

Rôle des composantes géochimiques et microbiologiques d'un sol sur le comportement du sélénium en conditions oxiques et anoxiques

Olivia DARCHEVILLE

Octobre 2008

N° ISRN/IRSN-2008/102

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie



Système de management
de la qualité IRSN certifié



ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THESE

présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

SPECIALITE : Sciences Agronomiques

ROLES DES COMPOSANTES GEOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES D'UN SOL SUR LE
COMPORTEMENT DU SELENIUM EN CONDITIONS OXIQUES ET ANOXIQUES

par **Olivia Darcheville**

soutenue le 9 septembre 2008 devant un jury composé de

M. Vincent, Vallès	Professeur, Université d'Avignon	Président du jury
Mme Agnès Richaume	Maître de conférence, Université de Lyon	Rapporteurs
M. Nicolas Marmier	Professeur, Université de Nice	Rapporteurs
M. George Shaw	Professeur, Université de Nottingham	Examineurs
M. Mohammed Krimissa	Ingénieur, EDF, Paris	Membre invité
Mme Laureline Février	Ingénieur-Chercheur, IRSN, Cadarache	Co-Directrice de thèse
M. Pierre Renault	Directeur de Recherche, INRA, Avignon	Directeur de thèse

Ecole doctorale Systèmes Intégrés en Biologie,
Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement (SIBAGHE)
Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (IRSN)
Laboratoire Sol, Climat et Environnement (INRA)



Remerciements

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (LRE) du Service d'Étude du Comportement des Radionucléides dans les Écosystèmes (SECRE) à l'IRSN, Cadarache. Je remercie Jacqueline Garnier-Laplace et Jean-Christophe Gariel de m'avoir accueillie dans leur équipe et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour effectuer ce travail de thèse.

Je voudrais également remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie Madame A. Richaume et Monsieur N. Marmier qui ont accepté d'être rapporteurs de ce mémoire, ainsi que Monsieur G. Shaw, Monsieur V. Vallès et Monsieur M. Krimissa pour leur présence en tant que membres du jury.

Je remercie très chaleureusement Pierre Renault, directeur de cette thèse, pour la qualité de son encadrement. Un grand merci, Pierre pour ton aide, tes conseils et tes remarques pour les expérimentations, mais également pour ta grande disponibilité malgré l'éloignement, les relectures et les questions de dernière minute.

Comme toute étude scientifique, cette thèse a été avant tout le résultat d'un travail d'équipe. Cette équipe, je l'ai trouvée avec Laureline Février, Arnaud Martin-Garin et Frédéric Coppin. Chaque étape de ce travail a été consciencieusement discutée avec chacun d'entre eux pour y apporter leur touche personnelle.

S'il y a un bien une personne incollable sur la bibliographie du sélénium, de la microbiologie et maintenant de l'uranium et des plantes, et que sais-je encore, c'est Laureline, « LA » référence bibliographique ! Toujours une petite publication qui traîne par là (Pub du jour : bonjour !). J'ai particulièrement apprécié chez toi ta franchise, même si cela a été un peu dur à accepter parfois. Merci aussi pour tes innombrables relectures et tes constantes améliorations de mon style un peu brut et souvent lourd, et même le week-end ! Merci encore pour ton aide au labo, malgré les nombreux oublis de pesées ! Et enfin bravo pour ton premier encadrement de thèse, malgré nos caractères respectifs pas toujours faciles, nous nous en sommes pas trop mal sorties ! Merci aussi à Olivier pour avoir accepté ma présence chez vous le week-end pour finir les corrections dans les temps.

Je me rappelle encore de mes premiers jours au labo, totalement terrifiée par ce grand monsieur barbu, Arnaud. Mais une fois cette première fausse impression passée, il apparaît une personne très gentille et drôle mais qui impose le respect. Arnaud, c'est « LA » personne de référence au laboratoire pour tous les designs expérimentaux, l'optimisation du plan de travail, les manipulations de sources, etc. Merci Arnaud pour m'avoir appris, grâce à ta patience et ta rigueur, à travailler dans les règles de l'art au laboratoire. Merci aussi pour t'être investi dans ma thèse comme tu l'as fait, aussi bien expérimentalement que dans la relecture du manuscrit, et ce jusqu'à la dernière ligne droite. Et puis Fred, « LA » référence analytique et des macros EXCEL. Merci pour tous tes conseils et ton aide au labo, pour tes « blagues » dans les moments les plus stressants (pas forcément appréciées à leur juste valeur dans ces moments là). Merci aussi pour avoir pris du temps pour m'expliquer et réexpliquer le fonctionnement d'une macro. Et enfin merci pour m'avoir écouté quand cela n'allait pas très fort et pour tous tes conseils sur mon avenir professionnel.

Un énorme merci à Marcel Morello et Danielle Poncet-Bonnard pour toutes les analyses de ⁷⁵Se. Merci d'avoir toujours été disponibles et d'avoir effectué mes analyses avec rapidité et le sourire malgré l'accumulation de flacons de scinti, très colorés grâce à de belles étiquettes ! Merci aussi à Daniel Orjollet pour la recherche de tous mes petits acides organiques et tes coups de main en manip pour que je puisse aller manger le midi.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres de mon comité de pilotage pour leurs différentes aides pour les orientations de ce travail de thèse :

- Lorenzo Spadini, géochimiste du LGIT (Grenoble), pour ses conseils et ses idées sur les expérimentations et les états redox, pour une chouette balade dans les rues de Philadelphie et grâce à qui, nous avons mangé au restaurant du Château à chaque comité de pilotage, pour le plus grand plaisir de François Lafolie.
- François Lafolie de l'INRA (Avignon), pour la partie modélisation, même si nous n'avons pas pu aller jusque là.
- Marie-Laure Fardeau, microbiologiste de l'IRD (Marseille) pour ses conseils et son savoir-faire dans le dénombrement des bactéries par NPP et la recherche de bactéries séléno-réductrices. Merci aussi à Christian Sery d'avoir effectué ce travail laborieux lors de son stage de Master dans notre laboratoire.
- Jean-Claude Jumas, (LAMMI, Montpellier) pour la spectroscopie Mössbauer, merci d'avoir passé du temps à essayer de mesurer le fer dans mon sol d'étude.
- Odile Berge du DEVM (CEA, Cadarache) pour son initiation au monde « merveilleux » des microorganismes, ses conseils et corrections des parties « microbiologie » de ce mémoire. Merci aussi

Zahar Haichar (CEA, Cadarache) pour avoir pris sur son temps de thèse (et je sais comme c'est précieux !) pour m'apprendre la DGGE et me permettre de présenter de très beaux gels.

Je remercie très chaleureusement tous les membres du LRE pour tous les moments partagés que ce soit scientifiques ou personnels. Merci à Hervé, l'homme « à tout faire » du labo, et qui essaie, toujours et désespérément, de faire appliquer des réglementations qui changent tous les 2 jours ; Nadine pour nos longues conversations dans ton bureau ; Cathy et son côté un peu « distrait » qui n'avait encore jamais rencontré autant de soucis sur la HPLC (elle marchait très bien quand j'ai fini avec) ; Daniel pour savoir récupérer les grandes tables à la cantine avec diplomatie ; Rodolphe, pour toute sa gentillesse, toujours très sollicité et maintenant d'autant plus encore ; Jean-Marc qui m'a appris à différencier le moustique mâle du moustique femelle (celui avec le rouge à lèvres) ; Fred A pour son humour et ces quelques mois en colocation dans le même bureau ; Chantal pour toutes les recettes de cuisines échangées au coin café ; et sans oublier Olivier, Pierre, Christelle, Valérie, Virginie, Magali, Laure, Pascale, Isa, tous les thésards, Christophe, Victor, Stef, Florence et Sandra et tous les stagiaires, pour certains aujourd'hui thésards, Astrid, Christian, Nico, Sandrine, Amandine, Elmina ... rencontrés durant ces trois ans au LRE.

Je souhaiterais remercier un peu plus particulièrement :

Christophe Chabrouillet pour ne pas avoir été effrayé de partager avec moi le même bureau durant 2 ans. Merci pour tous ces bons moments passés en ta compagnie, pour ton humour et pour ton écoute. Aujourd'hui « la vie et l'œuvre » du sélénium n'ont plus aucun secret pour nous.

Stéphanie Bourrachot pour toutes ces soirées à refaire le monde (et le labo) devant une tasse de thé, tes encouragements quand le moral n'était pas au meilleur de sa forme et pour toutes tes petites attentions pendant ma grossesse et même après. Courage, tu te rapproches un peu plus chaque jour de la fin.

Thomas Perrier, ses oiseaux et son humour, pour une année d'intérim inoubliable passée en ta compagnie.

Et que serait le LRE sans Claudine ? Merci de m'avoir facilité la vie administrativement pendant ces trois ans (et ce n'était pas tous les jours facile !), pour ta bonne humeur, ton nounours du nouvel an, tes concours de dessin de poissons d'avril et de sapin de Noël... et pour cette corbeille, toujours pleine de bonbons et autres gourmandises. Et je compte sur toi pour que ma Lilly occupe une bonne place sur ton panneau.

Enfin, il serait faux d'affirmer que ces 4 ans ne furent que joie et bonheur. Ce fût parfois au contraire rude et difficile. C'est pour cela que je suis énormément reconnaissante envers toutes les

personnes précédemment citées (et toutes celles que j'aurai éventuellement oubliées) qui m'ont aidée à traverser et à finir cette difficile épreuve.

Et je ne peux finir ces remerciement sans remercier Patrice, pour m'avoir soutenue, écoutée (ou fait semblant, parfois), encouragée et surtout m'avoir supportée dans les moments les plus difficiles et ce depuis 10 ans, merci pour tout et beaucoup plus encore. Et merci à Lilly, pour m'avoir motivée un peu plus chaque jour, du haut de ses 4 mois, avec tous ses sourires.

Résumé

Le sélénium (Se) est naturellement présent dans l'environnement. Élément essentiel aux êtres vivants à faibles concentrations, il devient rapidement toxique avec leurs augmentations. Un de ses isotopes radioactifs, le ^{79}Se est présent à hauteur de 0,04 % dans les déchets radioactifs de Haute Activité à Vie Longue (HAVL) dont le stockage géologique profond est envisagé. Dans le sol, le Se existe sous de multiples formes et sa mobilité est affectée par le potentiel d'oxydoréduction et les activités microbiennes. Très peu d'études ont porté sur sa réactivité à l'état de trace.

Afin d'améliorer les connaissances sur le devenir de cet élément, nous avons réalisé un travail permettant de distinguer les principaux processus géochimiques abiotiques et microbiologiques impliqués dans le devenir du sélénite (Se(IV)) à l'état de trace dans le sol. Cette étude était basée sur des incubations en batch de boues de sol contaminées artificiellement en Se(IV) à hauteur de $0,4 \text{ mg Se.kg}^{-1}\text{sol sec}$ et soumises à des conditions oxygène ou anoxique. Les incubations ont concerné du sol stérilisé et du sol non stérile sans ou avec amendement organique pour stimuler alors les activités microbiennes. En condition oxygène, il s'agissait de glucose ou de cellulose, et les incubations avec glucose ont été répétées après ajout d'un antibactérien ou d'un antifongique. En condition anoxique, il s'agissait de glucose, et le Se a été apporté à différentes dates correspondant à différents états redox et à des activités microbiennes contrastées. Pour chaque incubation, nous avons suivi la distribution du Se entre les phases solide (extractions séquentielles), liquide (état redox, dissous ou colloïdal) et gazeuse (piégeage). Nous avons par ailleurs suivi les évolutions géochimiques de la solution (pH, E_H , les composés azotés, les acides organiques et alcool), la composition de l'atmosphère gazeuse des flacons et la microflore du sol (biomasse totale, biomasse fongique, densité bactérienne, caractérisation de la structure des communautés bactériennes en condition oxygène, dénombrement en conditions anoxique des bactéries cultivables dénitrifiantes, fermentaires, SeO_3^{2-} -réductrices et Fe III-réductrices).

Les résultats ont montré que le Se apporté à l'état de trace est relativement peu mobile dans le sol étudié. Nous avons mesuré entre 50 et 90 % de rétention sur la phase solide. Les processus géochimiques ont un rôle majeur dans le contrôle de la mobilité du Se. Au cours du temps, certaines transformations abiotiques en phase solide aboutissent à une immobilisation de plus en plus forte du Se. Les processus microbiologiques contribuent à augmenter cette immobilisation au sein de la phase solide. Néanmoins, en condition oxygène et anoxique, en moindre mesure, certains processus microbiens peuvent être, au contraire, responsables d'une dispersion du Se dans la biosphère par la production de composés volatils. Par ailleurs, aucune des activités bactériennes ciblées en conditions anoxique (dénitrification, fermentation, réduction du fer, homoacétogénèse et acétogénèse vraie) n'a eu d'effet spécifique sur la mobilité du Se. Enfin, la mobilité du Se dans un sol ne peut se déduire d'un simple diagramme de Pourbaix (E_H -pH). En effet, la plupart des réactions d'oxydo-réductions se font dans le sol hors équilibre thermodynamique, et aboutissent à des mesures de E_H souvent liées un à seul couple oxydant-réducteur et ce en fonction de l'abondance des composés et de la sensibilité de l'électrode à ces composés.

Mots clés : sélénium ; sol ; mobilité ; processus géochimique ; processus microbiologique ; conditions oxygènes et anoxiques.

Table des Matières

Remerciements	iii
Résumé	vii
Introduction Générale	1
CHAPITRE I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. Le système sol : milieu complexe vivant	7
1.1 Généralité	7
1.2 L'état d'oxydo-réduction du sol.....	8
1.3 Les microorganismes du sol.....	11
1.3.1 Les sources d'énergie et de carbone	11
1.3.2 Les réactions d'oxydo-réduction chez les microorganismes	12
1.3.3 Les dynamiques microbiennes en fonction de l'état d'oxydo-réduction du sol.....	13
1.4 Interactions entre géochimie et microbiologie du sol	14
1.4.4 Effet de la géochimie sur les microorganismes	15
1.4.5 Effet des microorganismes sur la géochimie du sol.....	16
1.5 Paramètres géochimiques et microbiologiques influençant la mobilité des éléments dans un sol	17
1.5.6 Les paramètres géochimiques	18
1.5.7 Les processus microbiologiques	19
1.6 Conclusion	20
2. Le sélénium	21
2.1 Généralités	21
2.1.1 Les sources de sélénium et concentrations dans l'environnement.....	22
2.1.2 Les effets sur la santé.....	24
2.2 Mobilité du Se dans un sol.....	25
2.2.3 Réactivités abiotiques du Se	25
2.2.4 Réactivités biotiques du Se	29
2.2.5 La modélisation.....	33
2.3 Outils expérimentaux pour l'étude du Se.....	37
2.3.6 En phase liquide.....	37
2.3.7 En phase solide	37
2.3.8 En phase gazeuse	39
3. Bilan et conclusions de l'étude bibliographique	39
4. Références	41
CHAPITRE II – MATERIELS ET METHODES	51
1. Méthodologie	52
2.Design et protocole expérimental	54
2.1 Le design expérimental	54
2.2 Le protocole expérimental	54

3. L'échantillon de terre	55
4. Les solutions	57
4.1 Les solutions d'amendements	57
4.1.1 Les conditions oxiqes.....	57
4.1.2 Les conditions anoxiques.....	58
4.2 La solution de Se.....	59
5. Les analyses	59
5.1 Le Sélénium	59
5.1.1 Mesure de la volatilisation du Se.....	59
5.1.2 Mesure du Se en solution.....	60
5.1.3 Mesure du sélénite Se(IV) en solution.....	60
5.1.4 Estimation de la distribution en phase solide par extraction séquentielle.....	61
5.1.5 Mesure du Se associé à la biomasse	62
5.2 Les mesures physico-chimiques.....	62
5.2.1 Le potentiel d'oxydo-réduction.....	63
5.2.2 Le pH	63
5.2.3 L'analyse de l'atmosphère gazeuse	63
5.2.4 L'humidité pondérale	64
5.2.5 L'oxygène dissous	64
5.2.6 Le dosage du glucose	65
5.2.7 Le dosage des sucres totaux.....	65
5.2.8 Le dosage du Fe total	66
5.2.9 Le dosage des ions Fe(II).....	66
5.2.10 Le dosage de NH_4^+	67
5.2.11 Dosage des anions et des acides organiques	67
5.3 Les mesures microbiologiques.....	67
5.3.1 Détermination de la biomasse totale	68
5.3.2 Dosage de la biomasse fongique : mesure de l'ergostérol	68
5.3.3 Dénombrement de la microflore bactérienne totale : coloration à l'acridine orange.....	69
5.3.4 Les dénombrements de bactéries cultivables par le Nombre le Plus Probable (NPP)	70
5.3.5 La diversité des structures de communautés bactériennes.....	72
6. Références	75
CHAPITRE III – INCUBATIONS DE SOL EN CONDITIONS OXIQUES	78
1. Résultats et discussion	80
1.1 E_H et pH	80
1.2 Les activités microbiennes	83
1.2.1 L'atmosphère gazeuse.....	83
1.2.2 L'amendement glucose	86
1.3 La caractérisation microbiologique.....	88
1.3.1 La biomasse totale	88
1.3.2 La biomasse fongique	89
1.3.3 Le dénombrement bactérien.....	92
1.3.4 La caractérisation des communautés bactériennes.....	94
1.4 Le sélénium	105
1.4.1 Le Se en phase gazeuse.....	105
1.4.2 Le Se en phase liquide	107
1.4.3 Le Se en phase solide.....	113

1.4.5 Le Se lié à la biomasse.....	117
2. Conclusion	118
3. Références	120
CHAPITRE IV – INCUBATION DE SOL EN CONDITIONS ANOXIQUES.....	124
1. Résultats et Discussion.....	127
1.1 Evolutions géochimiques et microbiologiques	127
1.1.1 La condition stérile (S)	127
1.1.2 La condition control (C)	127
1.1.3 La condition amendée (G)	130
1.2 Le selenium	135
1.2.1 La rétention du Se et spéciation en phase aqueuse	135
1.2.2 Le selenium en phase solide	138
1.2.3 Le sélénium en phase gazeuse	140
2. Conclusion	141
3. Référence.....	142
CHAPITRE V - DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS.....	145
1. Rappels des principaux résultats.....	147
1.1 En condition stérile	147
1.2 En conditions non stériles	148
1.2.1 Incubations en conditions oxiques.....	149
1.2.2 Incubations en conditions anoxiques	151
2. Discussion sur la méthodologie et les résultats obtenus	153
2.1 Méthodologie	153
2.2 Système batch	155
2.3 Caractérisation du compartiment bactérien.....	155
2.4 Etude d'un élément à l'état de trace.....	157
3. Perspectives.....	158
4. Références	160
ANNEXE I – Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states.....	164
1. Introduction.....	166
2. Materials and methods	167
2.1 Soil	167
2.2 Solution composition and amendments	168
2.3 Batch experimental conditions.....	169
2.4 Selenium distribution	169
2.4.1 Gaseous phase.....	169
2.4.2 Liquid phase.....	170
2.4.3 Solid phase.....	170

2.5 Microbiological analyses	171
2.5.1 Microbial biomass measurement	171
2.5.2 Analyses of bacterial diversity	172
2.5.3 Sterility checking	173
3. Results	173
3.1 Soil microbiological states	173
3.1.1 Sterility checking	173
3.1.2 Microbial biomass.....	173
3.1.3 Structure of the soil bacterial communities	173
3.2 Distribution of selenium in the aqueous, liquid and solid phases of the batch	175
3.2.1 Selenium volatilisation	175
3.2.2 Selenium in the liquid phase.....	175
3.2.3 Solid distribution of selenium.....	177
4. Discussion.....	178
5. Conclusion	182
ANNEXE II – Effects of microbial dynamics activities on Se fate in an anaerobic sandy soil amended with glucose	188
1. Introduction.....	190
2. Materials and methods	191
2.1 Soil and applied solutions	191
2.2 Batch incubation and measurements.....	192
2.3 Analytical procedures	193
2.4 Data treatment for metabolic pathway	197
3. Results	199
3.1 Geochemical and microbial evolutions.....	199
3.1.1 The sterilised treatment (S).....	200
3.1.2 The control treatment (C)	201
3.1.3 The amended treatment (G)	202
3.2 Selenium fate: distribution in the gaseous, liquid and solid phases.....	205
3.2.1 Selenium retention and aqueous speciation	205
3.2.2 Selenium in the solid phase	206
3.2.3 Selenium volatilisation	209
4. Discussion and conclusion	209
4.1 Microbial and Geochemical evolutions	209
4.2 Selenium behaviour.....	212
ANNEXE III - Liste des Figures.....	221
ANNEXE IV - Liste des Tableaux.....	224
ANNEXE V - Analyse par CPG.....	226
ANNEXE VI - Compositions des milieux anaérobies utilisées pour le dénombrement.	228
ANNEXE VII – Propriétés physico-chimiques du sol	230
ANNEXE VIII – Propriétés minéralogiques du sol.....	232

Introduction Générale

Le sélénium (Se) est un élément naturellement présent dans l'environnement. Aux sources naturelles de Se (dissolution des roches, volcanisme...) s'ajoute une concentration anthropique associée à la combustion de charbon, au raffinage du cuivre, à la fabrication de semi-conducteurs (etc.) contribuant à la dispersion (redistribution) du Se dans l'environnement (Lemly, 2004). C'est un élément "ambivalent" pour les organismes vivants, car essentiel à de faibles concentrations (oligo-élément ayant notamment une fonction antioxydante), mais rapidement toxique à de plus fortes concentrations (ATSDR, 2003). Aussi existe-t-il une littérature assez abondante sur le Se, portant notamment sur son utilisation en médecine, en agriculture, dans l'industrie, ainsi que sur ses effets biologiques (carences et toxicités). Dans le contexte nucléaire, le ^{79}Se , isotope radioactif (émetteur β) du sélénium, est un produit de fission de l'uranium 235 (production 0,04 %). Il se retrouve dans le combustible usagé, ainsi que dans les déchets radioactifs provenant du retraitement de ce combustible.

En France, le souci de sécurité amène à considérer comme nécessaire le confinement des colis de déchets radioactifs dans les sous-sols géologiques (Toulhoat, 2002). Dans le cadre de l'évaluation des risques liés aux stockages de ces déchets, effectuée par l'ANDRA (Agence Nationale pour la gestion des Déchets RAdioactifs), tous les scénarii associés à ce type de stockage, même les plus pessimistes, sont envisagés. Ainsi, les risques de franchissement par les radioéléments des différentes barrières, artificielles et naturelles (roches), entourant le colis de déchets sont estimés. Le ^{79}Se a été identifié comme susceptible d'être remobilisé dans les sols (sous-sols et sols de surface) et, en tant qu'isotope à vie longue ($3,77 \times 10^5$ ans) (Bienvenu et al., 2007), de perdurer dans la biosphère.

Les connaissances actuelles concernant le ^{79}Se sont essentiellement des résultats indirects des diverses recherches effectuées sur le sélénium stable, généralement en zones sélénifères (à fortes concentration en Se), et de quelques travaux portant plus particulièrement sur la réactivité géochimique du Se vis-à-vis des phases minérales (granites, argiles...) constituant les barrières du colis de déchets. Les modèles radioécologiques couramment utilisés pour décrire le devenir du Se dans les sols et pour évaluer ses impacts sanitaires, radiologiques et chimiques sont basés essentiellement sur des lois mathématiques simples modélisant un équilibre entre les composants du système (sol, solution de sol, plante ...), à l'aide de coefficients de transfert ou de distribution (par exemples les coefficients de partage entre sol et plante (Ft) et entre phase solide du sol et solution du sol (Kd)). Dans le cas du Se,

les valeurs génériques de K_d proposées par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA, 1994) sont fonction du type de sol et varient entre 150 et 1800 $L \cdot kg^{-1}$ respectivement pour un sol sableux (>70 % sables) et un sol organique (> 30 % matière organique). Plus la valeur de K_d est grande, plus le Se sera retenu par la phase solide. Ces coefficients sont considérés comme constants dans le temps.

Toutefois, cette approche simplifiée semble être inadaptée pour décrire le devenir du Se, principalement pour deux raisons :

- D'une part, le Se peut exister sous 4 états d'oxydation (séléniate (VI), sélénite (IV), sélénium élémentaire (0) et séléniure (-II)). Sa mobilité dans un sol dépend (i) de sa spéciation (état d'oxydo-réduction et forme chimique) et (ii) de divers processus biotiques et abiotiques tels que la sorption/désorption, la réduction/oxydation et la volatilisation. Ces processus dépendent de l'état géochimique du sol (pH, potentiel d'oxydo-réduction, atmosphère gazeuse, phases minérales ...) et des activités microbiennes (communautés bactériennes et/ou fongiques aérobies et anaérobies). Par exemple, le séléniate et le sélénite (solubles) prédominent en conditions oxydantes, tandis que le sélénium élémentaire (insoluble) et les séléniures prédominent en conditions réductrices (Masscheleyn et al., 1990, 1991). De plus, il existe également quelques formes organiques volatiles issues principalement de la biométhylation. Ainsi, il semble difficile d'estimer toute la complexité de ces transformations et leurs évolutions temporelles au travers d'un seul paramètre.

- D'autre part, il existe une interdépendance dans les sols entre de très nombreux processus, parfois d'origines différentes (transferts, réactivités biotiques et abiotiques). En effet, les sols de surface sont généralement considérés comme oxiques (présence d'oxygène), les zones anoxiques (absence d'oxygène) étant restreintes à des micro-niches au sein de la zone oxique, à la périphérie des racines, à des sols submergés (rizières) ou à des zones plus profondes (voisinage de la nappe). L'état d'oxygénation du sol affecte principalement les activités microbiennes du système, aérobies et anaérobies, elles-mêmes en étroite relation avec les transformations géochimiques abiotiques. Par exemple, les activités microbiennes affectent le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la concentration en composés organiques et minéraux, la composition de l'atmosphère gazeuse du sol... Mais, la teneur en eau, le pH, la concentration en composés solubles organiques et minéraux (accepteurs terminaux d'électrons...), la nature des gaz et des phases minérales sont autant de variables géochimiques affectant directement les activités microbiennes. Aussi, la prise en compte de couplages entre transferts (gaz, solutés ...), réactivités biologiques et abiotiques s'avère nécessaire pour estimer le devenir des (radio)éléments, et plus particulièrement du Se, dans un

sol. Actuellement, peu d'études tentent de décrire l'ensemble des processus physico-chimiques et (micro)biologiques affectant la mobilité du Se dans un sol (Haudin, 2006; Chabroullet, 2007).

