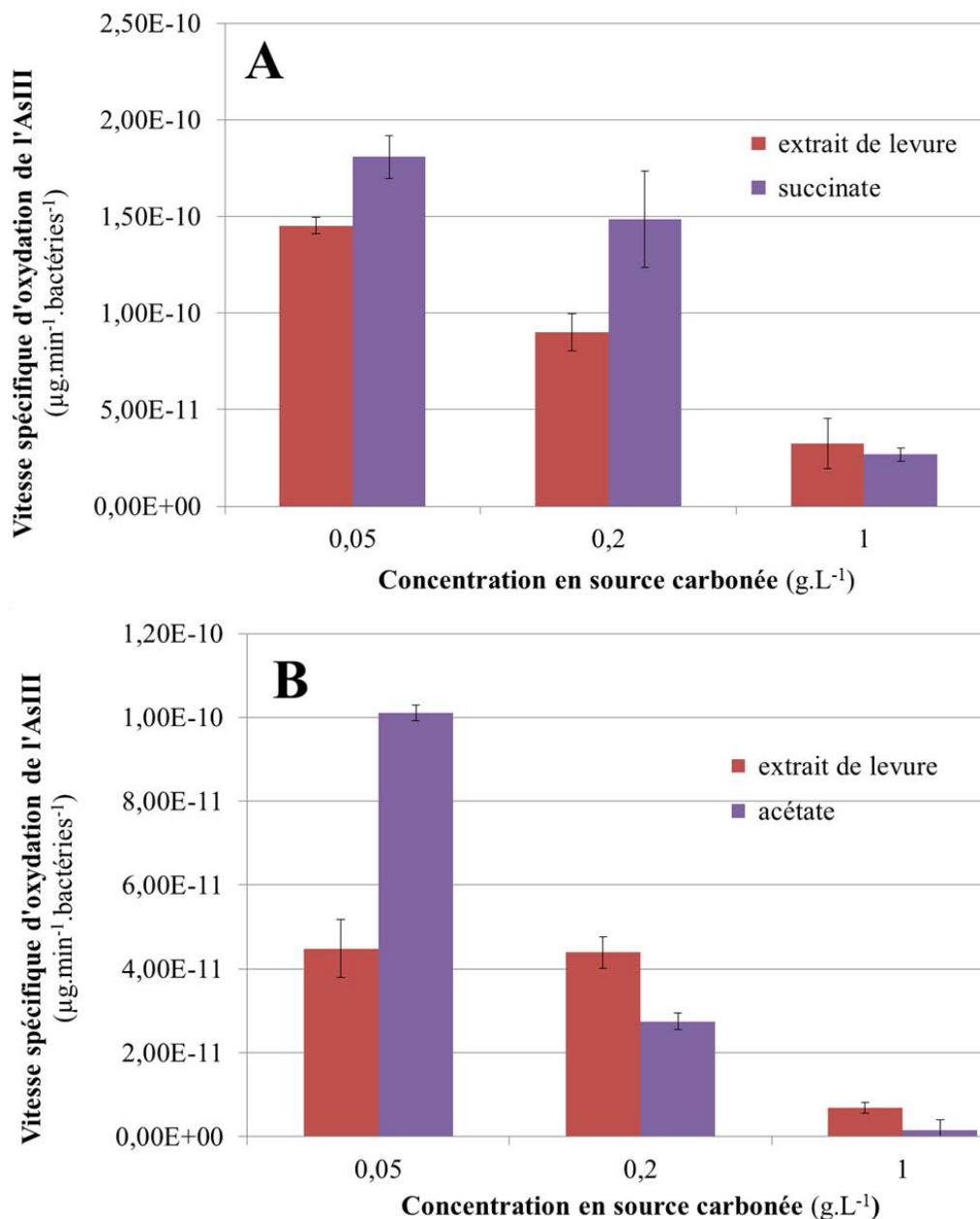


Figure . Vitesse spécifique d'oxydation d'AsIII par les souches pures à concentration cellulaire normée, et à 2 mg.L⁻¹ d'AsIII en présence de 0,05 ; 0,2 et 1 g.L⁻¹ de source carbonée. (A) *T. arsenivorans* ; (B) *H. arsenicoxydans*

II.3.2.2. Effet de la nature et de la concentration en substrat organique pendant la croissance des deux souches sur leurs activités ultérieures d'oxydation de l'AsIII.

Pour rappel, le milieu dans lequel les cellules sont mises en suspension pour la cinétique d'oxydation de l'AsIII ne contient pas de matière organique au cours de l'expérience. Une diminution de la vitesse d'oxydation de l'AsIII est observée lorsque la concentration en substrat dans le milieu de croissance des bactéries augmente. Ceci est encore observé pour les deux souches, à la fois avec des substrats simples et avec l'extrait de levure qui est un substrat complexe (Figure 16).

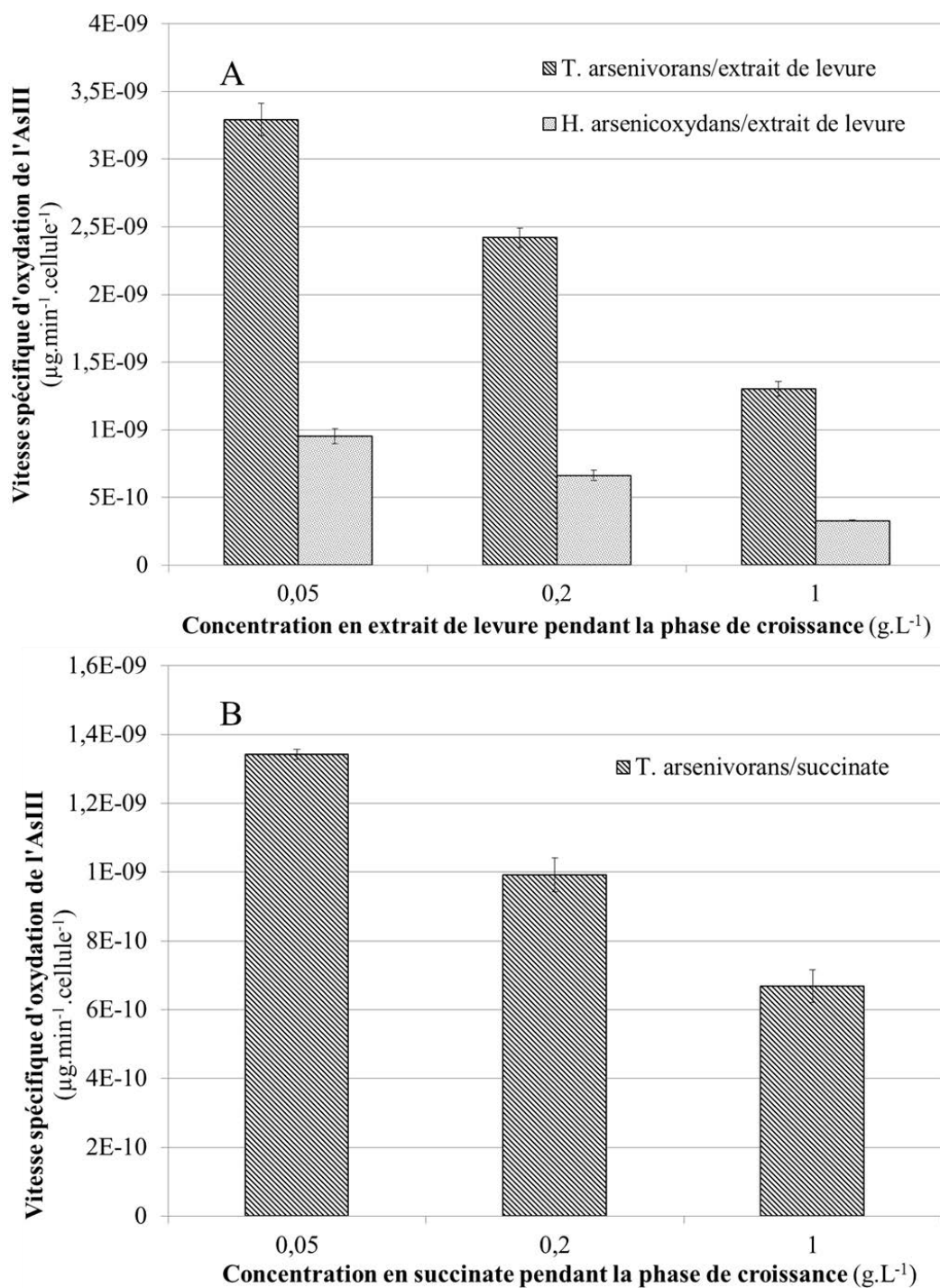


Figure . Vitesses spécifiques d'oxydation de l'AsIII à 2 mg.L⁻¹ d'AsIII par *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans* en présence (A) d'extrait de levure et (B) de substrats simples, pendant la pré-culture.

Le Tableau 3 montre l'effet de la matière organique pendant la cinétique d'oxydation de l'AsIII (variation observée entre la vitesse à 0 g.L⁻¹ de substrat ajouté dans le milieu de cinétique et la vitesse à 0,2 g.L⁻¹ de substrat ajouté dans le milieu de cinétique). Un effet négatif est observé avec l'extrait de levure (substrat complexe), mais pas avec les substrats carbonés simples (succinate et acétate), avec lesquels l'effet est soit nul, soit positif.

Tableau . Evolution de la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII entre la condition « 0 substrat organique » et la condition « 0,2 g.L⁻¹ de substrat organique » pendant la cinétique d'oxydation, à différentes conditions de pré-culture.

Souche	Condition de pré-culture	Effet du substrat organique présent dans le milieu au moment de la cinétique : variation en % de la condition 0 à la condition 0,2 g.L ⁻¹
<i>T. arsenivorans</i>	Extrait de levure 0,05	-13,6
<i>T. arsenivorans</i>	Extrait de levure 0,2	-39,1
<i>T. arsenivorans</i>	Extrait de levure 1	-17,7
<i>T. arsenivorans</i>	Succinate 0,05	+7,3
<i>T. arsenivorans</i>	Succinate 0,2	+3,0 (NS)
<i>T. arsenivorans</i>	Succinate 1	+26,3
<i>H. arsenicoxydans</i>	Extrait de levure 0,05	-25,9
<i>H. arsenicoxydans</i>	Extrait de levure 0,2	-17,9
<i>H. arsenicoxydans</i>	Extrait de levure 1	-10
<i>H. arsenicoxydans</i>	Acétate 0,05	-11,5 (NS)
<i>H. arsenicoxydans</i>	Acétate 0,2	ND
<i>H. arsenicoxydans</i>	Acétate 1	+106,1

ND : non déterminé (pas d'oxydation de l'AsIII observée)

NS : variation non significative (par recouvrement des barres d'erreur sur écarts-type)

Effet négatif	La présence du substrat dans le milieu pendant la cinétique a un effet négatif sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII
Effet positif	La présence du substrat dans le milieu pendant la cinétique a un effet positif sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII

Ces résultats suggèrent que la matière organique complexe, c'est-à-dire l'extrait de levure, aurait un effet négatif sur l'oxydation de l'AsIII au moment de la cinétique. Ce phénomène pourrait être lié à la complexation de l'AsIII par certains composants de l'extrait de levure, tels que des groupements soufrés d'acides aminés, qui rendrait l'As moins biodisponible. Ces réactions de complexation n'auraient pas lieu avec les substrats simples.

Les vitesses spécifiques d'oxydation de l'AsIII obtenues dans le cadre de la présente étude sont du même ordre de grandeur (Tableau 4) que les Vmax d'oxydation déterminées pour *Variovorax* sp. 24 ([Janda & Abbott, 2007](#)) et *Agrobacterium albertimagni* AOL15 ([Salmassi et al, 2002](#)).

Tableau . Comparaison des vitesses spécifiques d'oxydation obtenues dans la présente étude et rapportées dans la littérature

Souche bactérienne	V spécifique ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{cellule}^{-1}$)	Références
<i>Comamonas</i> sp. ASR11	$3,6 \times 10^{-11}$	(Das et al, 2014)
<i>Pseudomonas</i> sp. ASR1	$7,35 \times 10^{-11}$	(Das et al, 2014)
<i>Variovorax</i> sp. 34	$V_{\text{max}} 8.85 \times 10^{-11}$	(Janda & Abbott, 2007)
<i>H. arsenicoxydans</i>	0,5 à $9,5 \times 10^{-10}$	Présente étude
<i>Agrobacterium albertimagni</i> AOL15	$V_{\text{max}} 1.36 \times 10^{-10}$	(Salmassi et al, 2002)
<i>T. arsenivorans</i>	1 à 3×10^{-9}	Présente étude
<i>Bordetella</i> sp. SPB-24	$V_{\text{max}} 1.46 \times 10^{-6}$	(Bachate et al, 2012)
<i>Variovorax</i> sp. MM-1	$V_{\text{max}} 9,23 \times 10^{-6}$	(Bahar et al, 2013)

Pour les expériences à 2 mg.L^{-1} d'AsIII, la durée de la cinétique était courte : la croissance des cellules est négligeable sur la durée de la cinétique. La vitesse spécifique d'oxydation étant plus faible lorsque les cellules se sont développées à forte concentration en substrat, il est probable, à la lumière des résultats des expériences réalisées à 75 mg.L^{-1} d'AsIII, que le taux d'expression des gènes codant pour l'arsénite oxydase ait été affecté négativement par la matière organique, ce qui aurait eu pour conséquence une synthèse d'arsénite oxydase moins élevée. Plusieurs auteurs ont déjà observé un effet de substrats organiques sur l'activité de bactéries AsIII-oxydantes. Ainsi, [Santini et al \(2000\)](#) ont rapporté que la souche AsIII-oxydante NT-26 utilisant l'AsIII comme source d'énergie montrait une forte activité arsénite oxydase lorsqu'elle était cultivée sans aucune source de carbone organique, et que l'ajout d'extrait de levure entraînait une diminution de l'activité AsIII-oxydante chez cette bactérie.

[Bachate et al \(2012\)](#) ont étudié l'influence de divers paramètres (température, pH et milieu de croissance) sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII par les cellules bactériennes lavées et remises en suspension en présence de 75 mg.L^{-1} d'AsIII. Ils ont suivi l'oxydation de l'AsIII par ces cellules pendant 1 heure. Les souches utilisées par Bachate et al. étaient deux bactéries hétérotrophes apparentées du point de vue phylogénétique aux genres *Bordetella* et *Achromobacter*.

Ces auteurs ont observé que les conditions de croissance avaient un effet sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII : cette dernière était maximale quand les souches étaient cultivées en présence de seulement $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ d'extrait de levure, réduite de 25 à 50 % quand les cellules s'étaient développées en présence de 1 g.L^{-1} d'extrait de levure, et diminuée de 85 % quand elles s'étaient développées avec $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ d'extrait de levure + 20 mM ($1,18 \text{ g.L}^{-1}$) d'acétate. [Bachate et al \(2012\)](#) ont également observé une diminution de l'activité enzymatique arsénite-oxydase des deux souches avec l'augmentation de la concentration totale en substrats organiques dans le milieu de croissance. Les résultats obtenus au cours de la présente étude convergent donc avec ceux de [Bachate et al \(2012\)](#), alors que les souches considérées appartiennent à des genres distincts et proviennent d'environnements très différents : *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans* ont été isolées d'un site minier et d'une station d'épuration), les

souches de Bachate et al. provenant d'un sol de jardin. La vitesse d'oxydation bactérienne de l'AsIII est affectée négativement par la présence de matière organique dans le milieu de croissance. Ce phénomène est observé à concentrations en AsIII relativement élevée (75 mg.L⁻¹) et plus faible (2 mg.L⁻¹), de telles concentrations en arsenic étant couramment détectées dans des eaux souterraines ou dans l'eau interstitielle de sols sur des sites pollués. L'effet négatif sur l'oxydation de l'AsIII est observé à la fois avec un substrat complexe (l'extrait de levure), et des substrats carbonés simples n'apportant pas d'azote aux bactéries, tels que l'acétate et le succinate. Il semble donc bien exister un lien entre l'oxydation de l'arsenic et le métabolisme du carbone ou de l'énergie chez ces bactéries.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'effet négatif de substrats organiques sur l'expression d'*aioA* et sur la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII par les bactéries. Chez les bactéries capables d'utiliser l'AsIII comme source d'énergie, telles NT-26 ou *T. arsenivorans*, le phénomène pourrait être lié à une compétition entre l'AsIII et la matière organique en tant que substrat énergétique : en présence de substrat carboné, les cellules auraient moins besoin de l'énergie liée à l'oxydation de l'AsIII, et pour cette raison exprimeraient plus faiblement le gène *aioA*. Chez les bactéries incapables de récupérer de l'énergie de la réaction d'oxydation de l'AsIII (comme *H. arsenicoxydans*), chez lesquelles la capacité à oxyder l'AsIII est souvent considérée comme un mécanisme de détoxification du milieu, il est possible que la présence de substrat organique en forte concentration exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'AsIII. Des réactions de complexation pourraient survenir entre l'As et certains composés présents dans les substrats organiques complexes, et ainsi, diminuer la toxicité et/ou la biodisponibilité de l'AsIII. L'AsIII est reconnu comme susceptible de réagir avec les groupes thiols d'acides aminés soufrés, tels que ceux contenus dans l'extrait de levure. Enfin, en présence de plus de matière organique, les cellules bactériennes disposent de davantage d'énergie pour produire par exemple des molécules organiques telles que les EPS (ou autres molécules telles que des exopolymères de nature protéique portant des groupements thiols) qui complexeraient l'AsIII. Des processus proches ont été mis en évidence avec des bactéries produisant des sidérophores dans les sols pour mobiliser le chrome et le plomb, du lait écrémé étant fourni aux bactéries inoculées pour accroître la production de sidérophores (Braud et al, 2009). Des deux hypothèses initialement formulées pour expliquer la plus faible vitesse d'oxydation de l'AsIII en présence de matière organique (plus faible expression des gènes codant pour l'arsénite oxydase ou plus forte expression du système de résistance Ars) la première semble validée par les résultats de la présente étude : l'expression du gène *aioA* est impactée négativement par les substrats organiques carbonés. La seconde hypothèse n'a pas encore pu être testée, mais des amorces *arsC* ont été dessinées dans cette perspective (Annexe 1).

II.4. Conclusions

Des résultats antérieurs à la présente étude suggéraient un effet négatif de la matière organique sur l'activité d'oxydation bactérienne de l'AsIII. Ce travail a confirmé cet effet avec deux souches pures présentant des métabolismes contrastés, l'une utilisant l'AsIII comme source d'énergie et l'autre pas. Cette étude montre pour la première fois un effet négatif d'un substrat de croissance, l'extrait de levure, sur l'expression du gène *aioA*. La vitesse d'oxydation de l'AsIII est affectée par la présence d'extrait de levure mais également de substrats carbonés simples, présents dans le milieu de croissance des bactéries. Ces résultats devront être complétés par la détermination de l'effet de la matière organique sur la complexation de l'AsIII, et sur l'expression du gène *arsC* codant pour la réductase du système de résistance Ars, susceptible d'influencer, parallèlement au système Aio, l'équilibre de spéciation de l'arsenic inorganique dans les environnements aérés ou micro-aérophiles.

Introduction au Chapitre III.

Ce chapitre a été rédigé sous forme d'article et est en cours de soumission au journal *Soil Science Society of America Journal*.

Il est consacré à l'élaboration d'un mélange synthétique de molécules organiques représentatif de la matière organique naturelle des sols. Cette mixture est ensuite utilisée pour les expériences décrites dans le Chapitre IV. , afin d'étudier l'influence de matière organique complexe mais définie et reproductible sur l'activité AsIII oxydante de microflore de sols pollués.

Dans les études de laboratoire, l'amendement en matière organique des sols est communément imité soit par des molécules simples qui manquent de représentativité, soit par des matériaux complexes naturels qui ne peuvent être reproduits. Pour contrer cela, nous avons défini une mixture synthétique standardisée de composés organiques qui miment les matières organiques naturelles des sols.

La mixture modèle synthétique de matières organiques (SMOM) a été élaborée avec 39 molécules organiques définies dont la préparation est décrite dans un protocole détaillé. La mixture a été élaborée sur la base de la composition en matière organique naturelle des sols en termes de ratio C/N, diversité des sucres et des acides aminés, et du ratio fonctions carboxyliques / fonctions phénoliques à partir des données de la littérature et d'expériences de laboratoire.

Par cette contribution, une mixture modèle synthétique de matière organique est disponible pour étudier à l'échelle du laboratoire l'effet d'amendements organiques sur les communautés microbiennes de sols (structure et activité).

L'absence de toxicité aiguë de cette SMOM a été vérifiée par le test Microtox® en raison de la présence de composés phénoliques susceptibles d'exercer un effet toxique. La formulation proposée a été testée sur quatre sols pollués (Annexe 2).

Chapitre III. A synthetic standardized mixture to study the impact of added organic matter on soil bacterial communities

Tiffany Lescure • Pascale Bauda • Fabienne Battaglia-Brunet • Isabelle Lamy

T. Lescure • F. Battaglia-Brunet (✉)
BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France

T. Lescure
ADEME, 20, avenue du Grésillé, BP 90406 49004 Angers Cedex 01, France

P. Bauda
LIEC, UMR 7360 CNRS - Université de Lorraine, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

I. Lamy
INRA Centre de Versailles-Grignon, RD 10, 78026 Versailles Cedex, France

(✉) Corresponding author: F. Battaglia-Brunet. E-mail: f.battaglia@brgm.fr

SUMMARY

In laboratory studies, organic matter amendment of soils is commonly mimicked either with single molecules, lacking representativeness, or with natural complex materials whose composition cannot be reproduced and which may introduce exogenous microorganisms. To counter this we propose the determination of a synthetic standardized mixture of organic compounds that mimics natural soils organic matter.

The mixture was designed based on natural soils organic matter composition in terms of C/N ratio, diversity of sugars and amino-acids, and carboxylic/phenolic functions ratio based on literature data and laboratory experiments.

Main application of such a standardized model organic mixture is to study, at laboratory scale, the effect of organic amendments on soils microbial communities (structure and activities).

Keywords: Soil, Native organic matter, Synthetic organic compounds, Mimicked complex organic matter

III.1. Introduction

Organic matter is one of the major components of soils interacting with microorganisms and minerals (Huang et al., 2005). The impacts of added organic matter on soils bacterial communities or activities are usually studied at the laboratory scale using mimicking inputs like glucose or other simple substrates (Critter et al., 2001; Reischke et al., 2014). These techniques, however, introduce some bias and select adapted microorganisms. For instance, the taxa enriched by addition of single labile substrates to soil are restricted to a limited number of bacterial orders phylogenetically clustered, including orders Actinomycetales, Enterobacteriales, Burkholderiales, Rhodocyclales, Alteromonadales, and Pseudomonadales (Goldfarb et al., 2011; Poirel et al., 2013). Nevertheless, laboratory studies are necessary to evaluate the consequences on soil microorganisms of organic amendments particularly on polluted sites where the organic compounds may affect the behavior of pollutants over the long term and for which the soil bacterial communities are crucial for the soil functioning.

Some authors have designed experiments with mixtures of amino-acids, postulating that organic mixtures would activate a more diverse range of micro-organisms than only one type of simple low-molecular-weight molecules (Mondini et al., 2006, Dungait et al., 2013). Indeed metabolic responses (i.e. soil respiration and ^{13}C incorporation in phospholipid fatty acid (PLFA) pattern) were shown to be greater with complex mixtures than with single molecules (Mondini et al., 2006). Such model mixtures composed exclusively of molecules belonging to the same group (amino-acids for example) seem, however, too simple to mimic natural organic inputs.

An alternative to the addition of simple substrates would be to use for laboratory experiments the products marketed by the International Humic Substances Society (IHSS), which sells humic and fulvic acids extracted from soils. These products are well characterized from a physicochemical point of view (elemental composition, acidic functional groups, amino acids and carbohydrate content), but their characteristics can be non-constant from one batch to another, introducing a lack of reproducibility. Finally, in order to avoid the introduction of exogenous microorganisms in studies aiming to assess the impact of amendments on soils bacterial communities, it is better to develop a standardized and defined synthetic model mixture of organic compounds (SMOM). This SMOM needs to 1) exhibit a certain degree of complexity that mimics natural organic matter and also 2) be easily used to study the effect of organic amendments on soil bacterial communities. Its main advantage would be its reproducibility, enabling comparison of results between research laboratories.

The aim of this work was to develop such a standardized synthetic model mixture based on a compilation of literature data on soil organic matter and on laboratory experiments. Here, the design and procedure to prepare SMOM are detailed.

III.2. Design of the synthetic model organic mixture (SMOM)

The SMOM was designed on the basis of data available on the website of the IHSS (International Humic Substances Society, <http://www.humicsubstances.org>), which makes available the composition of its commercialized products (elemental compositions, concentrations of carboxylic and phenolic acids, sugar and amino acid contents).

As the applications of the SMOM are to mimic soil amendments in the laboratory, we wanted to know the average concentrations of sugars and amino-acids in humic and fulvic acids of exclusively continental soils. Three continental sources of humic substances were selected: Elliott soil (U.S. states of Indiana, Illinois, and Iowa), Pahokee Peat soil (Florida Everglades) and Summit Hill (city of Christchurch, New Zealand). The first two materials are a grassland soil and agricultural soil standards, while the third is a grassland soil reference.

The average concentrations of amino-acids and sugars were calculated from the seven dry, ash-free IHSS samples. These concentrations were kept in the model mixture which therefore contained the following molecules: L-arginine ($79.43 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry mixture), L-aspartic acid monopotassium salt ($81.29 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-glutamic acid monosodium salt monohydrate ($90.14 \mu\text{mol g}^{-1}$), glycine ($68.14 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-histidine ($9.38 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-isoleucine ($25.01 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-leucine ($30.37 \mu\text{mol g}^{-1}$), methionine ($7.70 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-phenylalanine ($15.01 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-serine ($53.61 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-threonine ($14.71 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-tyrosine ($9.59 \mu\text{mol g}^{-1}$), L-valine ($55.00 \mu\text{mol g}^{-1}$), glucose ($56.59 \mu\text{mol g}^{-1}$), galactose ($26.19 \mu\text{mol g}^{-1}$), mannose ($27.63 \mu\text{mol g}^{-1}$), fucose ($4.97 \mu\text{mol g}^{-1}$), rhamnose ($18.11 \mu\text{mol g}^{-1}$), arabinose ($15.24 \mu\text{mol g}^{-1}$), ribose ($2.46 \mu\text{mol g}^{-1}$), xylose ($22.47 \mu\text{mol g}^{-1}$).

To obtain the corresponding weights in percentage of dry mixture, refer to Supplementary Material SM1.

Once the concentrations of amino-acids and sugars were known and fixed, C/N and carboxylic function/phenolic function ratios were calculated based on averages for IHSS products. The desired final concentration in total carbon was determined by calculating the IHSS products' C/N ratio of humic and fulvic acids. The total C concentration is equal to 15.51 times the concentration of nitrogen, supplied mainly by the amino-acids.

The average ratio of carboxylic and phenolic groups of the seven IHSS products is 5.14. It should be noted that this ratio is one of the criteria traditionally differentiating humic and fulvic acids. Thus, for the four humic acids selected here, the average ratio (carboxylic/phenolic functions) of humic substances is $4.04 (\pm 0.45)$, while for the three fulvic acids it is $6.56 (\pm 0.73)$.

Both ratios were respected by adding selected organic acids found naturally in soils to the preceding list of amino-acids and sugars. In the final mixture, the concentrations of phenolic and carboxylic functions are 2,082 and 361 μM , respectively.

Strobel (2000) compiled the data contents of phenolic and carboxylic acids of low molecular weight in soil solutions and in soil extracts for soils that have been subject to different cultural practices. He observed that concentrations of low-molecular-weight carboxylic acids were highest in the upper horizons (O and A, representing about 10% of total organic carbon). Di- and tri-aliphatic low-molecular-weight carboxylic acids (oxalic, malonic, malic, succinic, tartaric, citric, etc.) are present at concentrations of about 0-50 mM, while monocarboxylic acid concentrations (formic, acetic, propionic, butyric, lactic and valeric) are of the order of 0-1 mM.

Average concentrations of carboxylic and phenolic acids in soils and their relative proportions were calculated from the data collected by Strobel (2000) for the O and A horizons. Nine carboxylic acids with the highest concentrations (>1.5%) in various soil solutions and extracts according to Strobel (2000), were selected for the mixture, namely succinic, acetic, propionic, tartaric, valeric, formic, citric, oxalic and butyric acids. The percentages of these carboxylic acids found in soil were maintained in the mixture, to keep about 94.5% of the natural variety of carboxylic acids in soil. 5.5% of the "missing" carboxylic functions were introduced to the mixture as palmitic acid (saturated fatty acid with 16 carbon atoms), in order to bring acids with long carbon chains (Table 1).

Table 1. Composition of the mixture in organic acids

Acid types	Acids	Amount of acid to be brought ($\mu\text{mol g}^{-1}$ equivalent humic substances)	Number of carboxylic and phenolic functions in the molecule		Relative concentration within each type of acids (%)	Relative concentrations (%)		
			Carboxylic	Phenolic		Carboxylic	Phenolic	
Carboxylic acids	succinic acid	709.46	2	0	1,418.92	0	34.08	29.04
	acetic acid	405.73	1	0	405.73	0	19.49	16.61
	propionic acid	164.04	1	0	164.04	0	7.88	6.72
	tartaric acid	158.63	2	0	317.26	0	7.62	6.49
	valeric acid	149.05	1	0	149.05	0	7.16	6.10
	formic acid	124.49	1	0	124.49	0	5.98	5.10
	citric acid	113.46	3	0	340.37	0	5.45	4.64
	butyric acid	102.63	1	0	102.63	0	4.93	4.20
	oxalic acid	39.14	2	0	78.27	0	1.88	1.60
	palmitic acid	115.12	2	0	230.24	0	5.53	4.71
						Total	100	
Phenolic or phenol-carboxylic acids	gallic acid	90.25	1	3	90.25	270.75	25.00	3.69
	vanillic acid	83.03	1	1	83.03	83.03	23.00	3.40
	4-hydroxy-benzoic acid	54.15	1	1	54.15	54.15	15.00	2.22
	catechin	43.32	0	4	0	173.28	12.00	1.77
	protocatechuic acid	28.88	0	2	0	57.76	8.00	1.18
	ferulic acid	21.66	1	1	21.66	21.66	6.00	0.89
	<i>p</i> -coumaric acid	3.61	1	1	3.61	3.61	1.00	0.15
	rutin	36.1	0	4	0	144.4	10.00	1.48
							Total	100
						Total	Total	100

Acids with a range of representative functions were added to the mixture in order to increase the apparent "complexity" of the proposed mixture and to respect the variety of acids found in soil solutions (i.e. aliphatic acids with mono-, di- and tri-carboxylic acid functions, benzoic-like and cinnamic-like acids).

All the phenolic compounds mentioned by Strobel (2000) were used for preparation of the mixture, with the exception of catechol which is toxic to numerous bacteria (Rodríguez Vaquero et al, 2007). This was replaced by catechin (12% of total phenolics). Phenolic acid concentrations were adapted in accordance with their inhibitory concentrations for certain bacteria (Rodríguez Vaquero et al, 2007). The "missing" phenolic functions were brought by rutin, at a concentration of 10% of the total of phenolic compounds. Rutin is a more complex phenolic compound of the flavonol type. It is supposed to mimic the behavior of the lignin compounds, which represent a large part of the phenolic compounds naturally present in soils. Lignin is not a molecule of reproducible and defined structure and could not be used as such in this mixture.

III.3. Preparation of the SMOM

The majority of chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, except L-glutamine, D-(+)-galactose and D-(+)-mannose, which were obtained from Fluka, glycine and L-leucine from Acros Organics, and acetic acid from VWR.

The components of the SMOM necessary to obtain 100 g of "equivalent humic substances" were gathered in 3 L of solution (final concentration of 33.3 g L⁻¹). To obtain the corresponding weights of each component for 100 g of dry SMOM, refer to Supplementary Material SM1.

The following methodology was applied to prepare 3 L of SMOM.

Ten solutions were prepared separately. A solution (1) of sugars and a solution (2) of amino acids were prepared in 50 and 850 mL of distilled water, respectively. Tartaric, oxalic, citric and succinic acids were dissolved respectively into 15, 10, 10 and 50 mL of distilled water. These acids were mixed together and 2.32 mL acetic, 1.224 mL propionic, 1.621 mL valeric and 0.938 mL butyric acids were added to this solution to produce a final volume of 120 mL (solution 3). Ten mL of a formic acid solution (4) was prepared separately with distilled water. Vanillic acid was dissolved under agitation in 1 L of distilled water at 60°C (solution 5). In a fume hood and protected from light, gallic, hydroxybenzoic, ferulic and coumaric acids were dissolved in 500 mL of distilled water at 60°C (solution 6). Rutin was weighed in a beaker and dissolved gradually with 25 mL NaOH 1M. This solution was then transferred to a glass bottle. The beaker was rinsed with 25 mL of ultrapure water. The rinse was added to the rutin to obtain solution (7). Catechin and protocatechuic acid solutions were prepared by dissolving the products respectively in 25 mL and 10 mL of 95 % ethanol (solution 8). Palmitic acid was weighed in a glass bottle and dissolved under agitation in 50 mL of 95% ethanol

heated to 60°C. The amount of ethanol provided with those solutions did not modify significantly the C/N ratio. The bottle was sealed and flushed with N₂ for 5 minutes (solution 9). Palmitic acid was then sterilized by autoclaving for 40 min at 121°C. Before mixing of all the solutions, palmitic acid had to be dissolved again by heating to 60°C. Except for the palmitic acid solution, all the solutions were sterilized by filtration at 0.2 µm, and stored at 4°C. All these solutions were mixed together in a 5 L beaker, under agitation, protected from light and in a sterile-vented fume hood. The formic acid solution (10) was added last. The intermediate bottles were rinsed with distilled water and the rinse was added to the final mixture. The pH was adjusted to 6 with 20 mL NaOH 5M (optimum pH value for isolated autochthonous bacteria studied) however the pH of the SMOM may be adapted to the context of each study. The volume was adjusted to 3 L with distilled water. The SMOM was aliquoted under agitation (magnetic stirrer) and stored at -20°C prior to utilization.

The presence of the different molecules composing the SMOM stored at -20°C was checked with the derivatisation method (methoximation and tert-butyldimethylsilylation, Paik and Kim, 2004; Becker et al., 2013) for direct analysis by gas chromatography-mass spectrometry (Thermo® TRACE-GCQ Polaris). All molecules were still present and no new product resulting from transformation of the SMOM was detected.

III.4. Conclusion

A defined and complex mixture of organic substances was designed to share some main properties of natural soil organic matter, i.e. C/N ratio, average amino acids and sugars concentration, carboxylic and phenolic functions. Such a standardized synthetic organic mixture should be useful in studies of the effect of organic amendments on soil bacterial communities' structure and activities. We suggest its use for laboratory experiments relating to environmental applications such as reclamation of degraded and/or polluted sites, or evaluation of the impact of agricultural practices on greenhouse gas production.

This standardized synthetic organic mixture is a draft that may be adjusted as needed depending on environmental conditions, or supplemented with more complex molecules depending on the objective of the study. For example, the C/N ratio can be modified to promote either bacterial or fungal populations, or the pH should be adapted according to applications.

Acknowledgements

This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), BRGM (convention TEZ 11-16), and the Labex Voltaire (ANR-10-LABX-100-01).

Supplementary Material SM1: Composition of the organic compounds SMOM (for 3L or 100 g dry weight of mixture)

	Formula	M (g mol ⁻¹)	for 3L concentrated SMOM (mmol)	for 3L concentrated SMOM (g)	dry SMO M (% weigh t)
L-arginine	H ₂ NC(=NH)NH(CH ₂) ₃ CH(NH ₂) CO ₂ H	174.2	7.94	1.384	3.158
L-aspartic acid monopotassium salt	HO ₂ CCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	133.1	8.13	1.082	2.469
L-glutamic acid monosodium salt monohydrate	H ₂ NCOCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	146.14	9.01	1.317	3.006
glycine	NH ₂ CH ₂ COOH	75.07	6.81	0.512	1.167
L-histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.15	0.94	0.146	0.332
L-isoleucine	C ₂ H ₅ CH(CH ₃)CH(NH ₂)CO ₂ H	131.17	2.50	0.328	0.749
L-leucine	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	131.17	3.04	0.398	0.909
methionine	CH ₃ SCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	149.21	0.77	0.115	0.262
L-phenylalanine	C ₆ H ₅ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	165.19	1.50	0.248	0.566
L-serine	HOCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	105.09	5.36	0.563	1.286
L-threonine	CH ₃ CH(OH)CH(NH ₂)CO ₂ H	119.12	1.47	0.175	0.400
L-tyrosine	4-(HO)C ₆ H ₄ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	181.19	0.96	0.174	0.396
L-valine	(CH ₃) ₂ CHCH(NH ₂)CO ₂ H	117.15	5.50	0.644	1.470
succinic acid disodium salt hexahydrate	HOOCCH ₂ CH ₂ COOH	118.09	70.95	8.378	19.12
acetic acid	CH ₃ CO ₂ H	60.05	40.57	2.436	0
propionic acid	CH ₃ CH ₂ COOH	74.08	16.40	1.215	5.560
sodium tartrate dihydrate	C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆ · 2H ₂ O	230.08	15.86	3.650	2.773
valeric acid	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	102.13	14.91	1.522	8.329
calcium formate	(HCOO) ₂ Ca	130.11	12.45	1.620	3.474
					3.696

citric acid monohydrate dibasic	$\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	210.14	11.35	2.384	5.441
butyric acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	88.11	10.26	0.904	2.064
oxalic acid	$\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$	90.03	3.91	0.352	0.804
palmitic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	256.42	11.51	2.952	6.737
gallic acid	$(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$	188.13	9.03	1.698	3.875
vanillic acid	$\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CO}_2\text{H}$	168.15	8.30	1.396	3.186
4-hydroxybenzoic acid	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$	138.12	5.42	0.748	1.707
(+)-catechin hydrate	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	290.27	4.33	1.257	2.870
protocatechuic acid ethyl	$(\text{HO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	182.17	2.89	0.526	1.201
trans-ferulic acid	$\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$	194.18	2.17	0.421	0.960
p-coumaric acid	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$	164.16	0.36	0.059	0.135
rutin	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	610.52	3.61	2.204	5.030
D-glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180.16	5.66	1.019	2.327
D(+)-galactose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180.16	2.62	0.472	1.077
D(+)-mannose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$	181.16	2.76	0.501	1.142
D(+)-fucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	164.16	0.50	0.082	0.186
L-rhamnose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	182.17	1.81	0.330	0.753
D(-)-arabinose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150.13	1.52	0.229	0.522
D(-)-ribose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	150.13	0.25	0.037	0.084
D(+)-xylose	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_6$	151.13	2.25	0.340	0.775

Introduction au Chapitre IV.

Influence de matières organiques sur l'oxydation de l'As^{III} par la microflore de sols pollués

Ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article publié dans le journal *Environmental Geochemistry and Health*. Il décrit une étude de l'influence de la matière organique sur la spéciation de l'As et sur la mobilité du métalloïde toxique influencée par l'activité de microflore globales de sols pollués, ainsi que l'influence des caractéristiques des sols sur la constante de vitesse d'oxydation microbienne de l'As^{III}.

Les activités globales As^{III} oxydantes des microorganismes des sols de surface de sites pollués ont été quantifiées avec et sans ajout de substrats organiques complexes. Les substances organiques apportées étaient soit de l'extrait de levure, couramment utilisé dans les milieux de culture biologiques, soit une mixture complexe synthétique de matières organiques définies (SMOM) présentant des propriétés communes avec la matière organique naturelle des sols. Des corrélations ont été établies entre les caractéristiques des sols et les constantes de vitesse d'oxydation de l'As^{III} et leur évolution en fonction des apports en substrats organiques. En absence de substrat ajouté, la constante de vitesse d'oxydation globale de l'As^{III} était corrélée positivement avec la concentration en matière organique intrinsèque du sol, suggérant que l'activité As^{III} oxydante était limitée par la disponibilité des substrats organiques dans les sols pauvres en nutriments. Cette limitation a été cependant levée par 0,08 g.L⁻¹ de carbone organique ajouté. Dans la plupart des conditions, la constante de vitesse d'oxydation de l'As^{III} décroissait au fur et à mesure qu'augmentaient les apports en carbone organique de 0,08 à 0,4 g.L⁻¹. Les incubations de sols pollués en condition aérobie, amendées ou non avec la SMOM, ont résulté en une mobilisation de l'As à court terme en présence de SMOM et de la microflore active. Par contraste, l'oxydation de l'As^{III} microbienne semblait stabiliser l'arsenic lorsqu'aucun substrat organique n'était ajouté. Les résultats suggèrent que la spéciation microbienne de l'arsenic dirigée par la matière organique exerce une influence majeure sur le devenir de cet élément toxique dans les sols de surface.

Des données complémentaires à l'article sont présentées en Annexe 4, p. 134.

Chapitre IV. Influence of organic matters on AsIII oxidation by the microflora of polluted soils

Lescure T.^{1,3,4}, Moreau J.¹, Charles C.¹, Ben Ali Saanda T.¹, Thouin H.¹, Pillas N.¹, Bauda P.³, Lamy I.⁵, Battaglia-Brunet F.^{1,2*}

¹BRGM, 3 avenue Claude Guillemin, 45060 Orléans, France

²BRGM, ISTO, UMR 7327, BP 36009, 45060 Orléans, France

³LIEC UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

⁴Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 20 avenue du Grésillé, BP 90406, 49004, Angers Cedex 01, France

⁵INRA Centre de Versailles-Grignon, RD 10, 78026 Versailles Cedex, France

*Author for correspondence (tel.: +33 238 643 930; fax: +33 238 643 680; e-mail: f.battaglia@brgm.fr)

ABSTRACT

The global AsIII oxidizing activity of microorganisms in eight surface soils from polluted sites was quantified with and without addition of organic substrates. The organic substances provided differed by their nature: either yeast extract, commonly used in microbiological culture media, or a synthetic mixture of defined organic matters (SMOM) presenting some common features with natural soil organic matter. Correlations were sought between soil characteristics and both the AsIII oxidizing rate constants and their evolution in accordance with inputs of organic substrates.

In the absence of added substrate, the global AsIII oxidation rate constant correlated positively with concentration of intrinsic organic matter in the soil, suggesting that AsIII oxidizing activity was limited by organic substrate availability in nutrient-poor soils. This limitation was, however, removed by 0.08 g L⁻¹ of added organic carbon. In most conditions, the AsIII oxidation rate constant decreased as organic carbon input increased from 0.08 to 0.4 g L⁻¹. Incubations of polluted soils in aerobic conditions, amended or not with SMOM, resulted in short term As mobilization in the presence of SMOM and active microorganisms. In contrast, microbial AsIII oxidation seemed to stabilize As when no organic substrate was added. Results suggest that microbial speciation of arsenic driven by nature and concentration of organic matter exerts a major influence on the fate of this toxic element in surface soils.

Keywords: arsenic, polluted soils, organic matter, microorganisms, AsIII oxidation

IV.1. Introduction

High soil concentrations of the toxic element arsenic (As) may be linked to pollution originating from mining and industrial activities, long-term application of As-containing pesticides ([Smith et al. 1998](#)) or to the geochemical background. On polluted mining sites, characterized by high concentrations of metal(oid)s and poor fertility, organic amendments are often considered as a means of facilitating phyto-stabilization ([Galende et al. 2014](#)). In addition, agricultural soils affected by diffuse As pollution from pesticides can be fertilized with organic matter ([Chantigny et al. 2000](#); [Chantigny et al. 2002](#); [Franchini et al. 2001](#)). Many studies have described the geochemical interactions between arsenic and organic matter: change of As speciation ([Redman et al. 2002](#)), formation of soluble complexes ([Redman et al. 2002](#); [Saada et al. 2003](#)), competition for sorption sites ([Bauer & Blodau, 2006](#)). Conversely, organic matter is also a trophic resource for microorganisms but its influence on microbial activities linked to As is poorly documented, even though the soil microflora plays a major role in geochemical cycles and particularly in As speciation. Bacteria isolated from soils have been shown to oxidize AsIII and/or reduce AsV ([Bachate et al. 2012](#); [Inskeep et al. 2007](#); [Macur et al. 2004](#)), or to methylate this toxic metalloid ([Huang et al. 2012](#)). Filamentous fungi isolated from contaminated soils are able to reduce AsV and methylate As ([Su et al. 2011](#)). Microbial transformations of arsenic in soil have important implications because mobility, toxicity and bioavailability of the element are closely related to its speciation ([Smedley & Kinniburgh, 2002](#)). The global AsIII-oxidizing activity of the microflora should tend to reduce the risk of transfer of the toxic element from soil to surface water or groundwater.

Important bacterial mechanisms involved in AsIII/AsV transformations are the *ars* system, whose primary function is detoxification with AsV being reduced by an arsenate reductase ArsC, the *ao* oxidation system through arsenite oxidase, and the *arr* system of AsV dissimilatory reduction in anaerobic conditions ([Inskeep et al. 2007](#)). [Huang et al \(2012\)](#) examined the effect of vegetal organic amendments on arsenic speciation and volatilization in flooded paddy fields. They observed that concentration and type of organic matter had a significant effect on AsIII oxidizing activities and AsV reduction via bacterial *arsC* genes expression. The organic matter amendments stimulated the methylation and volatilization of As. [Yamamura et al \(2009\)](#) showed that uncontaminated surface soil microflora exhibit both AsIII oxidizing and AsV reducing activities. However, the influence of organic matter on the behavior of As-transforming bacteria in unsaturated soils was not described. As several studies have suggested that organic substances could lower the efficiency of bacterial arsenic oxidation in the presence of oxygen ([Bachate et al. 2012](#); [Challan-Belval et al. 2009](#)), there is a need to acquire information about the influence of the nature and concentration of organic matter on As oxidizing activities in polluted soils.

In this context, the present study aimed to determine the influence of organic matters on the AsIII oxidizing activity of complete microflora of polluted soils in aerobic conditions. Activity measurements made in specific liquid media to evidence the global level of target microbial metabolisms are usual: this type of measurement has been proposed to quantify PAH biodegradation rate in soils ([Kästner & Mahro, 1996](#)), thiosulfate-oxidizing activity in paddy fields ([Stubner et al., 1998](#)), denitrification ([Buys et al., 2000](#)), anaerobic oxidation of ammonium ([Dapena-Mora et al., 2007](#)), and FeII oxidizing activity ([Senko et al., 2008](#)). In this study, AsIII oxidizing activities were monitored in a previously optimized mineral liquid culture medium ([Battaglia-Brunet et al., 2002](#)) to which two organic substrates differing in their composition, i.e. yeast extract or a synthetic mixture of defined molecules (SMOM) were added at two different concentrations. The composition of the yeast extract is not defined exactly but is close to that of living cells; it is also a source of vitamins that might stimulate the growth of some microorganisms. SMOM is a well-defined complex mixture of molecules displaying some of the main characteristics of natural soil organic matter such as C/N ratio and supply of phenolic and carboxylic groups that may interact with inorganic soil components. Thus, a substrate usually used in microbiology (yeast extract) and an organic amendment designed to present common features with natural organic matter (SMOM) were compared in terms of influence on AsIII biooxidation in conditions of equivalent organic carbon concentrations. The AsIII oxidizing rate constants were correlated with the presence of organic substrates and characteristics of eight polluted soils (physico-chemical, structural and biological features). A study was then made of the combined influence of microbial activities and amendment with complex organic substrates on the speciation and mobilization of intrinsic arsenic in the four most polluted soils.

IV.2. Material and methods

IV.2.1. Soil sampling and characterization

Eight different soils were sampled on three highly polluted sites that could be candidates for the application of aided phyto-stabilization. All materials were surface, non-saturated soils (0–15 cm). Four different soils were sampled in and around the Cheni disused gold mine site (Limousin; 45°32'59.90"N, 1°09'39.04"E): in a cultivated field, a meadow, a forest and on the site near the arsenic-containing waste dump. Two brownfield soil samples were taken from the Auzon disused industrial site (Haute-Loire; 45°23'13.67"N, 3°21'24.32"E) and two brownfield soil samples were collected on the Salsigne disused gold mine site (Aude; 43°31'89.25"N, 2°38'11.07"E and 43°31'52.75"N, 2°38'73.83"E). The soils were sampled in sterile glass jars, sieved at 2 mm in sterile sieves then stored at 5°C in sterile glass jars. Their water content was determined by drying at 50°C for 24h. Mineral carbon and carbonates were determined by volumetric method per NF ISO 10693. Total carbon was analyzed per NF ISO 10694. After drying and hand grinding in a mortar, total

concentrations of As, Pb, Cd, Zn and Fe were determined in the soils using a portable NITON© X-ray fluorescence field analyzer (XLT999KWY, bulk mode, counting time 60s). Values for the elements Ag, U, Se, Hg, Cu, Ni, Cr and V were below the detection limit. Total As was also analyzed in all soils by Atomic Absorption Spectrophotometry after total digestion, per NF EN 13346. AsIII and AsV were analyzed by HPLC-ICP-MS after extraction with 10 mL of H₃PO₄ 1M added to 0.4 g of sample and microwave heating ([Vergara Gallardo et al, 2001](#)) in a closed system at 120°C for 20 min. The remaining solution was diluted to 50 mL with ultrapure water and then analyzed with HPLC-ICP-MS, using quantification by standard additions to avoid matrix effects. Arsenic species separation was performed using an anion exchange column (Hamilton PRPX-100) and a mobile phase of ammonium hydrogen phosphate 15 mM at pH 8.5 ([Thomas et al, 1997](#)). The percentage of AsIII (%AsIII) was calculated as $[\text{AsIII}] \times 100 / [\text{total As}]$. Total nitrogen was analyzed by the Kjeldhal method per NF EN 25663. Granulometry was determined per NF X 31.107, total phosphorus per NF X 31.161, K₂ per NF X 31.108 and pH per NF ISO 10390. The biodegradability of intrinsic organic matter was studied via CO₂ emission (soil respiration), per [Rey et al \(2005\)](#).

Living bacteria were enumerated by microscopy using the Live/Dead® kit (BacLight™ Viability L-13152 Molecular Probes, Invitrogen) per [Pascaud et al \(2009\)](#). The soils (stored at 5°C) were incubated at ambient temperature for 72 h and then suspended at 1% in sodium pyrophosphate and agitated reciprocally for 15 min, sonicated 2 x 20 s at 45 kHz. The suspension was settled for 1 min, 1 mL of the supernatant was then sampled for filtration, application of coloration and observation with a Zeiss Axio Imager Z1 microscope equipped with UV HBO lamp. Living bacteria, exhibiting green fluorescence with the FITC filter, were enumerated on 10 independent fields (each of 5,800 μm²). Average cell concentrations were calculated from volume of sample used and known filter area.

The characteristics determined for the eight soils samples are detailed in Table 2.

Table 2. Characteristics of the polluted soils.