Notre étude s'est focalisée sur l'estimation de la mobilité du Se via sa distribution entre les différents constituants d'un sol (phases liquide, solide, gazeuse et microorganismes), en conditions contrôlées de laboratoire (système batch) et en fonction de différentes activités microbiologiques aérobies et anaérobies. Notre objectif était de savoir si les activités microbiennes affectent directement ou indirectement via la géochimie, la mobilité du Se et en quelle proportion par rapport aux processus abiotiques. L'utilisation de ⁷⁵Se (IV) en tant que radio-traceur nous a permis de travailler à des concentrations traces, rarement étudiées (0,4 mg Se.kg⁻¹sol sec), de l'ordre du bruit de fond géochimique. En ce sens, nous nous sommes rapprochés d'un scénario de « relargage » de ⁷⁹Se.

Cette étude se situe également dans le cadre général de l'action, menée en accord tripartite CEA-EDF-IRSN, intitulée 'transport réactif et zone non saturée'. L'objectif général de cette action est d'améliorer la prévision du transfert des radionucléides dans la zone non saturée du sol (ZNS). En particulier, il s'agit d'identifier les principaux processus biotiques et abiotiques régissant leur mobilité dans un sol.

Parmi les différents facteurs d'intérêt pour EDF pouvant engendrer des modifications de la mobilité des radionucléides, comme le Se, nous pouvons par exemple citer:

- les remaniements des couches de surface causant une ré-oxygénation des horizons sub-surfaciques ; ces remaniements pourront intervenir lors de la déconstruction de site,
- les précipitations prolongées créant un ennoiment des horizons surfaciques du sol,

la proximité des sites de centrales avec des rivières ou fleuves, qui engendre des battements de la nappe phréatique produisant une alternance oxygène/anoxique de la zone du sol située au dessus de cette nappe.

Ce mémoire comprend 5 chapitres. Le premier propose une synthèse bibliographique traitant (i) des interactions entre géochimie et microbiologie dans les sols, ainsi que de l'impact de ces interactions sur la mobilité des éléments, (ii) de l'état des connaissances sur le Se dans l'environnement, incluant le contexte radiologique, sa mobilité dans un sol via des processus géochimiques et microbiologiques, et (iii) sur les outils expérimentaux existant

pour étudier le comportement du Se. Le second chapitre présente la méthodologie d'étude mise en place afin d'évaluer l'impact relatif des paramètres géochimiques et microbiologiques du sol sur le comportement du sélénium et l'ensemble des analyses effectuées. Les troisième et quatrième chapitres sont consacrés aux incubations de sol en système batch respectivement en conditions oxiques et anoxiques. Enfin, le dernier chapitre reprend, dans une discussion générale, les principaux résultats discutés dans les chapitres précédents, et conclut cette étude en proposant quelques perspectives.

Bibliographie

- ATSDR, 2003. Toxicological profile for selenium. U.S. Department of health and human service - Public Health Service
- Bienvenu, P., Cassette, P., Andreoletti, G., Be, M.M., Comte, J., Lepy, M.C., 2007. A new determination of ⁷⁹Se half-life. *Applied Radiation and Isotopes* 65, 355-364.
- Chabroullet, C., 2007. Etude de la remobilisation d'éléments traces à partir d'un sol de surface contaminé: Influence du vieillissement des composés organiques du sol sur la remobilisation du sélénium. Thèse. Université Joseph Fourier - Grenoble I,
- Haudin, C.S., 2006. Conséquences de la variabilité spatiale et temporelle de l'anoxie sur le devenir du sélénium dans le sol. Thèse. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse,
- IAEA, 1994. Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in the terrestrial and freshwater environment. International Atomic Energy Agency
- Lemly, A.D., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 44-56.
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H., 1990. Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. *Environmental Science and Technology* 24, 91-96.
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H., 1991. Heavy metals in the environment: Arsenic and selenium chemistry as affected by sediment redox potential and pH. *Journal of Environmental Quality* 20, 522-527.
- Toulhoat, P., 2002. Confinement and migration of radionuclides in a nuclear waste repository. *Compte-rendu. Physique* 3, 975-986.

CHAPITRE I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le système sol : milieu complexe vivant

1.1 Généralité

D'un point de vue pédologique, le sol est la partie superficielle de l'écorce terrestre fortement soumise à l'action des agents climatiques et biologiques (Stengel et Gelin, 1998). C'est un milieu poreux, triphasique et organisé, composé de trois phases inertes respectivement solide, liquide et gazeuse. Les proportions entre ces différentes phases peuvent varier dans le temps. Aux trois phases inertes s'ajoutent un compartiment vivant. Ces 4 compartiments interagissent entre eux et sont le siège de nombreuses réactions bio-physico-chimiques, dont quelques exemples sont cités dans la Figure 1.

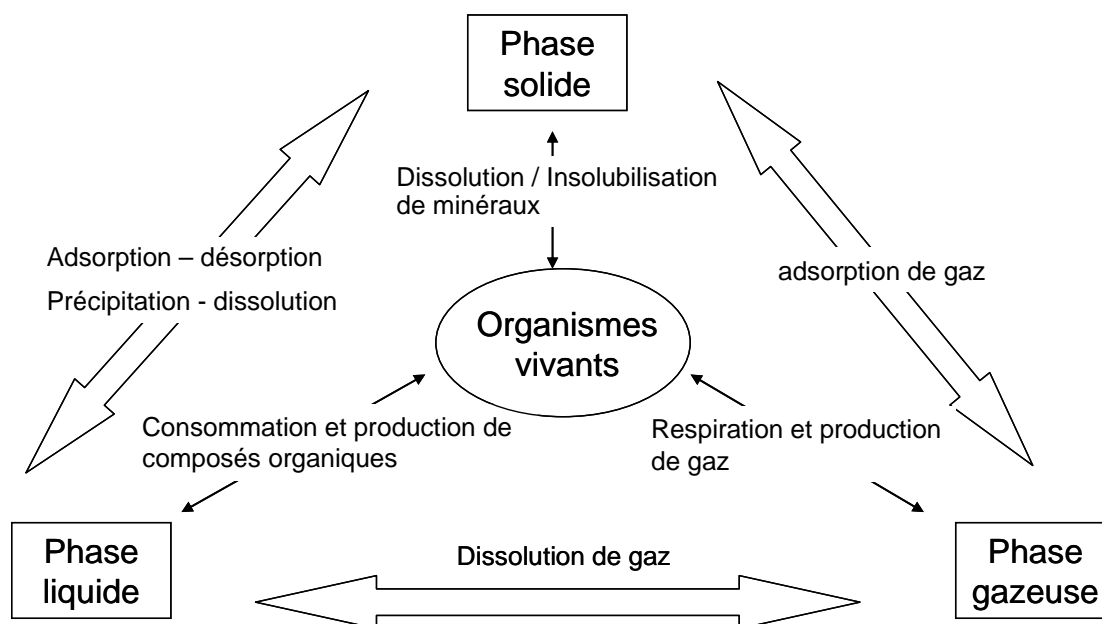


Figure 1 – Constituants formant un sol et quelques exemples d'interactions entre les différents constituants (inspiré de Calvet (2003a)).

- La phase solide représente de la moitié au deux tiers du volume du sol. Elle est constituée à plus de 90% de minéraux inorganiques primaires (quartz, feldspath...) et secondaires (kaolinite, goethite...) (Sposito, 1989). La matière organique, représentant de 0,5 à 10 % du sol, est un mélange complexe de constituants en décomposition, solubles ou insolubles, provenant principalement des plantes, animaux et microorganismes. Cette matière organique est importante biologiquement (source d'énergie pour les organismes vivants...),

chimiquement (sorption, complexations, adsorption de cations...) et physiquement (stabilité du sol).

- *La phase liquide* correspond à de l'eau infiltrée qui, par percolation, se charge en gaz dissous (O_2 , CO_2), en substances minérales dissoutes et en particules en suspensions (colloïdes). Elle véhicule les substances nutritives (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , NO_3^- , Cl^- ...) nécessaires aux organismes vivants.

- *La phase gazeuse*, ou atmosphère du sol, occupe les pores du sol non envahis par la phase liquide. L'atmosphère du sol contient généralement de 18 à 20 % d' O_2 , mais la teneur en O_2 peut chuter à 2 % voire 0 % au voisinage des racines, de résidus organiques en décomposition, au cœur d'agrégats ou de mottes saturées en eau, ou en profondeur dans le sol. La teneur en CO_2 peut varier de 0,3 à 5 % et peut atteindre et dépasser les 20 % dans certains cas (voisinage de racines ou source importante de matière organique). L'atmosphère du sol contient toujours aussi N_2 , H_2O vapeur et Ar, mais elle contient aussi très souvent d'autres gaz produits et/ou consommés biologiquement : NO, N_2O , NH_3 , H_2 ou CH_4 .

- *Les organismes vivants du sol* sont en excluant les racines et la méso-faune (proportion typique de biomasse entre parenthèse), les bactéries (25 %), les champignons (59 %), les algues (traces), les protozoaires (4 %) et la microfaune (12 %) (Gobat et al., 1998). Les bactéries représentent les microorganismes les plus abondants dans le sol en densité et en nombre, même si les champignons représentent une quantité de biomasse plus importante. Les microorganismes du sol sont aujourd'hui reconnus comme étant un des facteurs clé dans l'évolution des sols.

1.2 L'état d'oxydo-réduction du sol

Tout comme l'acidité d'un sol est exprimée en fonction de l'activité en protons de la solution $\{H^+\}$, soit par la valeur du pH ($pH = -\log \{H^+\}$), l'intensité d'oxydo-réduction, pe , est exprimé en fonction de l'activité en électrons, $\{e^-\}$:

$$pe = -\log \{e^-\}$$

Expérimentalement et de façon classique, le potentiel d'oxydo-réduction du sol, E_H , est mesuré, en volt (V), à l'aide d'une électrode. Cette valeur est ensuite ramenée au pe par la formule thermodynamique suivante :

$$E_H = 0,059 pe$$

Le E_H est un des paramètres du sol les plus difficiles à évaluer. De façon conventionnelle, le E_H est mesuré à l'aide d'une électrode de platine. Dans la littérature, cette mesure expérimentale est très critiquée (Lindberg et Runnells, 1984 ; Runnells et Lindberg,

1990 ; Chapelle et al., 1996 ; Tanji et al., 2003 ; Washington et al., 2004 ; Herbel et al., 2007). En effet, la définition thermodynamique du potentiel d'oxydo-réduction (Sposito, 1989 ; Sigg et al., 2000) suppose un système à l'équilibre. Or, l'équilibre thermodynamique entre différents couples oxydant/réducteur n'est jamais atteint dans le sol. Ainsi, la mesure du E_H ne reflète pas l'état redox de tous les couples impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction (O_2/H_2O , Fe^{3+}/Fe^{2+} , NO_3^-/NO_2^- , NO_2^-/N_2O , $Mn(IV)/Mn^{2+}$, SO_4^{2-}/HS^- , CO_2/CH_4 etc.) mais plutôt l'état "moyen" d'un ou quelques couples momentanément plus abondants dans le sol ou auxquels l'électrode est plus sensible. Ainsi, de nombreux auteurs ont proposé d'autres mesures pour accéder à un état d'oxydo-réduction du sol telles que les processus terminaux d'accepteurs d'électrons (TEAPs) ou la mesure de la capacité oxydative, mesure de l' H_2 (...) (Lovley et al., 1994 ; Chapelle et al., 1996 ; Gao et al., 2002 ; Tanji et al., 2003). Néanmoins, la mesure du potentiel d'oxydo-réduction à l'aide d'une électrode reste encore très utilisée, certainement pour des raisons de coût et de facilité d'utilisation.

Concrètement, une large gamme de E_H (ou p_e) existe naturellement pour les sols. Un E_H fort signifie une faible activité des électrons et des conditions oxydantes. A l'inverse, un E_H faible, qui peut être négatif, indique une forte activité des électrons et donc des conditions réductrices. Les sols sont parfois classés en trois catégories en fonction de leurs valeurs de E_H (ou p_e) et de pH : oxiq, suboxiq et anoxiq (Figure 2). La définition exacte de ces termes est liée à la teneur en O_2 du sol, mais varie avec les auteurs ; un sol oxiq est défini par la présence d' O_2 , un sol suboxiq par une faible, ou très faible, présence d' O_2 , et un sol anoxiq par l'absence d' O_2 . La plupart des sols de surface sont considérés majoritairement comme oxiq, les conditions anoxiq prévalent surtout en profondeur mais également lorsque le sol est saturé en eau (cas des rizières), conséquence de la lente diffusion de l' O_2 . Les conditions anoxiq peuvent également se produire localement et temporairement au centre de micro-agrégats de la zone oxiq ou à la périphérie des racines. Toutefois, en l'absence de couple oxydant/réducteur avec une forte activité électronique (par exemple SO_4^{2-}/HS^-), un sol anoxiq peut présenter un E_H élevé et donc des conditions oxydantes. Ainsi, nous parlerons plutôt de conditions oxydantes ou réductrices lorsqu'il s'agit de valeurs du potentiel d'oxydo-réduction et de sols oxiq, suboxiq ou anoxiq lorsqu'il s'agit de présence ou d'absence d' O_2 .

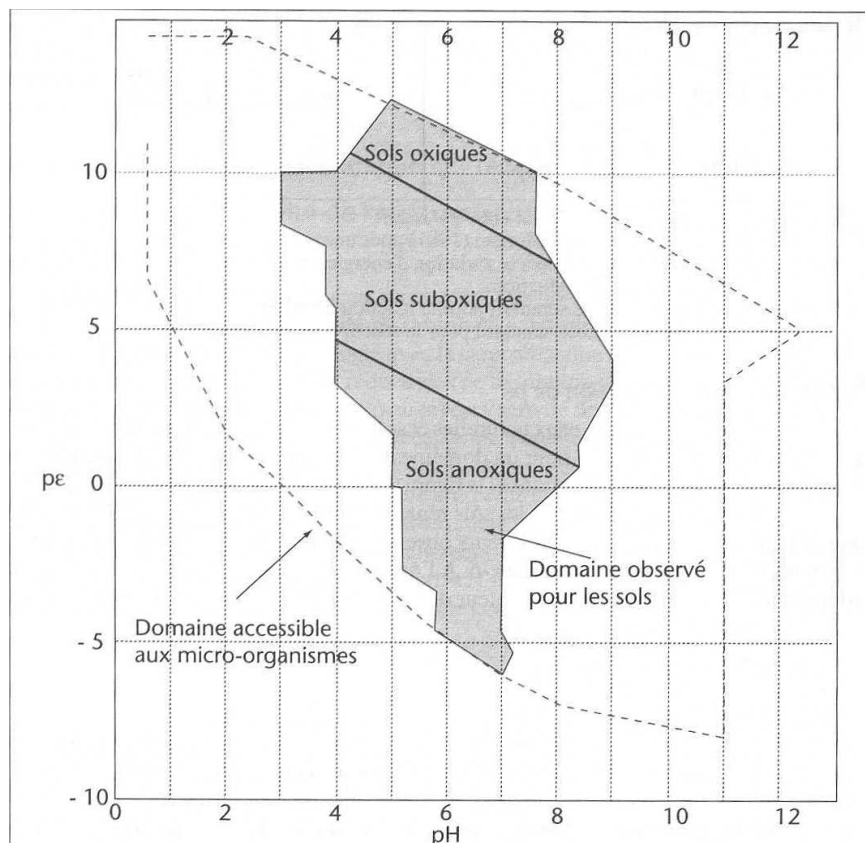


Figure 2 – Domaines pe-pH observés pour les sols accessibles aux microorganismes (Sposito, 1989 ; Calvet, 2003b)

Dans les sols, les principales espèces chimiques impliquées dans les réactions d’oxydo-réduction sont O₂, les oxydes de N et NH₃, Mn, Fe, les oxyde de S et les sulfures, H₂, CH₄, CO₂, auxquels il faut bien sûr ajouter les composés organiques qui sont très généralement (mais pas toujours) des donneurs d’électrons. Quelques exemples de réactions de réduction, à pH 7, ainsi que les gammes de pe associées sont présentés Tableau 1.

Tableau 1 – Exemples de quelques réactions de réduction observées dans les sols neutres pour une gamme de pe donnée (d’après Sposito, 1989)

Réaction de réduction	Gamme de pe
$\frac{1}{4} \text{O}_2 + \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{e}^- (\text{aq}) \rightarrow \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} (\text{l})$	11,0-5,0
$\frac{1}{2} \text{NO}_3^- + \frac{6}{5} \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{e}^- (\text{aq}) \rightarrow \frac{1}{10} \text{N}_2 (\text{g}) + \frac{3}{5} \text{H}_2\text{O} (\text{l})$	8,5-3,4
$\frac{1}{2} \text{MnO}_2 (\text{s}) + 2\text{H}^+ (\text{aq}) + \text{e}^- (\text{aq}) \rightarrow \frac{1}{2} \text{Mn}^{2+} (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} (\text{l})$	6,8-3,4
$\text{Fe}(\text{OH})_3 (\text{s}) + 2\text{H}^+ (\text{aq}) + \text{e}^- (\text{aq}) \rightarrow \text{Fe}^{2+} (\text{aq}) + 3\text{H}_2\text{O} (\text{l})$	5,0-1,7
$\frac{1}{8} \text{SO}_4^{2-} (\text{aq}) + \frac{9}{8} \text{H}^+ (\text{aq}) + \text{e}^- (\text{aq}) \rightarrow \frac{1}{8} \text{HS}^- (\text{aq}) + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} (\text{l})$	0,0-2,5

Ainsi, la réduction de l'O₂ a lieu en conditions oxydantes (sols oxiques et suboxiques). Si tous les couples redox étaient en équilibre thermodynamique, la réduction de NO₃⁻, Fe(III) et Mn(IV) aurait lieu en conditions modérément oxydantes, caractéristiques des sols suboxiques, et la réduction de SO₄²⁻, nécessiterait des domaines de pe très faibles, compris entre 0,0 et -2,5 en conditions réductrices (sols anoxiques). Toutefois, les couples redox ne sont généralement pas en équilibre entre eux, les réductions sont le fait de microorganismes plus ou moins spécialisés pour certaines d'entre elles, et le donneur d'électrons est généralement la matière organique (MO) avec un couple MO/CO₂ presque toujours en déséquilibre avec la plupart des couples redox à base de composés minéraux. Ainsi, la réduction de SO₄²⁻ en H₂S avec l'oxydation concomitante de l'acétate en CO₂ et H₂O est-elle possible d'un point de vue thermodynamique en condition oxique et de nombreux sulfato-réducteurs fonctionnent mieux (au moins initialement) en condition suboxiques (ou hypoxiques) qu'en conditions anoxiques strictes.

1.3 Les microorganismes du sol

1.3.1 Les sources d'énergie et de carbone

Pour croître et construire leurs composants organiques, les microorganismes du sol ont besoin principalement d'énergie et de carbone. Il est donc possible de classer ces microorganismes en fonction de leur source énergétique et/ou de carbone.

La source d'énergie peut être soit lumineuse (on parle de phototrophie), soit chimique (on parle alors de chimiotrophie). Dans ce dernier cas beaucoup plus général pour les microorganismes du sol, l'énergie est obtenue par des réactions d'oxydo-réduction mettant très généralement en jeu des composés organiques (on parle alors de chimio-organo-trophie) ou plus rarement exclusivement des composés minéraux (chimio-litho-trophie). Concernant les sources de C de constitution, certains microorganismes sont capables d'utiliser directement le carbone inorganique sous ses formes CO₂ ou HCO₃⁻ (atmosphérique ou dissous) pour fabriquer leurs composés organiques de constitution ; ils sont dit autotrophes. C'est le cas de certaines bactéries. Mais, la plupart des microorganismes ont besoin de substances organiques déjà synthétisées par d'autres organismes ; ils sont dits hétérotrophes. De nombreuses bactéries et la totalité des champignons sont des organismes hétérotrophes. A noter que les hétérotrophes sont très souvent aussi chimio-organo-trophes et que les autotrophes sont très souvent aussi chimio-litho-trophes.

1.3.2 Les réactions d'oxydo-réduction chez les microorganismes

En condition de chimiotrophie, l'énergie provient d'oxydo-réductions. Il s'agit de processus très généraux chez les êtres vivants. Au-delà des distinctions entre chimio-lithotrophie et chimio-organo-trophie, on peut distinguer aussi les microorganismes par le lieu des oxydo-réductions dédiées à la fourniture d'énergie :

- exclusivement plasmique chez les bactéries fermentaires et mettant en jeu des oxydo-réductions où oxydant et réducteur sont tous deux des composés organiques ;
- membranaires pour les étapes ultimes avec présence de chaînes respiratoires pour les microorganismes à catabolismes respiratoires. Le donneur d'électrons est alors bien souvent à l'origine une molécule organique et l'accepteur d'électron un composé minéral (mais parfois des composés organiques peuvent servir d'accepteurs terminaux d'électrons ou des molécules minérales servir de donneurs d'électrons).

On parle de catabolisme aérobie pour les catabolismes où l'O₂ est l'accepteur terminal d'électrons. On parle de catabolismes anaérobies dans les autres situations.

Selon leur besoin en O₂, les microorganismes du sol peuvent être classés en différents groupes :

- les aérobies stricts qui ne peuvent vivre qu'en présence d'O₂ ;
- les microaérophiles qui requièrent de l'O₂ pour survivre, mais à une concentration faible ;
- les aéro- ou anaérobies facultatives, qui peuvent vivre en présence ou en absence d'O₂ ;
- les aéro-tolérants qui sont des organismes anaérobies pour qui l'O₂ n'est pas toxique, mais qui ne l'utilisent pas ;
- les anaérobies stricts qui ne peuvent vivre qu'en absence d'O₂.

Dans le Tableau 2 sont répertoriés quelques exemples de processus engendrés par les bactéries aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes.

Tableau 2 – Exemples de biotransformations produits par les divers microorganismes présents dans les sols (modifié d’après Stengel, 1998 et Prescott et al., 2003).

PROCESSUS	REACTIONS
Microorganismes aérobies	
Respiration aérobie	$(\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
Nitritation	$\text{NH}_4^+ + \frac{3}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$
Nitratation	$\text{NO}_2^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$
Microorganismes anaérobies facultatifs	
Réduction catabolique des nitrates	$\text{C orga} + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{CO}_2$
Dénitrification	$\text{C orga} + \text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}, \text{N}_2 + \text{CO}_2$
Réduction du Fer, du manganèse	$\text{C. orga} + \text{Fe}^{3+}, \text{Mn}^{4+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+} + \text{CO}_2$
Fermentations	$\text{C. orga} \rightarrow \text{acides organiques (acétate, butyrate)}$
Microorganismes anaérobies stricts	
Réduction des sulfates	$\text{C orga (ou H}_2) + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-} \text{ (ou H}_2\text{S)} + \text{CO}_2$
Réduction du CO ₂	$\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4, \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+$
Déméthylation	$\text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4$
Réduction du proton	$\text{Acides gras, alcools} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+$

1.3.3 Les dynamiques microbiennes en fonction de l’état d’oxydo-réduction du sol

Si les couples redox étaient en équilibre entre eux, dans un sol suite à une transition entre conditions oxydantes et réductrices, les processus microbiens respiratoires interviendraient théoriquement avec utilisation séquentielle, des accepteurs terminaux d’électrons suivant : O₂, NO₃⁻, Mn⁴⁺, Fe³⁺, SO₄²⁻, CO₂... (Figure 3) entre lesquels il faudrait ajouter quelques accepteurs terminaux d’électrons organiques (fumarate notamment) et qu’il faudrait positionner par rapport aux métabolismes fermentaires et aux acidogénèses (Sposito, 1989 ; Peters et Conrad, 1996). Dans la pratique, l’enchaînement réel (lorsqu’il existe) dépend de l’aptitude des microorganismes à effectuer une ou plusieurs réactions, à la présence transitoire d’inhibiteurs plus ou moins sélectifs (NO₂⁻ notamment), et à la présence de substrats utilisables pour les métabolismes envisagés (éthanol, petits acides gras volatils (AGV) ou H₂ pour la sulfato-réduction). La séquence réelle et la simultanéité de différents processus dépendent ainsi de la biodiversité fonctionnelle des microorganismes présents, de la présence et de la biodisponibilité des donneurs et accepteurs d’électrons nécessaires et des phénomènes de compétitions. De plus, les processus sont souvent simultanés. Par exemple, la réduction des sulfates, du Fe(III) et la production de méthane est possible simultanément, si

les populations bactériennes sont actives et les donneurs d'électrons présents en excès (Chidthaisong et Conrad, 2000) ou encore un début de méthanogénèse arrêté ensuite par la dénitrification faisant s'accumuler du NO_2^- toxique assez facilement pour les méthanogènes.

Il est important de ne pas oublier que la plupart des réactions d'oxydo-réduction ne se font pas entre les couples oxydant/réducteur évoqués (par exemple $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ et $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$), mais entre un couple oxydant/réducteur minéral et le couple MO/CO_2 . Il n'y a donc pas de « sens » interdit ou obligatoire mais presque toutes les réactions sont thermodynamiquement possibles quelque soit le niveau d' O_2 .

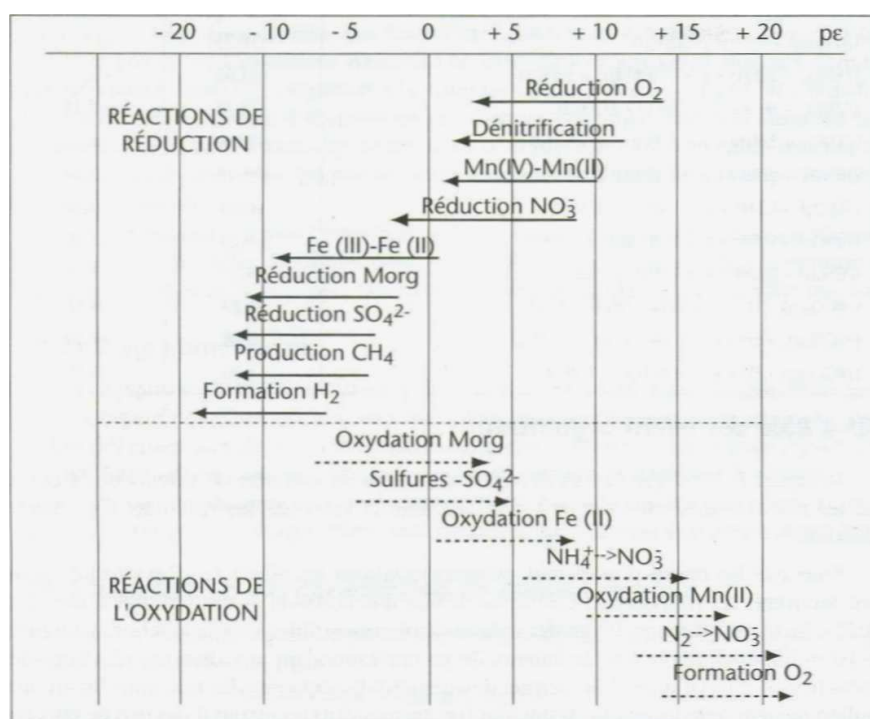


Figure 3 – Séquence des métabolismes microbiens intervenant dans un sol en fonction du pe (Calvet, 2003b)

1.4 Interactions entre géochimie et microbiologie du sol

Comme nous l'avons vu brièvement Figure 1, les différents composants inertes d'un sol (phases solide, liquide et gazeuse) sont en étroite relation avec le 4^{ème} composant que sont les organismes vivants. Dans ce paragraphe, nous avons choisi de développer les interactions entre les paramètres géochimiques du sol et les microorganismes.