		Cheni meadow	Cheni forest	Cheni site	Cheni field	Auzon 1	Auzon 2	Salsigne ZE1	Salsigne ZE2
mg kg ⁻¹	[As]*	182	617	785	80	3680	358	89	119
mg kg ⁻¹	[AsIII]**	0.6	4.32	23	0	180	0	0	0
%	AsIII***	0.39	1.22	3.76	0.00	5.75	0.00	0.00	0.00
mg kg ⁻¹	[Cd]	0	0	0	47.99	86.65	0	0	0
mg kg ⁻¹	[Pb]	36	48	67	31	2041	139	36	39
mg kg ⁻¹	[Zn]	110	145	104	76	240	159	83	33
g kg ⁻¹	[Fe]	18	30	24	26	32	29	18	39
%	[K]	1.7	1.1	1.5	1.7	1.9	1.7	0.7	0.9
%	[CaCO ₃]	0.1	0.1	2.9	0.1	0.1	0.1	14.2	2.9
%	humidity	14	37	34	17	10	16	10	8
	pH	5.33	4.8	4.91	6.02	5.65	5.7	8.84	9.02
%	clay	11.3	17.1	11.8	12.3	5	9.3	33.3	29.9
%	coarse sand	48.4	26.3	35	29.6	62.4	29.2	25.8	24
%	coarse silt	11.1	2.4	12.2	15.8	9.2	18.6	8.9	18.6
%	organic C	1.69	5.76	1.16	1.16	2.03	2.79	0.76	0.35
g kg ⁻¹	[N]	1.7	6.6	0.6	1.2	1.9	2.6	0.6	0.4
mg kg ⁻¹	[P]	1079	1722	798	1532	1471	1573	288	139
mM h ⁻¹ mol ⁻¹ g ⁻¹ x10 ⁻⁸	respiration	3.38	8.45	8.27	1.20	2.05	5.01	1.62	2.54
Bact g ⁻¹ x 10 ⁸	living bacteria	6.31	11.6	4.32	7.28	4.98	10.1	6.17	3.24

(*) Total As analyzed by NITON; (**) AsIII analyzed by HPLC_ICP-MS; (***)AsIII/(AsIII + AsV) analyzed by HPLC_ICP-MS

IV.2.2. AsIII oxidizing activity tests

The basal culture medium was the CAsO1 medium (pH 6) described in [Battaglia-Brunet et al \(2002\)](#). This was supplemented with 1 mM AsIII. The soils (stored at 5°C) were incubated at 25°C for 72 h before starting the tests which were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks filled with 100 mL medium and plugged with cotton. Each flask was inoculated with a mass of soil equivalent to 0.2 g dry weight. Flasks were incubated at 25°C under reciprocal agitation (150 rpm). The flasks were sampled (3 mL) twice a day; samples were filtered at 45 µm and frozen at -20°C until AsIII/AsV separation was performed. The AsIII oxidation activities were analyzed in (i) simple basal medium, (ii) basal medium amended with 0.2 g L⁻¹ or 1 g L⁻¹ of yeast extract (Sigma), and (iii) basal medium amended with two concentrations (0.4 g L⁻¹ or 2.1 g L⁻¹ corresponding to equivalent carbon concentrations as 0.2 and 1 g L⁻¹ of yeast extract, i.e. 0.08 and 0.4 g L⁻¹ of carbon) of a Synthetic Mixture of Organic Matter (SMOM, Chapitre III). The SMOM was designed to mimic the average composition of soil organic matter in terms of C/N ratio, functional groups, amino-acids and sugars, on the basis of data available from the International Humic Substances Society's website (IHSS – <http://www.humicsubstances.org>). It contained the following molecules: L-arginine (3.2% dry weight), L-aspartic acid monopotassium salt (2.5%), L-glutamic acid monosodium salt monohydrate (3.0%), glycine (1.2%), L-histidine (0.3%), L-isoleucine (0.7%), L-leucine (0.9%), methionine (0.3%), L-phenylalanine (0.6%), L-serine (1.3%), L-threonine (0.4%), L-tyrosine (0.4%), L-valine (1.5%), succinic acid disodium salt hexahydrate (19.1%), acetic acid (5.6%), propionic acid (2.8%), sodium tartrate dehydrate (8.3%), valeric acid (3.5%), calcium formate (3.7%), citric acid monohydrate dibasic (5.4%), butyric acid (2.1%), oxalic acid (0.8%), palmitic acid (6.7%), gallic acid (3.9%), vanillic acid (3.2%), 4-hydroxybenzoic acid (1.7%), (+)-catechin hydrate (2.9%), protocatechuic acid ethyl (1.2%), trans-ferulic acid (1.0%), p-coumaric acid (0.1%), rutin (5.0%), D-glucose (2.3%), D(+)-galactose (1.1%), D(+)-mannose (1.1%), D(+)-fucose (0.2%), L-rhamnose (0.8%), D(-)-arabinose (0.5%), D(-)-ribose (0.1%), D(+)-xylose (0.8%). The pH of the mixture was adjusted to that of the liquid medium (pH 6). The SMOM concentrations provided the same organic carbon concentration as the 0.2 and 1 g L⁻¹ of yeast extract, with 1 g L⁻¹ yeast extract corresponding to 0.4 g L⁻¹ of organic carbon ([Holwerda et al, 2012](#)). The conditions were therefore 0.08 and 0.4 g L⁻¹ of added organic carbon for both yeast extract and SMOM.

Incubations were performed in triplicate. The following controls were performed: as all experiments could not be carried simultaneously, the absence of effect of soil storage at 5°C was verified by repeating the test at the beginning and at the end of the study with one of the polluted soils. Abiotic AsIII oxidation controls were performed in the absence of soil inoculation and with sterile soils. For these latter controls, soils were sterilized by autoclaving four times at 120°C, 1h, at 24 h intervals.

AsV was quantified by flame atomic absorption spectrophotometry, after AsV/AsIII separation with the PDC/MIBK method (Battaglia-Brunet, 2002).

First order AsIII oxidizing rate constants were determined by linear least squares regression fitting of the $\ln[\text{AsV}]$ versus time line, using the following equation:

$$\ln[\text{AsV}] = kt + \text{Constant} \quad (1)$$

IV.2.3. Principal Component Analysis

Statistical analyses were carried out using the XLSTAT 2014 software (Addinsoft, version 16.2.01.6189). Pearson correlations were calculated with all soils parameters, and eight independent soil parameters – selected as those correlating most strongly with AsIII oxidizing rate constants and their ratios (Electronic Supplementary material ESM1) – were subjected to a principal component analysis (PCA). Rate constants and their ratios were integrated as supplementary data.

IV.2.4. Soil incubations without addition of AsIII

The four most polluted soils in terms of As concentration were selected for incubation: Auzon 1, Auzon 2, Cheni site and Cheni forest. Experiments were performed in 60 mL flasks with cotton stoppers (aerobic conditions). Slurries were prepared by mixing a mass of soil corresponding to 2.5 g (dry weight) and 25 mL of spring water (Montcalm, Ca 3 mg L⁻¹, Mg 0.7 mg L⁻¹, Na 2.2 mg L⁻¹, K 0.6 mg L⁻¹, SO₄ 10 mg L⁻¹, HCO₃ 5.2 mg L⁻¹, NO₃ 0.7 mg L⁻¹, Cl 0.6 mg L⁻¹, pH 6.8). Control blanks were prepared with soils sterilized as described in part 2.2. Spring water was autoclaved (120°C, 20 min). Incubations were performed with and without addition of SMOM at 0.4 g L⁻¹ of organic carbon. For each condition (blank and experiment, with and without SMOM), six flasks were prepared. One triplicate (T0) was sacrificed after 15 min of incubation and the remaining flasks were incubated for 7 days at 25°C, under reciprocal agitation (150 rpm). When the incubations were sacrificed, 10 mL of slurry were filtered at 0.45 µm; 2.5 mL of this filtrate were used immediately for AsIII/AsV separation on resin (Ficklin, 1983), the remainder was acidified with 50 µL HCl 37% for flame AAS analysis of total Fe. Separated AsIII and AsV were quantified by graphite furnace AAS (detection limit 20 µg L⁻¹). Samples of biotic soil slurries were taken after 15 min and 7 days of incubation and stored at -20°C. For biomolecular analyses, genomic DNA was extracted from the -20°C stored soil slurries using the FastDNA® Spin Kit for Soil (Bio101). The community structure and its evolution were monitored by two methods, (1) Capillary electrophoresis–terminal restriction fragment length polymorphism (CE–T-RFLP) diversity analysis of the 16S rRNA gene, as described by Mercier et al (2013) and (2) Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP, Delbès et al, 2000). CE-SSCP analyses were performed with an ABI Prism 310 genetic analyzer using a 47 cm long capillary, a non-

denaturing 5.6% CAP polymer (Applied Biosystems). CE-SSCP electrophoregrams were analyzed using the StatFingerprints Version 2 software ([Michelland et al, 2009](#)). For total bacteria enumeration, bacteria were separated from soil particles and from eukaryotes using the methods validated by [Lindahl and Bakken \(1995\)](#), [Lindahl \(1996\)](#) and [Bertrand et al \(2005\)](#), including a separation of bacteria from soil particles using the Nycodenz gradient method. The final pellet was suspended in 1 mL of NaCl 0.8%, mixed with 1 mL of absolute ethanol and stored at -20°C. Details about the methods are given in the Electronic Supplementary Material ESM4. Bacteria were enumerated after fluorescent staining, as described in [Kumar et al \(2013\)](#).

IV.3. Results and discussion

IV.3.1. AsIII-oxidizing activity in relation to soil characteristics

Experiments were performed in order to evaluate the influence of some soil characteristics on the AsIII oxidizing activity of microbes, with and without added organic matter. Controls showed no abiotic oxidation in sterile media nor with autoclaved soils (data not shown). Storage at 5°C did not significantly influence the AsIII oxidation rate (Electronic Supplementary material ESM2). The kinetics of AsIII oxidation differed between soils. Contrasting kinetics according to nature and concentration of added substrates obtained with three soils are shown in Figure 17.

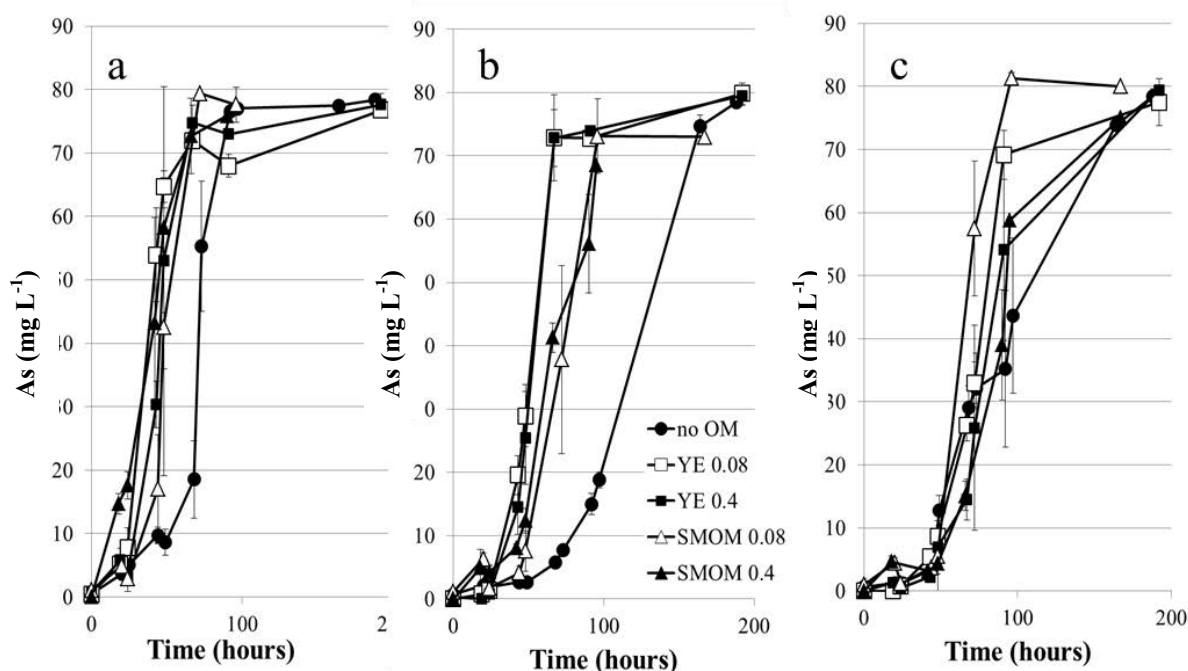


Figure . Evolution of AsV concentration in the AsIII oxidizing tests performed with (a) Cheni forest soil, (b) Cheni site soil, (c) Cheni meadow soil as inocula, in CASO1 medium amended with 1 mM AsIII. Graphs for the other soils are given in ESM3. Error bars represent the standard deviation of the mean of three replicates

With the Cheni forest soil, high AsIII oxidation rate was obtained without added organic matter (Figure 17a). With the Cheni site soil (Figure 17b), results were clearly grouped according to the type of organic matter added and the kinetic was slower without added organic matter. With Cheni meadow soil (Figure 17c), the higher AsIII oxidizing rates were obtained at 0.08 g L⁻¹ of added organic matter, the highest being observed with SMOM. The other kinetics are shown in Electronic Supplementary Material ESM3. The time preceding AsIII oxidation varied between 0 and 50 hours, and AsIII was entirely oxidized within 200 hours of incubation.

Many bacteria isolated from soils have been shown to oxidize AsIII ([Macur et al, 2004](#); [Inskeep et al, 2007](#); [Bachate et al, 2012](#)) and AsIII oxidation by complete soil microflora was evidenced by Yamamura et al. (2009). The bacterial AsIII oxidation is linked to the expression of *aio* genes that were evidenced in soil bacteria ([Huang et al, 2012](#); [Poirel et al, 2013](#)).

When no organic substance was added to the medium (C₀) and according to the PCA with rate constants as supplementary variables (Figure 18), the AsIII oxidation rate constant correlated positively with organic carbon and humidity.

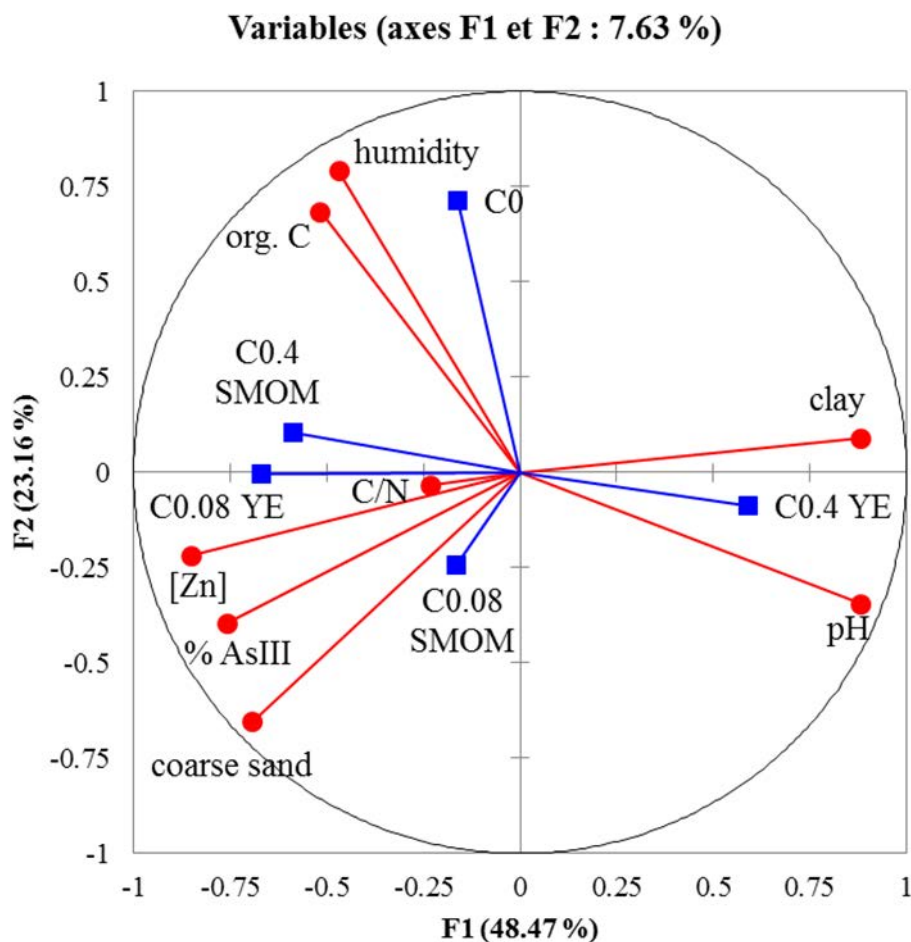


Figure . Principal Component Analysis of the soil characteristics (circles) with AsIII oxidation rate constants integrated as supplementary data (squares)

The highest significant Pearson correlation coefficients were obtained between C_0 and the intrinsic soil organic matter parameters (C, N and respiration) (Table 3).

When the culture medium was enriched with organic substrates, the rate constants no longer correlated with intrinsic soil organic matter parameters (Figure 18 and Table 3), with the exception of a positive significant correlation between $C_{0,4}$ SMOM and the C/N ratio (Table 3).

Table 3. Pearson correlation coefficients between soil characteristics and the AsIII oxidation rate constants and their ratios. Values in bold are significant for a level of significance alpha = 0.05, and the three highest coefficients, for each variable are underlined. IBCF: Indicator of biodegradable carbon fraction (ratio respiration/organic carbon concentration).

Variables	C ₀	C _{0.08} YE	C _{0.4} YE	C _{0.08} SMOM	C _{0.4} SMOM	C ₀ /C _{0.08} YE	C _{0.08} /C _{0.4} YE	C ₀ /C _{0.08} SMOM	C _{0.08} /C _{0.4} SMOM
[As]*	-0.02	0.44	-0.25	0.35	0.34	-0.10	0.35	-0.08	-0.14
[AsIII]**	-0.11	0.37	-0.18	0.32	0.27	-0.18	0.28	-0.17	-0.10
% AsIII***	-0.02	<u>0.62</u>	-0.28	<u>0.54</u>	<u>0.67</u>	-0.12	0.47	-0.10	-0.28
[Cd]	-0.24	0.11	0.18	-0.19	-0.04	-0.27	-0.07	-0.19	-0.23
[Pb]	-0.12	0.33	-0.17	0.26	0.17	-0.18	0.25	-0.17	-0.05
[Zn]	0.13	0.55	<u>-0.52</u>	0.19	0.36	0.03	0.61	0.09	-0.39
[Fe]	0.24	0.17	0.31	0.14	-0.30	0.20	-0.20	0.19	<u>0.60</u>
clay	0.15	<u>-0.62</u>	0.42	0.10	-0.32	0.26	<u>-0.68</u>	0.10	0.56
[CaCO ₃]	-0.13	-0.35	0.28	0.27	0.08	-0.06	-0.46	-0.19	0.13
coarse sand	-0.28	0.29	-0.51	0.19	0.25	-0.33	<u>0.57</u>	-0.31	-0.22
coarse silt	0.66	-0.02	0.10	-0.29	-0.30	0.65	-0.11	0.70	0.17
humidity	0.61	0.40	-0.29	0.09	<u>0.63</u>	0.53	0.38	0.61	-0.58
pH	-0.23	-0.56	<u>0.57</u>	0.09	-0.50	-0.13	<u>-0.74</u>	-0.27	<u>0.72</u>
[P]	0.30	0.32	-0.30	<u>-0.45</u>	0.07	0.22	0.41	0.39	<u>-0.64</u>
[N]	<u>0.88</u>	0.05	-0.45	-0.21	0.04	<u>0.84</u>	0.32	<u>0.90</u>	-0.31
organic C	<u>0.84</u>	0.17	-0.49	-0.14	0.14	<u>0.78</u>	0.40	<u>0.85</u>	-0.37
respiration	<u>0.77</u>	0.07	<u>-0.56</u>	-0.19	0.02	<u>0.74</u>	0.41	<u>0.79</u>	-0.31
C/N	-0.31	<u>0.61</u>	-0.05	<u>0.61</u>	<u>0.87</u>	-0.38	0.29	-0.39	-0.37
IBCF	0.04	-0.33	-0.42	-0.21	-0.19	0.09	0.17	0.06	-0.17
living bacteria	0.59	0.03	-0.27	-0.44	-0.09	0.56	0.19	0.66	-0.44

(*) Total As analyzed by NITON; (**) AsIII analyzed by HPLC_ICP-MS; (***)AsIII/(AsIII + AsV) analyzed by HPLC_ICP-MS

Evolution of the AsIII oxidation rate constants when organic matter was introduced in the medium was examined through calculation of the ratio of rate constants, $C_0/C_{0.08}$ and $C_{0.08}/C_{0.4}$. The evolution of these ratios according to soil respiration enlightens the influence of nature and concentration of organic matter on AsIII oxidation rate constants (Figure 19).

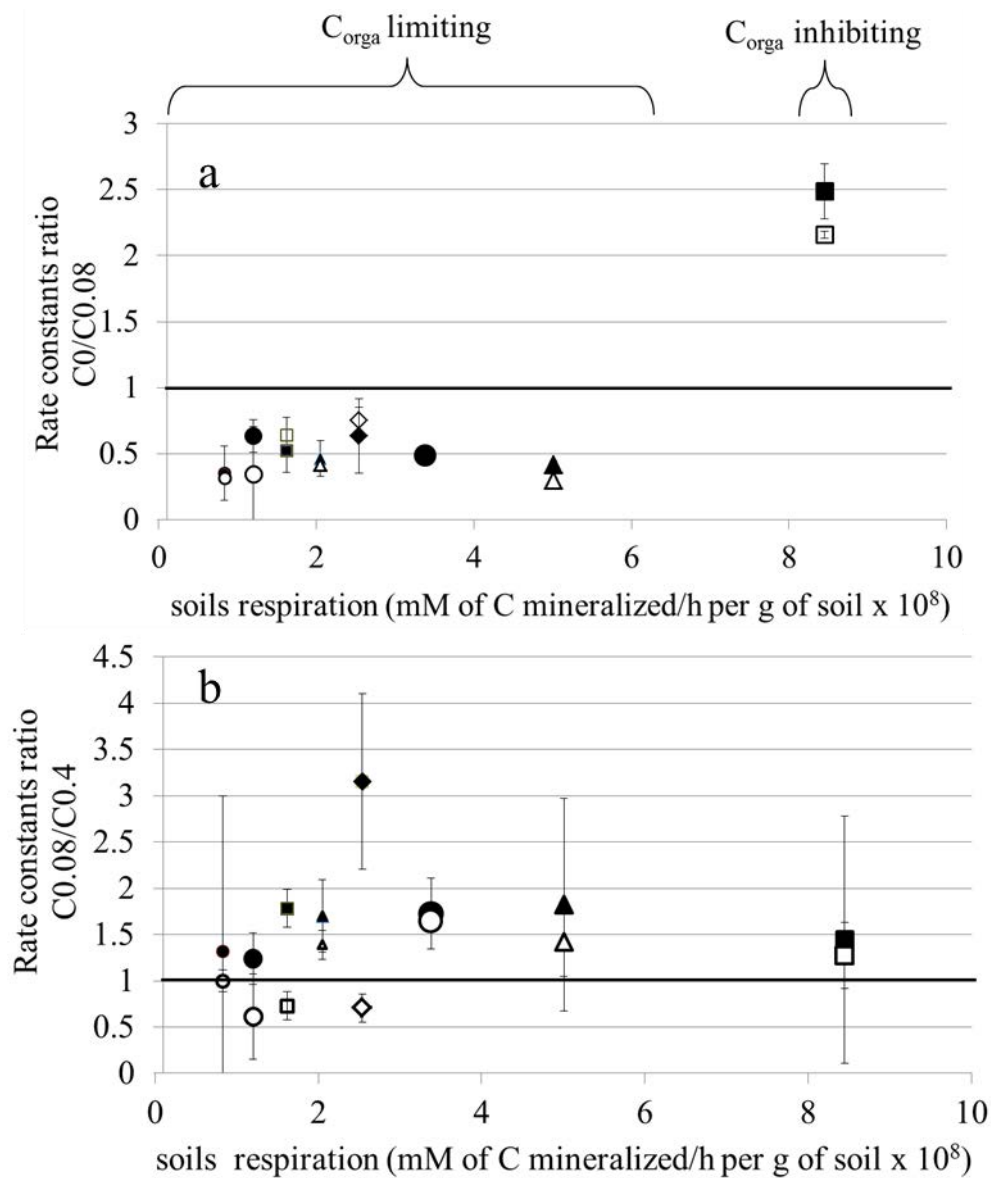


Figure . Evolution of AsIII oxidation rate constant ratio with soil respiration rate. a: ratio $C_0/C_{0.08}$; b: ratio $C_{0.08}/C_{0.4}$. Open symbols: yeast extract. Closed symbols: SMOM. Diamonds: Salsigne ZE2. Small squares: Salsigne ZE1. Small circles: Cheni site. Average size circles: Cheni field. Big circles: Cheni meadow. Small triangles: Auzon 1. Big triangles: Auzon 2. Big squares: Cheni forest. Error bars represent the standard deviation of the ratios calculated with the Taylor expansion method, based on three replicates

Soil respiration is linked to the intrinsic biodegradable organic matter. The $C_0/C_{0.08}$ ratio is very similar for yeast extract and SMOM (Figure 19a), and lower than 1 for all soils with the exception of the Cheni forest soil which presents the highest respiration level. Thus, the addition of organic substances

at 0.08 g L⁻¹ of organic carbon exerted a positive effect on AsIII oxidation rate constants, except when the soil contained enough biodegradable organic matter. These results suggest that the AsIII oxidation rate was limited by the availability of organic matter in natural conditions when no organic substrate was added to the liquid medium, and this limitation was removed by supplying 0.08 g L⁻¹ of available organic carbon, provided by either yeast extract or SMOM. Conversely, the C_{0.08}/C_{0.4} ratio was higher than 1 in all conditions except when yeast extract was added to media inoculated by the four soils with the lowest respiration levels (Figure 19b). In all other conditions, increasing the organic substrate concentration from 0.08 to 0.4 g L⁻¹ of organic carbon induced a decrease of the AsIII oxidation rate constant. But the influence of yeast extract on the AsIII oxidizing rate differed from that of SMOM. SMOM exerted a negative effect on AsIII oxidizing rate, more pronounced than that of yeast extract, in particular with the soils with lower respiration levels.

The PCA with ratios as supplementary variables (Figure 20) showed that the C₀/C_{0.08} ratios obtained with yeast extract and SMOM are located very close to one another on the graph.

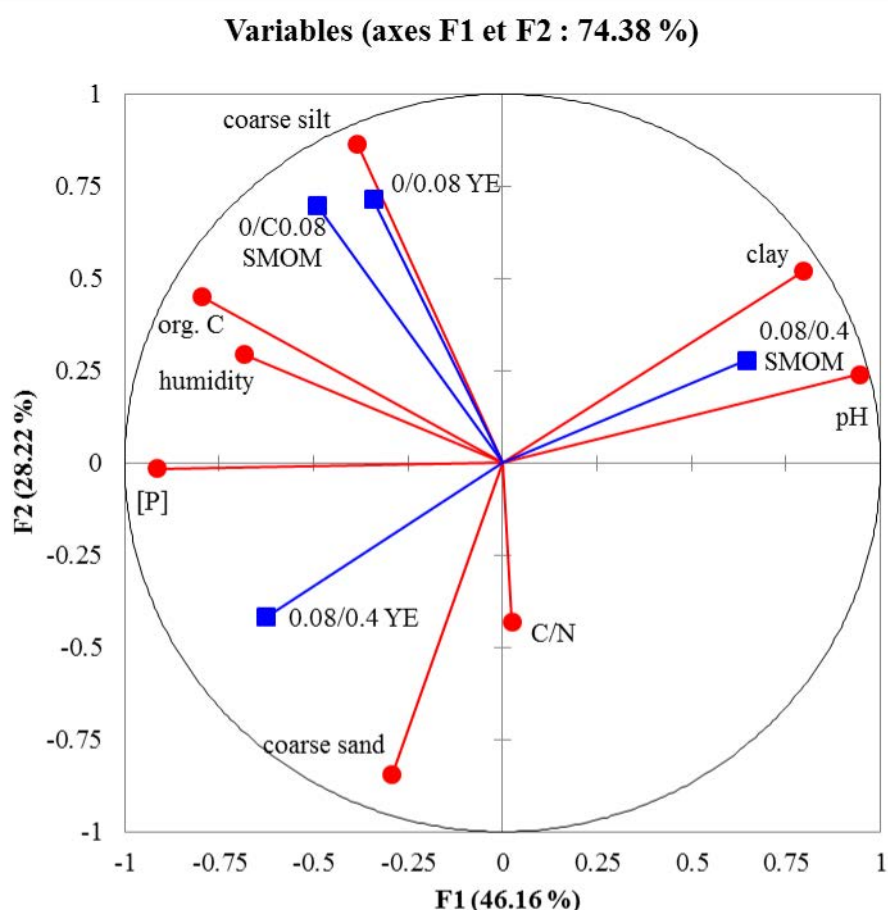


Figure . Principal Component Analysis of the soil characteristics (circles) with the ratios of AsIII oxidation rate constants integrated as supplementary data (squares)

The positive correlation between $C_0/C_{0.08}$ ratio and intrinsic organic matter concentrations in soils, for both types of added organic substrates, is confirmed by the significant values of the correlation coefficients (Table 3). Conversely, the $C_{0.08}/C_{0.4}$ ratio no longer correlated with intrinsic soil organic matter, and behaved differently for yeast extract and SMOM (Figure 20). This ratio correlated negatively with pH for yeast extract and positively with this parameter for SMOM (Table 3 and Figure 20). However, these correlations, although significant, were weaker than the positive link between $C_0/C_{0.08}$ and the intrinsic organic matter.

Significant correlations between soils parameters are detailed in Table 4.

Table 4. Pearson correlation coefficients between textural, physical, chemical and biogeochemical soil characteristics. Values in bold are significant for a level of significance $\alpha=0.05$. IBCF: Indicator of biodegradable carbon fraction (ratio respiration/ organic carbon concentration)

Variables	[As]	[AsIII]	% AsIII	[Cd]	[Pb]	[Zn]	[Fe]	clay	coarse silt	coarse sand	CaCO ₃	coarse silt	humidity	pH	[P]	[N]	org. C	resp.	C/N	IBCF h ⁻¹	living bacteria
[As]	1	0.991	0.899	0.798	0.979	0.832	0.295	-0.523	-0.365	0.807	-0.260	-0.365	-0.099	-0.291	0.322	0.084	0.128	0.033	0.059	-0.311	-0.195
[AsIII]	0.991	1	0.874	0.839	0.991	0.779	0.276	-0.480	-0.444	0.824	-0.209	-0.444	-0.207	0.207	0.253	0.023	0.015	0.139	0.043	-0.312	-0.283
% AsIII	0.899	0.874	1	0.620	0.808	0.696	0.163	-0.534	-0.402	0.733	-0.226	-0.402	0.199	0.427	0.217	0.007	0.074	0.124	0.434	-0.471	-0.311
[Cd]	0.798	0.839	0.620	1	0.851	0.583	0.239	-0.502	-0.356	0.678	-0.296	-0.356	-0.293	0.175	0.401	0.087	0.082	0.237	0.161	-0.354	-0.195
[Pb]	0.979	0.991	0.808	0.851	1	0.796	0.301	-0.470	-0.415	0.815	-0.217	-0.415	-0.287	0.167	0.280	0.002	0.030	0.103	0.061	-0.245	-0.231
[Zn]	0.832	0.779	0.696	0.583	0.796	1	0.081	-0.703	-0.165	0.711	-0.368	-0.165	0.102	0.575	0.664	0.425	0.495	0.417	0.016	0.085	0.310
[Fe]	0.295	0.276	0.163	0.239	0.301	0.081	1	0.003	0.545	-0.086	-0.421	0.545	-0.112	0.171	0.034	0.143	0.114	0.006	0.373	-0.651	-0.103
clay	-0.523	-0.480	-0.534	-0.502	-0.470	-0.703	0.003	1	0.057	-0.658	0.774	0.057	-0.268	0.864	0.793	0.237	0.313	0.233	0.111	0.165	-0.229
coarse silt	-0.365	-0.444	-0.402	-0.356	-0.415	-0.165	0.545	0.057	1	-0.594	-0.441	1.000	0.441	0.151	0.336	0.656	0.619	0.602	0.439	-0.166	0.604
coarse sand	0.807	0.824	0.733	0.678	0.815	0.711	-0.086	-0.658	-0.594	1	-0.353	-0.594	-0.213	0.415	0.303	0.081	0.039	0.106	0.049	-0.055	-0.278
[CaCO ₃]	-0.260	-0.209	-0.226	-0.296	-0.217	-0.368	-0.421	0.774	-0.441	-0.353	1	-0.441	-0.273	0.695	0.697	0.393	0.407	0.326	0.281	0.379	-0.255
coarse silt	-0.365	-0.444	-0.402	-0.356	-0.415	-0.165	0.545	0.057	1.000	-0.594	-0.441	1	0.441	0.151	0.336	0.656	0.619	0.602	0.439	-0.166	0.604
humidity	-0.099	-0.207	0.199	-0.293	-0.287	0.102	-0.112	-0.268	0.441	-0.213	-0.273	0.441	1	0.681	0.410	0.599	0.640	0.529	0.398	-0.185	0.463
pH	-0.291	-0.207	-0.427	-0.175	-0.167	-0.575	0.171	0.864	-0.151	-0.415	0.695	-0.151	-0.681	1	0.810	0.530	0.599	0.517	0.208	0.064	-0.461
[P]	0.322	0.253	0.217	0.401	0.280	0.664	0.034	-0.793	0.336	0.303	-0.697	0.336	0.410	0.810	1	0.677	0.713	0.652	0.253	0.066	0.720
[N]	0.084	-0.023	0.007	-0.087	-0.002	0.425	0.143	-0.237	0.656	-0.081	-0.393	0.656	0.599	0.530	0.677	1	0.991	0.957	0.392	0.209	0.842
org. C	0.128	0.015	0.074	-0.082	0.030	0.495	0.114	-0.313	0.619	-0.039	-0.407	0.619	0.640	0.599	0.713	0.991	1	0.963	0.298	0.209	0.851
Respiration	-0.033	-0.139	-0.124	-0.237	-0.103	0.417	-0.006	-0.233	0.602	-0.106	-0.326	0.602	0.529	0.517	0.652	0.957	0.963	1	0.368	0.432	0.909
C/N	0.059	0.043	0.434	-0.161	-0.061	-0.016	-0.373	-0.111	-0.439	0.049	0.281	-0.439	0.398	0.208	0.253	0.392	0.298	0.368	1	-0.236	-0.358
IBCF h ⁻¹	-0.311	-0.312	-0.471	-0.354	-0.245	0.085	-0.651	0.165	-0.166	-0.055	0.379	-0.166	-0.185	0.064	0.066	0.209	0.209	0.432	0.236	1	0.483
living bacteria	-0.195	-0.283	-0.311	-0.195	-0.231	0.310	-0.103	-0.229	0.604	-0.278	-0.255	0.604	0.463	0.461	0.720	0.842	0.851	0.909	0.358	0.483	1

Living bacteria concentration correlated significantly with respiration, C, N and P, indicating that living bacteria concentration was positively correlated with the intrinsic organic matter of the soils. However, the correlation between living bacteria and AsIII-oxidizing rate constants parameters did not reach the significance level (Table 3), whereas it globally followed the same tendency of correlation as that between intrinsic organic matter and AsIII-oxidizing rate constants parameters. This weakness of significance may be linked to a variable proportion of living As-transforming bacteria between soils.

The only parameters that influenced significantly the AsIII-oxidation rates constants and their ratios were either linked to organic matter, i.e. N, organic C, respiration and C/N, or pH (Table 3). One of the main parameters influencing soil biogeochemistry and microbial activities is pH ([Rousk et al., 2011](#); [Whittinghill and Hobbie, 2012](#)), thus it is not surprising to enlighten an influence of this parameter on microbial As-related activities. Concerning specifically the soil organic matter properties, their significant influence on the AsIII oxidizing rate without added organic substrate (C₀) decreased in the following order: total N > organic C > respiration, and the C/N ratio significantly influenced the C_{0.4} SMOM rate constant. These results suggest that microbial As oxidation may be limited not only by organic C but also by nitrogen. Thus, nitrogen-rich fraction of soil organic matter might influence As-related microbial activities. The C/N ratio in yeast extract is 4.25, whereas it is higher in SMOM (15.51) and in intrinsic organic matter of the eight soils (10 to 23). If the global soil respiration, linked to the total concentration of biodegradable organic matter, exerted a significant influence on AsIII-oxidizing rate constants, the proportion of biodegradable organic substances in soil organic matter, expressed as the indicator of biodegradable carbon fraction (ratio respiration/organic carbon concentration) was not related to any AsIII-oxidation related parameter (Table 3).

The soil microbial communities include organisms able to oxidize AsIII and/or reduce AsV ([Macur et al., 2004](#)), even in unpolluted environments ([Yamamura et al., 2009](#)). The AsIII oxidation rate constant is thus linked to the global activity of all microorganisms involved in As speciation. The global rate constant value should be linked to the following parameters, whose relative contributions have not been quantified: the cell density of As-transforming organisms, their physiological state and growth rate, and the kinetic parameters of the reactions (maximum rate and K_m) for each organism.

The AsIII-oxidizing activity in the soils also depends on the diversity and density of the different types of microorganisms; parameters those themselves depend on the environmental conditions of soils. The present study was focused on a global activity test that integrates all these variables. Such global activity measurements were developed and applied for other types of soil microbial activities: PAH biodegradation rate ([Kästner & Mahro, 1996](#)), thiosulfate-oxidizing activity in paddy fields ([Stubner et al., 1998](#)), and soil respiration, that integrates CO₂ production and consumption ([Rey et al., 2005](#)) as we integrate here AsIII production and consumption.

To date, all AsIII-oxidizing bacteria isolated from soils have been either heterotrophs ([Bachate et al., 2012](#); [Bahar et al., 2013](#); [Macur et al., 2004](#)) or facultative autotrophs ([Dong et al., 2014](#); [Garcia-Dominguez et al., 2008](#); [Inskeep et al., 2007](#); [Santini et al., 2002](#)). The availability of organic substrates should therefore favor increase of cell density of AsIII-oxidizing bacteria. This might almost partly explain the positive effect of organic matters on the AsIII oxidizing rate constants between 0 and 0.08 g L⁻¹ of carbon, and the positive correlation of the constant with intrinsic organic matter in the without-amendment condition. Conversely, high concentrations of organic substrates may decrease the specific AsIII-oxidizing activity of bacteria ([Bachate et al., 2012](#); [Challan-Belval et al., 2009](#)), and may also stimulate the aerobic AsV reducing activity of soil microorganisms ([Yamamura et al., 2009](#)). These latter phenomena may explain the decrease in global AsIII-oxidizing rate constants between 0.08 and 0.4 g L⁻¹ of added organic carbon observed in most of the conditions. In a liquid medium containing 0.5 g L⁻¹ yeast extract and 1.8 g L⁻¹ lactate (i.e. 0.92 g L⁻¹ organic C), [Yamamura et al. \(2009\)](#) observed rapid reduction of 1 mM AsV by unpolluted soil inocula, thus demonstrating the presence of active AsV-reducing microorganisms that may influence As speciation simultaneously with AsIII-oxidizing ones. Moreover, most AsIII-oxidizing bacteria have both oxidizing and reducing systems. In these experiments, different groups of soil microorganisms may have been favored in each condition (0, 0.08 and 0.4 g L⁻¹ of added carbon): according to [van Gestel et al. \(1993\)](#), autochthonous soil microorganisms are adapted to survive in soils containing recalcitrant material, where no abundant supply of easily oxidizable substrate occurs. These organisms exhibit K-selected behavior, with moderate growth rate and moderate nutrient demands, and are able to use diverse, complex materials ([Langer et al., 2004](#); [Metting, 1993](#); [Odum, 1969](#)). In contrast, zymogenous organisms show rapid growth when high energy-containing nutrients are added to soils ([Paul & Clark, 1996](#)), exhibiting r-selected behavior, characterized by rapid growth rate and use of simple and readily available substrates. Individual organisms may exhibit both r- and K-selected behavior, however amendment with organic substances should induce a change of behavior in soil microflora. The difference of effects exerted by yeast extract and SMOM at 0.04 g L⁻¹ carbon may be related to the distinct composition of the two substrates. The r-strategy should be more prevalent in the presence of yeast extract than with the SMOM, whose composition includes some molecules that are not easily biodegradable, and whose C/N ratio is lower than that of both SMOM and intrinsic soil organic matter.

IV.3.2. Soil incubations without added As

The experiment aimed to evaluate the short term (7 days) influence of amendment with SMOM (0.4 g L⁻¹ organic carbon) on the mobility of arsenic present in the four most polluted soils, in relation to microbial activity. The incubations remained aerobic throughout the experiment (positive redox potential, Electronic Supplementary Material ESM4). Similar tendencies were observed with the four

soils. When microbes were alive and without added SMOM, no arsenic was mobilized in the liquid phase (Figure 21a).

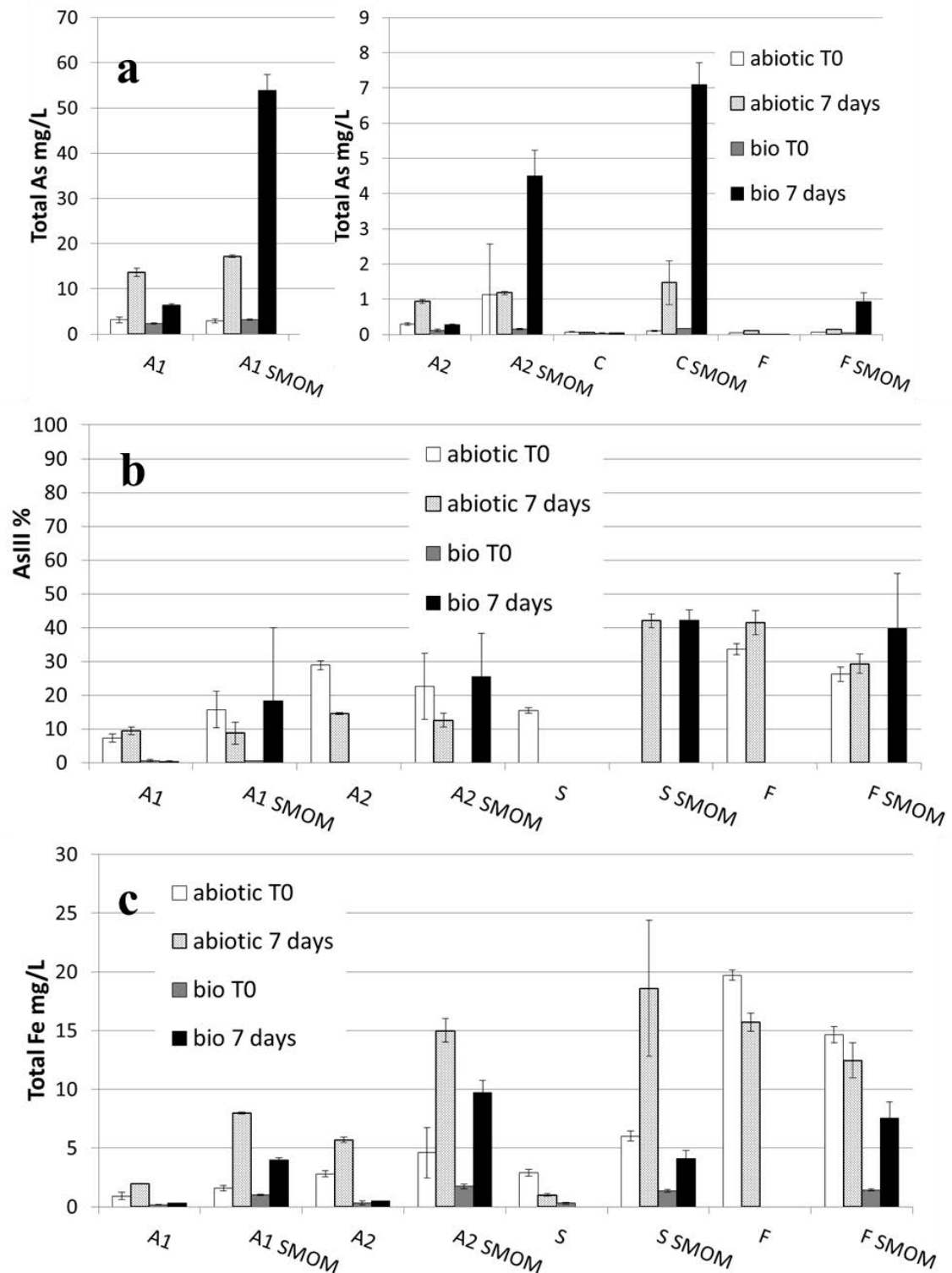


Figure . Incubations of soils with and without SMOM. (a) Concentrations in total As; (b) percentage of AsIII in the aqueous phase. (c) Concentration in total Fe.

A1: Auzon 1. A2: Auzon 2. S: Cheni site. F: Cheni forest. White bars: abiotic T0. Light gray: abiotic 7 days. Dark gray: biotic T0. Black: biotic 7 days.

Error bars represent the standard deviation of the mean of three replicates

Conversely, in the presence of SMOM, arsenic was solubilized, and this mobilization was significantly higher when the microbes were alive than in the abiotic controls. Regarding the speciation of As in the liquid phase after seven days of incubation (Figure 21b), AsIII was never detected in the absence of SMOM when microbes were alive. Conversely, AsIII was always detected in biotic conditions with SMOM, in proportion equivalent to that of the abiotic incubations (but with a higher variability between replicates). Present results showed mobilization of arsenic from soils contaminated for decades in presence of active bacteria and added organic matter, in aerobic condition. Iron concentration was increased by addition of SMOM in the soil slurries (Figure 21c), either in biotic and abiotic conditions. This phenomenon was probably linked to the increase of Fe solubility through complexation with dissolved organic molecules: as a fact, SMOM contains some organic acids, such as citric and oxalic acids, known to chelate iron ([Zhang et al., 1985](#)). Whereas Fe concentration increased during incubation in biotic conditions, iron concentration always remained lower in biotic than abiotic conditions, contrary to total arsenic whose release in solution, with SMOM, was clearly higher in biotic than abiotic conditions. Thus, biological reduction of iron does not seem to represent the major mechanism inducing As mobilization. The organic molecules present in the SMOM and their organic degradation products may have mobilized some As by chemical complexation: arsenite and arsenate form aqueous complexes with humic acid and natural organic matter in the presence of bridging metals ([Redman et al., 2002](#); [Ko et al., 2004](#); [Kim et al., 2015](#)). In addition, SMOM probably influenced the microbial speciation of As, either decreasing AsIII-oxidizing activity and/or stimulating the AsV-reducing heterotrophs as observed by [Yamamura et al. \(2009\)](#) when they incubated uncontaminated soils spiked with AsV and glucose. Incubating sediments sampled from a disused mine in aerobic conditions, [Lee et al. \(2005\)](#) observed bio-stimulation of As mobility by addition of acetate and lactate, but not by glucose, and linked the behavior of As to evolution of pH associated to the metabolism of organic substrates. Here, pH tended to increase in biotic conditions with SMOM (Table ESM4-1), which may have caused desorption of AsV. According to [Dixit and Hering \(2003\)](#), sorption of AsV onto iron oxides decreases when pH increases, contrary to AsIII, whose sorption should be favored by pH increase within the pH range of present experiments (pH 4.5 to 7.5). Thus, increase of pH may explain the increase of total As concentration but not that of AsIII.

In addition to influencing microbial speciation of As, presence of SMOM might also have exerted a priming effect ([Hamer & Marschner, 2002](#)), stimulating the biodegradation of the intrinsic organic matter of the soils and thus mobilizing some arsenic associated with natural organic matter.

The bacterial community structure and diversity of the soils amended or not with SMOM were assessed. The four soils without added organic matter had a constant bacterial diversity profile showing that our incubation procedure alone did not change these characteristics (Figure ESM4-1a). When the soils were amended with SMOM, bacterial diversity changed during incubation and

converged at the end of incubation for all soils. (Figure ESM4-1b). SMOM did not affect the bacterial diversity in the same way for all soils: it was decreased for the two soils that had the highest initial diversity, and was maintained or slightly increased for the two soils with lower initial diversity. In terms of total bacterial concentration, the mixture induced an increase in the bacterial cell concentration with the Cheni Site soil, however, for the other soils, bacterial counts did not differ with and without addition of the mixture (Figure ESM4-2). The convergence of the SSCP fingerprint profiles for all amended soils may be related to the selective development of bacteria able to metabolize the most easily biodegradable compounds of the SMOM, as previously observed by [Goldfarb et al \(2011\)](#), or may have resulted from the buffering effect of metabolized SMOM on pH. Nevertheless, the amendment of soils with the mixture did not result in the emergence of a few dominant species; it allowed the persistence of a diverse bacterial community, and did not significantly modify the total bacterial concentration.

IV.4. Conclusions

Results suggest that the global As^{III}-oxidizing activity of microorganisms in polluted soils is linked to availability of biodegradable organic substrates. As^{III} oxidation can be stimulated by some input of organic matter when the natural organic content of the soil is low; the limitation being already removed in the presence of 0.08 g L⁻¹ organic carbon. Higher intakes of organic substances no longer stimulate As^{III} oxidation and, conversely, may induce short term As mobilization through decrease of bacterial As^{III} oxidation, stimulation of As^V-reducing organisms and formation of soluble As complexes with organic molecules. In most natural conditions, As^V has lower mobility than As^{III} and the speciation of As in soils therefore influences its mobility. These phenomena should be given careful consideration when designing efficient management strategies for highly polluted sites and agricultural lands affected by diffuse As contamination.

Acknowledgements

This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), BRGM (convention TEZ 11-16), and the Labex Voltaire (ANR-10-LABX-100-01). The authors gratefully acknowledge Catherine Jouliau for expert judgment concerning SSCP profiles and technical support from Dominique Breeze and Pascal Auger.

ESM1. Correlation (Pearson) between soils parameters, rate constants and their ratios

The absolute values of Pearson correlation coefficients were summed for the 5 rate constants (C_0 , $C_{0.08}$ yeast extract, $C_{0.4}$ yeast extract, $C_{0.08}$ mixture, $C_{0.4}$ mixture) in Figure ESM1a, and for the 4 ratios ($C_0/C_{0.08}$ yeast extract, $C_{0.08}/C_{0.4}$ yeast extract, $C_0/C_{0.08}$ mixture, $C_{0.08}/C_{0.4}$ mixture) in Figure ESM1b.

The sums were represented in decreasing order, and the 8 independent parameters corresponding to the highest sums, indicated by arrows, were selected to design the PCA representations.

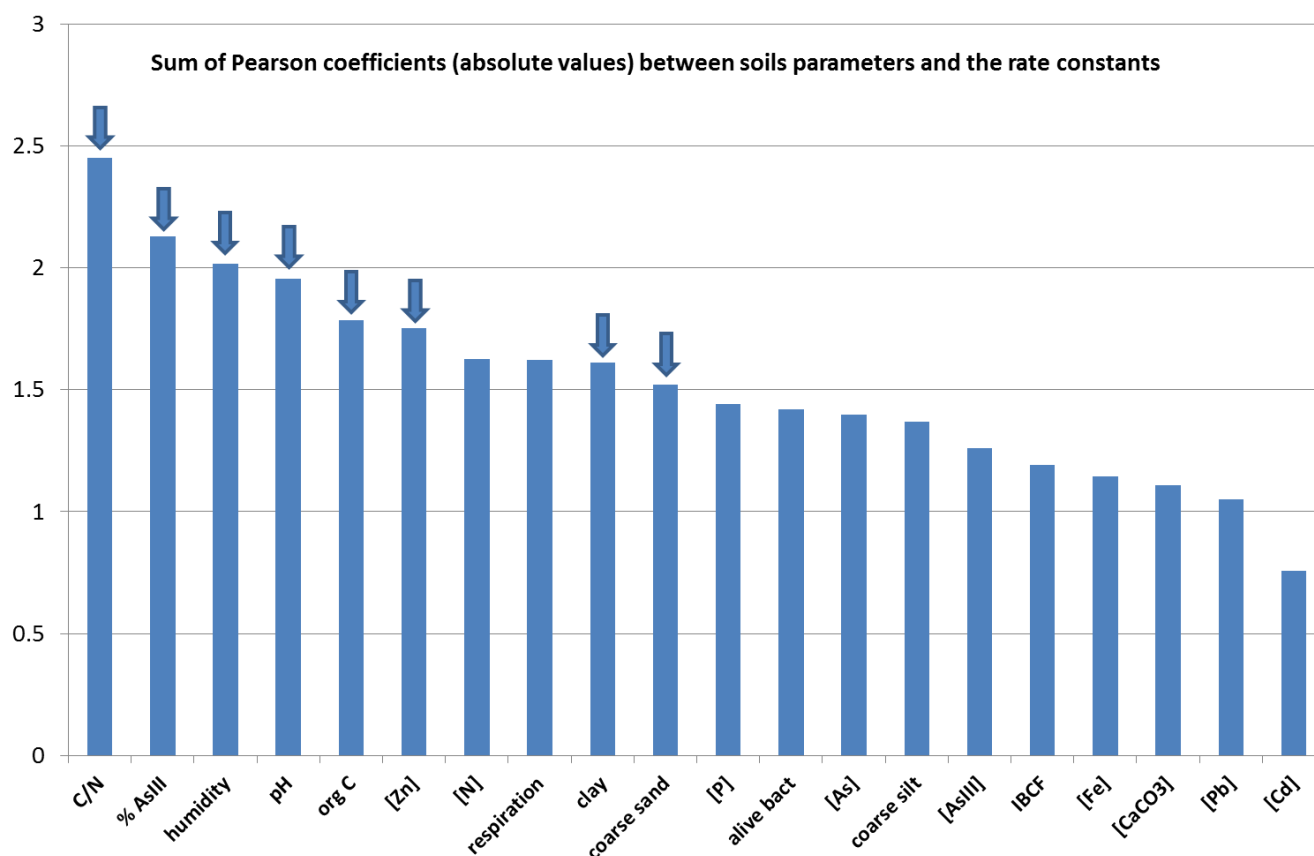


Figure ESM1a. Sum of Pearson coefficients (absolute values) between soils parameters and the rate constants. Arrows indicate the parameters selected for the PCA presented in Figure 18.