1.4.4 Effet de la géochimie sur les microorganismes

L'eau est indispensable à la vie et sa teneur dans le sol a des effets sur les microorganismes présents. Abondante, elle augmente la disponibilité des substrats et facilite les déplacements des microorganismes ; rare, elle facilite les échanges gazeux avec l'atmosphère. Un assèchement du sol a pour conséquence une mortalité partielle des populations et la réduction des activités microbiennes, alors que la réhydratation entraîne une reprise rapide de l'activité microbienne, qui pendant quelques jours, peut être très supérieure à un même sol conservé humide (Gobat et al., 1998). La saturation en eau, si elle persiste, entraîne la disparition progressive de l'O₂ suite à sa consommation et sa faible diffusion depuis la surface en milieu liquide. Elle modifie alors profondément les équilibres biologiques : les microorganismes aérobies (bactéries aérobies et champignons) régressent et cèdent la place aux microorganismes anaérobies (bactéries anaérobies facultatives et strictes). La composition de cette eau a aussi un impact important sur les microorganismes du sol. En effet, certaines espèces ont des effets d'inhibition sur les activités microbiennes anaérobies. Par exemple, l'effet inhibiteur de NO₂⁻ sur de nombreux catabolismes : fermentation, réduction du Fe(III) et des sulfates, et méthanogenèse (Achnich et al., 1995 ; Chidthaisong et Conrad, 2000 ; Cooper et al., 2003 ; Weber et al., 2006). L'inhibition est généralement due aux effets toxiques des produits intermédiaires de la dénitrification (NO₂⁻, NO et N₂O) (Chidthaisong et Conrad, 2000). En outre, les donneurs et accepteurs d'électrons nécessaires aux réactions d'oxydo-réduction doivent être biodisponibles. Or, la biodisponibilité de ces composés est affectée, entre autre, par le pH de la solution, facteur déterminant dans la spéciation chimique des éléments (Sposito, 1989 ; Sigg et al., 2000). Par ailleurs, le pH a aussi un impact sur la distribution des microorganismes. La majorité des bactéries prédominent dans des sols neutres ou légèrement alcalins, alors que les champignons prédominent plutôt dans des environnements acides (Prescott et al., 2003). De plus, des variations drastiques de pH peuvent également détruire la membrane plasmique ou inhiber l'activité d'enzymes ou de protéines membranaires de transport.

L'atmosphère gazeuse a un impact important sur la composition microbienne du milieu. Le renouvellement de l'O₂ consommé dans le sol est assuré par la diffusion du gaz à partir de l'atmosphère extérieure et dépend à la fois de la teneur en eau du sol et de la porosité de la phase solide. Toutefois, un grand nombre de bactéries aérobies et de champignons sont capables de se développer en l'absence d'O₂, tant que le potentiel d'oxydo-réduction reste oxydant, c'est-à-dire suffisamment élevé pour que d'autres accepteurs d'électrons soient disponibles. Par ailleurs, nous avons vu que la teneur en CO₂ du sol pouvait atteindre et

dépasser les 20 %. L'effet de ce gaz est très variable. Certaines études ont montré que le CO₂ était nécessaire pour la croissance de quelques bactéries et champignons, notamment dans les processus de fermentations (Picek et al., 2000), alors que d'autres études ont montré que le CO₂ limitait la croissance des microorganismes et inhibait certaines enzymes (Šantrůčková et Šimek, 1997). La présence d'H₂ dans les sols a aussi un impact sur les processus microbiologiques anaérobies. D'une part la présence d'H₂ dans le sol est indispensable à certaines activités telles que l'homoacétogénèse, la réduction du fer ou des sulfates. D'autre part, c'est un facteur thermodynamique limitant pour les réactions d'acétogénèse impliquant l'éthanol, le propionate, le butyrate et le benzoate (Dolfing, 1988 ; Dassonville et Renault, 2002).

La phase solide du sol est un élément important vis-à-vis des microorganismes. Elle agit également comme un tampon vis-à-vis des variations de pH du milieu, protégeant ainsi les microorganismes. Dans un sol calcaire, la production de CO₂ induit une dissolution de la calcite, minimisant ainsi la dissolution de H₂CO₃ en H⁺ et HCO₃⁻ (Sigg et al., 2000). L'acidification des sols induit une dissolution des (oxy)-hydroxydes métalliques, engendrant, la mobilisation d'éléments métalliques (Dassonville et Renault, 2002). En outre, dans le sol, il existe des enzymes, extracellulaires, ou libérées lors de la lyse des cellules, indispensables pour certains microorganismes, incapables d'ingérer des macromolécules. Ces enzymes sont généralement adsorbées à la surface des composants de la phase solide (argiles, composés humiques). Ces composants de la phase solide agissent alors comme protecteur et stabilisant vis à vis des variations physico-chimiques du milieu et de la dégradation par d'autres enzymes (protéase) (Gobat et al., 1998). De plus, la matière organique est une source importante de donneur d'électrons pour les microorganismes.

1.4.5 Effet des microorganismes sur la géochimie du sol

Les microorganismes affectent directement le pH du sol via les activités microbiologiques. De manière assez générale, l'accumulation de CO₂ et d'acides organiques aura tendance à acidifier le milieu ; par ailleurs les réductions microbiennes de Fe(III) et Mn(IV) auront tendance à l'alcaliniser suite à la plus grande mobilité des ions réduits Fe²⁺ et Mn²⁺ que des ions oxydés Fe³⁺ et Mn⁴⁺ (ou Mn³⁺). De la même façon, mais pour d'autres raisons, les réductions des oxydes de N et des oxydes de S auront tendance à alcaliniser le milieu. Ainsi suite à un passage de conditions aérées à des conditions sans O₂, l'évolution du pH va résulter de la "somme" de processus aux effets contrastés. Très pratiquement, on

observe plutôt une augmentation de pH dans les sols initialement acides et une baisse de pH dans les sols initialement alcalins.

Les activités microbiologiques affectent également le niveau redox du sol. Lorsque le sol évolue après un passage de conditions aérées à des conditions anoxiques, les microorganismes utilisent successivement/parallèlement différents accepteurs d'électrons (Cf. Tableau 2 et Figure 3) et affectent potentiellement le E_H du sol au travers de très nombreux couples oxydant/ réducteur : $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, $\text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}$, $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$, $\text{Mn(IV)}/\text{Mn(III)}$, $\text{Mn(III)}/\text{Mn}^{2+}$, $\text{Fe(III)}/\text{Fe}^{2+}$, H^+/H_2 , $\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$, CO_2/CH_4 etc. L'évolution du E_H telle qu'elle peut être observée résulte alors de l'évolution réelle de chacun de ces couples (sans équilibre entre eux, en partie comme conséquence de la lenteur des réactions, en partie parce qu'elles sont le fait d'organismes plus ou moins spécialisés pour certaines d'entre elles et ayant des systèmes de régulation biologiques de leurs catabolismes) et de la sensibilité de l'électrode à chacun de ces couples qui est affectée par la nature des composés et par leur abondance. L'utilisation simultanée de différents accepteurs d'électrons peut être le fait de microorganismes aux possibilités multiples ou de bactéries différentes présentant au même instant des fonctionnements différents. Le déclenchement d'une réaction d'oxydo-réduction dépend très généralement de la disponibilité en substrats, voire de préférences pour certains substrats s'ils sont présents, de compétitions entre métabolismes pour les mêmes substrats et d'inhibitions variées. Par exemple, en condition réductrice, la compétition vis-à-vis de l' H_2 a été largement étudiée (Achnich et al., 1995 ; Chidthaisong et Conrad, 2000). L' H_2 est le donneur d'électrons pour la réduction des sulfates, du Fe(III) et la production de méthane. Il semble que les bactéries nitrato-réductrices soient également capables d'utiliser l' H_2 et donc soient un compétiteur pour les trois processus précédents. De plus, les processus de réduction du Fe(III) et du sulfate peuvent également suffisamment diminuer l' H_2 du milieu pour que la méthanogenèse ne soit thermodynamiquement plus réalisable (Achnich et al., 1995 ; Peters et Conrad, 1996).

1.5 Paramètres géochimiques et microbiologiques influençant la mobilité des éléments dans un sol

La mobilité d'un élément dans un sol dépend des propriétés physico-chimiques même de l'élément, mais également de la composition minérale et organique du sol, incluant les microorganismes, et des diverses réactions biogéochimiques pouvant se dérouler dans un sol. Le système sol est très complexe car plusieurs réactions peuvent se dérouler simultanément. Dans ce paragraphe, nous avons choisi de présenter séparément et de manière succincte, les

paramètres et processus géochimiques et biologiques pouvant affecter la mobilité des éléments dans un sol. Ces paramètres et processus seront développés plus en détail dans le cas particulier du sélénium (§ 2).

1.5.6 Les paramètres géochimiques

- Le potentiel d'oxydo-réduction et le pH

Le comportement chimique d'un élément est déterminé majoritairement par sa spéciation chimique. Dans les sols, les principaux facteurs contrôlant cette spéciation sont le potentiel d'oxydo-réduction (E_H) et le pH. Afin de mieux comprendre la spéciation des éléments, des diagrammes E_H - pH peuvent être appliqués. Ce type de diagramme, appelé aussi diagramme de Pourbaix, représente et délimite des domaines de stabilités des espèces, soluble/insoluble, oxydée/réduite. Un exemple de diagramme E_H -pH est donné pour le Se Figure 7.

- Sorption sur les phases solides minérales et organiques du sol

Le terme « sorption » est un terme générique pour exprimer l'immobilisation d'un élément dans un sol. La Figure 4 représente les divers processus physico-chimiques de la sorption : (a) l'adsorption d'un ion via un complexe de sphère externe (molécule d'eau entre la phase solide et l'ion), (b) l'adsorption via un complexe de sphère interne (perte d'une molécule d'eau et interaction directe entre la phase solide et l'ion), (c) l'absorption (pénétration et diffusion dans le solide) et (d) la précipitation de surface qui peut résulter d'une dynamique d'équilibre liquide/solide ou de processus d'oxydo-réduction. Par abus de langage, le terme « adsorption » est très souvent utilisé pour désigner tous les phénomènes à l'interface liquide/solide (Sposito, 1989).

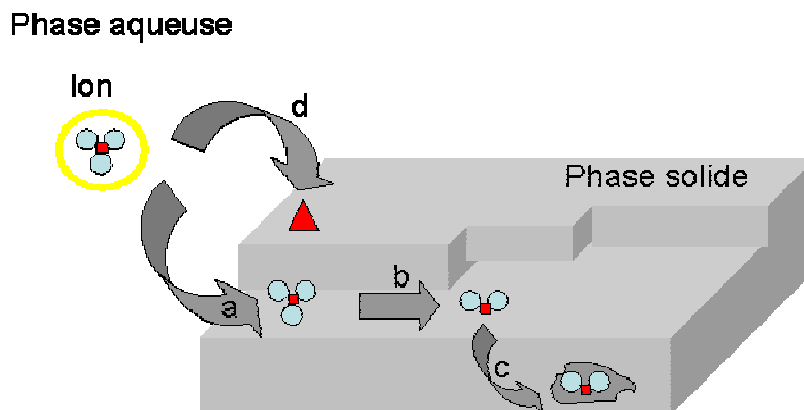


Figure 4 – Différents mécanismes de sorption d'un ion sur la phase solide du sol (inspirée de Sparks, 2003).

La réactivité de la phase solide minérale d'un sol est principalement due aux argiles (smectite, illite, ...) et aux (oxy)-hydroxydes métalliques (Al, Fe, Mn) (Sposito, 1989 ; Sparks, 2003). La sorption d'un soluté sur ces phases minérales est due, entre autre, à leur surface spécifique et à leur charge de surface (déterminant dans le cas de la sorption d'anions ou de cations) ou aux groupements non chargés (principalement MO) pouvant complexer les cations métalliques par des liaisons de coordination. La matière organique intervient souvent plus que les argiles et les oxy-hydroxydes dans la rétention des cations.

La matière organique du sol est extrêmement hétérogène, il y a donc un grand nombre de réactions directes possibles entre un soluté (cations, anions) et cette matière organique. La mobilité des complexes organiques dépend de la taille (colloïdes, acides de faible/fort poids moléculaire) et de la solubilité (soluble/insoluble) des composés. De plus, la matière organique du sol peut réduire, ou au contraire augmenter, la sorption sur les phases minérales par la formation d'un recouvrement organique (coating) à la surface du minéral.

1.5.7 Les processus microbiologiques

Aux paramètres et processus géochimiques cités précédemment viennent s'ajouter les processus biologiques dans le contrôle de la mobilité des éléments dans un sol. Ces processus, schématisés Figure 5, peuvent entraîner soit une insolubilisation, soit au contraire une solubilisation des éléments (Gadd, 1996 ; Gázsó, 2001). Le mécanisme de volatilisation biotique sera évoqué uniquement dans le cas particulier du sélénium (§2.2.2.4).

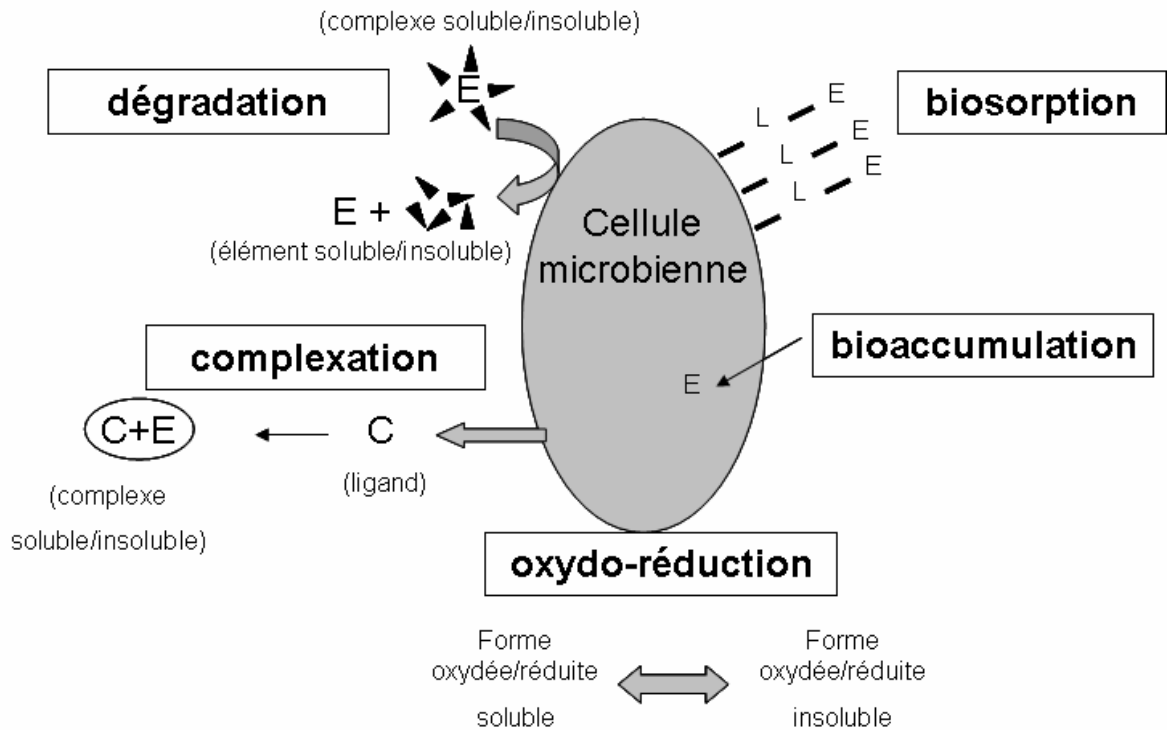


Figure 5 – Principales interactions entre un élément (E) et les microorganismes conduisant à la solubilisation et/ou à l’insolubilisation de cet élément.

L’immobilisation des éléments est induite principalement pas des phénomènes de précipitation (via des processus d’oxydo-réduction directs ou indirects et/ou via la production de complexes insolubles), de biosorption (formation de complexes avec des ligands cellulaires à la surface des microorganismes) et de bioaccumulation (absorption cellulaire des éléments). La solubilisation des éléments est due majoritairement à des processus d’oxydo-réduction (directs ou indirects), à la production d’agents complexants solubles (tels que les sidérophores) ou encore, de façon indirecte, à la dégradation de matière organique pouvant solubiliser des éléments préalablement complexés.

1.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu :

- i. que le sol est un milieu complexe et hétérogène que ce soit par sa structure, ses paramètres physico-chimiques et sa distribution en microorganismes,
- ii. par quels phénomènes les phases liquide, solide et gazeuse du sol ont un impact sur les microorganismes, leur distribution dans le sol et leurs activités,

iii. en quelles mesures les microorganismes modifient la composition de la solution, de l'atmosphère et de la phase solide du sol par leurs diverses activités,

iv. et que la mobilité des éléments dans un sol est contrôlée à la fois par les paramètres géochimiques et biologiques du sol.

Ainsi, afin d'estimer au mieux la mobilité d'un élément dans le sol, il est donc nécessaire de comprendre les impacts, directs et/ou indirects, des paramètres géochimiques et biologiques du sol sur cet élément. Dans le chapitre suivant, nous traitons le cas particulier du sélénium.

2. Le sélénium

2.1 Généralités

Le sélénium, de symbole Se et de numéro atomique 34, fait partie de la famille des chalcogènes, colonne 16 du tableau périodique des éléments (Figure 6). C'est un non-métal, analogue au soufre par ses propriétés chimiques. Il existe 6 isotopes stables naturels du sélénium, dont le plus abondant est le ^{80}Se (49,1 %) et des isotopes radioactifs artificiels dont le ^{75}Se (demi-vie : 119,4 jours), utilisé comme traceur en radio-écologie et le ^{79}Se , produit lors du cycle du combustible nucléaire (§ 2.1.1.3).

Les noyaux des éléments en italique sont instables

Colonne 13 : du BORE	Colonne 14 : du CARBONE	Colonne 15 : PNICOGÈNES	Colonne 16 : CHALCOGÈNES	Colonne 17 : HALOGENES	Colonne 18 : GAZ RARES
5 Bore B 10,81 801 23 2,04	6 Carbone C 12,01 1086 122 23,53	7 Azote N 14,01 1402 122 14,01	8 Oxygène O 16,00 1314 14 16,00	9 Fluor F 19 1981 236 39,1	10 Néon Ne 20,18 2081 24,5 27,1
13 Aluminium Al 26,98 578 43 11,63	14 Silicium Si 28,09 786 120 1,71	15 Phosphore P 30,97 1012 72 31,1	16 Soufre S 32,05 1000 201 32,05	17 Chlore Cl 35,45 1284 350 35,45	18 Argon Ar 39,95 1321 83,8 87,4
31 Gallium Ga 69,72 579 29 11,81	32 Germanium Ge 72,59 762 119 1,41	33 Arsenic As 74,4 947 119 74,4	34 Sélénium Se 78,96 196 196 78,96	35 Brome Br 79,9 84 8 79,9	36 Krypton Kr 83,80 1353 83,8 131
49 Indium In 114,82 589 49 11,78	50 Etain Sa 118,71 709 108 1,87	51 Antimoine Sb 121,1 834 104 121,1	52 Tellure Te 127,6 891 104 127,6	53 Iode I 126,9 1008 126,9 126,9	54 Xénon Xe 131,29 1170 131,29 131
81 Thallium Tl 204,38 389 48 11,62	82 Plomb Pb 207,19 716 35 1,87	83 Bismuth Bi 208,98 703 82 2,08	84 Polonium Po (209) 84 84 84	85 Astat At (210) 180 2,2	86 Radon Rn (222) 222 222 222

MÉTAUX SEMI-CONDUCTEURS NON-MÉTAUX

Figure 6 – Les 6 dernières colonnes du tableau périodique des éléments.

2.1.1 Les sources de sélénium et concentrations dans l'environnement

Les origines du sélénium dans l'environnement peuvent être naturelles ou anthropiques. Il se trouve naturellement dans l'écorce terrestre à une concentration moyenne de 0,03 à 0,80 mg.kg⁻¹ (Tamari, 1998). Il peut également se trouver en substitution au soufre dans certains minéraux tel que dans la chalcopyrite (CuFeS₂) ou la pyrite (FeS, FeS₂). Cependant, diverses activités humaines contribuent à l'augmentation des teneurs en sélénium dans l'environnement, notamment la combustion de charbon, le raffinage du cuivre et la fabrication de semi-conducteurs (Lemly, 2004).

2.1.1.1 Le sélénium dans les sols, les eaux et l'atmosphère

Dans les sols, les concentrations naturelles en Se varient de l'ordre de 0,1 mg.kg⁻¹ (Chine et en Finlande) à 100 mg.kg⁻¹ (Irlande et Etats-Unis) (Pyrzyńska, 2002). Ainsi, il est possible de distinguer des sols séléniprives avec une concentration en sélénium total inférieure à 0,2 mg.kg⁻¹ comme en Inde (Dhillon et Dhillon, 1999; 2004) ou en Chine (Tan et al., 2002), et des sols sélénifères où les teneurs en sélénium peuvent être supérieures à 5 mg.kg⁻¹, comme au Etats-Unis, dans le bassin de « Kesterson Reservoir », avec 90 mg.kg⁻¹ de sélénium (Zawislanski et Zavarin, 1996). Dans le Tableau 3 sont répertoriés quelques exemples de teneurs en sélénium des sols trouvés dans la littérature.

Tableau 3 – Teneur en sélénium de quelques sols.

localisation	concentration	référence
Etats-Unis (Hyco reservoir, Roxboro)	1,8 mg.kg ⁻¹	(Masscheleyn et al., 1991)
Etats-Unis (Kesterson reservoir)	0,4 - 92,7 mg.kg ⁻¹	(Zawislanski et Zavarin, 1996)
Etats-Unis (Montana)	1,2 - 9,1 mg.kg ⁻¹	(Zhang et Moore, 1997)
Etats-Unis (Wyoming)	2,6 - 4,2 mg.kg ⁻¹	(Ramirez et Rogers, 2002)
France (Nord)	0,1 – 1,4 mg.kg ⁻¹	(Sterckeman et al., 2002)
Chine	0,2 - 3,8 mg.kg ⁻¹	(Tan et al., 2002)
Inde	0,1 – 2,6 mg.kg ⁻¹	(Dhillon et Dhillon, 2004)

Le sélénium est présent dans les eaux de surface à des teneurs de 0,1 à 400 µg.L⁻¹ (Conde et Sanz Alaejos, 1997). Il provient principalement de réactions de dissolution des sols et/ou roches mères riches en sélénium.

Les données concernant le Se atmosphérique sont relativement peu abondantes en comparaison des données sur les sols ou les eaux. Les teneurs moyennes en sélénium dans l’atmosphère sont de l’ordre de 0,03 à 5,7 ng.m⁻³ (Conde et Sanz Alaejos, 1997 ; Ventura et al., 2005 ; Dudzinska-Huczuk et Bolalek, 2007). La principale source naturelle de Se atmosphérique est l’activité volcanique. L’abondance du Se dans les sulfures volcaniques émis peut atteindre jusqu’à 5 % (Seiler, 1998). Pour les zones dépourvues d’activité volcanique, les sources de sélénium atmosphérique sont principalement anthropiques (combustion du charbon, industrie électronique et verrière), mais également biologiques. La volatilisation biologique du Se peut être produite par les microorganismes (bactéries, champignons et levures) (§3-4-3) et par les plantes. Les émissions mondiales de Se dans l’atmosphère, issues principalement d’activités anthropiques, sont répertoriées, par continent, dans le Tableau 4, en tonnes/ans. Les continents produisant le plus de Se atmosphérique (Asie et Amérique du Nord) sont les zones géographiques ayant les plus fortes teneurs en Se dans les sols.

Tableau 4 – Emissions mondiales de Se issues principalement de sources anthropiques au milieu des années 1990, par continent et en tonnes/ans (Dudzinska-Huczuk et Bolalek, 2007)

Continent	Se (tonnes/an)
Europe	838
Afrique	300
Asie	1982
Amérique du Nord	1086
Amérique du Sud	225
Australie/Océanie	170
Total	4601

2.1.1.2 *Le sélénium en France*

La législation française (décret français n° 2001-1220 du 20/12/2001) impose une valeur maximale de potabilité pour les eaux de 10 µg.L⁻¹ en Se. Dans l’arrêté du 2 Février 1998 (J.O. Numéro 52 du 3 Mars 1998), des teneurs maximales en sélénium dans les rejets gazeux de 1 mg.m⁻³ (exprimé en Se+As+Te) et dans les boues d’épandage de 10 mg.kg⁻¹ de matière sèche sont imposées pour la protection de l’environnement.

Sterckeman et al. (2002) ont mis en évidence, dans les sols du Nord de la France, des teneurs en Se de l'ordre de 0,1 à 1,4 mg.kg⁻¹. Roubaux (2005) a également mesuré des teneurs en Se, légèrement supérieures aux normes de potabilité (de 5 à 14 µg.L⁻¹) dans des eaux destinées à la consommation de l'Essonne (rivière Itteville). Il ne s'agit toutefois pas de cas de forte pollution en Se sur le territoire français.

2.1.1.3 Le sélénium dans le contexte nucléaire

Le ⁷⁹Se est un produit de fission de l'uranium 235 (production de 0,04 %). Isotope à longue période (demi vie : 3,77 x 10⁵ ans, Bienvenu et al., 2007), il est présent dans les déchets nucléaires de haute activité à vie longue provenant du retraitement du combustible nucléaire usagé, ainsi que dans les rejets associés au fonctionnement normal des centrales nucléaires et des usines de retraitement du combustible. En tant qu'isotope à vie longue, il est susceptible de perdurer dans l'environnement (Toulhoat, 2002 ; Adam et Roussel-Debet, 2002).