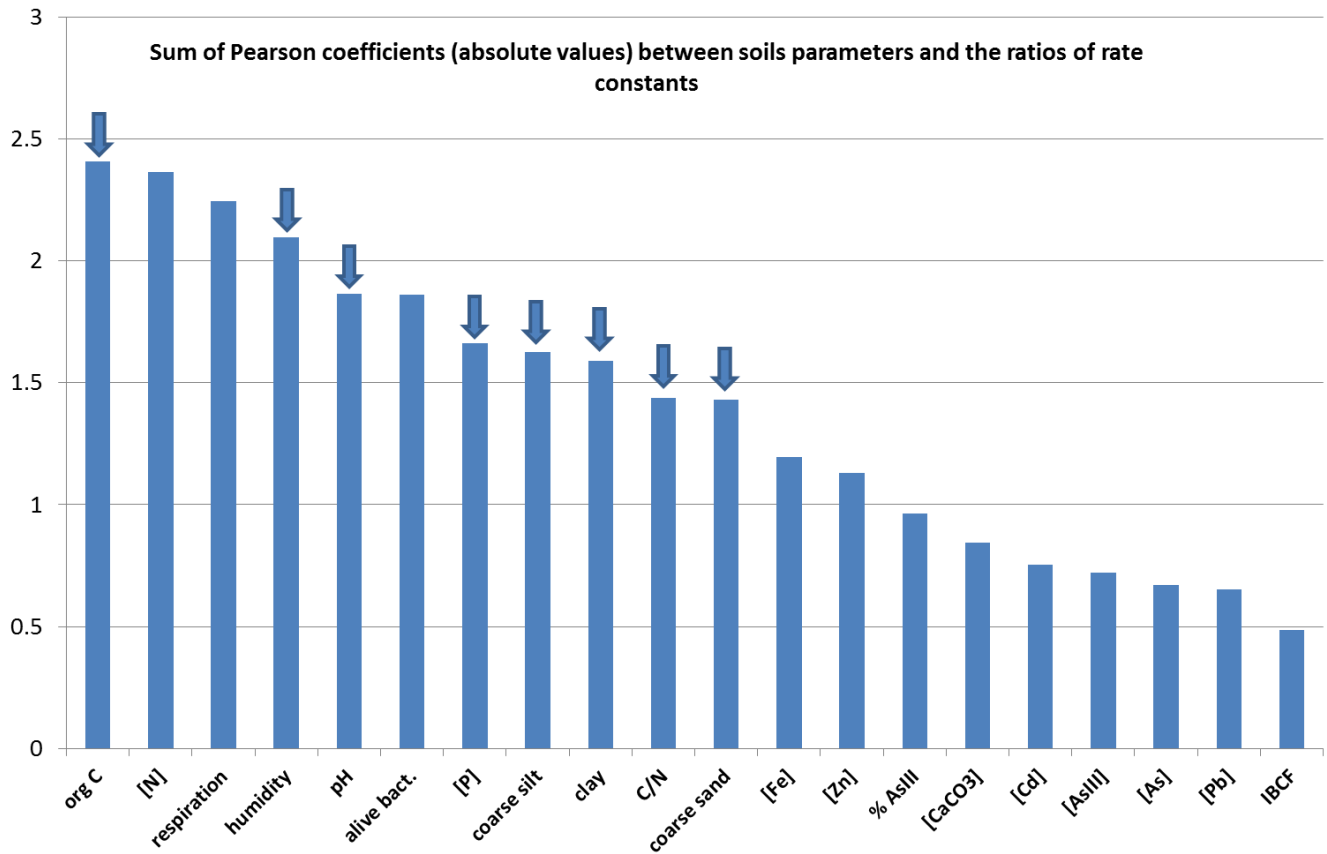


Figure ESM1b. Sum of Pearson coefficients (absolute values) between soils parameters and the ratios of rate constants. Arrows indicate the parameters selected for the PCA presented in Figure 19.

Table ESM1c. Effect of soils parameters on constant rates and their evolution when organic substrates are added.

Parameters	C ₀	C _{0.08} YE	C _{0.08} SMOM	C _{0.4} YE	C _{0.4} SMOM	Evolution 0→0.08 YE	Evolution 0→0.08 SMOM	Evolution 0.08→0.4 YE	Evolution 0.08→0.4 SMOM
Soil OM	+++			-		---	---		
%AsIII		++	+		++			-	
Zn		+		-				--	
pH		-		+	-			++	--
clay		-						++	-
K ₂								-	
coarse sand				-				-	
humidity	++				++	-	--		+
coarse silt	++					--	--		
P			-						++
Fe									-
alive bacteria	++		-			-	--		+

Soil OM: parameters total carbon, organic carbon, nitrogen and respiration

Red: positive effect, Green: negative effect

Dark red or **Dark green**: Pearson coefficient > or = to 0.8

Medium green or **Orange**: Pearson coefficient between 0.6 and 0.8

Light green or **yellow**: Pearson coefficient between 0.4 and 0.6

ESM2. Influence of soil storage

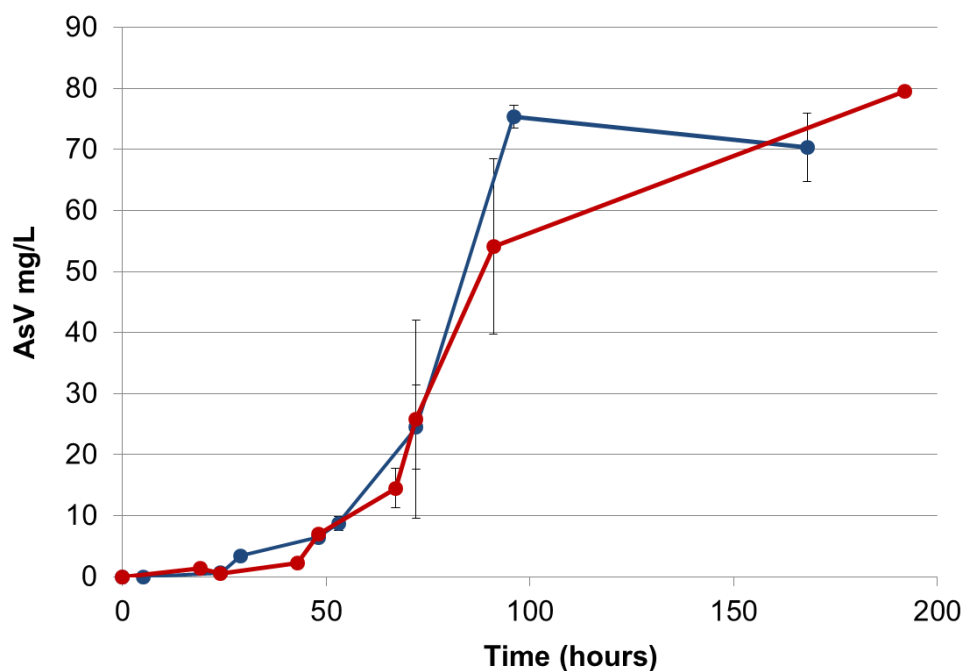


Figure ESM2. Evolution of AsV concentration in the AsIII oxidizing tests performed with Cheni Meadow soil after 1 week and repeated after 8 months of storage at 5°C, with yeast extract added at 0.4 g L⁻¹ organic C. Blue curve: eight months of storage. Red curve: one week of storage

ESM3. Evolution of AsV concentration in the AsIII oxidizing tests

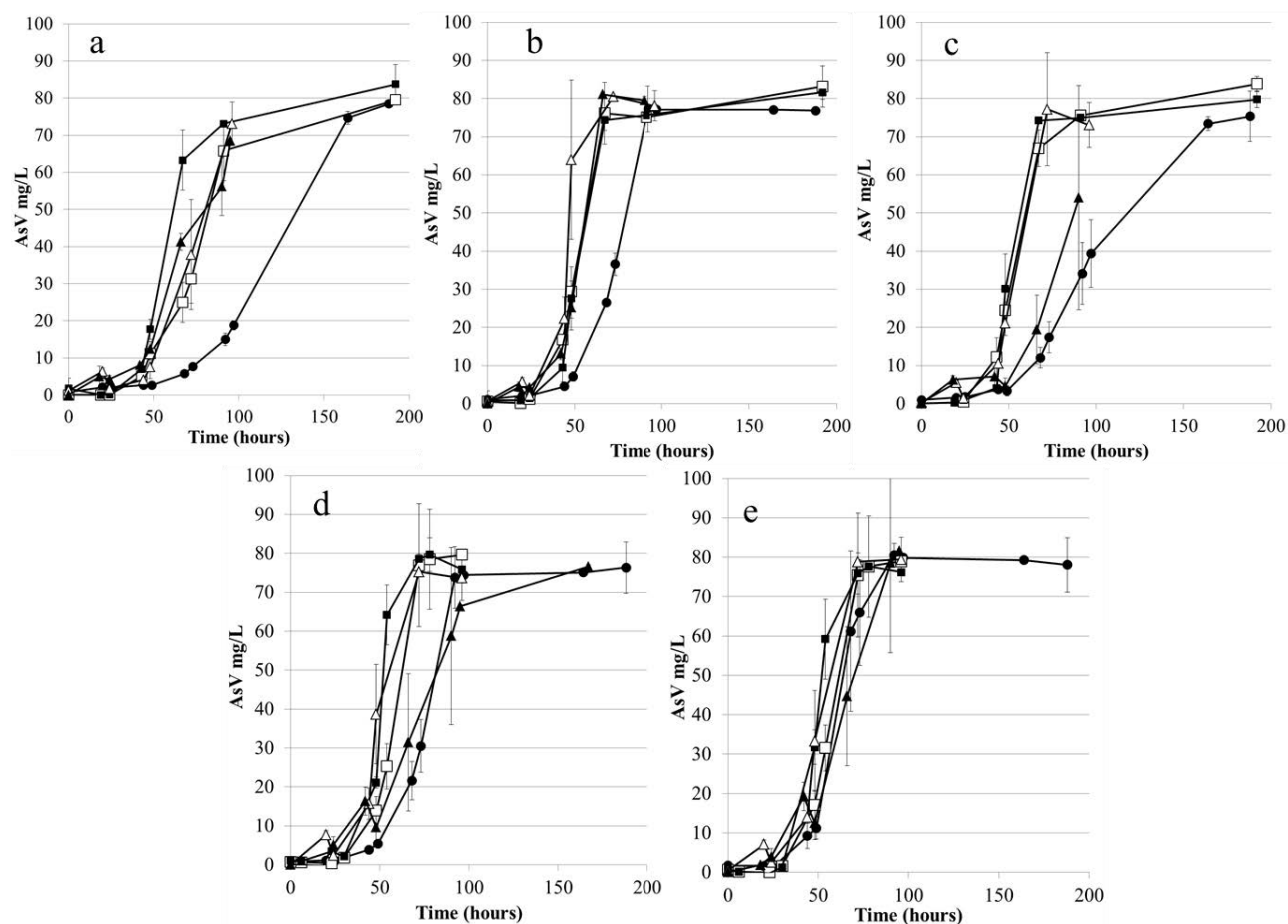


Figure ESM3. Evolution of AsV concentration in the AsIII oxidizing tests performed with (A) Cheni field soil, (B) Auzon 1, (C) Auzon 2, (D) Salsigne ZE1 soil, (E) Salsigne ZE2 soil. Open circles: no added OM. Squares: yeast extract. Triangles: SMOM. Open symbols: 0.08 g L⁻¹ organic C. Closed symbols: 0.4 g L⁻¹ organic C.

ESM4. Complementary information about soil incubation experiments

Table ESM4-1. Initial pH and final pH and Eh values (ref. Ag/AgCl) in the incubations of soils

Simple: Incubation without any added organic matter; SMOM: Incubations with added Synthetic Mixture of Organic Matters. B1, B2, B3: Blanks with autoclaved soils. E1, E2, E3: Experiments with non-sterile soils.

		Auzon 1 T0 pH	Auzon 1 T final pH	Auzon 1 T final Eh	Auzon 2 T0 pH	Auzon 2 T final pH	Auzon 2 T final Eh	Cheni site T0 pH	Cheni site T.final pH	Cheni site T final Eh	Cheni forest T0 pH	Cheni forest Tfinal pH	Cheni forest T final Eh
Simple	B1	4.96	4.86	290	4.91	4.86	289	4.95	5.34	237	4.87	4.79	255
Simple	B2	4.78	4.65	290	4.69	4.65	296	4.89	5.18	232	4.76	4.81	261
Simple	B3	4.83	4.73	289	4.61	4.73	287	4.93	5.22	231	4.62	4.86	266
Simple	E1	4.65	4.99	285	4.78	4.99	291	4.76	4.94	230	4.96	4.75	246
Simple	E2	4.74	5	287	4.56	5	286	4.82	4.95	233	4.88	4.77	251
Simple	E3	4.57	5	293	4.63	5	278	4.68	4.84	234	4.79	4.79	259
SMOM	B1	4.93	5.07	285	4.96	5.07	293	4.94	5.36	228	5.11	4.86	233
SMOM	B2	4.89	5.1	274	4.94	5.1	288	4.96	4.94	229	5.15	4.89	225
SMOM	B3	4.92	5.19	265	5.07	5.19	259	4.91	5.03	225	5.08	4.98	236
SMOM	E1	5.04	7.09	230	5.45	7.09	245	5.11	5.95	213	5.24	6.28	211
SMOM	E2	5.24	7.54	210	5.54	7.54	251	5.15	5.94	214	5.19	6.5	217
SMOM	E3	5.32	7.2	240	5.54	7.2	215	5.05	5.91	204	5.28	6.48	224

Details of Methods

Study of bacterial diversity

For biomolecular analyses, genomic DNA was extracted from the -20°C stored soil slurries using the FastDNA® Spin Kit for Soil (Bio101).

The population structure and its evolution were monitored by two methods, (1) Capillary electrophoresis–terminal restriction fragment length polymorphism (CE–T-RFLP) diversity analysis of the 16S rRNA gene, as described by Mercier et al (2013) and (2) Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP, Delbès et al., 2000) on 200 bp of the V3 region of 16S rRNA genes of members of the bacteria domain, amplified with forward primer w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3'; *E. coli* position, 331) and reverse primer w34 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'; *E. coli* position, 533), 5' end-labelled with the fluorescent dye FAM. 1 µL of diluted PCR product (5–100 fold in nuclease-free water) was added in a mixture of 18.8 µL of deionized formamide and 0.2 µL of a Genescan LIZ internal standard (Applied Biosystems). To obtain single-strand DNA, samples were heat denaturated for 5 min at 95°C, and immediately cooled on ice. CE-SSCP analyses were performed with an ABI Prism 310 genetic analyzer using a 47 cm long capillary, a non-denaturing 5.6% CAP polymer (Applied Biosystems) and the following electrophoresis conditions: run temperature 32°C, sample injection for 5 s at 15 kV, data collection for 35 min at 12 kV. CE-SSCP electrophoregrams were analyzed using the StatFingerprints Version 2 software (Michelland et al, 2009).

Bacterial counting

Bacteria were separated from soil particles and from eukaryotes using the methods validated by Lindahl and Bakken (1995), Lindahl (1996) and Bertrand et al., (2005), including a separation of bacteria from soil particles using the Nycodenz gradient method. Briefly, soil slurries were centrifuged for 10 min at 9,000 rpm, the supernatant was removed and replaced by 20 mL of sodium pyrophosphate 0.05 M, pH 8. The flasks were agitated on a reciprocal shaker for 5 min then vortexed for 1 min, and placed on ice. This step was repeated three times and the slurries were then centrifuged for 15 min at 700 rpm, at 10°C, to remove coarse particles. The sandy texture of the four studied materials facilitated the dispersion and the separation of bacterial cells from soil particles. The resulting supernatant was centrifuged at 7,500 rpm for 20 min at 10°C. The cells were suspended in 10 mL of sodium pyrophosphate and delicately placed above the surface of 10 mL Optiprep™ (Axis-Shield), density 1.3 g mL⁻¹, in a tube, and centrifuged at 14,000 rpm for 45 min at 10°C. The cell ring obtained at the aqueous/Optiprep™ interface was carefully recovered and suspended in 15 mL of sterile ultrapure water. This suspension was centrifuged at 7,500 rpm for 20 min and the resulting pellet was suspended in 1 mL of NaCl 0.8%, mixed with 1 mL of absolute ethanol and stored at -20°C.

Bacteria were enumerated after fluorescent staining, as described in Kumar et al. (2013). All counted cells presented typical morphology and size of bacteria, and the number of optical fields analyzed allowed a sensitivity of $\pm 0.6 \times 10^8$ cells g^{-1} .



Figure ESM4-1. Diversity analysis of the four soils at the start of experiment (regular), after seven days (bold) and with SMOM (boxed text). (a) The dendrogram was generated by hierarchical cluster analysis using Euclidean distance and Ward's algorithm. Heatmap is given as a simplified representation of each SSCP profiles where the signal intensity is translated into a gradient of greys. (b) The mean of Simpson's diversity index (D) was represented with standard error. (S) Cheni Site; (F) Cheni Forest; (A1) Auzon 1; (A2) Auzon2; (M) addition of SMOM; (T0) start of experiment; (T7) after 7 days of incubation.

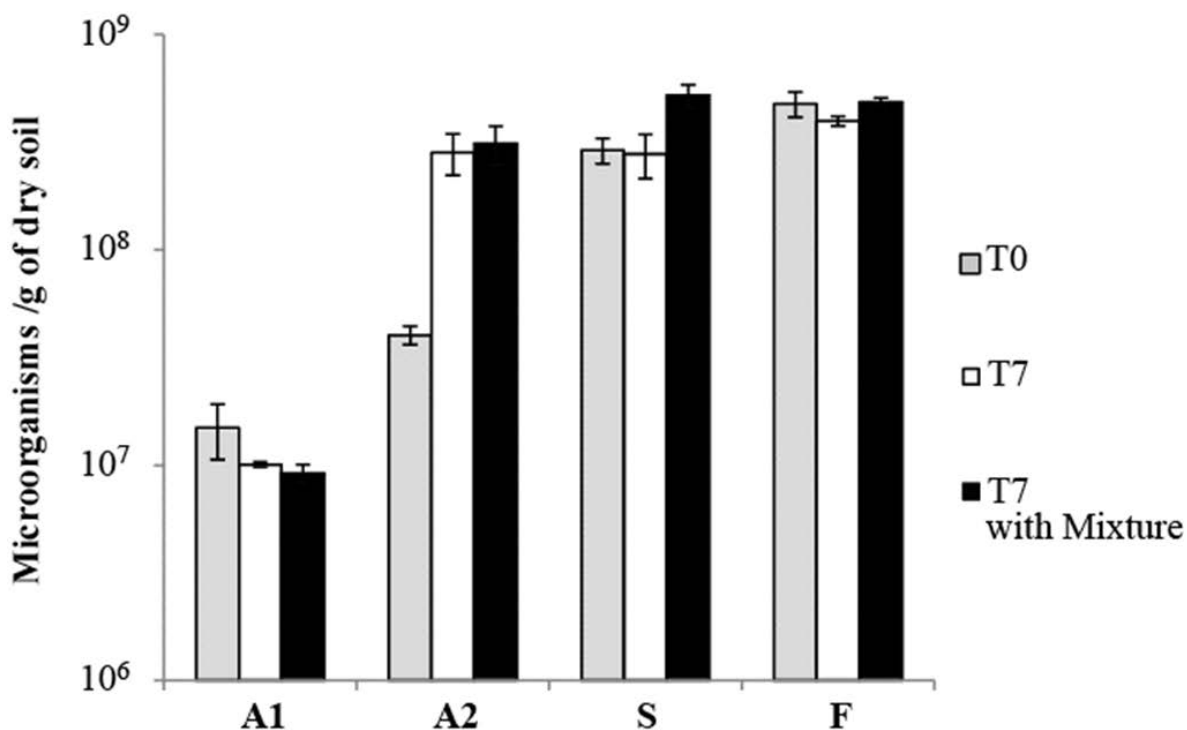


Figure ESM4-2. Total bacterial concentration in the four soils, determined by DAPI. (S) Cheni Site; (F) Cheni Forest; (A1) Auzon 1; (A2) Auzon2; (T0) start of experiment; (T7) after 7 days of incubation

Chapitre V. Conclusions générales et perspectives

La présente thèse portait sur l'influence de la matière organique sur le statut redox de l'arsenic lié à l'activité bactérienne dans les sols pollués. Le sujet a été abordé sous différents aspects et à différentes échelles: de l'échelle **moléculaire et cellulaire** jusqu'à celle des **communautés microbiennes** de sols. Les **sols** ont d'abord été **utilisés comme inocula** de milieux de culture, avant d'être l'objet d'**expériences d'incubations**. Nous avons fait également varier la **complexité de la matière organique**. D'une molécule simple de type acétate, nous sommes passés à des sources complexes de matière organique sous la forme (1) d'extrait de levure, (2) d'un mélange complexe de substances organiques (SMOM) que nous avons synthétisé de manière à être représentatif des matières organiques des sols et contenant 39 composés définis possédant des fonctions chimiques variées et (3) de matière organique naturelle contenue dans les sols.

A l'échelle moléculaire et cellulaire, un effet négatif d'un apport de matière organique sur l'oxydation de l'AsIII a été mis en évidence pour deux souches bactériennes, *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans*. En présence de 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure, la vitesse spécifique d'oxydation de l'AsIII se trouvait ralentie de 13,6 à 39,1 % pour *T. arsenivorans* et de 10 à 25,9 % pour *H. arsenicoxydans*, par rapport aux mêmes vitesses calculées sans substrat organique.

Nous avons observé que les conditions de croissance ont également un effet sur la vitesse d'oxydation de l'AsIII : cette dernière était maximale quand les souches étaient cultivées en présence de seulement 0,05 g.L⁻¹ de substrat organique, réduite de 46,2 à 75 % pour *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans* respectivement, cultivées en présence de 0,2 g.L⁻¹ de substrat simple, et de 60,0 à 70,0 % quand elles s'étaient développées avec 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Alors que la plupart des études réalisées jusqu'à présent mettaient en évidence une régulation de l'expression des gènes *aio* par la concentration en arsenic, ce présent projet de thèse a établi, pour la première fois, une corrélation entre concentration en matière organique dans le milieu de croissance et expression du gène *aioA*. En présence de 75 mg.L⁻¹ d'AsIII initial, l'expression du gène *aioA* par *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans* a été maximale lorsque la concentration en extrait de levure était la plus faible (0,2 g.L⁻¹).

L'étude réalisée avec des souches pures a donc montré que la vitesse d'oxydation de l'AsIII est affectée par la matière organique, qu'elle soit présente dans le milieu de croissance ou apportée après la croissance des cellules, et cela pour deux concentrations différentes en AsIII (2 et 75 mg.L⁻¹). Des effets différents ont été observés avec des substrats simples et un substrat complexe (l'extrait de levure) introduits dans le milieu de cinétique, suggérant une possible interaction entre l'AsIII et certains composés de l'extrait de levure qui pourraient modifier la forme chimique de l'As interagissant avec les cellules bactériennes.

A l'échelle des communautés microbiennes des sols nous avons montré que la constante de vitesse d'oxydation de l'As^{III} est influencée par la nature et la concentration de la matière organique à travers la réalisation de tests d'activité. A faible concentration en matière organique, la constante de vitesse semble limitée par le carbone organique intrinsèque du sol, mais cette limitation est levée par un apport en matière organique correspondant à 0,08 g.L⁻¹ de carbone. Au-delà de cette concentration, l'ajout de matière organique induit un effet inhibiteur sur la vitesse d'oxydation microbienne de l'As^{III}. Ces expériences ont également montré que la constante de vitesse d'oxydation de l'As^{III} est influencée par plusieurs caractéristiques du sol, tels que la proportion d'As^{III} par rapport à l'As total, le pH, l'humidité et la texture.

Des essais d'incubation ont montré que la microflore totale des sols pollués influence différemment le comportement de l'As en absence et en présence de matière organique ajoutée. Lorsque le sol n'est pas amendé par un substrat organique, la microflore tend à stabiliser l'As et réduire son transfert de la phase solide vers la phase aqueuse. Par contre, lorsqu'un substrat organique est introduit dans le système, l'activité bactérienne contribue à mobiliser de l'As du sol pollué vers la solution du sol.