2.1.2 Les effets sur la santé

Le sélénium est un oligo-élément essentiel pour les organismes vivants. Il intervient notamment dans le fonctionnement enzymatique agissant contre le stress oxydant. En tant qu'élément essentiel, la carence en sélénium chez l'homme a été associée à des maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, telles que les maladies de Keshan ou de Kaschin-Beck ainsi qu'à une augmentation du risque de cancer (Holben et Smith, 1999 ; ATSDR, 2003 ; Brenneisen et al., 2005). Aussi, aujourd'hui, le Se est retrouvé dans beaucoup de compléments alimentaires.

Alors que le minimum nutritionnel pour les animaux est de 0,05 à 0,1 µg Se.g⁻¹, une exposition à des teneurs de l'ordre de 2 à 5 µg Se.g⁻¹ peut avoir des effets toxiques (Wu, 2004). L'intervalle de concentration entre les effets bénéfiques et les effets toxiques du Se est donc très étroit. Aux Etats-Unis, dans la réserve naturelle « Kesterson Reservoir » (San Joaquin Valley, Californie), des baisses de la reproduction, des malformations et des cas de mortalités ont été mis en évidence sur les animaux de la réserve et ont été corrélés aux fortes teneurs des sols (> 5 mg.kg⁻¹) et des eaux (330 µg.L⁻¹) en sélénium (Conde et Sanz Alaejos, 1997 ; Wu, 2004).

2.2 Mobilité du Se dans un sol

Nous avons vu, Chapitre 1, que la mobilité des éléments dans un sol était contrôlée à la fois par les paramètres abiotiques et biotiques du sol et de façon directe et/ou indirecte, *via* les interactions géochimie/microbiologie. Donc, afin de mieux comprendre la mobilité du Se dans un sol, nous présentons tout d'abord les réactivités abiotiques et biotiques du Se, puis comment la mobilité du Se est étudiée d'un point de vue global dans un sol.

2.2.3 Réactivités abiotiques du Se

2.2.3.1 Effet du potentiel d'oxydo-réduction et du pH du sol sur la spéciation du Se

La spéciation du Se détermine sa solubilité, sa réactivité vis-à-vis de la phase solide, sa biodisponibilité et sa toxicité dans l'environnement. Les données thermodynamiques basées sur une compilation de Denison (2002) et de la littérature, listées dans les travaux de Morlon et al. (2006), ont servi à établir le diagramme E_H -pH, en milieu aqueux du Se à une concentration de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 7).

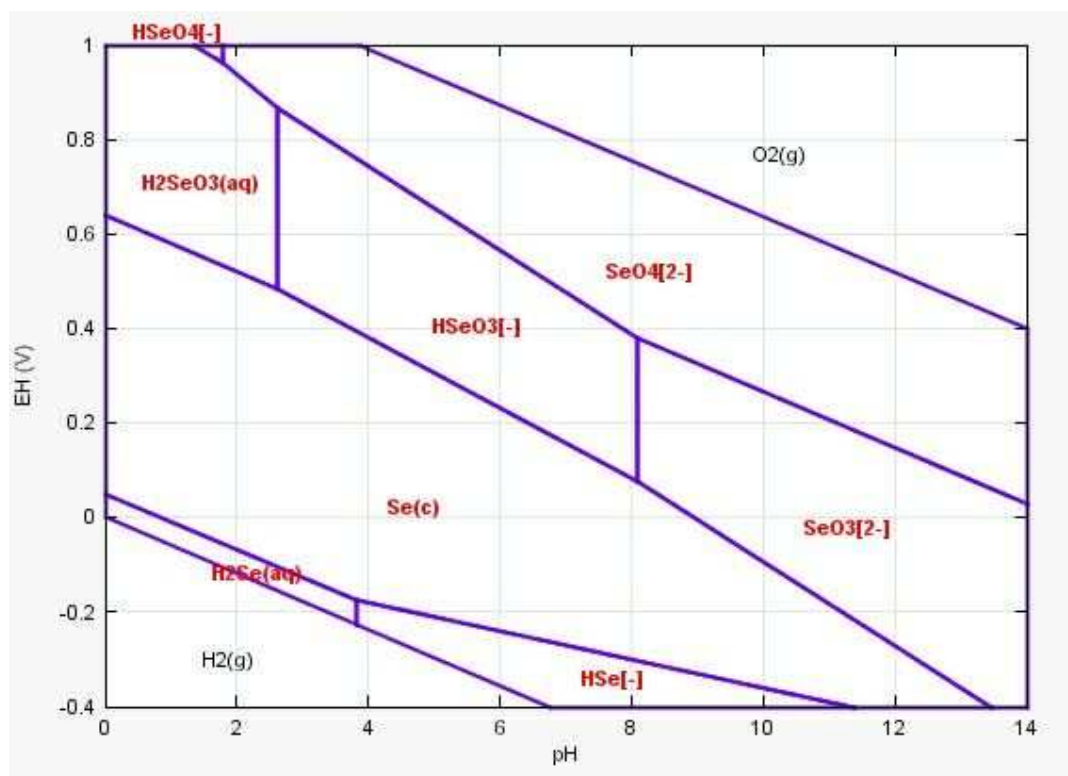


Figure 7 – Diagramme E_H -pH pour le Se à une concentration de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Le sélénium peut exister dans l'environnement sous quatre états d'oxydations différents, séléniate (VI), sélénite (IV), sélénium élémentaire (0) et séléniure (-II). Les formes oxydées, Se (VI) et Se (IV), présentes sous forme anionique (SeO_4^{2-} , HSeO_3^- et SeO_3^{2-}), sont solubles en solution, leur réduction conduit à une forme insoluble, le Se(0). Les séléniures, Se(-II), peuvent exister sous diverses formes organiques solubles, précipités de séléniures métalliques insolubles (FeSe (achavalite), PbSe (Clausthalite), CuSe (Klockmannite) (Olin et al., 2005) ainsi que sous formes de composés volatils.

Théoriquement, pour les conditions oxydantes et modérément oxydantes des sols de surface, le Se(IV) est l'espèce dominante sur une large gamme de pH environnementaux, alors qu'en conditions réductrices, les formes prédominantes sont Se(0) et Se(-II) (Elrashidi et al., 1987). Néanmoins, les prédictions thermodynamiques ne sont généralement pas applicables à un système naturel. En effet, les réactions d'oxydo-réduction sont cinétiquement lentes et les activités microbiologiques ne rendent le système sol que rarement à l'état d'équilibre.

Ainsi, des études ont été réalisées sur la spéciation du Se en fonction du E_H et du pH expérimentaux d'un sol ou d'un sédiment. Dans ces études, le E_H du sol est imposé et est maintenu dans les systèmes expérimentaux par des ajouts de gaz (O_2 ou N_2). Les études de Masscheleyn et al. (1990 ; 1991), servant généralement de référence pour la spéciation du Se, ont permis de définir les conditions de prédominance des différentes espèces du Se sur une suspension de sédiment:

- A 450 mV, le séléniate, Se(VI), est l'espèce prédominante en solution avec toutefois une forte dépendance au pH, le Se(VI) représentant 95 % des espèces dissoutes à $\text{pH} \geq 8,5$, mais plus que 75 % à des $\text{pH} \leq 7,5$.
- A 200 mV, le sélénite, Se(IV), est devenu l'espèce soluble majoritaire (60-78 %).
- A 0 mV, le Se(IV) est toujours l'espèce majoritaire.
- A -200 mV, seules les espèces Se (-II, 0) étaient détectées.
- Les formes volatiles du sélénium n'ont été détectées uniquement dans les conditions oxydantes et modérément oxydantes à 450 mV, 200 mV et 0 mV.

Ces résultats et ceux d'autres études (Masscheleyn et al., 1990 ; Sposito et al., 1991 ; Abdullah et al., 1995 ; Jayaweera et Biggar, 1996) ont permis de déterminer la séquence de réduction suivante lors d'une transition oxygène / anoxygène d'un sol/sédiment:



Il a également été mis en évidence que, cinétiquement, les processus d'oxydation du sélénium étaient plus lents que ceux de la réduction (Jayaweera et Biggar, 1996).

Toutefois, ces expériences ont été réalisées avec un sédiment naturel contenant des microorganismes. Les résultats présentés ci-dessus ne sont donc pas exclusivement dus à des transformations abiotiques du Se en fonction du E_H et du pH du sol, mais incluent également les interactions avec les microorganismes présents (cinétique, volatilisation ...).

2.2.3.2 *Les phénomènes de sorption du Se dans les sols*

Dans les environnements oxydants à modérément réducteurs, où le Se est principalement à l'état soluble (VI et IV), la distribution du Se entre la phase solide et liquide est principalement gouvernée par les processus chimiques d'adsorption. Les mécanismes d'absorption (diffusion dans le solide) ne sont pas (ou très peu) étudiés. Par contre, dans des conditions réductrices et dans des sols acides, où le Se est principalement à l'état Se(0) et Se(-II), il est généralement admis que la précipitation gouverne la solubilité du Se dans ces conditions.

- L'adsorption

Dans les sols, les principales phases minérales de rétention du Se étudiées sont :

- les oxy-hydroxydes métalliques (Fe, Mn, Al) (Balistreri et Chao, 1990 ; Zhang et Sparks, 1990 ; Dynes et Huang, 1997 ; Schulthess et Hu, 2001 ; Peak et Sparks, 2002 ; Wijnja et Schulthess, 2002 ; Duc et al., 2003 ; Foster et al., 2003 ; Duc et al., 2006 ; Martinez et al., 2006),
- les argiles (Bar-Yosef et Meek, 1987 ; Jacquier et al., 2001),
- et la calcite (Cowan et al., 1990 ; Cheng et al., 1997).

L'adsorption du Se sur ces phases minérales du sol dépend principalement (i) de sa spéciation et (ii) du pH du sol. Ainsi, l'adsorption du séléniate est beaucoup plus faible que celle du sélénite (Neal et al., 1987 ; Neal et Sposito, 1989). De plus à pH acide, la surface est chargée positivement, conduisant préférentiellement à la sorption d'anions, tels que Se(IV) et du Se(VI) (Neal et al., 1987 ; Balistreri et Chao, 1990 ; Su et Suarez, 2000 ; Koch-Steindl et Prohl, 2001).

En première approximation, le séléniate forme des complexes de sphère externe et le sélénite forme des complexes de type sphère interne avec les phases solides (Balistreri et Chao, 1990 ; Zhang et Sparks, 1990 ; Schulthess et Hu, 2001 ; Duc et al., 2003 ; Duc et al.,

2006 ; Martinez et al., 2006). Cependant des complexes de type sphère interne ont également été observés entre le séléniate et les oxydes de fer (Manceau et Charlet, 1994 ; Su et Suarez, 2000 ; Peak et Sparks, 2002).

Dans certains cas, la sorption du sélénium résulte d'un échange avec les ions présents à la surface des minéraux (carbonates, sulfates et phosphates...). Ces derniers représentent alors des sites d'échanges anioniques spécifiques (Cowan et al., 1990 ; Cheng et al., 1997).

Les études portant sur la sorption (principalement adsorption) du Se avec les composés organiques sont relativement peu nombreuses comparées aux études portant sur les phases minérales. Il est possible de considérer qu'il existe principalement trois types d'interactions (i) soit des interactions directes entre le composé organique et le Se, (ii) soit des interactions indirectes par la sorption sur la phase solide suite à la formation d'un complexe Se-composé organique, (iii) soit des interactions indirectes, lorsque le composé organique modifie la surface adsorbante du solide (augmentation ou diminution de la réactivité). La majorité des études concernent l'effet de certains composés organiques (substances humiques ou acides de faible poids moléculaire) vis-à-vis de la sorption du sélénium sur des minéraux purs (oxydes de Fe, Al). Globalement, ces composés n'ont pas, ou peu, d'effet sur les quantités de Se sorbées sur les phases minérales. La présence d'acides humiques a tendance à légèrement augmenter la sorption du sélénite sur des oxydes de fer amorphes, alors qu'il n'y a pas de sorption sur les acides humiques seuls (Tam et al., 1995). Les acides acétiques et formiques ne modifient pas la sorption du Se(IV) sur la goethite, mais augmentent légèrement celle du Se(VI) (Wijnja et Schulthess, 2002). Il apparaît également que les acides oxaliques et citriques ont un effet compétiteur à la fois sur la sorption du Se(IV) (Dynes et Huang, 1997) et du Se(VI) (Wijnja et Schulthess, 2002), en diminuant les quantités sorbées sur les oxydes d'aluminium. Par contre, les polysaccharides favorisent plutôt les processus de sorption du Se(IV) sur les particules en suspension et assureraient même une protection contre l'oxydation (Ferri et Sangiorgio, 2001).

- La précipitation / co-précipitation

La précipitation du Se se produit généralement après une étape de réduction abiotique d'une espèce soluble (Se(IV), Se(VI)). Myneni et al. (1997) ont conclu de leur étude, portant sur les transformations abiotiques du Se en présence d'oxyde de Fe (II, III) (rouilles vertes), que la réduction du Se(VI) en Se(0) avait lieu principalement par des réactions hétérogènes (adsorption et/ou co-précipitation), à la fois dans les couches interstitielles et à la surface des

rouilles vertes. De la même manière, les travaux de Bruggeman et al. (2002) et Naveau et al. (2007) ont mis en évidence la présence d'espèce réduite du Se (Se(0), FeSe et/ou FeSe₂) suite à une étape d'adsorption du Se(IV) sur de la pyrite (FeS₂) en conditions anoxiques.

Par ailleurs, une réaction biotique peut être, indirectement, à l'origine d'une réduction abiotique. Par exemple, Hockin et Gadd (2003) ont mis en évidence la précipitation de Se(0) engendrée par une réduction abiotique entre du Se(IV) et des sulfures produits par une bactérie (*Desulfomicrobium norvegicum*).

2.2.4 Réactivités biotiques du Se

Les microorganismes ont un rôle important dans le devenir du Se dans le sol. Ils sont responsables d'oxydo-réductions et modifient directement ou indirectement la mobilité du Se. Dans ce chapitre, les biotransformations du Se ont été divisées en trois groupes : l'assimilation microbienne, les oxydo-réductions et la transformation en composés volatils. Néanmoins, avant d'évoquer ces biotransformations, il est important d'évoquer la toxicité du Se sur les microorganismes.

2.2.4.1 La toxicité du Se et la résistance microbienne

Comme nous l'avons vu au § 2.1.2 et malgré son caractère essentiel, l'exposition à de fortes teneurs en Se est toxique et tératogène pour la plupart des organismes vivants. La toxicité du Se découlerait de la substitution de groupements thiol (-SH) des enzymes impliquées dans la respiration cellulaire par des groupements SeH, engendrant ainsi une inhibition de ces enzymes (Stolz et Oremland, 1999). Les formes solubles (Se(IV) et Se(VI)) sont considérées comme étant les plus toxiques, et leur transformation en formes insolubles ou volatiles (Cf § 2.2.2.3 et 2.2.2.4) sont généralement attribuées à des fonctions de protection ou de détoxification. La capacité des bactéries à résister à de fortes concentrations en Se semble dépendre de la souche bactérienne ainsi que de son environnement. Burton et al. (1987) ont estimés la proportion des bactéries résistantes au Se dans deux environnements différents : 59 % des bactéries issues d'un sédiment riche en Se (1364 µg.kg⁻¹) étaient résistantes à 10⁻³ mol.L⁻¹ de Se (IV) et Se (VI), contre seulement 1 % des bactéries issues du sédiment plus pauvre (< 5 µg.kg⁻¹). Ces mêmes auteurs ont estimé les concentrations minimales d'inhibition (MIC) des bactéries séléno-résistantes et celles des bactéries séléno-sensibles ; quelques valeurs sont présentées Tableau 5.

Tableau 5 – Concentrations minimales d’inhibition (MIC) en Se(IV) et Se(VI) pour les bactéries résistantes et sensibles isolées sur deux sites, Kesterson Reservoir (K) (riche en Se) et Volta Reservoir (V) (pauvre en Se) (modifié d’après Burton et al., 1987)

	MIC (mmol.L ⁻¹)	
	Se(IV)	Se(VI)
Seleno-résistantes		
<i>Bacillus sp (K)</i>	> 200	> 200
<i>Burkholderia (K)</i>	100	> 200
<i>Aeromonas hydrophylia (V)</i>	50	100
<i>Flavobacterium sp. (V)</i>	50	50
<i>Corynebacterium sp. (K)</i>	25	6,25
Seleno-sensibles		
<i>Aeromonas sp. (K)</i>	0,78	25
<i>Corynebacterium sp. (V)</i>	0,78	1,56
<i>Pseudomonas aeruginosa (V)</i>	1,56	1,56

2.2.4.2 L’assimilation dans la cellule

Oligo-élément essentiel à la vie, le Se est présent naturellement dans les cellules des microorganismes sous formes d’acides aminés (Se-méthionine, Se-cystéine, glutathion peroxydase) et de protéines (Doran, 1982). Ainsi, le Se présent dans le milieu, généralement sous la forme Se(IV) et/ou Se(VI), peut être incorporé, à faible concentration, dans les microorganismes, pour la formation de sélénoprotéines (Stolz et Oremland, 1999).

2.2.4.3 L’oxydo-réduction du sélénium

- L’oxydation

L’oxydation biologique du Se(0) dans les sols ou en cultures bactériennes, semble rare et très peu étudiée. A ce jour et à notre connaissance, seulement trois études ont porté sur ce sujet (Sarathchandra et Watkinson, 1981 ; Dowdle et Oremland, 1998 ; Losi et Frankenberger Jr, 1998). Le principal produit issu de l’oxydation est le sélénite.

- La réduction

La plupart des études portant sur la réduction microbienne du Se ont été réalisées en milieu de culture avec des souches bactériennes, au détriment d’autres microorganismes

comme les champignons ou les levures. A notre connaissance, il y a peu d'études portant sur la réactivité du Se dans des milieux naturels complexes (sol, sédiment, eaux) avec diverses interactions entre microorganismes. Deux mécanismes de réduction microbienne du Se ont été identifiés :

- la respiration anaérobie, qui correspond à une réduction avec un gain énergétique pour les microorganismes, ne se produisant qu'en condition anoxique ;
- la détoxification, réduction sans gain énergétique, qui peut avoir lieu en conditions oxygène (Hunter et Kuykendall, 2006) et anoxique (Ike et al., 2000).

De façon générale, le Se soluble (Se(IV) et Se(VI)) est réduit par les bactéries en Se(0) et est retrouvé sous forme de granules insolubles localisés (i) à l'intérieur et/ou à la surface des cellules bactériennes (Garbisu et al., 1996 ; Losi et Frankenberger, 1997 ; Kessi et al., 1999) et/ou (ii) dans le milieu de culture (Garbisu et al., 1996 ; Kessi et al., 1999 ; Roux et al., 2001 ; Sarret et al., 2005). Le terme « détoxification » est très souvent employé dans la littérature pour les réductions avec ou sans gain énergétique du Se en Se(0), moins toxique, car les concentrations en sélénite et/ou séléniate utilisées dans ces études sont souvent très élevées (10^{-2} - 10^{-3} mol.L⁻¹).

A notre connaissance, il n'y a pas d'études portant sur les processus de réduction à faibles concentrations en Se ($< 10^{-3}$ mol.L⁻¹). Ainsi, les données de la littérature ne permettent pas de savoir (i) s'il y a réduction microbienne de Se présent à faible concentration dans un sol, et (ii) si cette réduction est alors réellement un processus de détoxification.

2.2.4.4 La biométhylation et la volatilisation

La méthylation est un processus de transformation de composés non volatils en composés méthylés et volatils. La volatilisation du Se a été observée pour des cultures fongiques (Challenger et North, 1934 ; Frankenberger Jr et Karlson, 1994), des cultures bactériennes (Thompson-Eagle et Frankenberger Jr, 1990 ; Ranjard et al., 2002), et au niveau des plantes (Zieve et Peterson, 1984 ; Terry et al., 1992), et ce pour différents milieux tels que les eaux (Cooke et Bruland, 1987 ; Amouroux et al., 2001), les sols (Doran et Alexander, 1977) et les sédiments (Flury et al., 1997). Des études ont été menées pour identifier les principaux acteurs de la volatilisation dans un sol (Abu-Erreish et al., 1968 ; Zieve et Peterson, 1981 ; Doran, 1982 ; Karlson et Frankenberger Jr, 1988 ; Thompson-Eagle et Frankenberger Jr, 1991 ; Dungan et Frankenberger Jr., 2000 ; Ranjard et al., 2003). Les résultats de ces études sont variés. Il semblerait que bactéries et champignons soient capables de volatiliser le Se, en différentes proportions, en fonction, entre autre, des propriétés du sol,

de l'atmosphère gazeuse, et de la concentration en Se. La volatilisation est augmentée suite à un amendement organique (Karlson et Frankenberger Jr, 1988 ; Calderone et al., 1990). Les amendements organiques comme la pectine ou l'acide galacturonique (monomère de pectine) induisent de plus fortes augmentations de la volatilisation de Se. Il est possible que ces composés ayant une structure partiellement méthylée, soient une source de groupes méthyles pour les processus de méthylation microbiens (Karlson et Frankenberger Jr, 1988). De plus, les auteurs observent également un effet de la disponibilité de la source de C. Lorsque la source de C devient limitée, la volatilisation est similaire à la condition contrôle, non amendée.

Le processus de volatilisation est très souvent considéré comme un mécanisme de détoxification (Doran, 1982), mais la plupart des études sur la volatilisation ont été faites à de fortes teneurs en Se (de 10 à 100 mg.kg⁻¹ sol) (Doran et Alexander, 1977 ; Karlson et Frankenberger Jr, 1988 ; Stork et al., 1999). Toutefois, Dungan et Frankenberger Jr. (2000) ont montré que la volatilisation du Se était possible à une faible concentration en Se (10 µmol.L⁻¹) par une bactérie (*Enterobacter cloacae*) en milieu de culture. Mais, la volatilisation n'a pas encore été mise en évidence à de faibles concentrations en Se dans un milieu complexe (sols, sédiments).

La biométhylation a été observée à partir des formes inorganiques et organiques du Se (Abu-Erreish et al., 1968 ; Doran et Alexander, 1977 ; Thompson-Eagle et Frankenberger Jr, 1990 ; Azaizeh et al., 1997). Néanmoins, les taux de Se volatilisés ne sont pas identiques pour tous ces composés et dépendent surtout de la biodisponibilité du Se pour les microorganismes. En effet, le Se natif d'un sol n'est pas toujours biodisponible pour les microorganismes (Reamer et Zoller, 1980). De plus, en présence de Se(0), insoluble, le taux de volatilisation est très faible comparé aux autres formes solubles du Se, tel que le Se(IV), le Se(VI) et la sélénométhionine (Abu-Erreish et al., 1968 ; Doran et Alexander, 1977).

- Les formes méthylées et leur devenir

Dès 1977, les composés volatils issus de la biométhylation ont été identifiés (Doran et Alexander, 1977). Les deux principaux composés sont le diméthyle seleniure (DMSe) et le diméthyle disélénure (DMDS₂). Alors que le DMSe est le principal produit formé lors de la volatilisation, le DMDS₂ est plus rarement observé. Un troisième métabolite a été détecté dans l'atmosphère et identifié comme étant (CH₃)₂SeO₂ par spectroscopie de masse (Reamer et Zoller, 1980). En condition anoxique, un produit gazeux de Se non méthylé est issu du sol. On suppose, par analogie au soufre, qu'il s'agit de H₂Se (Doran et Alexander, 1977).

Une fois formés, le DMDS_e et le DMS_e ont des devenir différents dans le sol. Le DMDS_e peut être solubilisé dans l'eau, sorbé sur le sol, mais aussi transformé en espèce non volatile ainsi qu'en DMS_e (Martens et Suarez, 1999 ; Zhang et Frankenberger Jr, 2002). La rapide sorption et l'instabilité du DMDS_e peuvent alors expliquer pourquoi la plupart des études considèrent que le DMS_e est l'espèce majoritairement formée lors du processus de volatilisation. Le DMS_e n'est pas ou peu sorbé dans un sol (Guo et al., 1999) mais est très soluble dans l'eau (24,4 g.L⁻¹) (Azaizeh et al., 2003). Ainsi, dans un sol aéré, le DMS_e est retrouvé dans l'atmosphère, alors que dans un sol saturé en eau, le DMS_e est majoritairement (96 %) piégé dans la phase aqueuse (Zhang et Frankenberger Jr, 1999).

2.2.5 La modélisation

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe de nombreux processus biotiques et abiotiques impliqués dans la réactivité du Se dans un sol. Ces divers processus (réductions abiotique et biotique, sorption, précipitation, assimilation dans les cellules des microorganismes, volatilisation...) tendent à diminuer la concentration de Se dans la phase liquide. Toutefois, il est très difficile de modéliser la distribution du Se entre la phase solide et la phase liquide, car il n'est pas toujours possible de distinguer expérimentalement ces divers processus. Aussi, des modèles macroscopiques simples et non mécanistes sont souvent utilisés pour définir et expliquer cette distribution. L'isotherme de sorption, parfois appelée abusivement isotherme d'adsorption, est l'approche la plus courante.

Nous évoquerons le principe expérimental de l'isotherme de sorption et les deux types d'équations utilisées pour reproduire les données expérimentales. Il s'agit :

- du modèle de Langmuir ;
- du modèle de Freundlich.

Nous poursuivrons avec l'utilisation d'un coefficient unique de distribution liquide/solide, appelé « K_d » qui est souvent utilisé pour modéliser la rétention ou la remobilisation des radionucléides dans les sols.

2.2.5.1 L'isotherme de sorption : approche expérimentale

L'isotherme de sorption est obtenue par une technique de laboratoire, en réacteur fermé parfaitement agité, classiquement appelé « batch », schématisée Figure 8.

Concrètement, une solution de volume V (L), contenant un soluté i (par exemple du Se) à la concentration C_i⁰ (mol.L⁻¹) est mise contact avec une masse m (kg) de solide (par exemple du sol). Le soluté étant partiellement retenu sur le solide adsorbant, la concentration

C_i en solution va diminuer en fonction du temps (Figure 8). De cette concentration en solution, il est possible de déduire, la concentration de soluté de la phase solide q_i (mol.kg^{-1}) en fonction du temps, par l'équation 1 suivante :

Équation 1
$$q_i = \frac{V(C_i^0 - C_i)}{m}$$

Expérimentalement, il n'existe pas de valeur standard pour le ratio masse de solide sur volume de solution à utiliser. Pour le Se, dans la littérature, ce rapport peut varier entre des valeurs fortes de 1/2 (Alemi et al., 1991) à des valeurs plutôt de faible de 1/50 (Wang et Liu, 2005). De plus, les cinétiques d'adsorption du Se sont généralement considérées comme rapides. Des temps d'équilibre de 2h à 48h suffisent à atteindre un équilibre thermodynamique entre la phase solide et la phase liquide (Sarathchandra et Watkinson, 1981 ; Neal et al., 1987 ; Fio et al., 1991 ; Dhillon et Dhillon, 1999).

Au-delà du temps d'équilibre, (t_{eq}), les concentrations en solution et en phase solide, respectivement C_i^{eq} et q_i^{eq} , n'évoluent plus. En fixant le temps de contact soluté / phase adsorbante au temps d'équilibre t_{eq} et en faisant varier la concentration initiale en soluté C_i^0 , il est alors possible de représenter graphiquement l'isotherme de sorption $q^{eq}=f(C^{eq})$. Selon l'allure des courbes $q^{eq}=f(C^{eq})$, on peut proposer différentes fonctions mathématiques pour représenter les isothermes de sorption. Les plus couramment utilisées sont les isothermes de Langmuir et de Freundlich.

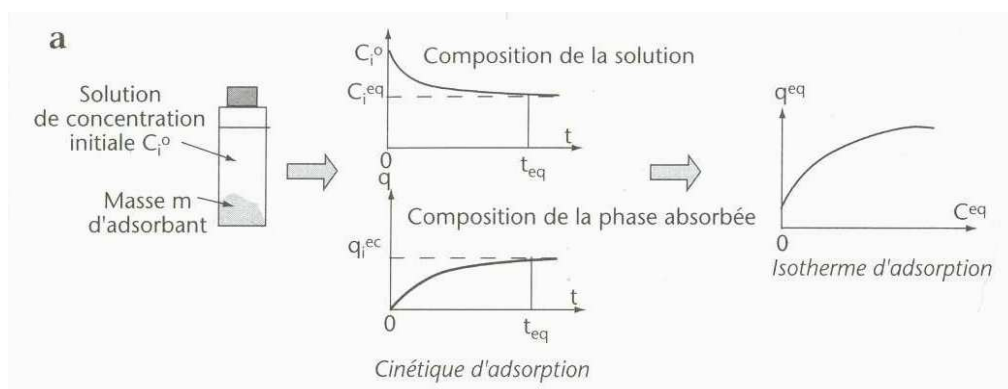


Figure 8 – Principe expérimental d'obtention de l'isotherme de sorption (appelée isotherme d'adsorption dans le schéma) (Calvet, 2003a)

- L'isotherme de Langmuir

La formulation mathématique de l'isotherme de Langmuir est la suivante :

Équation 2
$$q_i = q_{\max} \cdot \frac{K \cdot C_i}{1 + K \cdot C_i}$$

Avec q_{\max} , la concentration maximale retenue sur la phase solide et K , la constante relative à l'énergie des sites de liaison

L'isotherme de Langmuir repose sur un certain nombre d'hypothèses :

- la surface adsorbante est homogène et tous les sites d'adsorption possèdent la même énergie de liaison ;
- la quantité adsorbée est limitée à une monocouche ;
- l'adsorption est réversible.

- L'isotherme de Freundlich

La formulation mathématique de l'isotherme de Freundlich est la suivante :

Équation 3
$$q = K \cdot C_i^N$$

Avec K , une constante et N compris entre 0 et 1.

Dans le cas particulier de l'isotherme linéaire avec $N=1$, $K = K_d$, le coefficient de distribution liquide/solide utilisé en radioécologie. Le paragraphe suivant est entièrement consacré à ce paramètre.

Les isothermes de Freundlich et Langmuir ont été utilisées pour modéliser la rétention de Se sur différents types de sol (Alemi et al., 1991 ; Fio et al., 1991 ; Sharmasarkar et Vance, 2002). Néanmoins, l'ajustement de fonctions mathématiques sur des données expérimentales ne signifie nullement que les hypothèses des modèles soient satisfaites et ne tient en aucun cas compte des différents processus biogéochimiques pouvant intervenir dans le devenir du Se. Il s'agit, le plus souvent, d'un simple ajustement mathématique, afin de pouvoir comparer les valeurs des constantes des formules.

- Le coefficient de distribution liquide solide : K_d

Classiquement, la réactivité d'un radioélément dans un sol est évaluée par la détermination du coefficient K_d de distribution entre la phase solide et la phase liquide :

Équation 4
$$K_d = \frac{q_{eq}}{C_{eq}} \quad (\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$$

Kd est un coefficient de distribution macroscopique ; il ne tient pas compte de la spéciation de l'élément, ni des processus impliqués dans ces diverses transformations, mais uniquement de la répartition de l'élément entre les phases solide et liquide. Théoriquement, la formulation de ce coefficient repose sur un certain nombre d'hypothèses :

- les sites de sorption de la phase solide sont toujours en excès par rapport à la concentration totale de l'élément ;
- l'équilibre chimique de sorption est atteint. Le modèle Kd est un modèle à l'équilibre ;
- les phénomènes de sorption/désorption sont instantanés et réversibles ;
- tous les sites de sorption sont identiquement accessibles et de même nature vis-à-vis de l'intensité de liaison.

Plus la valeur de Kd est importante, plus la rétention du Se dans le sol est importante.

Selon l'AIEA (IAEA, 1994) et Yu et al. (2001), il est possible de classer des valeurs « génériques » de Kd pour le Se en fonction du sol. Ces valeurs sont classées selon 4 catégories : sol sableux (>70 % sables), sol argileux (>35 % argiles), sol limoneux (> 80 % de limons) et sol organiques (> 30 % matière organique). De ces valeurs (Tableau 6), on peut conclure que la matière organique des sols a un fort pouvoir de rétention du Se dans le sol.

Tableau 6 – Valeurs par défaut de Kd (L.kg⁻¹) pour le sélénium en fonction du type de sol selon l'AIEA (modifié d'après Roussel-Debet et Colle, 2005)

Se	Sol sableux	Sol argileux	Sol limoneux	Sol organique
Kd (L.kg ⁻¹)	150	490	740	1800

Les valeurs de l'AIEA semblent donc être largement surestimées car Roussel-Debet et Colle (2005) ont montré que malgré le peu de valeurs de Kd disponible pour le Se dans la littérature, les résultats montrent un Kd compris entre 5 et 50 L.kg⁻¹. Toutefois, deux études menées sur 58 sols du Japon (Nakamaru et al., 2005) et 8 sols d'Inde (Dhillon et Dhillon, 1999) ont répertoriés des valeurs de Kd allant respectivement de 12 à 1060 L.kg⁻¹ et de 1 à 570 L.kg⁻¹, ces sols présentant des pH, composition physico-chimique et minéralogique très différents. Il est très difficile de comparer les différentes valeurs de Kd, car les différentes hypothèses relatives au Kd ne sont que rarement toutes respectées. Aussi, ces larges gammes de valeurs de Kd trouvées dans la littérature montrent que la sorption du sélénium n'est pas contrôlée par un paramètre particulier, mais par un ensemble d'interactions entre différents paramètres. Par ailleurs, Jacquier et al. (2001) ont montré qu'il n'était pas possible d'estimer

le Kd dans un système complexe à partir des Kd obtenus pour les phases pures composant ce système complexe. Dans le cas du Se(IV) et du mélange smectite-goethite, les différences de pH des solutions expliquerait la non-additivité des Kd.

2.3 Outils expérimentaux pour l'étude du Se

Comme nous l'avons vu précédemment, le Se peut se trouver dans le sol sous forme soluble dans la phase liquide, sorbé ou précipité sur la phase solide ou encore sous forme de composés méthylés dans la phase gazeuse. Ainsi, afin d'estimer au mieux la réactivité du Se dans un sol, il est important de pouvoir le quantifier dans ces différents compartiments.

2.3.6 En phase liquide

Plusieurs méthodes analytiques permettent d'accéder au Se en phase liquide. Les plus utilisées pour les échantillons environnementaux liquides sont la spectrométrie de fluorescence, la spectrométrie d'adsorption atomique (AAS) utilisant la génération d'hydrure (HG-AAS) ou le four graphite (GF-AAS), l'analyse par activation de neutrons (AAN), la chromatographie en phase gazeuse (CG), les méthodes électrochimiques Néanmoins, les échantillons environnementaux ont souvent des matrices complexes, générant ainsi de nombreuses interférences avec ces différentes méthodes d'analyses. Aussi, des étapes de solubilisation, minéralisation, pré-concentrations, purifications, séparations... sont souvent employées avant les analyses. Les multiples limites de détection et interférences des méthodes citées et des autres sont récapitulées dans les revues bibliographiques de Niedzielski et Siepak (2003), Conde et Sanz Alaejos (1997), Munos Olivas et al. (1994), et Dauchy et al. (1994).

2.3.7 En phase solide

Les méthodes spectroscopiques (XAS et XPS)¹ et les observations microscopiques (MET, MEB)² couplées à la spectroscopie des rayons X par dispersion en énergie (EDX) permettent d'accéder soit aux différents états d'oxydation du Se directement dans l'échantillon solide, sans prétraitement, soit aux différents types de complexes formés entre la phase solide et le Se (Tokunaga et al., 1996 ; Peak et al., 2006 ; Ryser et al., 2006 ; Naveau et al., 2007). Néanmoins, ces techniques nécessitent de fortes concentrations en Se (> 10 mg.kg⁻¹) et un appareillage complexe et très coûteux.

¹ XAS : X-ray Absorption Spectroscopy, XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy

² MEB : Microscopie Electronique à Balayage, MET : Microscopie Electronique à Transmission

L'approche la plus simple pour accéder à la distribution du Se en phase solide reste les extractions chimiques (séquentielles ou parallèles). Le principe est basé sur l'utilisation d'un extractant chimique qui, soit solubilise une ou plusieurs fractions (minéralogiques ou organiques) du sol susceptibles de retenir le Se, soit cible un état d'oxydation du Se particulier (Se(IV), Se(0)) (Tableau 7). Le Se peut ensuite être quantifié dans chaque extrait par différentes techniques (AAS, fluorométrie, ...). En pratique, il est souvent reproché à cette méthode son manque de sensibilité mais surtout son manque de sélectivité. De plus, il existe beaucoup de protocoles différents, ce qui rend les résultats difficilement comparables. Néanmoins, des extractions communes ont été identifiées ces dernières années. Les extractions communes sont récapitulées Tableau 7.

Tableau 7 – Phases communes retrouvées dans quelques protocoles d'extractions séquentielles.

Phase ciblée	Extractant	références
Se soluble	KCl	(Gao et al., 2000) (Dhillon et Dhillon, 1999) (Zhang et Moore, 1996) (Chao et Sanzolone, 1989)
	Eau	(Martens et Suarez, 1997)
Se(IV) adsorbé ou échangeable	K ₂ HPO ₄	(Dhillon et Dhillon, 2004) (Martens et Suarez, 1997) (Zhang et Moore, 1996)
	KH ₂ PO ₄	(Chao et Sanzolone, 1989)
	K ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄	(Hagarova et al., 2005) (Gao et al., 2000)
Se(0)	Na ₂ SO ₃	(Gao et al., 2000) (Zhang et Moore, 1996)
Se associé aux composés organiques	NaOCl	(Zhang et Moore, 1996)
	K ₂ S ₂ O ₈	(Séby et al., 1997) (Martens et Suarez, 1997)
	NaOH	(Doran, 1982)
Se « réfractaire »	HNO ₃	(Martens et Suarez, 1997)

Dans une évaluation critique de deux des multiples procédures d'extraction séquentielles (Zhang et Moore, 1996 ; Martens et Suarez, 1997), Wright et al. (2003), ont modifié la plus sélective d'entre elles (Zhang et Moore, 1996) afin d'optimiser sa sélectivité vis-à-vis des différentes fractions de Se ciblées.

2.3.8 En phase gazeuse

Le Se en phase gazeuse peut être estimé par différentes techniques. La méthode la plus directe est l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) de l'atmosphère du système (Thompson-Eagle et Frankenberger Jr, 1990 ; Martens et Suarez, 1999 ; Ranjard et al., 2003). Les autres techniques nécessitent un piégeage au préalable des formes volatiles. Généralement, un balayage de gaz (air, N₂, Ar) purge l'atmosphère des systèmes expérimentaux et envoie les espèces gazeuses vers des pièges. Ces pièges peuvent être soit liquide (HNO₃ ou NaOH-H₂O₂) (Zieve et Peterson, 1981 ; Terry et al., 1992), soit solide (charbon actif) (Karlson et Frankenberger Jr, 1988 ; Chabrouillet, 2007). Dans le premier cas, le sélénium est ensuite mesuré en phase liquide (§ 2.3.1). Dans le second cas, il est nécessaire d'extraire le Se du charbon actif, puis de le doser en phase liquide. Lorsqu'un isotope radioactif émetteur γ est utilisé (⁷⁵Se), la quantité de Se radioactif piégée dans le charbon actif peut directement être dosée en spectrométrie γ . De plus, l'utilisation d'un isotope radioactif permet de doser des quantités de Se volatilisé beaucoup plus faible, de l'ordre du ‰, comparée aux autres méthodes, de l'ordre du %.

3. Bilan et conclusions de l'étude bibliographique

Dans un premier temps, nous avons vu que le sol est un ensemble hétérogène et complexe contrôlant la mobilité du Se, *via* des processus géochimiques et microbiologiques. De plus, ces processus interagissent entre eux et donnent lieu à de nombreuses interactions bio-physico-chimiques. Ainsi, ils ne peuvent être considérés comme indépendants dans les mécanismes de mobilité. Malgré cela, il existe principalement deux types d'approches dans les études de la mobilité du Se : soit les composantes du sol sont étudiées séparément, soit le sol est étudié dans toute sa complexité. Dans le premier cas, que ce soit sur les composantes biotiques (cultures de bactéries, champignons...) ou abiotiques (phases minérales et organiques), les études visent à appréhender des mécanismes très fins en terme de réactivité tel que les processus de réduction et/ou de volatilisation pour les microorganismes ou les processus de sorption pour les phases solides. Toutefois, lorsque le sol est utilisé dans toute sa

globalité, la réactivité du Se est étudiée d'un point de vue macroscopique (isothermes, Kd), au détriment quasi-total des processus géochimiques et microbiologiques intervenant.

De plus, l'essentiel des études publiées concerne de fortes concentrations en Se (10^{-2} - 10^{-3} mol.L⁻¹). Or, les réactions géochimiques telles que la sorption, la distribution en phase solide ou encore la précipitation (co-précipitation) du Se peuvent être toutes autres à de plus faibles concentrations. Il en est de même pour les processus microbiologiques, tels que la réduction ou la volatilisation. Ces réactions identifiées comme des processus de détoxification sont-elles envisageables ou non à des concentrations dites non toxiques. Par ailleurs, ces gammes de concentrations élevées permettent d'utiliser des techniques de spéciation en phase solide telles que les méthodes spectroscopiques, non envisageables à des concentrations inférieures à 10 mg Se.kg⁻¹.

En outre, les connaissances actuelles concernant le ⁷⁹Se sont essentiellement des résultats indirects des diverses recherches, effectuées à fortes concentrations en Se et donc inadaptes. A celles-ci s'ajoutent quelques travaux portant essentiellement sur la prévision d'impact du stockage des déchets nucléaires, et plus particulièrement orientés vers la géochimie du Se vis-à-vis des phases minérales (granites, argiles...) constituant potentiellement des barrières géochimiques.

Enfin, peu d'étude sont consacrées à l'étude des cinétiques d'évolution du Se. Or, le système « sol » évolue dans le temps et n'est que rarement à l'équilibre.

Donc, afin d'améliorer la prévision du comportement du Se dans les sols, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des paramètres géochimiques et des paramètres microbiologiques du sol sur les cinétiques et le devenir du Se dans un sol à faible concentration. Pour cela, nous avons choisi de développer une méthodologie expérimentale pluridisciplinaire capable (i) de réaliser un grand nombre d'expériences, dans un temps limité, en maîtrisant un maximum de paramètres (grâce au système batch) (ii) de travailler à l'échelle des ultra-traces (grâce à l'utilisation d'un radio-traceur ⁷⁵Se); (iii) suivre les évolutions cinétiques du Se à la fois dans les phases solide, liquide et gazeuse et (iv) de différencier le rôle des paramètres géochimiques de celui des paramètres microbiologiques.

4. Références

- Abdullah, M.I., Shiyu, Z., Mosgren, K., 1995. Arsenic and selenium species in the oxic and anoxic waters of the Oslofjord, Norway. *Marine Pollution Bulletin* 31, 116-126.
- Abu-Erreish, G.M., Whitehead, E.I., Olson, O.E., 1968. Evolution of volatile selenium from soils. *Soil Science* 106, 415-420.
- Achtnich, C., Bak, F., Conrad, R., 1995. Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils* 19, 65-72.
- Adam, C., Roussel-Debet, S., 2002. Fiche Radionucléide: Sélénium 79 et environnement. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire - Direction de l'Environnement et de l'intervention - Service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes
- Alemi, M.H., Goldhamer, D.A., Nielsen, D.R., 1991. Modeling selenium transport in steady-state, unsaturated soil columns. *Journal of Environmental Quality* 20, 89-95.
- Amouroux, D., Liss, P.S., Tessier, E., Hamren-Larsson, M., Donard, O.F.X., 2001. Role of oceans as biogenic sources of selenium. *Earth and Planetary Science Letters* 189, 277-283.
- ATSDR, 2003. Toxicological profile for selenium. U.S. Department of health and human service - Public Health Service
- Azaizeh, H.A., Gowthaman, S., Terry, N., 1997. Microbial selenium volatilization in rhizosphere and bulk soils from a constructed wetland. *Journal of Environmental Quality* 26, 666-672.
- Azaizeh, H.A., Salhani, N., Sebesvari, Z., Emons, H., 2003. The potential of rhizosphere microbes isolated from a constructed wetland to biomethylate selenium. *Journal of Environmental Quality* 32, 55-62.
- Balistrieri, L.S., Chao, T.T., 1990. Adsorption of selenium by amorphous iron oxyhydroxide and manganese dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 739-751.
- Bar-Yosef, B., Meek, D., 1987. Selenium adsorption by kaolinite and montmorillonite. *Soil Science* 144, 11-19.
- Bienvenu, P., Cassette, P., Andreoletti, G., Be, M.M., Comte, J., Lepy, M.C., 2007. A new determination of ⁷⁹Se half-life. *Applied Radiation and Isotopes* 65, 355-364.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., Sies, H., 2005. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 256-267.
- Bruggeman, C., Vancluysen, J., Maes, A., 2002. New selenium solution speciation method by ion chromatography plus gamma counting and its application to FeS₂-controlled reducing conditions. *Radiochimica Acta* 90, 629-635.

- Burton, J.G.A., Giddings, T.H., DeBrine, P., Fall, R., 1987. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 185-188.
- Calderone, S.J., Frankenberger Jr, W.T., Parker, D.R., Karlson, U., 1990. Influence of temperature and organic amendments on the mobilization of selenium in sediments. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 615-620.
- Calvet, R., 2003a. *Le Sol. Propriétés et fonctions - Tome 1*. France Agricole, Paris, 455 p.
- Calvet, R., 2003b. *Le Sol. Propriétés et fonctions - Tome 2*. France Agricole, Paris, 455 p.
- Chabrouillet, C., 2007. Etude de la remobilisation d'éléments traces à partir d'un sol de surface contaminé: Influence du vieillissement des composés organiques du sol sur la remobilisation du sélénium. Thèse. Université Joseph Fourier - Grenoble I,
- Challenger, F., North, H.E., 1934. The production of organometalloidal compounds by microorganisms. Part II. Diméthylselenide. *Journal of Chemical Society* 68-71.
- Chao, T.T., Sanzolone, R.F., 1989. Fractionation of soil selenium by sequential partial dissolution. *Soil Science Society of America Journal* 53, 385-392.
- Chapelle, F.H., Haack, S.K., Adriaens, P., Henry, M.A., Bradley, P.M., 1996. Comparison of E_H and H_2 measurements for delineating redox processes in a contaminated aquifer. *Environmental Science and Technology* 30, 3565-3569.
- Cheng, L., Lyman, P.F., Sturchio, N.C., Bedzyk, M.J., 1997. X-ray standing wave investigation of the surface structure of selenite anions adsorbed on calcite. *Surface Science* 382, 690-695.
- Chidthaisong, A., Conrad, R., 2000. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 73-86.
- Conde, J.E., Sanz Alaejos, M., 1997. Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chemical Reviews* 97, 1979-2003.
- Cooke, T.D., Bruland, K.W., 1987. Aquatic chemistry of selenium: Evidence of biomethylation 1. *Environmental Science and Technology* 21, 1214-1219.
- Cooper, D.C., Picardal, F.W., Schimmelman, A., Coby, A.J., 2003. Chemical and biological interactions during nitrate and goethite reduction by *Shewanella putrefaciens* 200. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3517-3525.
- Cowan, C.E., Zachara, J.M., Resch, C.T., 1990. Solution ion effects on the surface exchange of selenite on calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 2223-2234.
- Dassonville, F., Renault, P., 2002. Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: A review. *Agronomie* 22, 51-68.
- Dauchy, X., Potin Gautier, M., Astruc, A., Astruc, M., 1994. Analytical methods for the speciation of selenium compounds: a review. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 348, 792-805.

- Denison, F., 2002. Uranium(VI) speciation: Modelling, uncertainty, and relevance to bioavailability models. Application to uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve. PhD Thesis. Université de Provence, Aix Marseille, France.
- Dhillon, K.S., Dhillon, S.K., 1999. Adsorption-desorption reactions of selenium in some soils of India. *Geoderma* 93, 19-31.
- Dhillon, S.K., Dhillon, K.S., 2004. Pools of selenium in some Indian soils at field capacity and submerged moisture regimes. *Australian Journal of Soil Research* 42, 247-257.
- Dolfing, J., 1988. Acetogenesis. *Biology of anaerobic microorganisms*, John Wiley & Sons: 417-469.
- Doran, J.W., 1982. Microorganisms and the biological cycling of selenium. *Advances in Microbial Ecology* 6, 1-32.
- Doran, J.W., Alexander, M., 1977. Microbial transformations of selenium. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 31-37.
- Dowdle, P.R., Oremland, R.S., 1998. Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures. *Environmental Science and Technology* 32, 3749-3755.
- Duc, M., Lefevre, G., Fedoroff, M., 2006. Sorption of selenite ions on hematite. *Journal of Colloid and Interface Science* 298, 556-563.
- Duc, M., Lefevre, G., Fedoroff, M., Jeanjean, J., Rouchaud, J.C., Monteil-Rivera, F., Dumonceau, J., Milonjic, S., 2003. Sorption of selenium anionic species on apatites and iron oxides from aqueous solutions. *Journal of Environmental Radioactivity* 70, 61-72.
- Dudzinska-Huczuk, B., Bolalek, J., 2007. Particulate selenium in the baltic sea atmosphere. *Water, Air, and Soil Pollution* 179, 29-41.
- Dungan, R.S., Frankenberger Jr., W.T., 2000. Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1353-1358.
- Dynes, J.J., Huang, P.M., 1997. Influence of organic acids on selenite sorption by poorly ordered aluminum hydroxides. *Soil Science Society of America Journal* 61, 772-783.
- Elrashidi, M.A., Adriano, D.C., Workman, M., Lindsay, W.L., 1987. Chemical equilibria of selenium in soils: a theoretical development. *Soil Science* 144, 141-152.
- Ferri, T., Sangiorgio, P., 2001. Selenium speciation in waters: Role of dissolved polysaccharides on the mobilization process. *Annali di Chimica* 91, 229-238.
- Fio, J.L., Fujii, R., Deverel, S.J., 1991. Selenium Mobility and distribution in irrigated and non irrigated alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* 55, 1313-1320.
- Flury, M., Frankenberger Jr, W.T., Jury, W.A., 1997. Long-term depletion of selenium from Kesterson dewatered sediments. *Science of the Total Environment* 198, 259-270.

- Foster, A.L., Gordon, G.E., Parks, G.A., 2003. X-ray absorption fine structure study of As(V) and Se(IV) sorption complexes on hydrous Mn oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 1937-1953.
- Frankenberger Jr, W.T., Karlson, U., 1994. Soil management factors affecting volatilization of selenium from dewatered sediments. *Geomicrobiology Journal* 12, 265-278.
- Gadd, G.M., 1996. Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides. *Endeavour* 20, 150-156.
- Gao, S., Tanji, K.K., Peters, D.W., Herbel, M.J., 2000. Water selenium speciation and sediment fractionation in a California flow-through wetland system. *Journal of Environmental Quality* 29, 1275.
- Gao, S., Tanji, K.K., Scardaci, S.C., Chow, A.T., 2002. Comparison of redox indicators in a paddy soil during rice-growing season. *Soil Science Society of America Journal* 805-817.
- Garbisu, T., Ishii, T., Leighton, Buchanan, a.B.B., 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chem. Geol.* 132, 199–204.
- Gazsó, L.G., 2001. The Key Microbial Processes in the Removal of Toxic Metals and Radionuclides from the Environment. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 7, 178-185.
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W., 1998. *Le sol vivant*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 519.
- Guo, L., Frankenberger Jr, W.T., Jury, W.A., 1999. Adsorption and degradation of dimethyl selenide in soil. *Environmental Science and Technology* 33, 2934-2938.
- Hagarova, I., Zemberyova, M., Bajcan, D., 2005. Sequential and single step extraction procedures used for fractionation of selenium in soil samples. *Chemical Papers* 59, 93-98.
- Herbel, M.J., Suarez, D.L., Goldberg, S., Gao, S., 2007. Evaluation of chemical amendments for pH and redox stabilization in aqueous suspensions of three California soils. *Soil Science Society of America Journal* 71, 927-939.
- Hockin, S.L., Gadd, G.M., 2003. Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7063-7072.
- Holben, D.H., Smith, A.M., 1999. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. *Journal of the American Dietetic Association* 99, 836-843.
- Hunter, W.J., Kuykendall, L.D., 2006. Identification and characterization of an *Aeromonas salmonicida* (syn *Haemophilus piscium*) strain that reduces selenite to elemental red selenium. *Current Microbiology* 52, 305-309.
- IAEA, 1994. Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in the terrestrial and freshwater environment. International Atomic Energy Agency.