L'effet de la complexité et de la nature de la matière organique sur l'oxydation microbienne de l'As^{III} a été prise en compte aux différentes étapes du travail de thèse. Ainsi, des expériences ont d'abord été réalisées avec des substrats simples et n'apportant pas d'azote (acétate et succinate) et de l'extrait de levure qui est un substrat complexe mais peu caractérisé et peu représentatif de la matière organique naturelle des sols. Les résultats de ces expériences ont suggéré que l'effet de la MO sur l'activité des microorganismes vis-à-vis de l'As dans les sols dépendrait à la fois de sa concentration et de sa nature. Nous avons alors élaboré un mélange synthétique et complexe de molécules organiques (SMOM), dont la composition présente des caractéristiques proches de la matière organique des sols, afin d'étudier de façon reproductible l'effet de la matière organique des sols sur l'activité des microorganismes vis-à-vis de l'As. La formulation de cette mixture a été basée sur la compilation de données sur la composition de matières organiques naturelles et extractibles de différents types de sols. Cette mixture présente un rapport C/N, et une proportion de groupements phénoliques et carboxyliques représentative de ces MO naturelles. Nous avons ensuite montré que l'effet de cette SMOM sur l'activité As^{III}-oxydante de la microflore de sols pollués est différent de celle de l'extrait de levure. L'extrait de levure stimule ainsi l'oxydation de l'As^{III} à des concentrations auxquelles la mixture est inhibitrice. Ces résultats suggèrent que l'extrait de levure et la mixture pourraient stimuler des métabolismes de types différents. L'extrait de levure stimulerait davantage des organismes de métabolisme de type **zymogène** (stratèges-r), qui ont une croissance plus rapide lorsque la concentration en matières organiques est plus élevée ([Paul & Clark, 1996](#)), et seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique fraîche au stade précoce de minéralisation de la MO. *H. arsenicoxydans*, bactérie hétérotrophe stricte dont la croissance est favorisée lorsque la concentration

en matières organiques augmente, aurait donc, dans ce travail, un comportement proche des bactéries zymogènes.

A *contrario*, la SMOM, dont la composition est proche de celle de la MO des sols, pourrait également stimuler des microorganismes **indigènes** des sols, adaptés à la survie dans des conditions naturelles de très faibles apports en matières organiques ([van Gestel et al, 1993](#)). Ces organismes revêtent une stratégie d'adaptation de type -K et seraient plutôt impliqués dans la dégradation de la matière organique native du sol. A ce titre, dans notre étude, la bactérie *T. arsenivorans*, autotrophe facultative, pourrait être considérée comme un modèle de bactéries autochtones.

Le comportement de ces deux microorganismes modèles pourrait donc permettre d'approcher le comportement des deux stratégies écologiques -r et -K vis-à-vis de l'arsenic ainsi que leur successivité suite à un apport de matière organique.

De façon plus globale, ce travail a permis de démontrer qu'un apport de matière organique influence la vitesse d'oxydation de l'As^{III} par des communautés microbiennes de sols pollués, et donc la mobilité de l'arsenic. Les bactéries contribuent à la stabilisation du métalloïde toxique en conditions aérobies et en absence d'un apport de matière organique. Ainsi, dans un sol n'ayant pas d'apport de matières organiques (zones non végétalisées des sites, et dans la couche de sol non impactée par les systèmes racinaires), les bactéries contribuent probablement à stabiliser les polluants inorganiques *in situ*, tant que de l'oxygène est disponible. Par contre, dans les zones alimentées en matières organiques (sol proche de la litière et rhizosphère), les bactéries sont susceptibles de contribuer à la mobilisation de l'arsenic, de façon directe ou indirecte.

Le présent travail de thèse a permis d'améliorer la compréhension de l'effet de la matière organique sur la spéciation de l'As *via* l'activité des bactéries au niveau du compartiment microbien (Figure 22).

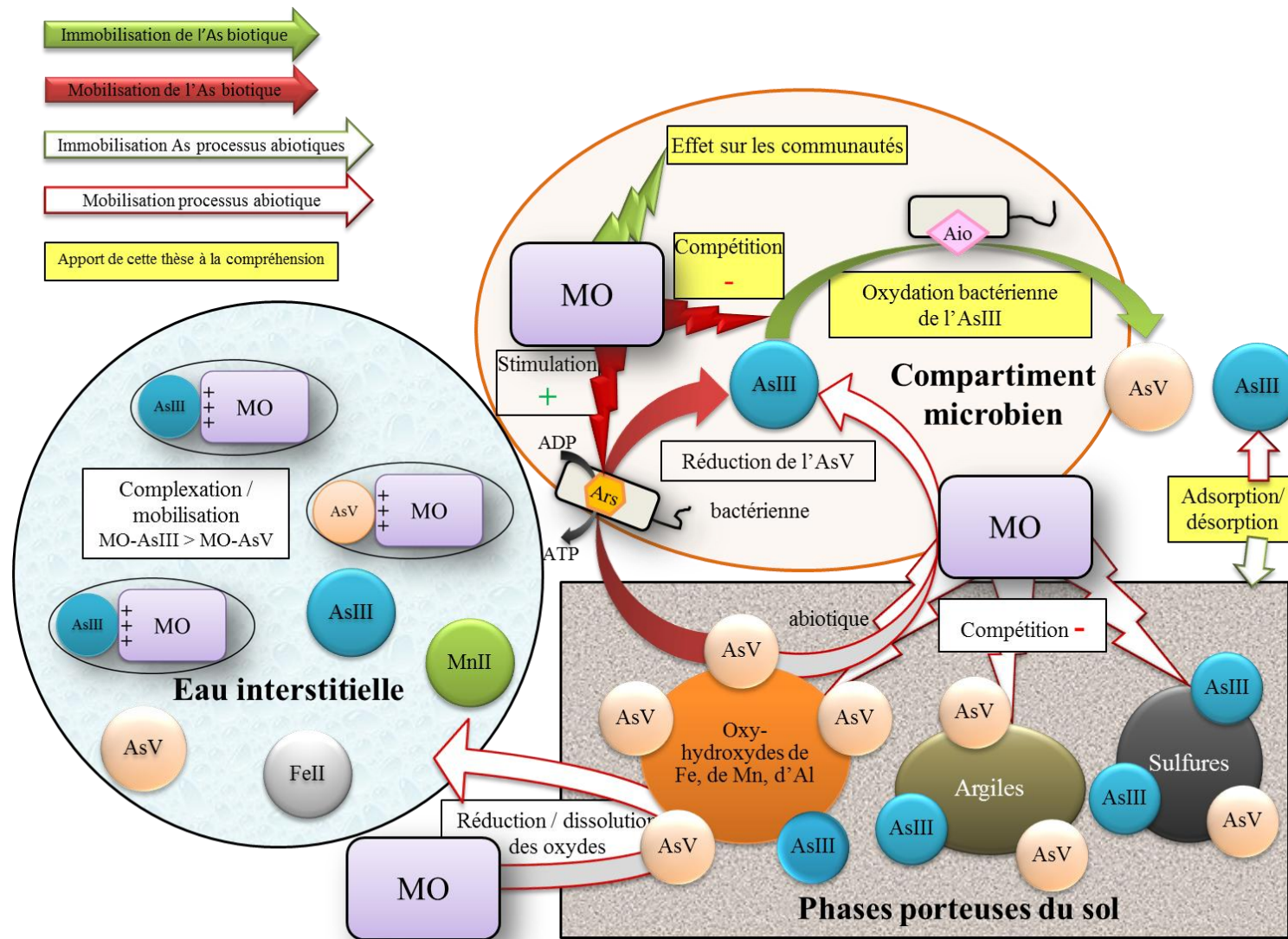


Figure . Impact de la matière organique sur la biogéochimie de l'As dans les sols : apports de la présente thèse surlignés en jaune

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que la matière organique a un impact fort sur la biogéochimie de l'As via la structure des communautés microbiennes et leur capacité à transformer la spéciation de l'As, influant ainsi la mobilité du métalloïde dans les sols.

Des travaux complémentaires seront nécessaires pour appréhender de façon complète ces phénomènes dans différents contextes, au niveau **génétique**, au niveau **cellulaire et des communautés microbiennes**, et au niveau des **phénomènes biogéochimiques** liés aux interactions entre compartiment microbien, nature de la MO et compartiment minéral.

Au niveau génétique, les résultats obtenus sur les gènes *aio* devront être complétés par la détermination de l'effet de la matière organique sur l'expression du gène *arsC* codant pour la réductase du système de résistance Ars, susceptible d'influencer, parallèlement au système Aio, l'équilibre de spéciation de l'arsenic inorganique dans les environnements aérés ou micro-aérophiles.

Au cours de cette thèse, des amorces ciblant le gène *arsC* ont été dessinées mais n'ont pas pu être testées *in vitro*. Ces amorces pourraient permettre d'étudier l'expression du gène *arsC* (réductase). Ceci permettrait de déterminer si la matière organique stimule l'expression de ce gène et donc la réduction de l'AsV par les deux souches pures *T. arsenivorans* et *H. arsenicoxydans* puis d'évaluer la balance réduction/oxydation chez ces deux souches en présence de différentes concentrations en matières organiques.

L'expression des gènes *aioA* et *arsC* pourraient être directement évaluée dans des systèmes plus proches de l'environnement réel par des méthodes d'extraction des ARNm des sols. Cette étape expérimentale demeure délicate, mais l'équipe de [Huang et al \(2012\)](#) a obtenu des résultats concernant l'expression de gènes liés à la transformation de l'arsenic dans les sols de rizière. Si leur méthode pouvait être reproduite avec des sols aérés, il serait possible de déterminer quelle peut être l'influence d'un apport de matières organiques sur l'expression de ces gènes dans des expériences de laboratoire ou sur site.

L'influence de la matière organique et en particulier de la SMOM sur l'évolution de la diversité bactérienne fonctionnelle dans les sols pourrait être évaluée en ciblant la diversité des gènes *aio* et *arsC* par clonage/séquençage ou pyroséquençage.

Au niveau du **compartiment microbien**, un apport de SMOM a montré une influence sur la diversité des bactéries des sols. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer quelles populations ont été stimulées par cet apport. Pour le savoir, des méthodes permettant de détecter les groupes bactériens se développant en présence de substrats précis pourraient être appliquées, telles que l'utilisation de traceurs incorporés aux acides nucléiques des microorganismes en croissance, tels que la BrdU, analogue de la thymidine marqué ([Goldfarb et al, 2011](#)).

L'impact d'un apport de SMOM sur le nombre de bactéries qui oxydent l'As pourrait être évalué par la méthode du nombre de plus probable (NPP), utilisant des milieux de culture contenant de l'AsIII. L'oxydation de l'AsIII dans les cultures positives serait mise en évidence soit par spéciation et analyse, soit par la révélation de l'AsIII complexé avec de la Pyrrolidine dithiocarbamate d'ammonium (PDC) ([Battaglia-Brunet et al, 2002](#)), l'AsIII formant un complexe insoluble avec la PDC qui provoque un trouble dans le milieu ([Charlot, 1974](#)).

De façon plus prospective, il serait intéressant de rechercher l'influence du compartiment « champignons filamenteux » sur la spéciation de l'As. En effet, les champignons représentent un groupe microbien important dans les sols, mais leur rôle dans la transformation de l'arsenic reste peu connu. Il semblerait que diverses moisissures soient capables de réduire l'AsV et de générer des espèces méthylées, mais la distribution de ce caractère dans les communautés microbiennes des sols n'est pas connue, et l'éventuelle activité d'oxydation de l'AsIII par les champignons et les archées demeure à rechercher.

Au **niveau biogéochimique**, d'autres mixtures de matières organiques que la SMOM pourraient être élaborées, qui se rapprocheraient de la composition des exsudats racinaires, par exemple. Ainsi, des expériences comparables à celles réalisées au cours de cette thèse permettraient d'étudier l'effet potentiel de ces exsudats sur la spéciation bactérienne de l'As à proximité de plantes. Ceci serait utile afin d'estimer l'impact d'opérations de phyto-stabilisation de sols pollués, miniers ou industriels, sur la mobilité de l'As. L'influence de ces différentes mixtures sur le *priming effect* dans les sols, la biodégradation de la matière organique intrinsèque, ainsi que sur l'activité simultanée des bactéries qui transforment l'As, pourrait être évaluée en mesurant la respiration des sols et l'évolution de la spéciation de l'As au cours des expériences.

Afin de se rapprocher encore plus des conditions en sol réel, il serait intéressant d'extraire des matières organiques des sols et de tester l'impact de la concentration de ces matières organiques naturelles sur l'activité bactérienne totale et AsIII-oxydante sur ces mêmes sols. Pour cela, des protocoles d'extraction de la matière organique naturelle des sols ont déjà été décrits ([Jones & Willet, 2006](#)). Lors de la réalisation d'expériences mettant en œuvre des matières organiques complexes (synthétiques ou naturelles), il serait pertinent de déterminer quelles molécules sont biodégradées simultanément à la croissance des microorganismes et à la transformation de l'arsenic.

Un développement analytique ou de la chromatographie d'affinité devrait être réalisé afin d'identifier les phénomènes de complexation entre les molécules composant les matières organiques utilisées pour les expériences (synthétique ou naturelle) et les différentes espèces d'As, leurs caractéristiques, et leurs impacts potentiels sur la mobilité et la toxicité de l'As. Une telle étude permettrait de mieux comprendre comment la matière organique peut influencer les réactions de transformation de l'As par

les bactéries *via* la régulation de l'expression des gènes *aioA* et *arsC* ou *via* les interactions directes entre les enzymes Aio ou ArsC et les espèces d'As. Ces études nécessiteraient la mise en œuvre d'études d'activité enzymatique *in vitro*. Les activités de ces deux enzymes ont déjà fait l'objet de travaux de ce type (Lieutaud et al, 2010; Martin et al, 2001).

Enfin, afin de compléter ce travail, il serait également intéressant de suivre l'effet des amendements organiques sur les sols pollués en fonction du temps. En effet, l'amendement d'un sol par la matière organique complexe est immédiatement suivi de la libération de petites molécules organiques qui sont rapidement consommées par les microorganismes du sol, en particulier les microorganismes zymogènes dont la croissance est stimulée de façon transitoire et rapide. Les fractions les moins biodégradables de la matière organique apportée auront une durée de vie plus longue dans le sol et pourront alimenter les bactéries autochtones. Un apport de molécules organiques permet aussi de stimuler la biodégradation de la fraction réfractaire de la matière organique intrinsèque du sol par le phénomène de *priming effect*. Il serait important d'évaluer les interactions entre bactéries et arsenic au cours de ces différentes phases, qui peuvent s'étaler sur plusieurs semaines ou mois.

Références bibliographiques

Achour-Rokbani A, Cordi A, Poupin P, Bauda P, Billard P (2010) Characterization of the ars gene cluster from extremely arsenic-resistant *Microbacterium* sp. strain A33. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 948-955

Achour AR, Bauda P, Billard P (2007) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in Microbiology* **158**: 128-137

Ahmann D, Roberts AL, Krumholz LR, Morel FMM (1994) Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* **371**: 750

Anderson LC, Bruland KW (1991) Biogeochemistry of Arsenic in Natural Waters: The Importance of Methylated Species. *Environmental Science & Technology* **25**: 420-427

Bachate SP, Khapare RM, Kodam KM (2012) Oxidation of arsenite by two beta-proteobacteria isolated from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 2135-2145

Bahar MM, Megharaj M, Naidu R (2013) Kinetics of arsenite oxidation by *Variovorax* sp. MM-1 isolated from a soil and identification of arsenite oxidase gene. *Journal of Hazardous Materials* **262**: 997-1003

Balasoiu CF, Zagury GJ, Deschênes L (2001) Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. *Science of The Total Environment* **280**: 239-255

BASOL : Base de données BASOL sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif. (2015) Site internet : <http://basol.developpement-durable.gouv.fr/>

Bastian F, Bouziri L, Nicolardot B, Ranjard L (2009) Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 262-275

Battaglia-Brunet F, Dictor MC, Garrido F, Crouzet C, Morin D, Dekeyser K, Clarens M, Baranger P (2002) An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterisation, and performance in reactors. *Journal of Applied Microbiology* **93**: 656-667

Battaglia-Brunet F, Joulian C, Breeze D, Poirier L, Coulon S, Guérin V (2010) Monitoring of arsenic bio-oxidation and bio-reduction activities in highly As-polluted soils during a phytostabilization field experiment (Phytoperf project). In *Consoil 2010, 11th International UFZ- Deltares/TNO Conference on Management of Soil, Groundwater and Sediment*. Salzburg

Battaglia-Brunet F, Joulian C, Garrido F, Dictor MC, Morin D, Coupland K, Barrie Johnson D, Hallberg KB, Baranger P (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 99-108

Baubron JC. (2004) Tests analytiques d'un sol contaminé par des résidus de munitions au sud de Verdun (Meuse).

Bauer M, Blodau C (2006) Mobilization of arsenic by dissolved organic matter from iron oxides, soils and sediments. *Sci Total Environ* **354**: 179-190

Baumann K, Marschner P, Smernik RJ, Baldock JA (2009) Residue chemistry and microbial community structure during decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 1966-1975

Bausinger T, Bonnaire E, Preuss J (2007) Exposure assessment of a burning ground for chemical ammunition on the Great War battlefields of Verdun. *Science of The Total Environment* **382**: 259-271

Baykov AA, Tuominen HK, Lahti R (2011) The CBS Domain: A Protein Module with an Emerging Prominent Role in Regulation. *ACS Chemical Biology* **6**: 1156-1163

Becker M, Zweckmair T, Forneck A, Rosenau T, Potthast A, Liebner F (2013) Evaluation of Different Derivatisation Approaches for Gas Chromatographic-mass Spectrometric Analysis of Carbohydrates in Complex Matrices of Biological and Synthetic Origin. *Journal of Chromatography A* **1281**: 115-126

Benfeldt ES, Burger JA, Daniels WL (2001) Quality of amended mine soils after sixteen years. *Soil Sci Soc Am J* **65**: 1736-1744

Bernard L, Mougél C, Maron PA, Nowak V, Lévêque J, Henault C, Haichar F, Berge O, Marol C, Balesdent J, Gibiat F, Lemenceau P, Ranjard L (2007) Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³C labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology* **9**: 752-764

Bertrand H, Poly F, Van VT, Lombard N, Nalin R, Vogel TM, Simonet P (2005) High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods* **62**: 1-11

Bhumba DK, Keefer RF (1994) Arsenic mobilization and bioavailability in soils. In *Arsenic in the environment. Part I: cycling and characterization*, Nriagu JO (ed), pp 51–81. New York: John Wiley & Son

- Bingemann CW, Varner JE, Martin WP (1953) The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil. *Proceedings-Soil Science Society of America* **17**: 34-38
- Blagodatskaya EV, Blagodatsky SA, Anderson T-H, Kuzyakov Y (2007) Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology* **37**: 95-105
- Blagodatsky S, Blagodatskaya E, Yuyukina T, Kuzyakov Y (2010) Model of apparent and real priming effects: linking microbial activity with soil organic matter decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* **42**: 1275-1283
- Bodénan F, Baranger P, Lassin A, Piantone P, Braibant G (2001) Comportement biogéochimique de l'arsenic dans un ancien site minier (Chéni, France) - I. Suivi hydrogéochimique. In « *Industrie Minérale, Environnement* » pp 23-26. Paris, Ecole des Mines
- Bond GP, Martin J (2014) In *Encyclopedia of Toxicology*, Press/Elsevier, 3rd Edition, pp 110-111. London
- Branco R, Chung AP, Morais PV (2008) Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. *BMC Microbiology* **8**: 95
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T (2009) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* **74**: 280-286
- Bryan CG, Marchal M, Battaglia-Brunet F, Kugler V, Lemaitre-Guillier C, Lievremont D, Bertin PN, Arsene-Ploetze F (2009) Carbon and arsenic metabolism in Thiomonas strains: differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiology* **9**: 127
- Butcher BG, Rawlings DE (2002) The divergent chromosomal ars operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology* **148**: 3983-3992
- Buys BR, Mosquera-Corral A, Sanchez M, Mendez R (2000) Development and application of a denitrification test based on gas production. *Water Science and Technology* **41**: 113-120
- Campos VL, Valenzuela C, Yarza P, Kampfer P, Vidal R, Zaror C, Mondaca MA, Lopez-Lopez A, Rossello-Mora R (2010) *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Systematic and Applied Microbiology* **33**: 193-197
- Cancès B, Juillot F, Morin G, Laperche V, Alvarez L, Proux O, Hazemann J-L, Brown GE Jr, Calas G (2005) XAS evidence of As(V) association with iron oxyhydroxides in a contaminated soil at a former arsenical pesticide processing plant. *Environmental Science & Technology* **39**: 9398-9405

Cao X, Ma LQ (2004) Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. *Environmental Pollution* **132**: 435-442

Cao X, Ma LQ, Shiralipour A (2003) Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator, *Pteris vittata* *Environmental Pollution* **126**: 157-167

Casiot C, Morin G, Juillot F, Bruneel O, Personné J-C, Leblanc M, Duquesne K, Bonnefoy V, Elbaz-Poulichet F (2003) Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Research* **37**: 2929-2936

Caussy D (2003) Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**: 164-173

Cebon A, Arsene-Ploetze F, Bauda P, Bertin P, Billard P, Carapito C, Poirel J, Leyval C (2014) Impact of organic and metallic pollutants on functions and structure of the bacterial community from a heavily contaminated soil. *Microbial Ecology* **67**: 129-144

Challan-Belval S, Garnier F, Michel C, Chautard S, Breeze D, Garrido F (2009) Enhancing pozzolana colonization by As(III)-oxidizing bacteria for bioremediation purposes. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 565-573

Chantigny MH, Angers DA, Beauchamp CJ (2000) Decomposition of de-inking paper sludge in agricultural soils as characterized by carbohydrate analysis. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1561-1570

Chantigny MH, Angers DA, Rochette P (2002) Fate of carbon and nitrogen from animal manure and crop residues in wet and cold soils. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 509-517

Charlot G (1974) In *Chimie analytique quantitative*, Masson et Cie edn, Part II: Méthodes sélectionnées d'analyse chimique des éléments, pp 338-340. Paris

Chen M, Ma LQ, Harris WG (2002) Arsenic concentrations in Florida surface soils: Influence of soil type and properties. *Soil Science Society of America Journal* **66**: 632-640

Choong TSY, Chuah TG, Robiah Y, Gregory Koay FL, Azni I (2007) Arsenic toxicity, health hazards and removal techniques from water: an overview. *Desalination* **217**: 139-166

Cordi A, Pagnout C, Devin S, Poirel J, Billard P, Dollard MA, Bauda P (2015) Determination of physiological, taxonomic, and molecular characteristics of a cultivable arsenic-resistant bacterial community. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-014-3840-5

Cowan MM (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 564–582

Critter SAM, Freitas SS, Airoidi C (2001) Calorimetry versus respirometry for the monitoring of microbial activity in a tropical soil. *Applied Soil Ecology* **18**: 217-227

Cullen WR, Reimer KJ (1989) As speciation in environment. *Chemical Reviews* **89**: 713-764

Cytryn E, Kautsky L, Ofek M, Mandelbaum RT, Minz D (2011) Short-term structure and functional changes in bacterial community composition following amendment with biosolids compost. *Applied Soil Ecology* **48**: 160-167

Dapena-Mora A, Fernandez I, Campos JL, Mosquera-Corral A, Mendez R, Jetten MSM (2007) Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 859-865

Das S, Jean JS, Kar S, Chou ML, Chen CY (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of Hazardous Materials* **272**: 112-120

Delbès C, Godon JJ, Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Environmental Microbiology* **4**: 267-275

Delbès C, Moletta R, Godon JJ (2000) Monitoring of Activity Dynamics of an Anaerobic Digester Bacterial Community Using 16S rRNA Polymerase Chain Reaction-Single-strand Conformation Polymorphism Analysis. *Environmental Microbiology* **2**: 506-515

Demolon A, Leroux D (1952) *Guide pour l'étude expérimentale du sol*, Seconde édition.

Dixit S, Hering JG (2003) Comparison of Arsenic(V) and Arsenic(III) sorption onto iron oxide minerals: implications for arsenic mobility. *Environmental Science & Technology* **37**: 82-4189

Donahoe-Christiansen J, D'Imperio S, Jackson CR, Inskip WP, McDermott TR (2004) Arsenite-oxidizing *Hydrogenobaculum* strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1865-1868

Dong D, Ohtsuka T, Tao Dong D, Mamachi S (2014) Arsenite oxidation by a facultative chemolithoautotrophic *Sinorhizobium* sp. KGO-5 isolated from arsenic-contaminated soil. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **78**: 1963-1970

Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, Rettenmeier AW, Hirner AV (2004) Environmental distribution, analysis and toxicity of organometal(loid) compounds. *Critical Reviews in Toxicology* **34**: 1-33

Dowdle PR, Laverman AM, Oremland RS (1996) Bacterial dissimilatory reduction of arsenic(V) to arsenic(III) in anoxic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1664-1669

Drobna Z, Devesa V, Thomas DJ, Styblo M (2008) Mechanism of arsenic in human liver. In *2nd International Congress Arsenic in the Environment*, pp 431-432.