- Ike, M., Takahashi, K., Fujita, T., Kashiwa, M., Fujita, M., 2000. Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. *Water Research* 34, 3019-3025.
- Jacquier, P., Meier, P., Ly, J., 2001. Adsorption of radioelements on mixtures of minerals - Experimental study. *Applied Geochemistry* 16, 85-93.
- Jayaweera, G.R., Biggar, J.W., 1996. Role of redox potential in chemical transformations of selenium in soils. *Soil Science Society of America Journal* 60, 1056 - 1063.
- Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., 1988. Effects of carbon and trace element addition on alkylselenide production by soil. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1640-1644.
- Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., Bachofen, R., 1999. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4734-4740.
- Koch-Steindl, H., Prohl, G., 2001. Considerations on the behaviour of long-lived radionuclides in the soil. *Radiation and Environmental Biophysics* 40, 93-104.
- Lemly, A.D., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 44-56.
- Lindberg, R.D., Runnells, D.D., 1984. Ground water redox reactions: an analysis of equilibrium state applied to Eh measurements and geochemical modeling. *Science* 225, 925-927.
- Losi, M.E., Frankenberger Jr., W.T. 1997. Reduction of selenium oxanions by *Enterobacter Cloacae* SLD1a-1: isolation and growth of bacterium and its expulsion of selenium particles. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3079-3084.
- Losi, M.E., Frankenberger Jr, W.T., 1998. Microbial oxidation and solubilization of precipitated elemental selenium in soil. *Journal of Environmental Quality* 27, 836-843.
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H., Woodward, J.C., 1994. Use of dissolved H₂ concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. *Environmental Science and Technology* 28, 1205-1210.
- Manceau, A., Charlet, L., 1994. Mechanism of selenate adsorption on goethite and hydrous ferric oxide. *Journal of Colloid and Interface Science* 168, 87-93.
- Martens, D.A., Suarez, D.L., 1997. Selenium speciation of soil/sediment determined with sequential extractions and hydride generation atomic absorption spectrophotometry. *Environmental Science and Technology* 31, 133-139.
- Martens, D.A., Suarez, D.L., 1999. Transformation of volatile methylated selenium in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1355-1361.
- Martinez, M., Gimenez, J., De Pablo, J., Rovira, M., Duro, L., 2006. Sorption of selenium(IV) and selenium(VI) onto magnetite. *Applied Surface Science* 252, 3767-3773.

- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H., 1990. Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. *Environmental Science and Technology* 24, 91-96.
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H., 1991. Heavy metals in the environment: Arsenic and selenium chemistry as affected by sediment redox potential and pH. *Journal of Environmental Quality* 20, 522-527.
- Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J., 2006. Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1408-1417.
- Munoz-Olivas, R., Donard, O.F.X., Camara, C., Quevauviller, P., 1994. Analytical techniques applied to the speciation of selenium in environmental matrices. *Analytica Chimica Acta* 286, 357-370.
- Myneni, S.C.B., Tokunaga, T.K., Brown Jr., G.E., 1997. Abiotic selenium redox transformations in the presence of Fe(II,III) oxides. *Science* 278, 1106-1109.
- Nakamaru, Y., Tagami, K., Uchida, S., 2005. Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere* 58, 1347-1354.
- Naveau, A., Monteil-Rivera, F., Guillon, E., Dumonceau, J., 2007. Interactions of aqueous selenium (-II) and (IV) with metallic sulfide surfaces. *Environmental Science and Technology* 41, 5376-5382.
- Neal, R.H., Sposito, G., 1989. Selenate adsorption on alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* 53, 70-74.
- Neal, R.H., Sposito, G., Holtzclaw, K.M., Traina, S.J., 1987. Selenite adsorption on alluvial soils: I. Soil composition and pH effects. *Soil Science Society of America Journal* 51, 1161-1165.
- Niedzielski, P., Siepak, M., 2003. Analytical methods for determining arsenic, antimony and selenium in environmental samples. *Polish Journal of Environmental Studies* 12, 653-667.
- Olin, A., Nolang, B., Ohman, L.-O., Osadchii, E., Rosen, E., 2005. *Chemical Thermodynamics of Selenium*. Elsevier, The Netherlands, 851.
- Peak, D., Sparks, D.L., 2002. Mechanisms of selenate adsorption on iron oxides and hydroxides. *Environmental Science and Technology* 36, 1460-1466.
- Peak, D., Saha, U.K., Huang, P.M., 2006. Selenite adsorption mechanisms on pure and coated montmorillonite: An EXAFS and XANES spectroscopic study. *Soil Science Society of America Journal* 70, 192-203.
- Peters, V., Conrad, R., 1996. Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 371-382.
- Picek, T., Simek, M., Santruckova, H., 2000. Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. *Biology and Fertility of Soils* 31, 315-322.

- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*. DeBoeck & Larcier, Bruxelles.
- Pyrzyńska, K., 2002. Determination of Selenium Species in Environmental Samples. *Microchimica Acta* 140, 55-62.
- Ramirez, J.P., Rogers, B.P., 2002. Selenium in a Wyoming grassland community receiving wastewater from an in situ uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 431-436.
- Ranjard, L., Nazaret, S., Cournoyer, B., 2003. Freshwater bacteria can methylate selenium through the thiopurine methyltransferase pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3784-3790.
- Ranjard, L., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S., Cournoyer, B., 2002. Methylation of inorganic and organic selenium by the bacterial thiopurine methyltransferase. *Journal of Bacteriology* 184, 3146-3149.
- Reamer, D.C., Zoller, W.H., 1980. Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge. *Science* 208, 500-502.
- Robaux, V., 2005. Assessment of the presence of selenium in drinking waters of the Essonne department: Characterisation and evolution. *Journal Européen d'Hydrologie* 36, 93-106.
- Roussel-Debet, S., Colle, C., 2005. Comportement de radionucléides (Cs, I, Sr, Se, Tc) dans le sol: proposition de valeurs de Kd par défaut. *Radioprotection* 40, 203-229.
- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., Coves, J., 2001. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 769-773.
- Runnells, D.D., Lindberg, R.D., 1990. Selenium in aqueous solutions: the impossibility of obtaining a meaningful Eh using a platinum electrode, with implications for modeling of natural waters. *Geology* 18, 212-215.
- Ryser, A.L., Strawn, D.G., Marcus, M.A., Fakra, S., Johnson-Maynard, J.L., Moller, G., 2006. Microscopically focused synchrotron x-ray investigation of selenium speciation in soils developing on reclaimed mine lands. *Environmental Science and Technology* 40, 462-467.
- Šantrůčková, H., Šimek, M., 1997. Effect of soil CO₂ concentration on microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils* 25, 269-273.
- Sarathchandra, S.U., Watkinson, J.H., 1981. Oxidation of elemental selenium to selenite by *Bacillus megaterium*. *Science* 211, 600-601.
- Sarret, G., Avoscan, L., Carriere, M., Collins, R., Geoffroy, N., Carrot, F., Coves, J., Gouget, B., 2005. Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2331-2337.
- Schulthess, C.P., Hu, Z., 2001. Impact of chloride anions on proton and selenium adsorption by an aluminum oxide. *Soil Science Society of America Journal* 710-718.

- Séby, F., Potin-Gautier, M., Lespès, G., Astruc, M., 1997. Selenium speciation in soil after alkaline extraction. *The Science of the Total Environment* 207, 81-90.
- Seiler, R.L., 1998. Prediction of lands susceptible to irrigation-induced selenium contamination of water. *Environmental Chemistry of Selenium*. Frankenberger Jr, W. T. and Engberg, R. New York, Marcel Dekker Inc. pp 397-418.
- Sharmasarkar, S., Vance, G.F., 2002. Selenite-selenate sorption in surface coal mine environment. *Advances in Environmental Research* 7, 87-95.
- Sigg, L., Behra, P., Stumm, W., 2000. *Chimie des milieux aquatiques*. Dunod, Paris, 567 p.
- Sparks, D.L., 2003. *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, California, 352.
- Sposito, G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford University Press, New York, 277 p.
- Sposito, G., Yang, A., Neal, R.H., Mackzum, A., 1991. Selenate reduction in an alluvial soil. *Soil Science Society of America Journal* 55, 1597-1602.
- Stengel, P., Gelin, S., 1998. *Sol: Interface fragile*. INRA, Paris, 213 p.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the north of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 135, 173-194.
- Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 615-627.
- Stork, A., Jury, W.A., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Accelerated volatilization rates of selenium from different soils. *Biological Trace Element Research* 69, 217-234.
- Su, C., Suarez, D.L., 2000. Selenate and selenite sorption on iron oxides: An infrared and electrophoretic study. *Soil Science Society of America Journal* 64, 101-111.
- Tam, S.C., Chow, A., Hadley, D., 1995. Effects of organic component on the immobilization of selenium on iron oxyhydroxide. *Science of the Total Environment* 164, 1-7.
- Tamari, Y., 1998. Methods of analysis for the determination of selenium in biological, geological, and water sample. *Environmental Chemistry of Selenium*. Frankenberger Jr, W. T. and Engberg, R. New York, Marcel Dekker Inc. pp 27-46.
- Tan, J., Zhu, W., Wang, W., Li, R., Hou, S., Wang, D., Yang, L., 2002. Selenium in soil and endemic diseases in China. *The Science of the Total Environment* 284, 227-235.
- Tanji, K.K., Gao, S., Scardaci, S.C., Chow, A.T., 2003. Characterizing redox status of paddy soils with incorporated rice straw. *Geoderma* 114, 333-353.
- Terry, N., Carlson, C., Raab, T.K., Zayed, A.M., 1992. Rates of selenium volatilization among crop species. *Journal of Environmental Quality* 21, 341-344.
- Thompson-Eagle, E.T., Frankenberger Jr, W.T., 1990. Volatilization of selenium from agricultural evaporation pond water. *Journal of Environmental Quality* 19, 125-131.
- Thompson-Eagle, E.T., Frankenberger Jr, W.T., 1991. Selenium biomethylation in an alkaline, saline environment. *Water Research* 25, 231-240.

- Tokunaga, T.K., Pickering, I.J., Brown Jr, G.E., 1996. Selenium transformations in ponded sediments. *Soil Science Society of America Journal* 60, 781-790.
- Toulhoat, P., 2002. Confinement and migration of radionuclides in a nuclear waste repository. *Compte-rendu. Physique* 3, 975-986.
- Ventura, M.G., Freitas, M.D.C., Pacheco, A.M.G., 2005. Selenium levels in mainland Portugal. *Water, Air, and Soil Pollution* 166, 167-179.
- Wang, X., Liu, X., 2005. Sorption and desorption of radioselenium on calcareous soil and its solid components studied by batch and column experiments. *Applied Radiation and Isotopes* 62, 1-9.
- Washington, J.W., Endale, D.M., Samarkina, L.P., Chappell, K.E., 2004. Kinetic control of oxidation state at thermodynamically buffered potentials in subsurface waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 4831-4842.
- Weber, K.A., Urrutia, M.M., Churchill, P.F., Kukkadapu, R.K., Roden, E.E., 2006. Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environmental Microbiology* 8, 100-113.
- Wijnja, H., Schulthess, C.P., 2002. Interaction of carbonate and organic anions with sulfate and selenate adsorption on an aluminum oxide. *Soil Science Society of America Journal* 63, 898-908.
- Wright, M.T., Parker, D., Amrhein, C., 2003. Critical evaluation of the ability of sequential extraction procedures to quantify discrete forms of selenium in sediments and soils. *Environmental Sciences and Technology*.
- Wu, L., 2004. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 257-269.
- Yu, C., Orlandini, K.A., Cheng, J.J., Biwer, B.M., 2001. Assessing the impact of hazardous constituents on the mobilization, transport and fate of radionuclides in RCRA waste disposal units. Environmental Assessment Division, Argonne National laboratory
- Zawislanski, P.T., Zavarin, M., 1996. Nature and rates of selenium transformations: A laboratory Study of Kesterson Reservoir Soils. *Soil Science Society of America Journal* 60, 791 - 800.
- Zhang, P., Sparks, D.L., 1990. Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at the goethite/water interface. *Environmental Science and Technology* 24, 1848-1858.
- Zhang, Y., Moore, J.N., 1996. Selenium fractionation and speciation in a wetland system. *Environmental Science and Technology* 30, 2613.
- Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality* 28, 1321-1326.

- Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 2002. Fate of dimethyldiselenide in soil. *Journal of Environmental Quality* 31, 1124-1128.
- Zhang, Y.Q., Moore, J.N., 1997. Interaction of selenate with a wetland sediment. *Applied Geochemistry* 12, 685-691.
- Zieve, R., Peterson, P.J., 1981. Factors influencing the volatilization of selenium from soil. *Science of the Total Environment* 19, 277-284.
- Zieve, R., Peterson, P.J., 1984. Volatilization of selenium from plants and soils. *Science of the Total Environment* 32, 197-202.

CHAPITRE II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord la méthodologie globale d'étude adoptée pour la thèse (§1), puis le design et le protocole expérimental développé (§2). Nous donnons ensuite les caractéristiques du sol étudié (§3) et des solutions utilisées (§4). Enfin, nous terminons ce chapitre par les différentes analyses effectuées relatives au sélénium, à la physico-chimie et à la microbiologie du sol (§5).

1. Méthodologie

L'objectif de notre thèse était d'évaluer l'impact des paramètres géochimiques et des paramètres microbiologiques du sol sur le comportement du sélénium (Se). Plusieurs séries d'incubations de sol contraint à différents états biogéochimiques ont été effectuées en systèmes fermés et agités (batchs). Les différentes conditions ont été obtenues en forçant l'atmosphère gazeuse des batchs (conditions oxygène ou anoxygène) et les activités microbiennes présentes dans les systèmes (conditions stérile, non stérile et amendée). La réactivité du Se a été caractérisée par la cinétique et l'amplitude des réactions de sorption sur la phase solide, la distribution en phase solide et la volatilisation. Pour identifier les processus, directs ou indirects, impliqués dans la réactivité du Se, des données relatives (i) à l'état géochimique du sol et (ii) aux activités microbiennes ont été acquises. La Figure 1 récapitule la méthodologie globale de l'étude.

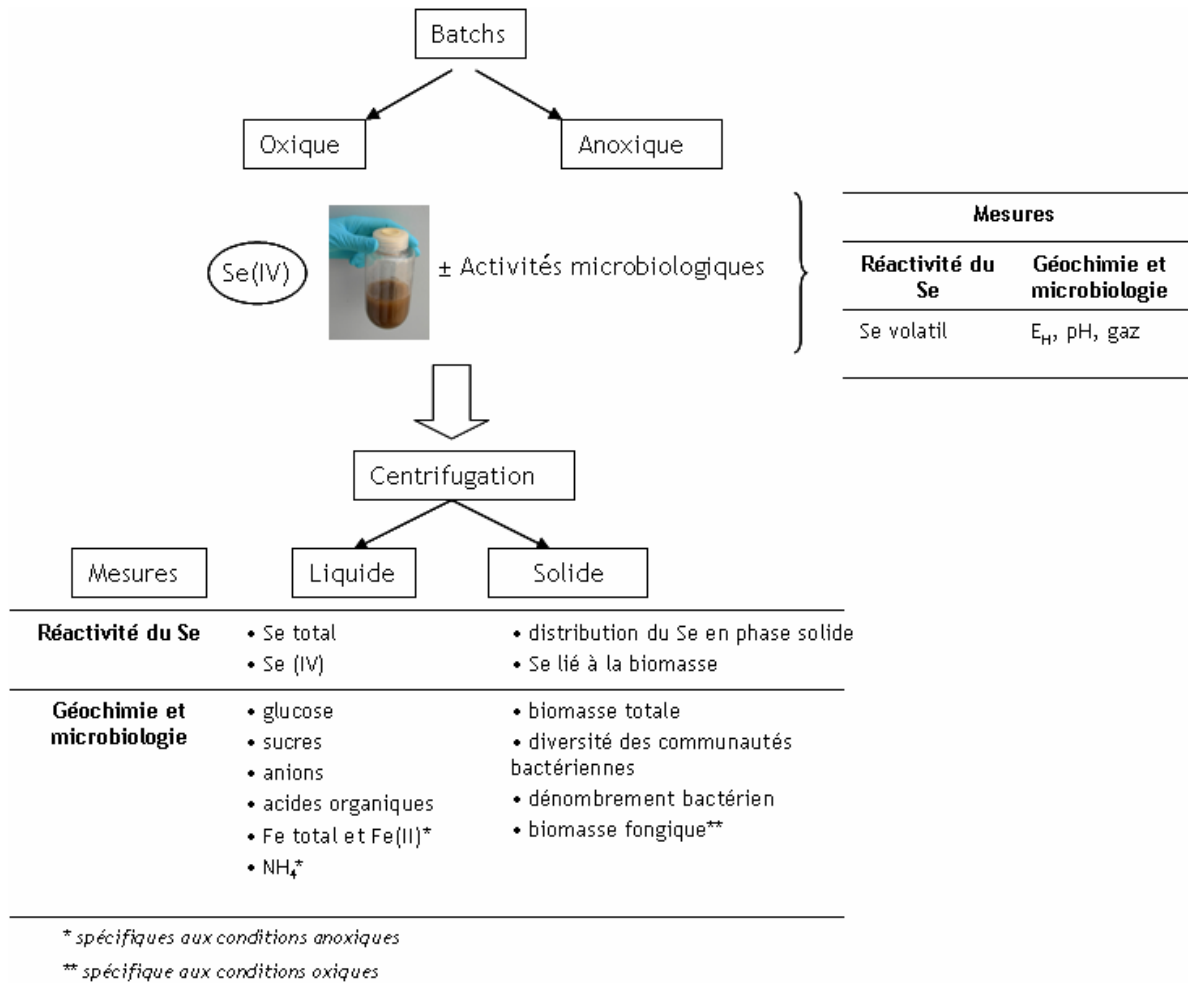


Figure 1 – Schéma récapitulatif de la méthodologie de l'étude et des analyses effectuées

Les conditions d'incubation proposées se différenciaient par :

- la présence ou l'absence d'O₂ (conditions oxique ou anoxique) afin de comprendre l'influence de l'aération sur l'état géochimique du sol et donc sur la mobilité du Se. En effet, la présence ou l'absence d'O₂ affecte la survie et l'activité de la plupart des microorganismes et la nature des biotransformations qui en résultent ;

- l'apport ou non d'amendements. Les amendements ont été apportés sous forme de solutions nutritives à l'exception de la cellulose. En conditions oxiques, les amendements étaient du glucose ou de la cellulose avec du NO₃⁻ ; dans ces conditions, la cellulose est dégradée plus lentement que le glucose (Dilly, 2004), et devait être utilisée préférentiellement par les champignons (Schutter et Dick, 2001). En condition anoxique, l'amendement était une solution contenant glucose, NO₃⁻, NH₄⁺ et SO₄²⁻.

- la présence ou non de microorganismes, voire la sélection éventuelle des bactéries ou des champignons, pour ce qui était des incubations en stérilisant certains échantillons par irradiation (rayonnement γ), et en apportant à d'autres un antibactérien ou un antifongique. Il s'agissait d'une part de différencier les processus d'origine biotique des processus d'origine abiotique, d'autre part de différencier les contributions relatives des activités bactériennes et des activités fongiques sur la mobilité du Se.

2.Design et protocole expérimental

2.1 Le design expérimental

Le réacteur fermé de type « batch » a été choisi car il permet de travailler dans des conditions contrôlées sur des systèmes simples et homogènes à l'échelle du laboratoire. Ce design expérimental nous a permis de suivre le devenir du Se pendant un temps limité, dans toutes les conditions d'incubations proposées ci-dessus. Nous avons travaillé dans des flacons à centrifugation en polycarbonate (PC) de 250 ml équipés de bouchons septum (Figure 2). Ces bouchons septum pouvaient être traversés pour effectuer des mesures non destructives du potentiel d'oxydo-réduction (E_H) et du pH, mais aussi pour caractériser l'atmosphère gazeuse sans avoir à ouvrir le flacon et en maintenant l'étanchéité du système.



Figure 2 – Système « batch » : flacon à centrifugation de 250 ml équipé d'un septum.

2.2 Le protocole expérimental

L'étude cinétique de la réactivité du Se en batch a consisté à mettre en suspension un échantillon de terre pré-incubé de 30 g sec dans 150 ml d'une solution saline contenant ou non un amendement et du sélénite pendant différentes durées (de 1 h à 15 j). Les flacons ont été agités dans une enceinte thermostatée ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) à $300\text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$ (table d'agitation, KS 250 basic, IKA). 3 réplicats ont été réalisés en parallèle pour chaque pas de temps étudié.

A chaque pas de temps, les mesures non destructives du pH, du E_H et de l'atmosphère gazeuse du batch ont été effectuées avant de séparer les phases liquide et solide par centrifugation à 4600 g pendant 20 min (Sorvall® superspeed). Le surnageant, filtré à 0,22 μm et non filtré, et le culot de terre ont ensuite été récupérés et répartis pour analyses (§5).

Pour les incubations de sol stérile, en conditions oxygènes et anoxiques, et afin de maintenir la stérilité des systèmes, toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire, et tout le matériel (batch, spatule, pointes de pipette ...) a été stérilisé par autoclavage ou lavage à l'éthanol 75%.

Pour maintenir la condition oxygène durant l'incubation, un système d'aération permettait de renouveler l'atmosphère du batch. Chaque jour, une analyse de l'atmosphère était effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour déterminer les teneurs en O_2 et CO_2 du système. L'aération était déclenchée si le pourcentage d' O_2 était inférieur à 16 %. Le renouvellement d'atmosphère se faisait alors par un bullage d'air pendant 10 min, à un débit de 50 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ à travers le septum. Cette opération était répétée 3 fois après avoir agité vigoureusement le flacon pour remettre en équilibre les compartiments dissous et gazeux. Pour obtenir des conditions anoxiques, toutes les manipulations ont été effectuées en boîte à gants sous atmosphère inerte (N_2). Pour les conditions anoxiques stériles, les batch étaient remplis sous hotte à flux laminaire puis l'atmosphère de chaque batch était purgée avec de l' N_2 pendant 3 fois 10 min.

Pour estimer la quantité de Se pouvant se fixer sur les parois du tube, des expériences sans échantillon de terre, (tube + solution), appelés « blancs » ont également été réalisées.

3. L'échantillon de terre

L'échantillon de terre utilisé dans cette étude a été prélevé en bordure du Rhône à hauteur de Creys-Malville (Isère), sur une profondeur d'environ 30 cm sous la zone racinaire et à environ 12 % d'humidité pondérale. L'échantillon a été séché à l'air à environ 4 % d'humidité pondérale, tamisé à 2 mm, puis stocké à 4 °C, pour minimiser son évolution pendant le temps de l'étude. Les propriétés physico-chimiques et minéralogiques de l'échantillon de terre tamisé sont répertoriées Tableau 1 et Tableau 2. Ces analyses ont été effectuées respectivement par le laboratoire d'analyse des sols d'Arras (INRA) (annexe VII) et le BRGM (annexe VIII).

Tableau 1 – Caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon de terre.

pH	C orga (%)	CaCO ₃ (%)	CEC** (meq/100g)	Eléments totaux traces (ppm)						
				Se	As	Pb	Cr	Cu	Ni	Zn
7,74	0,99	0,65	4,28	0,126 (0,4)*	6,14 (6)*	19,3 (19)*	43,6 (52,5)*	8,45 (15,0)*	14,3 (24,5)*	97,4 (68)*

**CEC cobaltihexamine

* Les valeurs entre parenthèses sont les teneurs moyennes des éléments traces dans les sols français (Bourrelie et Berthelin, 1998).

Tableau 2 – Caractéristiques minéralogiques de l'échantillon de terre

Minéralogie / fraction				
Argile (< 2µm)	Limons fins (2-20 µm)	Limons grossiers (20- 50 µm)	Sables fins (50-200 µm)	Sables grossiers (200 - 2000 µm)
7,9 %	6,9 %	4,0 %	9,2 %	72,0 %
Quartz Feldspath et phyllosilicates (traces)			Quartz Feldspath (traces)	Quartz Hydroxyde de fer (traces)

Avant les incubations, le sol a été pré-incubé de manière à éviter le flush classiquement observé après humectation d'un sol sec et à stabiliser plus ou moins ses activités microbiennes. Pratiquement, le sol a été humidifié avec de l'eau UHQ à une teneur en eau massique d'environ 17 % et a alors été conservé à température ambiante (20 ± 2 °C) pendant 2 jours, avant le lancement des incubations.

Pour les conditions stériles, la stérilisation du sol a été effectuée par irradiation γ (dose de 40 kGy) à partir d'une source de ⁶⁰Co. Cette technique est connue pour sa grande efficacité et est préférée aux techniques chimiques ou à l'autoclavage, qui affectent les propriétés chimiques et physiques du sol (McNamara et al., 2003). Après irradiation, l'échantillon de sol a été conservé à 4°C pendant au minimum 8 semaines avant utilisation, pour limiter les activités résiduelles des enzymes du sol (Lensi et al., 1991). L'efficacité de la stérilisation a été vérifiée par ensemencement d'un échantillon de solution de sol sur boîte de pétri (Lensi et al., 1991).

4. Les solutions

4.1 Les solutions d'amendements

4.1.1 Les conditions oxiques

Pour toutes les incubations en condition oxique (Tableau 3), la force ionique de la solution a été ajustée à $8,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec du KCl et le pH a été ajusté à 7,7 avec du NaOH, afin de se rapprocher du pH_{eau} de l'échantillon de terre.

Pour les amendements, le glucose a été ajouté à cette solution pour obtenir un apport de 5 g glucose kg^{-1} sol sec et la cellulose a été apportée sous forme de poudre mélangée directement au sol, à une concentration de 4,5 g cellulose kg^{-1} sol sec. Ainsi l'apport de C a été identique en quantité dans les deux conditions. Afin d'éviter un déficit en N lors de la croissance microbienne, nous avons apporté simultanément à ces amendements carbonés du NO_3^- (à raison de 1,2 g KNO_3 kg^{-1} sol sec). Le bactéricide (condition NSG+B) était de la streptomycine sulphate apporté à raison de 5 g kg^{-1} sol sec, et le fongicide (condition NSG+F) était de la cycloheximide apporté à hauteur de 10 g kg^{-1} sol sec, ces deux produits étant connus pour leur sélectivité (Anderson et Domsch, 1975).

Pour les conditions stériles, les solutions ont été filtrées à 0,22 μm avant la mise en contact avec le sol.

Tableau 3 – Incubation en conditions oxiques

nom	sol	solutions	Durée d'incubation (jours)
S	stérile	KCl	10
SG	stérile	glucose - KNO ₃ -KCl	6
NS	brut	KCl	10
NSC	amendé	cellulose - KNO ₃ - KCl	10
NSG	amendé	glucose - KNO ₃ - KCl	6
NSG+B	amendé	glucose - KNO ₃ - streptomycine sulphate - KCl	6
NSG+F	amendé	glucose - KNO ₃ - cycloheximide - KCl	6

4.1.2 Les conditions anoxiques

Les incubations réalisées en condition anoxique sont présentées Tableau 4. Comme pour les conditions oxiques, la force ionique a été ajustée à $8,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et le pH a été ajusté à 7,7 avec NaOH.

Pour les solutions sans amendement, la force ionique de la solution a été ajustée par ajout de KCl exclusivement. La solution d'amendement est composée de glucose, d'ions SO_4^{2-} , NO_3^- et NH_4^+ sous forme respectivement de K_2SO_4 et de NH_4NO_3 . Les concentrations qui ont été utilisées sont les suivantes : 5 g de glucose.kg⁻¹ sol sec, 4,9 g de K_2SO_4 .kg⁻¹ sol sec et 0,6 g de NH_4NO_3 .kg⁻¹ sol sec. Les ions NO_3^- et SO_4^{2-} ont été utilisés en tant qu'accepteurs d'électrons spécifiques pour favoriser des activités bactériennes ciblées (dénitrification et sulfato-réduction). Les ions NH_4^+ ont été utilisés pour éviter un déficit en azote lors le la croissance bactérienne.

Avant leur mise en contact avec l'échantillon de terre et avant d'injecter le Se, les solutions ont été dégazées avec N₂ pendant 2 h. Une mesure de l'O₂ dissous a permis de vérifier l'état anoxique des solutions.

Pour la condition stérile, les solutions ont été stérilisées par autoclavage avant le dégazage.

Tableau 4 – Incubation en conditions anoxiques

nom	sol	Durée d'incubation
S	stérile	15 j
C	brut	15 j
G	amendé	15 j
Date d'injection du Se		Durée d'incubation en présence de Se
G_2	amendé 2 j	13 j
G_6	amendé 6 j	9 j
G_10	amendé 10 j	5 j

Des incubations amendées supplémentaires ont été effectuées en parallèle de la condition G, où le Se a été injecté après 2 j, 6 j ou 10 j d'incubation pour les conditions G_2, G_6 et G_10 respectivement.

4.2 La solution de Se

Le sélénium a été utilisé sous forme de sélénite de Na (Na_2SeO_3) à 10^{-6} mol.L⁻¹ marqué avec du ⁷⁵Se (1000 Bq.mL⁻¹) (Isotope Products), utilisé comme traceur du Se stable. La concentration de Se a été choisie pour se situer dans la gamme environnementale selon l'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2003).

5. Les analyses

5.1 Le Sélénium

5.1.1 Mesure de la volatilisation du Se

A chaque date d'analyse, l'atmosphère des batch était purgée, soit avec de l'air en conditions oxiques, soit avec N₂ en conditions anoxiques. Les gaz formés étaient alors envoyés vers un flacon rempli avec du charbon actif, le Se gazeux y étant piégé. L'efficacité du charbon actif pour piéger les formes méthylées du Se a été démontrée dans la littérature (Karlson et Frankenberger Jr, 1988 ; Chabrouillet, 2007).

L'activité du ⁷⁵Se du charbon actif contenu dans le flacon était alors mesurée par un spectromètre γ à bas bruit de fond (LEMER) équipé d'un détecteur Germanium ultra-pur

(GeHP) et couvrant une gamme d'énergie de 25-1900 keV (Canberra-Eurisys). La limite de détection était de 0,2 Bq par échantillon pour les mesures de Se, ce qui correspond à un taux de volatilisation de 0,0013 ‰ du Se introduit dans le batch.

5.1.2 Mesure du Se en solution

La quantité de Se total présent en solution était déduite de la mesure de l'activité du ^{75}Se en phase liquide. Cette mesure était effectuée par comptage en scintillation liquide avec un spectromètre à bas bruit de fond (Quantulus 1220, Wallac®). Une fraction de la solution à analyser (de 50 μL à 1 mL selon l'activité des échantillons) était mélangée à un liquide scintillant (Packard Insta-Gel). La limite de détection était de 30 mBq par flaconnage, correspondant à $1,25 \times 10^{-16}$ mol de Se, et l'incertitude de mesure de l'ordre de 1 à 2 %.

Le Se total retenu par la phase solide a été déduit des mesures de Se total dans le surnageant des batches, selon la formule suivante :

$$S = \frac{V}{M} (C_0 - C_e)$$

Avec S : quantité de sélénium fixée par kilogramme de sol (mol.kg^{-1}),

C_e : concentration finale de sélénium en solution (mol.L^{-1}), filtrée à 0,22 μm ,

C_0 : concentration initiale de sélénium en solution (mol.L^{-1}), filtrée à 0,22 μm ,

V : volume de solution (L)

M : masse de sol sec (kg)

5.1.3 Mesure du sélénite Se(IV) en solution

Le sélénite (Se(IV)) a été dosé dans les expérimentations avec échantillons de terre, en solution, filtrée à 0,22 μm ainsi que dans les « blancs ». La mesure était effectuée par un spectromètre d'absorption atomique couplé à un générateur d'hydrures (GH-AAS)(FIAS-100, AAS 4110-ZL, Perkin-Elmer).

Cette méthode repose sur le principe que le sélénite est l'unique forme qui réagit avec le borohydrure de sodium (NaBH_4) en milieu acide (HCl) pour former un hydruure de Se volatil (H_2Se). Après formation, ce composé gazeux est acheminé par flux d'argon dans une cellule de quartz chauffée à 1000°C où il est atomisé. L'absorption est mesurée à 196 nm par une lampe à décharge sans électrode (EDL). La gamme de calibration utilisée va de 0,5 à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les solutions d'étalonnage sont réalisées à partir d'une solution standard de

Na_2SeO_3 (Sigma-Aldrich). Les échantillons sont préparés dans HCl 10% (vol/vol) pour l'analyse.

Dans les échantillons naturels, des interférences causées par des composés organiques dissous ont été constatées, engendrant une sous-estimation de la quantité de Se(IV) (Roden et Tallman, 1982 ; Séby, 1994 ; Reddy et al., 1995). Des méthodes pour éliminer ces composés organiques dissous ont été proposées (élution sur colonnes...) mais peuvent également aboutir à une perte de Se(IV) complexé à la matière organique soluble. Pour nos expériences, nous avons choisi de doser directement les échantillons obtenus sans traitement préalable.

5.1.4 Estimation de la distribution en phase solide par extraction séquentielle

La distribution en phase solide du Se dans l'échantillon de terre est obtenue en réalisant des extractions séquentielles selon le protocole de Coppin et al. (2006). Les expériences sont réalisées dans des tubes à centrifuger en polycarbonate de 50 mL contenant environ 3 g d'échantillon de terre. Les ratios volume de solution/masse de l'échantillon (v/m) ainsi que les temps d'agitation sont donnés en fonction de l'extractant dans le Tableau 5. Après chaque extraction, l'intégralité du surnageant est prélevée par centrifugation ($10000 \text{ g} \times 20 \text{ min}$) et filtré à $0,22 \mu\text{m}$. L'extractant suivant est alors ajouté au culot restant dans le tube, le culot remis en suspension puis à nouveau agité sur table d'agitation ou au bain à ultrasons. Afin de connaître la quantité de Se extraite à chaque étape, un échantillon du surnageant est dosé par scintillation liquide via l'activité du ^{75}Se .

La fraction extraite avec K_2HPO_4 représente le Se échangeable avec les phosphates pour toutes les phases absorbantes, donc en théorie le Se(IV) adsorbé à la surface des minéraux et/ou des composés organiques. La fraction extraite avec NaOH représente le Se lié à la matière organique et plus particulièrement aux substances humiques (et/ou aux oxydes de fer), indépendamment de son degré d'oxydo-réduction. La fraction extraite avec Na_2SO_3 représente le Se élémentaire, Se(0).

Tableau 5 – Etapes des extractions séquentielles.

Etape	Phase extraite	réactif	Condition
1	Se(IV) adsorbé	0,1 mol.L ⁻¹ K ₂ HPO ₄	4 h – 20°C – 10/1 (v/m)
2*	Se organique	0,1 mol.L ⁻¹ NaOH	15 h – 20°C – 10/1 (v/m)
3	Se élémentaire	0,25 mol.L ⁻¹ Na ₂ SO ₃	4h – bain à ultrasons – 10/1 (v/m)

* le temps de centrifugation est d'1 heure pour cette étape ; un rinçage à l'eau UHQ est ensuite effectué (agitation de 30 min, même ratio v/m, centrifugation 1h).

Afin de connaître la quantité de Se résiduel, restant dans la phase solide après les différentes extractions, l'activité en ⁷⁵Se du culot de terre est dosée en spectrométrie gamma. Pour cela, suite aux différentes extractions, le culot de terre est récupéré, séché, broyé puis homogénéisé avec une matrice poudreuse inerte (NaHCO₃, densité 2,16 g.ml⁻¹) afin d'obtenir un volume identique à celui utilisé lors de l'étalonnage de l'appareil (5 ou 10 ml).

5.1.5 Mesure du Se associé à la biomasse

Le Se associé à la biomasse a été estimé à l'aide du protocole de fumigation-extraction de Vance et al. (1987), utilisé pour quantifier la biomasse totale de l'échantillon de terre (§ 5.3.1). Dans cette méthode, le C organique est extrait par K₂SO₄ à partir d'un échantillon de terre fumigé et d'un échantillon de terre témoin (qui ne subit pas de traitement). Le ⁷⁵Se est mesuré dans chaque extrait. La différence de ⁷⁵Se de ces deux extraits permet de quantifier le Se associé à la biomasse microbienne et libéré lors de la lyse des microorganismes, suite à la fumigation.

5.2 Les mesures physico-chimiques

Les différentes analyses effectuées avaient pour but (i) de caractériser l'état physico-chimique du sol dans chaque condition d'incubation à travers plusieurs paramètres, (ii) de voir si ces paramètres variaient dans les différentes conditions d'incubation, et (iii) de définir leur impact sur les microorganismes du sol et sur la réactivité du Se. Elles supposaient des mesures relativement simples et rapides afin de pouvoir les réaliser à chaque pas de temps, en parallèle des autres analyses.

5.2.1 Le potentiel d'oxydo-réduction

La mesure du potentiel d'oxydo-réduction a été réalisée au moyen d'une mini-électrode combinée Ag/AgCl saturé en KCl (Microelectrode.inc). L'électrode est équipée d'une aiguille de 10 cm de long pour pouvoir traverser le septum et faire une mesure directement dans le batch (Figure 3). Un étalonnage de l'électrode a été effectué de façon hebdomadaire par 2 solutions tampons de 220 mV et 470 mV. Le potentiel d'oxydo-réduction par rapport à l'électrode standard à H (E_H) se déduit des mesures faites par la formule suivante:

$$E_H = E_{\text{mesuré}} + E_{\text{Ag/AgCl}}$$

avec $E_{\text{Ag/AgCl saturé KCl}} = 199 \text{ mV à } 25 \text{ °C}$



Figure 3 – Mesure du potentiel d'oxydo-réduction du système au travers du septum.

5.2.2 Le pH

La mesure du pH est réalisée au moyen d'une mini-électrode combinée Ag/AgCl saturée en KCl (Microelectrode.inc). L'électrode utilisée est du même type que l'électrode d'oxydo-réduction. Une calibration hebdomadaire est effectuée par 2 solutions tampons de pH 9 et 7.

5.2.3 L'analyse de l'atmosphère gazeuse

La caractérisation de la composition de la phase gazeuse des flacons (O_2 , CO_2 , N_2 , N_2O , H_2 , CH_4 et Kr) a été réalisée par un chromatographe en phase gazeuse (CPG) (Hewlett Packard 6890) équipé d'une colonne Porapack Q (1,8 m) et d'un tamis moléculaire 5 Å (1,8 m) et d'un catharomètre. L'hélium (qualité 6.0) était utilisé comme gaz vecteur. L'ensemble était piloté par le logiciel *Chemstation*. L'incertitude relative était de l'ordre de 1% pour tous les gaz, à l'exception de H_2 (3%), dont la masse molaire et la conductivité

thermique sont proches de celles de He. La calibration hebdomadaire de l'appareil a été réalisée avec des mélanges de gaz étalons dont la composition est donnée dans le Tableau 6. Les caractéristiques techniques du CPG ainsi que celles de l'analyse (schéma, programmation) sont présentées annexe V.

Tableau 6 – Mélange de gaz étalons utilisés pour la calibration du CPG

Gaz 1	Gaz 2	Gaz 3
O ₂ (10 %)		
CO ₂ (5%)	CH ₄ (5 %)	
Kr (1 %)	H ₂ (5%)	Kr (100 %)
N ₂ O (1%)	N ₂ (90 %)	
N ₂ (83 %)		

5.2.4 L'humidité pondérale

La mesure exacte de la teneur en eau de l'échantillon de terre utilisé dans les différentes expérimentations a été effectuée afin de nous permettre de rapporter l'ensemble de nos résultats à la quantité de sol sec. Les teneurs en eau ont toujours été réalisées en triplicats. Quelques grammes d'échantillon de terre humide sont pesés avant et après 48h à l'étuve (105°C). La teneur en eau (ω) est déterminée par la formule suivante (Pansu et Gautheyrou, 2003).

$$\omega = m_{\text{eau}} / m_{\text{sol sec}} = (m_{\text{sol humide}} - m_{\text{sol sec}}) / m_{\text{sol sec}}$$

5.2.5 L'oxygène dissous

La mesure de l'O₂ dissous a été effectuée avec une électrode de type Clark (Unisense OX-N), équipée d'une aiguille permettant de percer le septum. L'électrode est connectée à un pico-ampèremètre de haute sensibilité (Unisense PA2000, sensibilité ~ 5pA). L'électrode est calibrée chaque semaine en 2 points :

- 100 % atmosphérique (~ 20 % d'O₂), après 5 min de bullage d'air dans la solution de calibration (eau UHQ).
- 0 % après bullage vigoureux d'un gaz inerte (N₂) dans la solution de calibration (eau UHQ).

5.2.6 Le dosage du glucose

Le dosage du glucose a été réalisé par colorimétrie après oxydation enzymatique en acide gluconique et en peroxyde d'H₂ par la glucose-oxydase. Les réactifs sont issus du kit de dosage GAGO20 (Sigma). Le peroxyde d'H₂ réagissait avec de l'o-dianisidine en présence de peroxydase pour former un complexe oxydé de couleur brune. Ce complexe réagissait ensuite avec de l'acide sulfurique concentré pour former un complexe de couleur rose-violet plus stable. C'est ce dernier qui était dosé par spectrophotométrie à 540 nm.

Afin de réduire les quantités d'échantillon nécessaire et d'augmenter le nombre de dosages, quelques modifications du protocole du kit ont été effectuées (Tableau 7). Les solutions d'étalonnage ont été réalisées à partir d'une solution standard de glucose à 1 g.L⁻¹ (Sigma).

Tableau 7 – Modifications du protocole d'utilisation du kit de dosage GAGO20 (Sigma)

	Kit Sigma GAGO20	Protocole Labo
Gamme de calibration		20 – 80 mg.L ⁻¹
Mélange réactionnel	1 mL de glucose-oxydase /o-dianisidine 2 mL d'échantillon 30 min à 37°C 1 mL de H ₂ SO ₄ (12 N)	0,250 mL de glucose-oxydase /o-dianisidine 0,5 mL d'échantillon 30 min à 37°C 250 µL de H ₂ SO ₄ (12 N)
Dosage	Cuve (5mL de réactif) 1 mesure en moins d'1 minute	Microplaque (300 µL de réactif /puit) 96 mesures en moins d'1 minute
Nombre de dosage/kit	20	80

5.2.7 Le dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique de Dubois et al. (1956). Les sucres simples, les oligosaccharides, les polysaccharides et leurs dérivés

forment un complexe jaune-orangé lorsqu'ils réagissent avec du phénol (5% massique) et de l'acide sulfurique concentré. Le mélange réactionnel est le suivant : 250 μL d'échantillon, 250 μL de phénol à 5% et 1 mL d' H_2SO_4 (98%). Le dosage du complexe coloré est ensuite effectué par spectrophotométrie à 490 nm. La gamme de calibration utilisée est de 10 à 100 mg.L^{-1} . Les solutions d'étalonnage ont été réalisées à partir d'une solution standard de glucose à 1 g.L^{-1} (Sigma).

5.2.8 Le dosage du Fe total

En conditions anoxiques, le dosage du Fe total a été réalisé avec le kit de dosage Spectroquant® 1.14761.0001 (Merck).

Tous les ions de Fe présents en solution sont réduits en ions Fe(II) par de l'acide thioglycolique. Dans un milieu tamponné au thioglycolate, les ions Fe(II) forment, avec un dérivé de triazine, un complexe rose-violet qui est dosé par spectrophotométrie à 540 nm. La gamme de calibration utilisée est de 0,1 à 2,5 mg.L^{-1} . Les solutions d'étalonnage ont été réalisées à partir d'une solution mère de sel de Mohr ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma) à 10 mg.L^{-1} .

5.2.9 Le dosage des ions Fe(II)

En condition anoxiques, le dosage des ions Fe(II) a été effectué par colorimétrie. En milieu acide, les ions Fe(II) forment un complexe stable avec l'orthophénantroline 1,10 (Phen), de couleur orangée. Le dosage de ce complexe s'effectue par spectrophotométrie à 510 nm. La solution mère et la gamme d'étalonnage utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour le dosage du Fer total (§ 5.2.8).

- Le milieu acide tamponné dans lequel s'effectue la complexation est le suivant :
50 ml d'une solution d'hydrogène-phthalate de K à 0,1 mol.L^{-1} auquel sont ajoutés 8,2 ml de solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L^{-1} . Le pH du mélange doit être de 3,5.

- Le mélange réactionnel est le suivant :
400 μL de milieu acide tamponné à pH 3,5
400 μL d'orthophénantroline à 6×10^{-3} mol.L^{-1}
1000 μL d'échantillon

Les ions Fe(II) s'oxydent immédiatement à l'air en ions Fe(III), le mélange réactionnel doit alors être effectué sous atmosphère dépourvue d' O_2 . Dans notre cas, le mélange

réactionnel a été effectué dans la boîte à gants, lors de l'ouverture des batch. Une fois le complexe formé, il est stable à l'air.

5.2.10 Le dosage de NH_4^+

En conditions anoxiques, le dosage de NH_4^+ a été effectué en phase liquide et en phase solide. Pour ce dernier dosage, il a fallu tout d'abord extraire l' NH_4^+ de l'échantillon de terre. L'extraction s'est faite par la mise en contact de l'échantillon de terre avec une solution de K_2SO_4 à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (ratio v/m = 4), sous agitation pendant 30 min. Le mélange a ensuite été centrifugé et la solution filtrée à $0,45 \mu\text{m}$ pour le dosage de l' NH_4^+ (Pansu et Gautheyrou, 2003). Un kit de dosage, Spectroquant® 1.14752.0001 (Merck), simple d'utilisation et n'utilisant pas de produits toxiques et cancérigènes, contrairement au protocole standard (Pansu et Gautheyrou, 2003), a été utilisé pour doser l' NH_4^+ des échantillons liquides et extrait de la phase solide. En milieu alcalin, l' NH_4^+ réagit avec un agent de chloration pour former de la monochloramine. Celle-ci forme par la suite, avec du thymol, un dérivé du bleu d'indophénol, dosé au spectrophotomètre à 630 nm. Les solutions d'étalonnage sont réalisées à partir d'une solution mère de NH_4Cl (dans K_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) à $128,5 \text{ mg.L}^{-1}$ en NH_4 (100 mg.L^{-1} en N). La gamme d'étalonnage est de $0,26$ à $3,86 \text{ mg.L}^{-1}$ en NH_4 .

5.2.11 Dosage des anions et des acides organiques

Les mesures des anions majeurs (Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-}) et des acides organiques de faible poids moléculaire (lactate, acétate, propionate, formate, butyrate, succinate, oxalate) étaient réalisées par chromatographie ionique liquide (DIONEX DX-120). Les composés étaient élués dans un gradient de KOH ($1-40 \text{ mmol.L}^{-1}$) et séparés à l'aide d'une pré-colonne AG11-HC et d'une colonne AS11HC. La mesure était effectuée en sortie de colonne par conductimétrie. La limite de quantification est d'environ $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, dépendant légèrement du composé dosé. Des mélanges étalons ont été analysés régulièrement, en intercalage avec les solutions à analyser. Les quantifications ont été effectuées grâce au logiciel Chroméléon à partir des surfaces de pic du chromatogramme.

5.3 Les mesures microbiologiques

Nous avons choisi de réaliser différents types d'analyses, pour accéder à la fois à la quantité de microorganismes (biomasse totale), et plus spécifiquement à la biomasse fongique et au dénombrement de la microflore bactérienne, mais également à la diversité moléculaire des communautés bactériennes.

5.3.1 Détermination de la biomasse totale

La détermination de la biomasse du sol a été réalisée par fumigation-extraction (Vance et al., 1987). La méthode consiste à extraire puis à quantifier le C d'origine microbienne contenu dans le sol. Pratiquement, l'échantillon de terre est divisé en deux aliquotes ; l'une est fumigée au chloroforme, l'autre non (témoin). Le dosage du C organique dans la solution d'extraction a été réalisé avec un COT-mètre Shimadzu TOC 5000A. La valeur de C organique est obtenue par différence entre la mesure du C total (TC) et la mesure du C inorganique (IC) ($OC = TC - IC$). Les gammes de mesure s'étendent de 3 à 70 mg.L⁻¹ pour le C total et de 1 à 10 mg.L⁻¹ pour le C inorganique. La quantité de C total (TC) est obtenue par une mesure du CO₂ (détecteur infrarouge) formé par combustion de l'échantillon dans un four chauffé à 680°C. La mesure du C inorganique (IC) se fait par injection de l'échantillon dans un réacteur en mélange avec H₃PO₄ (50 % v/v). Les carbonates solubles sont alors transformés en CO₂ puis dosés par infrarouge. Le C d'origine microbienne (E_C) est obtenu par différence entre le C organique extrait d'un échantillon de sol fumigé et celui extrait du même sol témoin. Cette quantité est alors directement proportionnelle à la biomasse totale du sol, appelée biomasse C (B_C), par la formule suivante :

$$B_C = E_C / K_{EC}$$

La constante K_{EC}, correspondant à la fraction extractible du C issue de la biomasse microbienne après fumigation, a été fixée à 0,45 pour notre étude (Vance et al., 1987 ; Joergensen, 1996). Elle peut être affectée, entre autre, par le type de microorganismes présents (bactéries et/ou champignons), leur stade de développement, le type de sol, la teneur en eau de l'échantillon et par l'apport d'amendement carboné (Vance et al., 1987 ; Joergensen, 1996 ; Dictor et al., 1998). Elle est ainsi très variable et la détermination de la biomasse totale ne reste qu'une approximation de la biomasse réelle (Vance et al., 1987 ; Joergensen, 1996). Les valeurs de biomasse totale obtenues dans nos conditions expérimentales sont donc à prendre avec précaution. Malgré cela, les valeurs obtenues peuvent permettre de traiter des évolutions relatives entre échantillons pour les différentes conditions.

5.3.2 Dosage de la biomasse fongique : mesure de l'ergostérol

L'ergostérol est un composé spécifique de la membrane fongique (Montgomery et al., 2000). Sa présence est considérée comme un marqueur de la biomasse fongique vivante et une bonne estimation de l'activité métabolique des champignons dans le sol (Mille-Lindblom et

al., 2004), bien que certains champignons en soient dépourvus (Zhao et al., 2005). L'ergostérol est extrait du sol selon le protocole de Gong et al. (2001) puis dosé par Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC- Dionex). La HPLC est équipée d'une pompe (Dionex P580), d'un passeur d'échantillon thermostaté à 4°C (Dionex ASI-100), d'une colonne C18 (Supelco 15 cm x 4,6 mm x 5 µm) et d'un détecteur UV (Dionex UVD -340S). L'ergostérol est élué par une phase mobile à 100% de méthanol (Sigma) à un débit de 1 ml.min⁻¹ et est détecté à 282 nm. La gamme de calibration, de 50 à 5000 µg.L⁻¹, a été faite à partir d'une solution d'ergostérol (Sigma).

Dans la littérature, il est possible de trouver plusieurs facteurs de conversion entre la quantité d'ergostérol et la biomasse fongique, ainsi que la quantité de C contenu dans cette biomasse fongique (Djajakirana et al., 1996 ; Montgomery et al., 2000 ; Gong et al., 2001 ; Mille-Lindblom et al., 2004) Pour nos conditions expérimentales, nous avons choisi, d'après Montgomery et al.,(2000), un facteur de conversion égal à 4 µg ergostérol/mg biomasse fongique (qui semble être une bonne moyenne des diverses valeurs utilisées dans la littérature) et une quantité de C contenu dans la biomasse fongique de 43 %.

5.3.3 Dénombrement de la microflore bactérienne totale : coloration à l'acridine orange

Le nombre de bactéries présentes dans le sol peut être obtenu par un dénombrement au microscope à épifluorescence suite à une coloration de l'ADN et/ou de l'ARN des bactéries avec un fluorochrome. Une dilution de la solution de sol est mélangée à de l'acridine orange pour obtenir une concentration en colorant de 0,01 % (vol/vol). La suspension colorée est alors filtrée à pression réduite sur membrane filtrante afin que les bactéries se concentrent sur le filtre (Millipore GTBP02500). Après différents rinçages avec de l'eau stérile, du propanol pour éliminer l'excès de fluorochrome, puis de nouveau de l'eau stérile, le filtre est monté entre lame et lamelle. Il est ensuite observé au microscope à épifluorescence (Nikon) à l'objectif à immersion (×100). Les bactéries, colorées avec l'acridine orange, entraînent une fluorescence de couleur verte lorsqu'elles sont excitées par une lumière bleue à 450 nm - 490 nm (filtre FITC). Généralement, 10 à 15 champs de surface contenant 20 à 30 bactéries par champ sont comptés au hasard par filtre. Le nombre de bactéries par g de sol (N) est calculé grâce la formule suivante :

$$N = n \times (S/s) \times d \times (V/v)/m$$

Avec N le nombre de bactéries par g de sol sec, n la moyenne du nombre de bactéries comptées dans chaque champ, S la surface filtrante (mm²), s la surface d'un champ oculaire (mm²), d la dilution de l'échantillon utilisée, V le volume de suspension (mL), v le volume de

dilution filtrée (mL), et m la masse de sol sec (g). Dans nos conditions, la surface filtrante (S) est 201,062 mm², la surface d'un champ oculaire (s), correspondant à la surface d'un champ vu par la camera ((85 x 95) x10⁻⁶ mm), est 0,0080750 mm², la masse de sol sec (m) est d'environ 0,5 g, le volume de suspension (V) est 5 mL, auquel nous avons ajouté l'eau contenue dans la masse de sol humide (teneur en eau à environ 28 %), et le volume de dilution filtrée (v) est 1 mL.