Dungait JAJ, Kemmitt SJ, Michallon L, Guo S, Wen Q, Brookes PC, Evershed RP (2013) The Variable Response of Soil Microorganisms to Trace Concentrations of Low Molecular Weight Organic Substrates of Increasing Complexity. *Soil Biology & Biochemistry* **64**: 57-64

Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, Muller D, Lett MC, Bonnefoy V (2008) Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp. : from the strain isolation to the gene study. *Environmental Microbiology* **10**: 228-237

Ellis PJ, Conrads T, Hille R, Kuhn P (2001) Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **9**: 125-132

Escarré J, Lefèbvre C, Raboyeau S, Dossantos A, Gruber W, Cleyet Marel JC, Frérot H, Noret N, Mahieu S, Collin C, van Oort F (2011) Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France): Implications for Soil Restoration. *Water, Air, & Soil Pollution* **216**: 485-504

Fahy A, Giloteaux L, Bertin P, Le Paslier D, Médigue C, Weissenbach J, Duran R, B. L. (2015) 16S rRNA and As-Related Functional Diversity: Contrasting Fingerprints in Arsenic-Rich Sediments from an Acid Mine Drainage. *Environmental Microbiology*. DOI 10.1007/s00248-014-0558-3

Ficklin WH (1983) Separation of arsenic(III) and arsenic(V) in ground waters by ion-exchange. *Talanta* **30**: 371-373

Fierer N, Bradford MA, Jackson RB (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354-1364

Fierer N, Nemergut D, Knight R, Craine JM (2010) Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* **161**: 635-642

Fischlin A, Midgley GF, Price J, Leemans R, Gopal B, Turley C, Rounsevell M, Dube P, Tarazona J, Velichko A (2007) Ecosystems, their properties, goods, and services. In *Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability*, Parry ML, Canziani, O. F., Palutikof, J. P., van der Linden, P. J. & Hanson, C. E. (ed), pp 211-272. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press

Fitz WJ, Wenzel WW (2002) Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology* **99**: 259-278

Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry* **35**: 837-843

Franchini JC, Gonzalez-Vila FJ, Cabrera F, Miyazawa M, Pavan MA (2001) Rapid transformations of plant water-soluble organic compounds in relation to cation mobilization in an acid Oxisol. *Plant and Soil* **231**: 55-63

Frérot H, Petit C, Lefèbvre C, Gruber W, Collin C, Escarré J (2002) Zinc and cadmium accumulation in controlled crosses between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*). *New phytologist* **157**: 643-648

Fuller CC, Davis JA, Waychunas GA (1993) Surface chemistry of ferrihydrite: Part 2. Kinetics of arsenate adsorption and coprecipitation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**: 2271-2282

Galende MA, Becerril JM, Barrutia O, Artexe U, Garbisu C, Hernandez A (2014) Field Assessment of the Effectiveness of Organic Amendments for Aided Phytostabilization of a Pb-Zn Contaminated Mine Soil. *Journal of Geochemical Exploration* **145**: 181-189

Garcia-Dominguez E, Mumford A, Rhine ED, Paschal A, Young LY (2008) Novel autotrophic arsenite-oxidizing bacteria isolated from soil and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 401-410

Gihring TM, Banfield JF (2001) Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiology Letters* **204**: 335-340

Gihring TM, Druschel GK, McCleskey RB, Hamers RJ, Banfield JF (2001) Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environmental Science & Technology* **35**: 3857-3862

Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J, Morel JL (2005) *Sols et environnement*: Imprimerie Chirat.

Gobat JM, Aragno M, Matthey W (1998) *Le sol vivant*, Vol. 14, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes edn.

Goldberg S (2002) Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxide and clay minerals. *Soil Science Society of America Journal* **66**: 413-421

Goldfarb KC, Karaoz U, Hanson CA, Santee CA, Bradford MA, Treseder KK, Wallenstein MD, Brodie EL (2011) Differential Growth Responses of Soil Bacterial Taxa to Carbon Substrates of Varying Chemical Recalcitrance. *Frontiers in Microbiology* **2**: 94

Grafe M, Eick MJ, Grossl PR, Saunders AM (2002) Adsorption of Arsenate and Arsenite on Ferrihydrite in the Presence and Absence of Dissolved Organic Carbon. *Journal of Environmental Quality* **31**: 1115-1123

Green HH (1918) Isolation and description of a bacterium causing oxidation of arsenite to arsenate in cattledipping baths. *Rep Dir Vet Res Union of South Africa* **6**: 593-599

Griffith SM, Schnitzer M (1976) The alkaline cupric oxide oxidation of humic and fulvic acids extracted from tropical volcanic soils. *Soil Science* **122**: 191-201

Halter D, Cordi A, Gribaldo S, Gallien S, Goulhen-Chollet F, Heinrich-Salmeron A, Carapito C, Pagnout C, Montaut D, Seby F, Van Dorsselaer A, Schaeffer C, Bertin PN, Bauda P, Arsène-Ploetze F (2011) Taxonomic and functional prokaryote diversity in mildly arsenic-contaminated sediments. *Research in Microbiology* **162**: 877-887

Hamer U, Marschner B (2002) Priming effects of sugars, amino acids, organic acids and catechol on the mineralization of lignin and peat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **165**: 261-268

Hanaoka K, Tagawa S, Kaise T (1991) Conversion of arsenobetaine to dimethylarsinic acid by arsenobetaine-decomposing bacteria isolated from coastal sediment. *Applied Organometallic Chemistry* **5**: 435-438

Hartley W, Dickinson NM, Riby P, Lepp NW (2009) Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environmental Pollution* **157**: 2654-2662

Heinrich-Salmeron A, Cordi A, Brochier-Armanet C, Halter D, Pagnout C, Abbaszadeh-fard E, Montaut D, Seby F, Bertin PN, Bauda P, Arsène-Ploetze F (2011) Unsuspected diversity of arsenite-oxidizing bacteria as revealed by widespread distribution of the *aoxB* gene in prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4685-4692

Hirano S, Kobayashi Y, Hayakawa T, Cui X, Yamamoto M, Kanno S, Shraim A (2004) Accumulation and toxicity of monophenyl arsenicals in rat endothelial cells. *Archives of Toxicology* **79**: 54-61

Hoelt SE, Kulp TR, Stolz JF, Hollibaugh JT, Oremland RS (2004) Dissimilatory Arsenate Reduction with Sulfide as Electron Donor: Experiments with Mono Lake Water and Isolation of Strain MLMS-1, a Chemoautotrophic Arsenate Respirer. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2741-2747

Holwerda E, Hirst K, Lynd L (2012) A defined growth medium with very low background carbon for culturing *Clostridium thermocellum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**: 943-947

Huang H, Jia Y, Sun GX, Zhu YG (2012) Arsenic speciation and volatilization from flooded paddy soils amended with different organic matters. *Environmental Science & Technology* **46**: 2163-2168

Huang PM, Wang MK, Chiu CY (2005) Soil mineral-organic matter-microbe interactions: impacts on biogeochemical processes and biodiversity in soils. *Pedobiologia* **49**: 609-635

Hughes MF (2002) As toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* **133**: 1-16

Ilyaletdinov AN, Abdrashitova SA (1981) Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologiya* **50**: 197-204

Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, Warelow TP, Ward SA, Santini JM (2007) Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology* **9**: 934-943

Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2761-2764

Jia Y, Huang H, Zhong M, Wang F-H, Zhang L-M, Zhu Y-G (2013) Microbial Arsenic Methylation in Soil and Rice Rhizosphere. *Environmental Science & Technology* **47**: 3141-3148

Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes CJ, Valko M (2011) Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology* **31**: 95-107

Jones DL, Willet VB (2006) Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **9**: 991-999

Kashyap DR, Botero LM, Franck WL, Hassett DJ, McDermott TR (2006) Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **188**: 1081-1088

Kästner M, Mahro B (1996) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Applied Microbiology and Biotechnology* **44**: 668-675

Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Yamazaki S, Haikawa Y, Jin-no K, Takahashi M, Sekine M, Baba S, Ankaï A, Kosugi H, Hosoyama A, Fukui S, Nagai Y, Nishijima K, Nakazawa H, Takamiya M, Masuda S, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Kikuchi H, et al. (1999) Complete genome

sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Research* **6**: 83-101, 145-152

Kim EJ, Hwang BR, Baek K (2015) Effects of natural organic matter on the coprecipitation of arsenic with iron. *Environmental Geochemistry and Health*, DOI 10.1007/s10653-015-9692-1.

Ko I, Kim JY, Kim KW (2004) Arsenic speciation and sorption kinetics in the As-hematite-humic acid system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **234**: 43-50

Koechler S, Arsène-Ploetze F, Brochier-Armanet C, Goulhen-Chollet F, Heinrich-Salmeron A, Jost B, Lièvreumont D, Philipps M, Plewniak F, Bertin PN, Lett M-C (2015) Constitutive arsenite oxidase expression detected in arsenic-hypertolerant *Pseudomonas xanthomarina* S11. *Research in Microbiology* **166**: 205-214

Koechler S, Cleiss-Arnold J, Proux C, Sismeiro O, Dillies MA, Goulhen-Chollet F, Hommais F, Lievreumont D, Arsène-Ploetze F, Coppee JY, Bertin PN (2010) Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *BMC Microbiology* **10**: 53

Kumar N, Millot R, Battaglia-Brunet F, Nègre P, Diels L, Rose J, Bastiaens L (2013) Sulfur and Oxygen Isotope Tracing in Zero Valent Iron Based In situ Remediation System for Metal Contaminants. *Chemosphere* **90**: 1366-1371

Kuzyakov Y (2010) Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 1363-1371

L'Hopitault JC, Pommery J (1982) Le pouvoir complexant de différentes fractions de matières humiques vis-à-vis des pesticides et des métaux. *Sciences de l'Eau* **1**: 85-92

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985) Rapid determination of 16S ribosomal sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**: 6955-6959

Langer U, Böhme L, Böme F (2004) Classification of soil microorganisms based on growth properties : a critical view of some commonly used terms. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **167**: 267-269

Laperche V, Bodéan F, Dictor MC, Baranger P (2003) Guide méthodologique de l'arsenic, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR, 90 p., 5 fig., 10 tabl., 3 ann.

Larney FJ, Angers DA (2012) The Role of Organic Amendments in Soil Reclamation: A Review. *Canadian Journal of Soil Science* **92**: 19-38

- Laverman AM, Blum JS, Schaeffer JK, Philips EJP, Lovley DR, Oremland RS (1995) Growth of strain SES-3 with arseniate, other diverse electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3556-3561
- Lee J-U, Lee S-W, Kim K-W, Yoon C-H (2005) The effects of different carbon sources on microbial mediation of arsenic in arsenic-contaminated sediment. *Environmental Geochemistry and Health* **27**: 159-168
- Lett MC, Muller D, Lievreumont D, Silver S, Santini J (2012) Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *Journal of Bacteriology* **194**: 207-208
- Liebich J, Vereecken H, Burauel P (2006) Microbial community changes during humification of ¹⁴C-labelled maize straw in heat-treated and native Orthic Luvisol. *European Journal of Soil Science* **57**: 446-455
- Lieutaud A, van Lis R, Duval S, Capowicz L, Muller D, Lebrun R, Lignon S, Fardeau ML, Lett MC, Nitschke W, Shoep-Cothenet B (2010) Arsenite oxidase from *Ralstonia* sp. 22: characterization of the enzyme and its interaction with soluble cytochromes. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 2433-2441
- Lin S, Cullen WR, Thomas DJ (1999) Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chemical Research in Toxicology* **12**: 924-930
- Lindahl V (1996) Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *Journal of Microbiological Methods* **25**: 279-286
- Lindahl V, Bakken LR (1995) Evaluation of Methods for Extraction of Bacteria from Soil. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 135-142
- Liu G, Liu M, Kim E-H, Maaty WS, Bothner B, Lei B, al. e (2012) A periplasmic arsenite-binding protein involved in regulating arsenite oxidation. *Environmental Microbiology* **14**: 1624-1634
- López-Maury L, Florêncio FJ, Reyes JC (2003) Arsenic sensing and resistance system in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* **185**: 5363-5371
- Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**: 445-448
- Lundquist E, Jackson LE, Scow K, Hsu C (1999) Changes in microbial biomass and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* **31**: 221-236

Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Sloma E, Migocka M, Wysocki R (2010) The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* **1798**: 2170-2175

Macur RE, Jackson CR, Botero LM, McDermott T, Inskip WP (2004) Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environmental Science & Technology* **38**: 104-111

Macy JM, Nunan K, Hagen KD, Dixon DR, Harbour PF, Cahill M, Sly LI (1996) *Chrysiogenes arsenatis*, gen nov., sp. nov., a new arseniate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 1153-1157

Manlay RJ, Feller C, Swif MJ (2007) Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **119**: 217-233

Mench M, Bussiere S, Boisson J, Castaing E, Vangronsveld J, Ruttents A, De Koe T, Bleeker P, Assuncao A, Manceau A (2003) Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in situ treatment. *Plant and Soil* **249**: 187-202

Mercier A, Wille G, Michel C, Harris-Hellal J, Amalric L, Morlay C, Battaglia-Brunet F (2013) Biofilm formation vs PCB adsorption on granular activated carbon in a PCB contaminated aquatic sediment. *Journal of Soils and Sediments* **13**: 793-800

Metting FBJ (1993) *Soil Microbial Ecology*, New York: Marcel Dekker Inc.

Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L (2009) StatFingerprints: A Friendly Graphical Interface Program for Processing and Analysis of Microbial Fingerprint Profiles. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1359-1363

Mohamed I, Ahamadou B, Li M, Gong C, Cai P, Liang W, Huang Q (2010) Fractionation of copper and cadmium and their binding with soil organic matter in a contaminated soil amended with organic materials. *Journal of Soils and Sediments* **10**: 973-982

Mondini C, Cayuela ML, Sanchez-Monedero MA, Roig A, Brookes PC (2006) Soil Microbial Biomass Activation by Trace Amounts of Readily Available Substrate. *Biology and Fertility of Soils* **42**: 542-549

Moore JC, Berlow EL, Coleman DC, de Ruiter PC, Dong Q, Hastings A, Collins Johnson JC, McCann KS, Melville K, Morin PJ, Nadelhoffer K, Rosemond AD, Post DM, Sabo JL, Scow KM, Vanni MJ, Wall DH (2004) Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* **7**: 584-600

Morin G, Lecocq D, Juillot F, Calas G, Ildefonse P and eight authors (2002) EXAFS evidence of sorbed arsenic(V) and pharmacosiderite in a soil overlying the Echassieres geochemical anomaly, Allier, France. *Bulletin de la Société Géologique de France* **173**: 281-291

- Morin G, Calas G (2006) Arsenic in soils, mine tailings and former industrial sites. *Elements* **2**: 97-101
- Muller D, Lievremont D, Simeonova DD, Hubert JC, Lett MC (2003) Arsenite Oxidase *aox* Genes from a Metal-Resistant-Proteobacterium. *Journal of Bacteriology* **185**: 135-141
- Muller D, Medigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsene-Ploetze F, Carapito C, Chandler M, Cournoyer B, Cruveiller S, Dossat C, Duval S, Heymann M, Leize E, Lieutaud A, Lievremont D, Makita Y, Mangenot S, Nitschke W, Ortet P, Perdrial N, Schoepp B, Siguier P, Simeonova DD, Rouy Z, Segurens B, Turlin E, Vallenet D, Van Dorsselaer A, Weiss S, Weissenbach J, Lett MC, Danchin A, Bertin PN (2007) A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genetics* **3**: 518-530
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**: 655-670
- Newman DK, Beveridge TJ, Morel FMM (1997) Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2022-2028
- Neyt C, Iriarte M, Thi V, Cornelis G (1997) Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *Journal of Bacteriology* **179**: 612-619
- Nicolardot B, Bouziri L, Bastian F, Ranjard L (2007) A Microcosm Experiment to Evaluate the Influence of Location and Quality of Plant Residues on Residue Decomposition and Genetic Structure of Soil Microbial Communities. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 1631-1644
- Odum EP (1969) The strategy of ecosystem development. *Science* **164**: 262-270
- Ona-Nguema G, Morin G, Juillot F, Brown GE JR, Calas G (2005) EXAFS analysis of Arsenic(III) sorption onto 2-line ferrihydrite, hematite, goethite, and lepidocrocite under anoxic conditions. Influence of the surface structure. *Environmental Science and Technology* **39**: 9147-9155
- Oremland RS, Hoefl SE, Santini JM, Bano N, Hollibaugh RA, Hollibaugh JT (2002) Anaerobic Oxidation of Arsenite in Mono Lake Water and by a Facultative, Arsenite-Oxidizing Chemoautotroph, Strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4795-4802
- Oremland RS, Stolz JF (2003) The ecology of arsenic. *Science* **300**: 939-944

Oremland RS, Switzer Blum J, Culbertson CW, Visscher PT, Miller LG, Dowdle P, Strohmaier FE (1994) Isolation, growth, metabolism of an obligatory anaerobic selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 3011-3019

Osborne TH, Heath MD, Martin ACR, Pankowski JA, Hudson-Edwards KA, Santini JM (2013) Cold-adapted arsenite oxidase from a psychrotolerant *Polaromonas* species. *Metallomics* **5**: 318-324

Paik MJ, Kim KR (2004) Sequential Ethoxycarbonylation, Methoximation and Tert-butyldimethylsilylation for Simultaneous Determination of Amino Acids and Carboxylic Acids by Dual-column Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1034** 13–23

Pardo T, Bernal MP, Clemente R (2014a) Efficiency of soil organic and inorganic amendments on the remediation of a contaminated mine soil: I. Effects on trace elements and nutrients solubility and leaching risk. *Chemosphere* **107**: 121-128

Pardo T, Clemente R, Alvarenga P, Bernal MP (2014b) Efficiency of soil organic and inorganic amendments on the remediation of a contaminated mine soil: II. Biological and ecotoxicological evaluation. *Chemosphere* **107**: 101-108

Pascaud A, Amellal S, Soulas ML, Soulas G (2009) A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. *Journal of Microbiological Methods* **76**: 81-87

Pascault N (2010) Réponse des communautés microbiennes du sol à l'apport de résidus de culture : influence des pratiques agricoles et lien avec le fonctionnement biologique du sol. UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement (MSE), INRA, UFR des Sciences de la Terre et de l'Environnement, Université de Bourgogne,

Paul E, Clark F (1996) *Soil Microbiology and Biochemistry*. pp 69-74. San Diego: Academic Press

Pérez-de-Mora A, Burgos P, Madejon E, Cabrera F, Jaekel P, Schlöter M (2006) Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals : effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 327-341

Poirel J, Joulian C, Leyval C, Billard P (2013) Arsenite-induced changes in abundance and expression of arsenite transporter and arsenite oxidase genes of a soil microbial community. *Research in Microbiology* **164**: 457-465

Poll C, Brune T, Begerow D, Kandeler E (2010) Small-scale diversity and succession of fungi in the detritosphere of rye residues. *Microbial Ecology* **59**: 130-140

Qin J, Rosen BP, Zhang Y, Wang G, Franke S, Rensing C (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**: 2075-2080

Quéméneur M (2008) Les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'arsenic : recherche de bioindicateurs. Thèse de doctorat d'université. Thesis, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), UMR 7137 CNRS, Université Henri Poincaré de Nancy,

Quéméneur M, Cébron A, Billard P, Battaglia-Brunet F, Garrido F, Leyval C, Joulian C (2010) Population structure and abundance of arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the upper isle River Basin, France. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4566-4570

R Development Core Team (2008) R: A Language and Environment Statistical Computing. In *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria

Redman AD, Macalady DL, Ahmann D (2002) Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environmental Science & Technology* **36**: 2889-2896

Reischke S, Rousk J, Bååth E (2014) The effects of glucose loading rates on bacterial and fungal growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **70**: 88-95

Rey A, Petsikos C, Jarvis PG, Grace J (2005) Effect of temperature and moisture on rates of carbon mineralization in a Mediterranean oak forest soil under controlled and field conditions. *European Journal of Soil Science* **56**: 589-599

Rhine ED, Phelps CD, Young LY (2006) Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environmental Microbiology* **8**: 899-908

Rocha JC, Sargentini J, Ezio, Zara LF, Rosa AH, dos Santos A, Burba P (2003) Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro)--Part II. Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur). *Talanta* **61**: 699-707

Rodríguez Vaquero MJ, Alberto MR, Manca de Nadra MC (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **18**: 93-101

Rosen BP (1999) Families of arsenic transporters. *Trends in Microbiology* **7**: 207-212

Rosen BP (2002(a)) Biochemistry of As detoxification. *FEBS Letters* **529**

Rosen BP, Marakapala K, Ajees AA, Yoshinaga M (2014) Arsenic biotransformations: the cycle of arsenic methylation and demethylation. In *One century of the Discovery of arsenicosis in Latin America (1914-2014)*, pp 309-311. Buenos Aires, Argentina

Rossmann TG (2003) Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research* **533**: 37-66

Rousk J, Brookes PC, Bååth E (2011). Fungal and bacterial growth response to N fertilization and pH in the 150-year „Park Grass“ UK grassland experiment. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 89-99

Saada A, Breeze D, Crouzet C, Cornu S, Baranger P (2003) Adsorption of arsenic (V) on kaolinite and on kaolinite-humic acid complexes. *Chemosphere* **51**: 757-763

Salmassi TM, Venkateswaran K, Satomi M, Neilson K, Newman DK, Hering JG (2002) Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni* AOL15, sp. Nov., isolated from hot creek California. *Geomicrobiology Journal* **19**: 53-66

Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, Macy JM (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine : phylogenetic, physiological, preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 92-97

Santini JM, Sly LI, Wen A, Comrie D, Wulf-Durand PD, Macy JM (2002) New Arsenite-Oxidizing Bacteria Isolated from Australian Gold Mining Environments-Phylogenetic Relationships. *Geomicrobiology Journal* **19**: 67-76

Santini JM, van den Hoven RN (2004) Molybdenum-Containing Arsenite Oxidase of the Chemolithoautotrophic Arsenite Oxidizer NT-26. *Journal of Bacteriology* **186**: 1614-1619

Sato T, Kobayashi Y (1998) The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *Journal of Bacteriology* **180**: 1655-1661

Senko JM, Wanjugi P, Lucas M, Bruns MA, Burgos WD (2008) Characterization of Fe(II) oxidizing bacterial activities and communities at two acidic Appalachian coalmine drainage-impacted sites. *ISME Journal* **2**: 1134-1145

Shariatpahani M, Anderson AC, Abdelghani AA, Englande AJ (1983) Microbial metabolism of an organic arsenical herbicide. In *5th International Biodeterioration Symposium*, pp 268-277. Aberdeen

Shariatpahani M, Anderson AC, Abdelghani AA, Englande AJ, Hugues J, Wilkinson RF (1981) Biotransformation of the pesticide sodium arseniate. *Journal of Environmental Science and Health B* **16**: 35-47

Shi H, Shi X, Liu KJ (2004) Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and cellular biochemistry* **255**: 67–78

Shibu ME, Leffelaar PA, Van Keulen H, Aggarwal PK (2006) Quantitative description of soil organic matter dynamics - A review of approaches with reference to rice-based cropping systems. *Geoderma* **137**: 1-18

Shiralipour A, Ma L, Cao R. (2002) Effects of compost on arsenic leachability in soils and arsenic uptake by a fern. Florida Centre for Solid Hazardous Waste Management. State University System of Florida, Gainesville, Florida.

Silver S, Phung LT (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 599-608

Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. *Nature* **163**: 688-688

Slyemi D, Bonnefoy V (2012) How prokaryotes deal with arsenic. *Environmental Microbiology Reports* **4**: 571-586

Smedley PL, Kinniburgh DG (2002) A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* **17**: 517-568

Smith E, Naidu R, Alston MM (1998) Arsenic in the soil environment: a review. *Advances in Agronomy* **64**: 149-195

Song W, Kim M, Adams JM (2015) Predictable communities of soil bacteria in relation to nutrient concentration and successional stage, in a laboratory culture experiment. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.12879

Spuches AM, Kruszyna HG, Rich AM, Wilcox DE (2005) Thermodynamics of the AsIII-thiol interaction: arsenite and monomethylarsenite complexes with glutathione, dihydrogluconic acid and other thiol ligands. *Inorganic Chemistry* **44**: 2964-2972

Strobel BW (2000) Influence of Vegetation on Low-molecular-weight Carboxylic Acids in Soil Solution- A Review. *Geoderma* **99**: 169-198

Stubner S, Wind T, Conrad R (1998) Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **21**: 569-578

Su S, Zeng X, Bai L, Li L, Duan R (2011) Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1. *Science of The Total Environment* **409**: 5057-5062

Tamaki S, Frankenberger WTJ (1992) Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of environmental contamination, toxicology* **124**: 79-110

Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001) The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* **176**: 127-144

Thomas P, Finnie JK, Williams JG (1997) Feasibility of identification and monitoring of arsenic species in soil and sediment samples by coupled high-performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **12**

Tisa LS, Rosen BP (1990) Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 190-194

Turner AW, Legge JW (1954) Bacterial oxidation of arsenite. II. Description of bacteria isolated from cattle-dipping fluids. *Australian Journal of Biological Sciences* **7**: 452-478

Valentin-Vargas A, Root RA, Neilson JW, Chorover J, Maier RM (2014) Environmental factors influencing the structural dynamics of soil microbial communities during assisted phytostabilization of acid-generating mine tailings: a mesocosm experiment. *Science of the Total Environment* **500-501**: 314-324

Van Der Lee J, Van Der Ree J, Ledoux E (1997) Modélisation du comportement géochimique et du transport des radionucléides en présence de colloïdes. Ecole Nationale Supérieure des Mines, Paris, France

van Gestel M, Merckx R, Vlassak K (1993) Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: the fate of fast- and slow-growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 109-123

Vanden Hoven RN, Santini JM (2004) Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14, the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1656**: 148-155

Vergara Gallardo M, Bohari Y, Astruc A, M. P-G, Astruc M (2001) Speciation analysis of arsenic in environmental solids reference materials by high-performance liquid-chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry following orthophosphoric acid extraction. *Analytica Chimica Acta* **441**: 257-268

Walsh LM, Keeney DR (1975) Behavior and phytotoxicity of inorganic arsenicals in soils. In *ACS Symposium Series 7*, Vol. 7, pp 35-52. Washington DC

Weeger W, Lièvreumont D, Perret M, Lagarde F, Hubert JC, Leroy M, Lett MC (1999) Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals* **12**: 141-149

Weisburg W, Barns SM, Pelletier DA, Lane DL (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic studies. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703

Whittinghill KA, Hobbie SE (2012) Effects of pH and calcium on soil organic matter dynamics in Alaskan tundra. *Biogeochemistry*, **111**: 569-581

Yamamura S, Watanabe M, Yamamoto N, Sei K, Ike M (2009) Potential for microbially mediated redox transformations and mobilization of arsenic in uncontaminated soils. *Chemosphere* **77**: 169-174

Yang H-C, Cheng J, Finan TM, Rosen BP, Bhattacharjee H (2005) Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **187**: 6991-6997

Zargar K, Conrad A, Bernick DL, Lowe TM, Stolc V, Hoefft S, Oremland RS, Stolz J, Saltikov CW (2012) ArxA, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environmental Microbiology* **14**: 1635-1645

Zech W, Senesi N, Guggenberger G, Kaiser K, Lehmann J, Miano TM, Miltner A, Schroth G (1997) Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma* **79**: 117-161

Zhang Y, Kallay N, Matijevic E (1985) Interaction of metal hydrous oxides with chelating agents. 7. hematite-oxalic acid and -citric acid systems. *Langmuir* **1**: 201-206

Zumstein E, Moletta R, Godon JJ (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**: 69-78

ANNEXES

Annexe 1 : Design d'amorces *arsC*

Après alignement des séquences protéiques ArsC provenant de *Thiomonas* sp. CB2, *Thiomonas* sp. 3As et *Herminiimonas arsenicoxydans*, deux régions conservées ont été identifiées : l'une d'elle est longue de 37 acides aminés et débute au 10^{ème} ou au 24^{ème} acide aminé, tandis que la seconde, longue de 48 acides aminés, est située entre les acides aminés 25 et 72 (5).

Tableau . Exemple de résultats issus de Block Maker à partir des dix séquences *arsC*

Block B		
Thiomonas sp. str. 3As arsC1	10	YNVLVLCTGNSARSIMGEGTLNLTGKGRFKAYSAGSH
Thiomonas sp. str. 3As_arsC2a	25-72	KSWDSXXLPVTPXXDIVITVCASAAGETCPAYLGPVLRHAWGVDDPAK
Thiomonas sp. str. 3As_arsC2b	25-72	KSWTEFAAPDAPSMDFIFTVCDQAAGEACPAWPGQPITAHWGFADPAA
Thiomonas sp. CB2_arsC	25-72	KSWDEFATPDAPQMDVFVTVCDKAAGETCPWPGHPMTAHWGFEDPAA
Herminiimonas arsenicoxydans arsC1	25-72	KSWDEYALPDAPKMDFIITVCDNAAGEVCPVWPGQPVSAHWGFEDPAA
Herminiimonas arsenicoxydans arsC2a	25-72	KSWDEFALPDAPHMDIVITVCDNAAGEVCPFVWPGQPVSAHWGFEDPAA
Herminiimonas arsenicoxydans arsC2b	14-75	XXXXXXKGYAELGLDNPQLSDDALIEAMLANPILINRXXXXPFVVAD
Herminiimonas arsenicoxydans arsC3a	14-75	XXXXXXKGYAELGLDQKWSDEQLIDFMLQHPILINRXXXXPIVVTP
Herminiimonas arsenicoxydans arsC3b	25-72	KSWDEFVAPGAPVDFVDFVTVCDNAAGEACPLWPGKPVSAHWGVDPDPA
Herminiimonas arsenicoxydans arsC4	25-72	KSWDEFAAPDAPHMDFIITVCDNAAGEVCPWPGHPHTSAHWGFEDPAA

Le motif d'acides aminés conservé entre les dix séquences protéiques ArsC des trois souches peut être représenté par un logo (Figure 23).

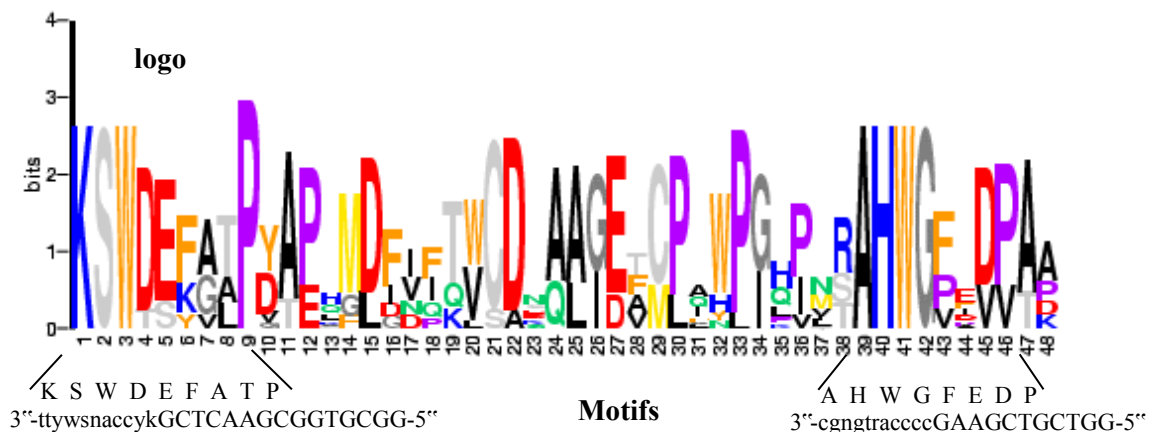


Figure . Représentation « Logo » des dix séquences protéiques ArsC sélectionnées (généré sur le site de Block Maker : <http://blocks.fhrc.org/>).

Deux exemples d'amorces CODEHOP et les motifs à partir duquel elles ont été dessinées sont indiqués.

À partir de la deuxième région conservée, deux amorces sens et quatre amorces anti-sens ont été générées par le programme CODEHOP (Figure 24)

Motif	P G H P N R A H W G
Oligo	5'-GGCCGGGTCATCCTATGAGngncaytggg-3'
Motif	G H P N R A H W G
Oligo	5'-CGGGTCATCCTATGAGGgncaytgggg-3'
Motif	K S W D E F A T P
Oligo	3''-ttywsnaccykGCTCAAGCGGTGCGG-5''
Motif	A H W G F E D P
Oligo	3''-cgngtraccccGAAGCTGCTGG-5''
Motif	H W G F E D P A
Oligo	3''-gngtraccccnvAGCTGCTGGGCCGT-5''
Motif	H W G F E D P A A
Oligo	3''-gtraccccnvrGCTGCTGGGCCGTGCG-5''

Figure . Exemple d'amorces proposées par le programme CODEHOP et séquences d'acides aminés à partir desquelles elles ont été dessinées

Annexe 2. Test de toxicité aigüe de la SMOM

Acute toxicity assessment was performed in triplicate on the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri*. The experimental procedure was carried out according to ISO Standard 11348-3:1998. Freeze-dried bacterial strain was obtained from Strategic Diagnostics, Inc. and stored at -20°C until use. The bioluminescence variation was determined using a microtox Analyser M500 (Microbics Corporation, USA). All assays were performed with a final NaCl concentration of 2%, as recommended to reach optimal osmotic conditions for *V. fischeri*. Reliability of the method and reagent sensitivity was ensured by determination of Zn²⁺ toxicity, prior to beginning sample tests. IC50 of Zn²⁺ was measured at 2.2 mg L⁻¹, as per ISO standard. The exposure times chosen were 5, 15 and 30 minutes.

An important step for this study was to ensure that the mixture of organic molecules does not exert a toxic effect on microbial communities. As phenolic acids, in particular, are potentially toxic for bacteria, it was crucial to get a rapid response as to a possible acute toxic effect of the "cocktail" of organic compounds. The bioluminescent bacterial strain *V. fischeri* was chosen as a model, with Microtox® bioassay, an acute toxicity assessment based on inhibition of bioluminescence emission. This test is commonly used for a wide range of applications, including ecotoxicity, evaluation of toxin-containing samples, industrial effluents, industrial process waters, municipal effluents, hazardous wastes, soils, sediments and medical products (Bond and Martin, 2014). The Microtox® procedure is thus suitable for complex inorganic and/or organic sample toxicity assessment.

Results of Microtox® acute toxicity bioassay obtained for the SMOM did not show significant inhibition of bioluminescence at any concentration tested (0, 0.09, 0.45, 2.25, 4.5 and 9% volume).

Annexe 3 : Comparaison des compositions de l'extrait de levure et du mélange synthétique de matières organique (SMOM)

Extrait de levure		SMOM		
Composition chimique (g pour 100 g)				
azote total	10,7 - 12,2	1,2		
acides aminés	5,2 - 6,7	7,1		
protéines	66,8 - 76,3	7,8		
sucres	2,0 - 6,0	3,0		
Composition en acides aminés				
	g pour 100 g total	% des protéines	g pour 100 g total	% des protéines
alanine	0,5	8,8	-	-
arginine	0,3	5,1	1,4	19,5
ac. aspartique	0,6	9,9	1,1	15,2
cystéine	0,1	0,9	-	-
glutamine	1,0	16,3	1,3	18,6
glycine	0,3	4,8	0,5	7,2
histidine	0,1	2,1	0,1	2,1
isoleucine	0,3	5,5	0,3	4,6
leucine	0,5	7,6	0,4	5,6
lysine	0,5	8	-	-
méthionine	0,1	1,4	0,1	1,6
phénylalanine	0,2	3,7	0,2	3,5
proline	0,2	4	-	-
sérine	0,3	4,6	0,6	7,9
thréonine	0,3	4,3	0,2	2,5
tyrosine	0,1	2,4	0,2	2,5
tryptophane	0,1	1,3	-	-
valine	0,4	5,9	0,6	9,1
Composition en matériaux inorganiques (dans 100 g)				
soufre	0,05		0,02	
potassium	4,5 - 6,8		-	
sodium	< 0,4		0,7	
magnésium	< 0,1		-	
calcium	< 0,1		0,4	
phosphore	1,0 - 2,0		-	
Métaux (mg.kg⁻¹ de MS)				
arsenic	< 0,50		-	
cadmium	< 0,10		-	
mercure	< 0,05		-	
plomb	< 0,20		-	
sélénium	< 0,10		-	
zinc	< 90,00		-	
Composition en vitamines (en mg.kg⁻¹ de MS):				
B1 (thiamine)	100 - 120		-	

B2 (riboflavine)	80 - 120	-
B5 (acide pantothénique)	120 - 200	-
B6 (pyridoxine)	60 - 80	-
PP (niacine)	900 - 1100	-
B12 (cyanocobalamine) (mg.kg ⁻¹)	5 à 15	-
Composition en acides organiques (g pour 100 g)		
acide oxalique	-	0.270
acide succinique	-	6.259
acide acétique	-	1.862
acide formique	-	1.262
acide citrique	-	1.681
acide tartrique	-	2.991
acide férulique	-	0.388
acide p-coumarique	-	0.164
acide vanillique	-	1.345
acide 4-hydroxybenzoïque	-	0.691
acide gallique	-	0.941
acide protocatéchique	-	1.016
catéchine	-	0.455
rutine	-	3.663

Annexe 4 : Expériences témoins

1. Méthodes

a. Témoins sans sol

L'objectif de cette expérience était de déterminer l'influence abiotique de substrats organiques (extrait de levure et mixture) sur l'AsV analysé dans le milieu.

Des milieux stériles ont été préparés avec 10 g d'extrait de levure, 0,2, 1 et 10 g.L⁻¹ de mixture, tous ces milieux contenant 75 mg.L⁻¹ d'AsIII. La concentration en AsV dans ces milieux a été déterminée à T0 et après 15 jours d'incubation à 25°C en condition statique.

b. Témoins avec sol autoclavé + extrait de levure

Cinq g de chaque sol ont été déposés dans des flacons pénicilline, et autoclavés (120 °C, 40 min) à 4 reprises, à 24 h d'intervalle. Entre chaque autoclavage, les sols ont été protégés de la dessiccation par du parafilm. Cent millilitres de milieu de culture CAsO1 contenant 0, 1 ou 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure ont été inoculés à raison de l'équivalent en sol autoclavé de 0,2 g de sol sec.

Ces témoins abiotiques devaient permettre de confirmer que l'oxydation de l'AsIII dans les essais était bien due à l'activité de la microflore des sols, et non à des processus abiotiques (adsorption sur les particules du sol, oxydation abiotique de l'AsIII par les matières organiques). L'expérience a été réalisée en triplicat.

c. Témoins avec sol autoclavé + mixture

Les cinétiques ont été réalisées à une concentration en carbone organique équivalente à celle obtenue à 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure, c'est-à-dire 0,08 g.L⁻¹ de carbone organique. Cela revient à mettre 12,45 mL de mixture par litre de milieu normal.

Les cinétiques ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL. Les sols, à raison de 0,2 g de sol équivalent sec, ont été pesés dans les erlenmeyers. Les témoins abiotiques ont été préparés pour évaluer l'oxydation de l'AsIII en présence de sol autoclavé sans microorganisme actif.

Les erlenmeyers contenant les sols sont autoclavés 4 fois à 120°C pendant 1 heure, à 24 h d'intervalle. Ensuite, 100 mL de milieu stérile contenant 75 mg.L⁻¹ d'AsIII sont versés dans chaque erlenmeyer.

Les prélèvements sont stockés à -20°C pour éviter toute oxydation. Ensuite, les erlenmeyers sont incubés 1 semaine à 25°C sous agitation réciproque. Des prélèvements sont effectués à T0 et T7 jours.

2. Résultats des expériences témoin

a. Témoins abiotiques sans sol

Les résultats de l'expérience abiotique sans sol sont donnés dans le Tableau 6 suivant :

Tableau . Résultats de l'expérience abiotique sans sol : concentrations en AsV analysées à t0 et t final.

Milieu	AsV mg.L ⁻¹	AsV mg.L ⁻¹	AsV mg.L ⁻¹
	T0 (non dilué)	T0 (dilué ½)	T final
Extrait de levure 10 g.L ⁻¹	2	9	12
SMOM 10 g.L ⁻¹	32	8	65
SMOM 1 g.L ⁻¹	0	-	10
SMOM 0,2 g.L ⁻¹	0,17	-	2

Les observations microscopiques (état frais) ont confirmé que tous les flacons sont restés stériles (pas de contamination) et pourtant, une oxydation abiotique de l'AsIII en AsV a été observée, en particulier avec 10 g.L⁻¹ de SMOM, dès le prélèvement à T0. Il est possible que la mixture ait oxydé l'AsIII par une réaction chimique, ou bien qu'elle gêne la séparation de l'AsIII et de l'AsV par la PDC et la MIBK. Pour tester cette hypothèse, une spéciation de l'arsenic a été réalisée sur des prélèvements dilués au ½ dans l'eau à T0. Avec ces échantillons dilués, la concentration en AsV est moins élevée qu'avec les échantillons purs pour la SMOM.

Jusqu'à 1 g.L⁻¹, l'oxydation abiotique de l'AsIII par l'extrait de levure et par la SMOM est négligeable par rapport à l'oxydation en présence de microflore de sols. Par la suite, la concentration maximale utilisée au cours des expériences n'était pas supérieure à 1 g.L⁻¹.

b. Témoins abiotiques avec sol

En présence d'extrait de levure

La Figure présente les résultats obtenus avec tous les sols aux trois concentrations en extrait de levure.

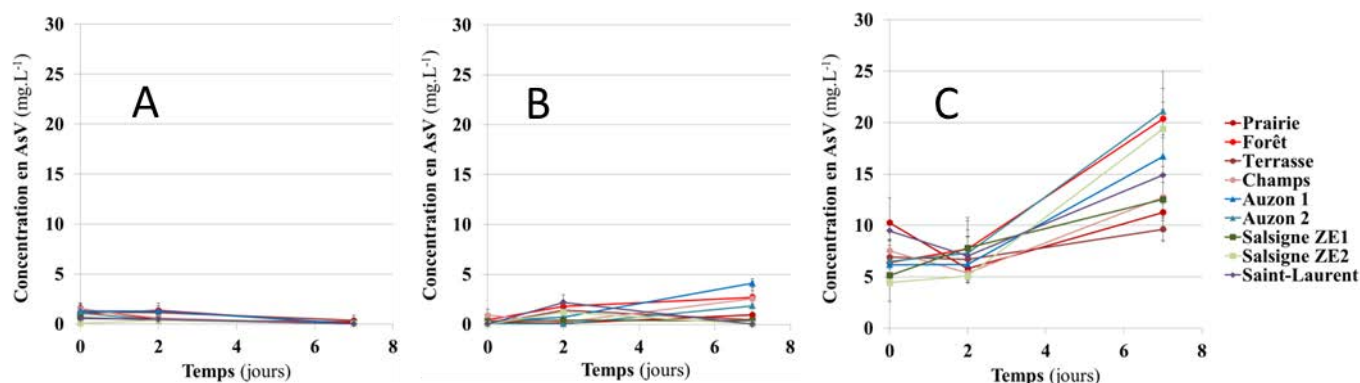


Figure . Graphiques obtenus en conditions abiotiques.

Concentration en extrait de levure : A : 0 g.L⁻¹ ; B : 1 g.L⁻¹ ; C : 10 g.L⁻¹.

Aucune oxydation n'a été observée dans les milieux sans extrait de levure. La variation de la concentration en AsV n'est pas significative et correspond au bruit de fond du spectromètre d'absorption atomique. Dans les essais à 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure, une légère augmentation de la teneur en AsV a pu avoir lieu après une semaine d'incubation dans certains sols mais ces valeurs ne sont pas réellement significatives. Il pourrait y avoir eu une oxydation de l'As^{III}, de l'ordre de 3-4 mg.L⁻¹.

A 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure, lors d'une première expérience, certains erlenmeyers étaient contaminés et l'As^{III} a été oxydé. Il est probable que des spores de bactéries présentes dans les sols aient résisté aux 4 autoclavages précédents et que la forte concentration en extrait de levure ait eu pour effet de les réactiver. Un cinquième autoclavage des sols, plus long et à plus haute température (1 h, 130 °C), a été réalisé. L'expérience a été recommencée et cette fois, aucune croissance bactérienne n'a été détectée pendant 7 jours.

Les résultats de ces expériences témoin à 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure sont présentées Figure C. Dès le temps initial, la concentration en AsV se situait entre 5 mg.L⁻¹ et 10 mg.L⁻¹. Cette concentration est probablement due à un biais de l'analyse, à cause de la concentration importante en extrait de levure. Après une semaine d'incubation, l'une concentration de l'ordre de 15 à 20 mg.L⁻¹ d'AsV a été mesurée. Il y a donc vraisemblablement eu une oxydation abiotique de l'As^{III}. Néanmoins, cette oxydation s'est produite de façon beaucoup plus lente que celle que nous mesurons couramment dans nos essais.

La Figure compare à même échelle, les cinétiques obtenues avec le sol Auzon 2, autoclavé ou non. La courbe en bleu présente les résultats obtenus avec un inoculum de sol brut (la concentration en AsV atteint environ 75 mg.L^{-1} en 6 jours). La courbe en noir correspond à la cinétique avec le sol autoclavé : la concentration en AsV reste à 0 mg.L^{-1} , sauf pour la condition à 10 g.L^{-1} d'extrait de levure pour laquelle on suppose qu'un composant de l'extrait de levure a pu interagir avec l'AsIII. Des résultats analogues ont été obtenus avec tous les sols. Le mécanisme majoritaire d'oxydation de l'AsIII dans nos expériences apparaît donc d'origine biologique. Par la suite, les expériences ont été réalisées avec 1 g.L^{-1} d'extrait de levure comme concentration maximale, valeur pour laquelle l'oxydation abiotique de l'AsIII est négligeable.

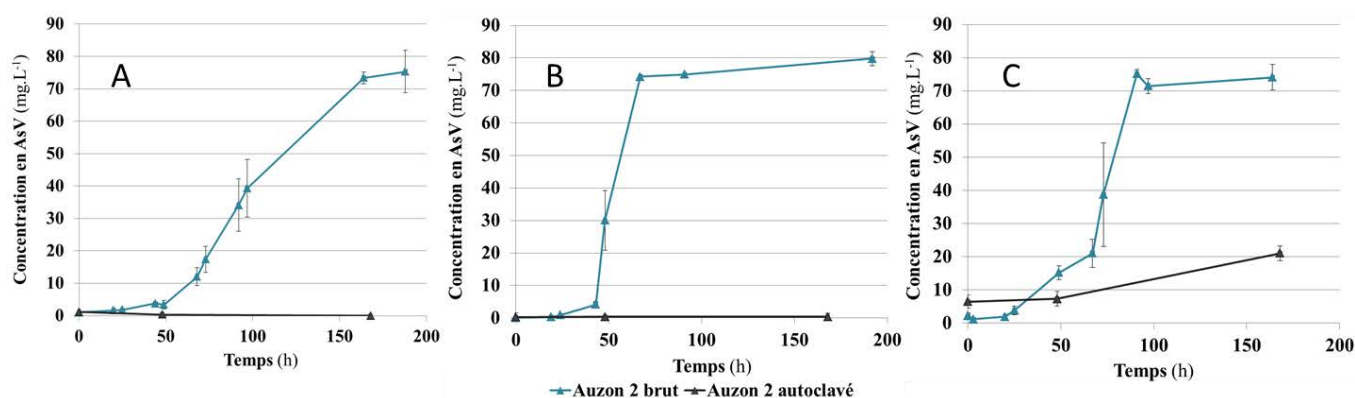


Figure . Graphiques de comparaison entre témoins abiotiques et essais pour le sol Auzon 2. Concentrations en extrait de levure A : 0 g.L^{-1} ; B : 1 g.L^{-1} ; C : 10 g.L^{-1} .

En présence de mixture

Les concentrations en AsV dans les différents milieux incubés en présence des sols ont été déterminées à l'état initial (T_0) et à T final, après 7 jours d'incubation. Les concentrations en AsV à T final sont toujours inférieures à 9 mg.L^{-1} d'AsV et ne sont pas significativement différentes de celles mesurées à T_0 . L'oxydation abiotique est donc faible.

RESUME

La microflore joue un rôle majeur dans la mobilité des éléments métalliques et métalloïdes dans les sols. L'activité bactérienne globale d'oxydation de l'As^{III} en As^V tend à diminuer la toxicité et la mobilité de l'arsenic (As) dans les sols, cependant l'effet de la matière organique (MO) sur cette activité n'a pas été déterminé jusqu'à présent. Il est important de répondre à cette question car sur des sites pollués, un apport de MO peut être préconisé dans le cadre d'opérations de phyto-stabilisation. Par ailleurs, dans un contexte de pollution diffuse, les pratiques agricoles d'amendement des sols pourraient avoir un impact sur le transfert d'As. L'objectif de ce projet de thèse était donc de quantifier l'influence de la MO sur la spéciation de l'As par la microflore de sols pollués, et les conséquences de ce processus sur la mobilité du métalloïde. L'influence de la MO sur la spéciation de l'As a été évaluée (1) au niveau physiologique et moléculaire, sur l'activité de deux souches pures et (2) au niveau global, par l'évaluation de l'activité d'oxydation de l'As^{III} par les communautés microbiennes de sols pollués et des incubations de sols. L'effet de la nature même de la MO a été examiné à travers la comparaison de substrats simples et complexes. Les expériences réalisées avec les souches de *Thiomonas delicata* et *Herminiimonas arsenicoxydans* ont montré un effet négatif de la MO sur la vitesse spécifique d'oxydation de l'As^{III}. L'extrait de levure (EdL) induit une diminution de l'expression du gène *aioA* codant pour la grande sous-unité de l'arsénite-oxydase permettant l'oxydation de l'arsenic, avec les deux souches pures. Au niveau plus global des communautés microbiennes de sols, l'activité As^{III}-oxydantes a été évaluée sur 8 sols pollués par de l'As. Les mesures ont été effectuées dans des milieux de cultures contenant différentes concentrations de MO. Deux MO complexes ont été comparées : l'EdL et une mixture synthétique de molécules organiques (SMOM) dont la composition a été inspirée par les caractéristiques de la MO de sols réels (rapport C/N, contenu en groupes fonctionnels). Des corrélations ont été recherchées entre les caractéristiques des sols et la constante de vitesse d'oxydation de l'As^{III} par la microflore, avec et sans ajout de MO. La vitesse d'oxydation de l'As^{III} par la microflore des sols semble limitée par la MO disponible, et cette limitation est levée par un apport de 0,08 g.L⁻¹ de C apporté sous forme d'EdL ou de SMOM. Lorsque l'apport de MO s'élève à 0,4 g.L⁻¹ de C, des résultats divergents sont observés : l'EdL est moins inhibiteur que la SMOM. Enfin, une expérience a été réalisée dans le but d'évaluer l'influence combinée de l'activité microbienne et de l'apport de SMOM sur la mobilisation de l'As présent dans quatre sols pollués, incubés au laboratoire en suspension. Une mobilisation dans la phase aqueuse de l'As présent dans les sols pollués est observée en présence de SMOM et de microorganismes actifs. Ce travail de thèse apporte un éclairage sur le rôle important joué par le métabolisme de la MO au sein du cycle biogéochimique de l'As, phénomène devant être pris en compte lors des études visant à optimiser la remédiation des sites pollués.

SUMMARY

The soil microflora plays a major role in the mobilization of metals and metalloids in soils. The global bacterial oxidation of As^{III} to As^V tends to decrease the toxicity and mobility of arsenic in soils. The effect of organic matter (OM) on bacterial As^{III} oxidation in presence of oxygen and its potential impact on the behavior of arsenic in non-saturated soils has not been determined up to date. However, supply of OM on polluted sites can be proposed in the context of a phytostabilization operation. Furthermore, agricultural soils affected by diffuse As pollution may be fertilized by organic amendments that could impact arsenic transfer. The objective of the present PhD thesis was to quantify the influence of OM on the speciation of As by the polluted soil microflora and the consequences of this process on arsenic mobility. The influence of OM on the speciation of As was evaluated (1) at the physiological and molecular levels on two pure strains and (2) at global level by As^{III} oxidation measurements by microbial communities from polluted soils and on soils incubations. The effect of the nature of OM was considered through the comparison of simple and complex substrates. The experiments with *Thiomonas delicata* and *Herminiimonas arsenicoxydans* showed a negative effect of OM on the specific As^{III} oxidation rate. Yeast extract (YE) induced a decrease of *aioA* gene (encoding for the big subunit of arsenite oxidase responsible for As^{III} oxidation) expression with both pure strains. At the level of soils microbial communities, As^{III} oxidizing activity were measured on 8 As-polluted soils. Measurements were realized in culture media containing different concentrations of OM. Two complex OM were compared: YE and a synthetic mixture of organic matters (SMOM) whose composition was inspired from soils OM characteristics (C/N ratio and proportion of functional groups). Correlations were searched between soils characteristics and As^{III} bio-oxidation rate constants with and without added OM. Results indicate that As^{III} oxidation rate by the soil microflora was limited by available OM and this limitation was removed by the addition of 0.08 g L⁻¹ of organic C as YE or SMOM. When the addition of OM reached 0.4 g L⁻¹ of C, divergent results were observed: YE was less inhibiting than SMOM. Finally, an experiment was carried out to evaluate the combined influence of microbial activity and SMOM addition on As mobilization from polluted soils incubated as slurries at laboratory scale. A mobilization of As present in the polluted soils was observed in presence of both SMOM and active microorganisms. This PhD thesis enlightens the important role played by OM metabolism within the biogeochemical cycle of As, which should be given consideration in the context of polluted site remediation.