Néanmoins, cette méthode de comptage direct suite à une coloration a plus particulièrement été développée pour des systèmes aquatiques ou des cultures bactériennes (Kepner Jr et Pratt, 1994 ; Sunamura et al., 2003). Son utilisation dans un sol ou un sédiment reste difficile due à la présence de nombreuses particules, dont la fluorescence peut masquer l'énumération des microbes (Kepner Jr et Pratt, 1994 ; Sunamura et al., 2003). Aussi, elle est très dépendante de l'expérimentateur, principalement au niveau de l'énumération (choix des formes, tailles pour l'élimination des particules non microbiennes). De plus, cette méthode est relativement limitée lorsqu'il s'agit d'extrapoler des données collectées sur la surface limitée d'une observation au microscope aux dimensions expérimentales (terrain, batch ...) (Tate, 1995). Toutefois, elle est un bon outil de comparaison entre nos différentes conditions expérimentales.

5.3.4 Les dénombrements de bactéries cultivables par le Nombre le Plus Probable (NPP)

Les populations cultivables de bactériennes anaérobies fermentaires, dénitrifiantes, FeIII-réductrices et sélénio-réductrices, ont été déterminées par la technique d'estimation statistique du Nombre le Plus Probable (NPP). Cette technique permet, grâce à des dilutions liquides en cascade, d'estimer le nombre de bactéries cultivables d'une population sélectionnée par un milieu de culture, et qui étaient présentes dans l'échantillon de terre initial.

La Figure 4 présente le principe du dénombrement par NPP. Un échantillon de suspension de sol est prélevé et dilué dans un premier flacon de NaCl (8,5 g.L⁻¹). Après homogénéisation, une partie de la solution est prélevée de ce flacon pour être à nouveau diluée dans un second flacon (pour réaliser la seconde dilution), et une partie est inoculée dans une série de tubes de Hungate contenant le milieu de sélection. La même procédure est effectuée sur le second flacon (3^{ème} dilution), et ce jusqu'à la dernière dilution recherchée. En

pratique, nous avons effectué 8 dilutions au $10^{\text{ème}}$, et 6 répliquats par dilutions ont été effectués dont un témoin.

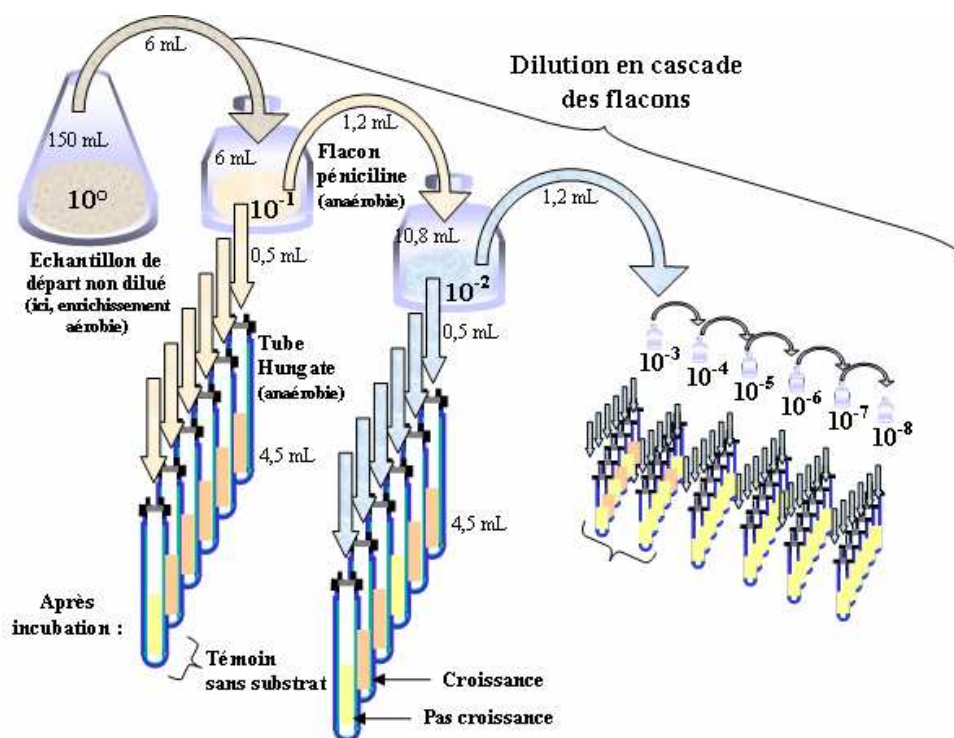


Figure 4 - Principe du dénombrement par NPP (dans cet exemple une dilution au 10^0 entre chaque série de tubes, avec 5 tubes par dilution + 1 témoin).

Les différents milieux de cultures sélectionnés, présentés annexe VI, avaient au préalable été distribués dans des tubes de Hungate stériles, ces tubes ayant été ensuite dégazés avec N_2 , puis stérilisés de nouveau par autoclave.

Après inoculation, tous les tubes ont été incubés 14 jours à 25°C dans le noir. A la fin de cette période, les tubes ont été annotés positifs ou négatifs selon les critères suivants :

- pour le milieu de culture spécifique des bactéries fermentaires, on considère qu'il y avait présence de bactéries (tube compté « + ») lorsque le milieu de culture est trouble à l'œil, ce trouble étant le signe d'une croissance bactérienne importante ;
- pour le milieu de culture adapté aux bactéries dénitrifiantes, un tube était compté « + » lors de la disparition de NO_3^- et NO_2^- du milieu, mesurée par dosage colorimétrique (réactif de Morgan et lecture à 600 nm) ;

- pour le milieu de culture adapté aux bactéries Fe(III)-réductrices, un tube était compté « + » lorsqu'il y avait apparition de Fe(II) dans le milieu de culture, mesurée par dosage colorimétrique (méthode de l'orthophénantroline et lecture à 540 nm),
- pour le milieu de culture adapté aux bactéries séléno-réductrices, un tube était compté positivement lors de l'apparition d'une couleur rouge provenant de la réduction du Se(IV) en Se(0), estimée par observation visuelle.

Les 3 dilutions comprenant les dernières dilutions « + » et les premières « - » ont alors été comparées à l'aide d'un tableau statistique standard de NPP (table de Mc Grady). En comparant les profils des tubes positifs avec ceux du tableau, il est possible d'estimer le nombre de bactéries par mL de milieu.

5.3.5 La diversité des structures de communautés bactériennes

Après une extraction de l'ADN bactérien de l'échantillon de terre, la diversité des structures de communautés bactériennes a été déterminée par électrophorèse sur gel dénaturant (DGGE- Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) d'un fragment du gène codant pour l'ARN16S.

Cette technique repose sur l'existence d'une région de l'ADN présente chez toutes les bactéries, mais qui diffère de façon importante au niveau de sa séquence des nucléotides. La DGGE exploite la variabilité du nombre de bases GC dans le double brin d'ADN. Après amplification par PCR, le double brin d'ADN se sépare en migrant sur le gel dénaturant. Les paires de bases de nucléotides GC, plus solides que les bases AT, résistent mieux à la dénaturation. Donc, plus le double brin d'ADN est riche en paire de bases GC, moins il se dénature et plus il migre rapidement vers le bas du gel. Ainsi, la DGGE conduit à l'obtention d'un profil de bande, où chaque bande correspond en théorie à (au moins) une communauté bactérienne.

- Extraction et purification de l'ADN bactérien

L'ADN bactérien issu de l'échantillon de terre a été extrait en utilisant le kit « Fast DNA spin kit for soil » (6560-200- Q-biogen). Pour éliminer les contaminants de la solution d'ADN, cette dernière a été purifiée en utilisant le kit de purification « Geneclean » (1001-200 Qbiogen).

- Amplification du fragment d'ADN par PCR

L'ADN purifié a subi une première PCR avec les amorces fD1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', position 8-27 sur le gène rrs de E. coli), et S17 (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3', position 1492-1509 sur le gène rrs de E. coli). Ces amorces bactériennes universelles ont permis d'obtenir un produit PCR donnant approximativement le gène 16S rADN complet, soit environ 1500 paires de bases. Ce produit a ensuite subi une seconde PCR avec les amorces 518r et 357F-GC, ce dernier permettant de fixer à l'extrémité de l'amplification 23 paires GC, appelé « GC Clamp » afin d'imposer une certaine solidité commune à tous les fragments amplifiés. Le fragment issu de la PCR finale comprend 233 paires de bases. Le programme de PCR utilisé est le suivant : Après une phase initiale dénaturante à 94°C pendant 5 min, 35 cycles de 30 sec à 95°, 30 sec à 53°C et 30 sec à 72°C sont réalisés avant la phase finale à 72°C pendant 10 min.

- La migration sur gel dénaturant

Un échantillon de produit PCR est analysé sur gel d'agarose pour estimer la quantité d'ADN à analyser en DGGE. Les fragments d'ADN_r-16s sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide avec un gradient dénaturant de 32 à 60 % (où dénaturant à 100 % correspond à un mélange de 7 mol.L⁻¹ d'urée et de 40 % de formamide) dans un système DCode (bio-rad). Des quantités similaires d'ADN de chaque produit PCR sont appliquées sur le gel vertical dénaturant de 1,5 mm d'épaisseur. La migration se déroule ensuite pendant 16 h à 75 Volt à 60°C (Système Dcode, Bio-rad) dans un milieu TAE 1X (TAE 1X: 0,04 mol.L⁻¹ de Tris-acétate, 2x10⁻³ mol.L⁻¹ d'EDTA à pH 8).

Afin de pouvoir comparer les profils des structures de communautés, le gel est ensuite révélé par du AgNO₃ selon le protocole de Radojkovic and Kusic (2000) et scanné.

Toutefois, l'analyse des communautés bactériennes par DGGE permet de détecter uniquement les communautés bactériennes majoritaires du système. De plus, une bande sur le profil d'ADN peut représenter plusieurs communautés bactériennes. Donc, en complément de cette analyse, une identification des communautés bactériennes majoritaires est nécessaire.

- Séquençage et analyse

Afin de pouvoir obtenir les séquences d'ADN de certaines bandes de DGGE, les échantillons initiaux de produit PCR d'intérêt ont de nouveau subi une migration sur gel avec un gradient dénaturant avec quelques modifications. La DGGE se déroule comme décrite ci-dessus, excepté que le gel est ensuite révélé dans une solution d'acide nucléique SYBR Green

I (Sigma-Aldrich), diluée à 1 : 10 000. Les bandes d'intérêts sont coupées sous UV. Puis, l'ADN est séparé des bandes de gel par incubation des bandes dans 25 µL d'eau stérile à 65°C pendant 30 min. L'ADN est ensuite utilisé comme échantillon pour l'amplification par PCR comme décrite précédemment, excepté que seulement 28 cycles sont effectués au lieu de 35. Les produits PCR sont analysés à Genome express (Meylan, France). Les séquences sont analysées par NCBI BLASTN search tool (Altschul et al., 1990) pour trouver des analogies et les séquences d'ADN les plus similaires avec les bases de données. Deux bases de données sont utilisées : la première est une base de données très complète, librement accessible couramment utilisée pour les identifications, qui contient de nombreuses séquences d'organismes cultivés ou pas GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ; la seconde est une base locale développée par Richard Christen (CNRS, UMR 6543, Université de Nice, Laboratoire de Biologie Virtuelle, Parc Valrose, 06108 Nice) qui recense uniquement les bactéries cultivées.

6. Références

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003. Toxicological profile for selenium. U.S. Department of health and human service - Public Health Service
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Hyers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1975. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Canadian Journal of Microbiology* 21, 314-322.
- Bourrelier, P., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. Académies des sciences,
- Chabroullet, C., 2007. Etude de la remobilisation d'éléments traces à partir d'un sol de surface contaminé: Influence du vieillissement des composés organiques du sol sur la remobilisation du sélénium. Thèse. Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- Coppin, F., Chabroullet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J., 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* 42, 379-386.
- Dictor, M.C., Tessier, L., Soulas, G., 1998. Reassessment of the K_{ec} coefficient of the fumigation-extraction method in a soil profile. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 119-127.
- Dilly, O., 2004. Effects of glucose, cellulose, and humic acids on soil microbial eco-physiology. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 261-266.
- Djajakirana, G., Joergensen, R.G., Meyer, B., 1996. Ergosterol and microbial biomass relation ship in soil. *Biology and Fertility of Soil* 22, 299-304.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Gong, P., Guan, X., Witter, E., 2001. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. *Applied Soil Ecology* 17, 285-289.
- Joergensen, R.G., 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EC} value. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 25-31.
- Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., 1988. Effects of carbon and trace element addition on alkylselenide production by soil. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1640-1644.

- Kepner Jr, R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Review* 58, 603-615.
- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.M., Faurie, G., 1991. Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a gamma-sterilized soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 367.
- McNamara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A., Parekh, N.R., 2003. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* 24, 117-132.
- Mille-Lindblom, C., von Wachenfeldt, E., Tranvik, L.J., 2004. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59, 253-262.
- Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C., Seifert, K.A., 2000. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1207-1217.
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2003. *L'analyse du sol*. Springer-Verlag France, Paris.
- Radojkovic, D., Kusic, J., 2000. Silver Staining of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Gels. *Clinical Chemistry* 46, 883-884.
- Reddy, K.J., Blaylock, M.J., Vance, G.F., See, R.B., (1995). Effects of redox potential on the speciation of selenium in ground water and coal-mine backfill materials, Wyoming. *Proceeding of the 12th annual national meeting of american society for surface mining and reclamation, Gillette, Wyoming.*
- Roden, D.R., Tallman, D.E., 1982. Determination of inorganic selenium species in groundwaters containing organic interferences by chromatography and hybride generation/atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 54, 307.
- Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1481-1491.
- Séby, F., 1994. *Optimisation de méthodes analytiques pour la spéciation du sélénium inorganique dans les eaux et les sols*. Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.
- Sunamura, M., Maruyama, A., Tsuji, T., Kurane, R., 2003. Spectral imaging detection and counting of microbial cells in marine sediment. *Journal of Microbiological Methods* 53, 57-65.
- Tate, R.L., 1995. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- Zhao, X.R., Lin, Q., Brookes, P.C., 2005. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 37, 311-317.

CHAPITRE III – INCUBATIONS DE SOL EN CONDITIONS OXIQUES

Le but de cette première partie de l'étude était d'étudier le rôle des microorganismes dans le comportement du Se dans un sol naturel en conditions oxygènes. Ainsi, nous avons deux objectifs principaux: tout d'abord contraindre un sol à différents états microbiologiques puis étudier la réactivité du Se dans ces différents états. La méthodologie de l'étude, les conditions d'incubation réalisées et les analyses effectuées sont présentées dans le chapitre précédent « II Matériels et Méthodes ».

Initialement, ce chapitre était divisé en deux parties : la première partie était un article publié dans *Journal of Environmental Radioactivity* et la seconde partie complétait l'article, avec les études cinétiques complètes (jusqu'à 10 jours d'incubation) des conditions déjà présentées, ainsi que des conditions et des analyses non présentées dans la publication. Pour des raisons d'homogénéité de langue du manuscrit (intégralement en français), l'article a dû être déplacé en annexe (Annexe I). Aussi, nous suggérons la lecture de la publication (annexe I) au préalable de ce chapitre.

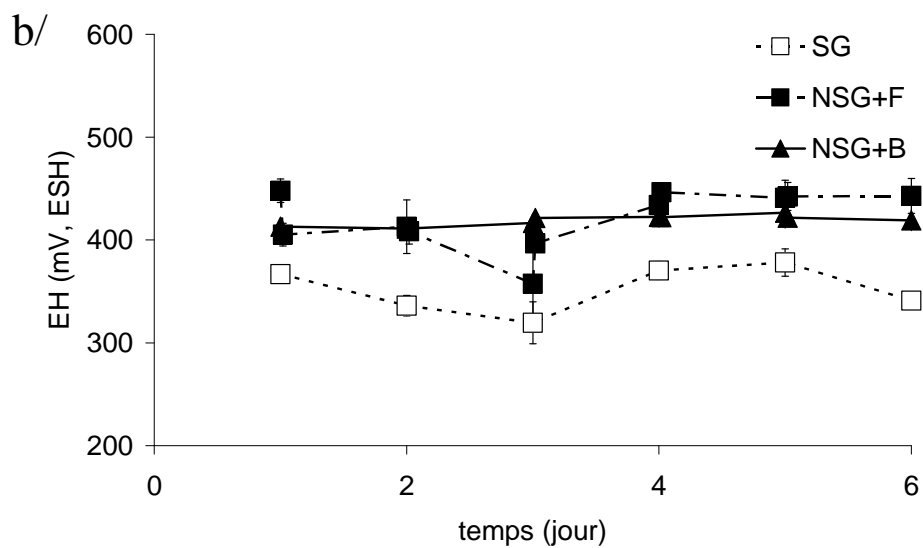
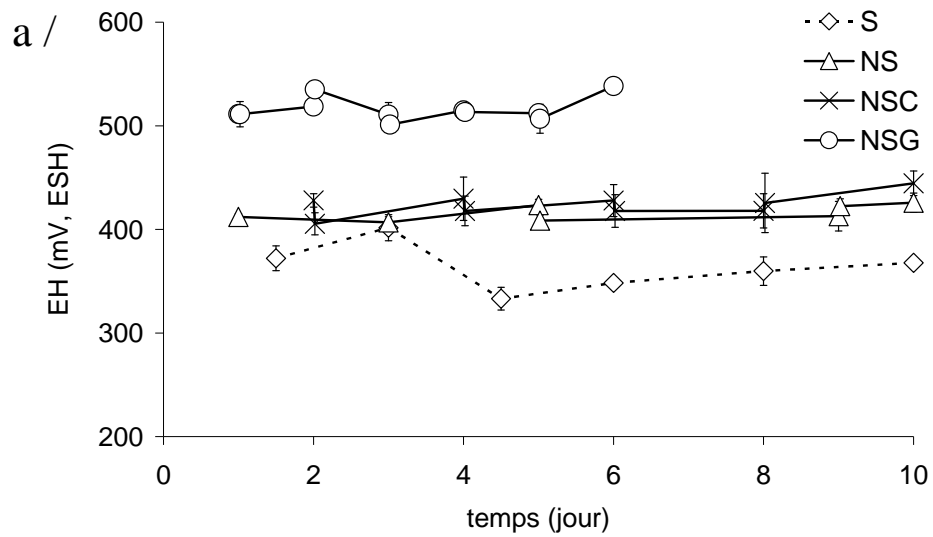
1. Résultats et discussion

Les analyses de E_H , pH et production de CO_2 sont présentées sur différents graphiques avec d'une part (a) les 4 conditions présentées dans la publication (Annexe I) (S, NS, NSC et NSG), et d'autre part (b) les 3 autres conditions définies comme suivant :

- SG : sol stérile et amendement glucose,
- NSG+B : sol non stérile, amendement glucose et antibactérien (streptomycine sulphate) et
- NSG+F : sol non stérile, amendement glucose et antifongique (cycloheximide).

1.1 E_H et pH

La valeur du potentiel d'oxydo-réduction, E_H , est une mesure très critiquée dans la littérature. D'une part, la définition thermodynamique du potentiel d'oxydo-réduction repose sur l'hypothèse que le système est à l'équilibre. Or, l'équilibre thermodynamique n'est jamais atteint dans un sol, principalement parce que les réactions d'oxydo-réductions résultent généralement d'activités microbiennes qui agissent spécifiquement sur certains couples redox et parce que les réactions abiotiques d'oxydo-réductions sont généralement lentes, voire très lentes. Ainsi, la mesure ne reflète pas tous les changements des espèces impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction (O_2 , oxydes de Fe et Mn...), mais plutôt une mesure globale qui dépend de la sensibilité de l'électrode à chaque couple redox et de l'abondance de ces couples dans le milieu. Pour toutes les conditions, il n'y a pas d'évolution majeure du E_H en fonction du temps, ni des amendements (Figure 1a et 1b). Toutes les valeurs de E_H mesurées (de 358 à 516 mV) sont cohérentes avec des conditions oxydantes.



Figures 1a et 1b : Evolutions cinétiques du potentiel d'oxydo-réduction E_H (mV) par rapport à l'électrode standard à H_2 . Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Les évolutions du pH en fonction du temps sont représentées Figures 2a et 2b pour les différentes conditions.

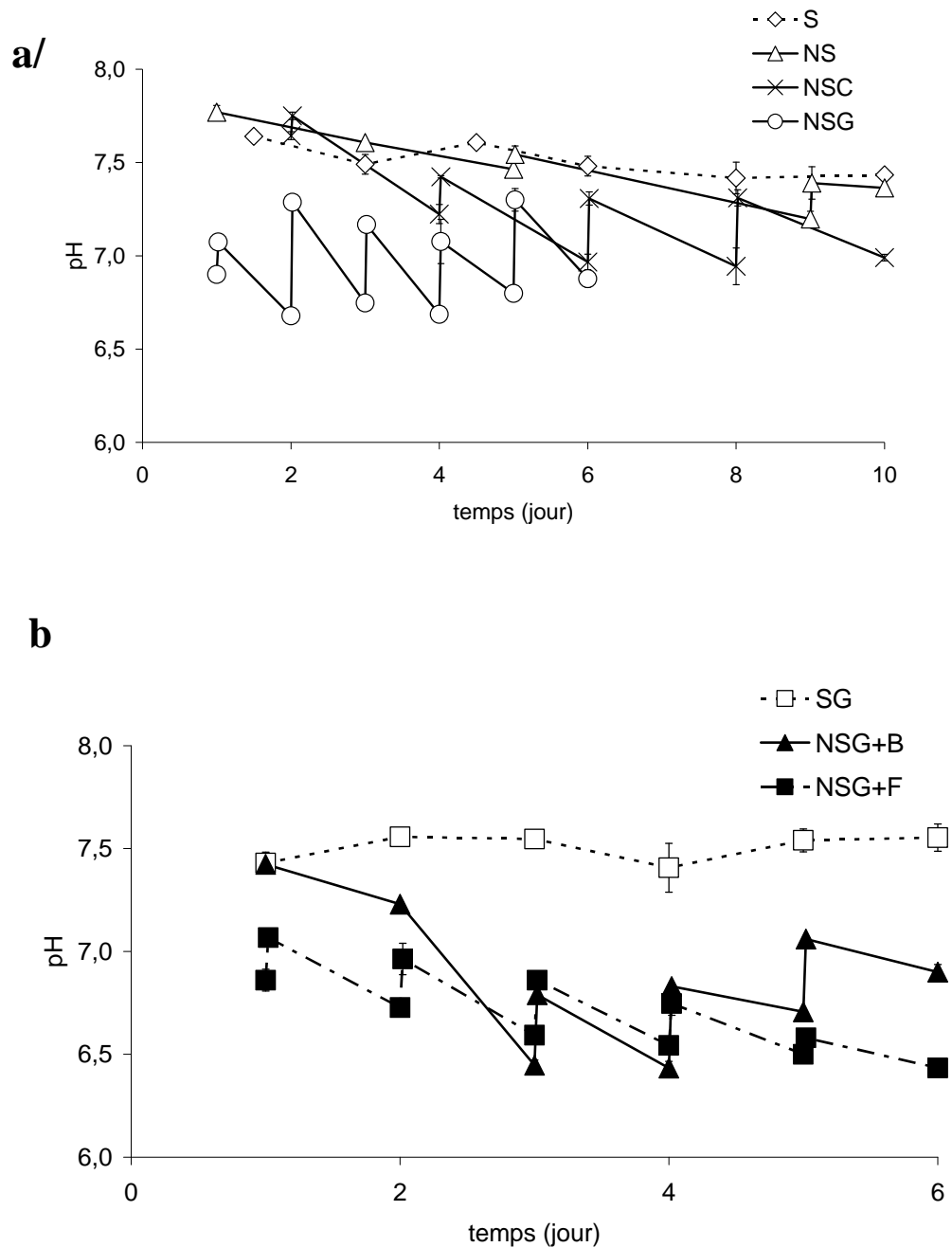


Figure 2a et 2b : Evolutions cinétiques du pH. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Pour toutes les conditions, le pH initial de la solution est de $7,7 \pm 0,1$. Dans nos systèmes expérimentaux, l'évolution du pH est étroitement liée à l'accumulation transitoire de CO_2 et aux cycles d'aération des batchs. En raison de la forte solubilité du CO_2 et de la dissociation partielle de H_2CO_3 en H^+ et HCO_3^- (pH de la solution compris entre 7,7 et 6,5

proche du pKa de la première dissociation de H₂CO₃ de 6,35), la production de CO₂ induit une diminution de pH. L'aération des systèmes abaisse simultanément les teneurs en CO₂ en phase gazeuse et en solution, et engendre à l'inverse une augmentation du pH. Les cycles d'aération sont ainsi responsables des évolutions temporelles en « dents de scie » du pH.

Les aérations ont pour but de maintenir les conditions oxiques (O₂ ≥ 16 %) durant toute l'incubation. En fonction de la consommation d'O₂, dépendante des amendements et des activités microbiennes, les cycles d'aération ont été effectués à différents moments de l'incubation.

Concernant les conditions stériles, le taux d'O₂ n'ayant pas varié, les batchs n'ont pas été aérés au cours de l'incubation, le pH est resté stable. Pour la condition NS, les cycles d'aération ont été effectués après 5 jours d'incubation. Pour la condition NSC, les aérations ont été effectuées tous les 2 jours et pour les conditions NSG et NSG+F, les cycles d'aération sont journaliers. Pour la condition NSG+B, la première aération des batch a eu lieu après 5 jours d'incubation, puis de façon journalière. Néanmoins et malgré les cycles d'aération, une diminution globale du pH est observée dans toutes conditions non stériles. Cette diminution résulte d'une augmentation de la concentration en CO₂ dans les systèmes, plus ou moins importante selon les conditions, et peut-être pour partie aussi d'oxydations ayant un caractère acidifiant (par exemple l'oxydation de NH₄⁺ en NO₃⁻).

1.2 Les activités microbiennes

1.2.1 L'atmosphère gazeuse

Due à la forte solubilité du CO₂, la quantité totale de CO₂ produite dans un batch se répartit en phase gazeuse (elle est alors mesurée par chromatographie en phase gazeuse), et en phase liquide, (elle peut alors être calculée à partir de la pression partielle de CO₂ dans la phase gazeuse et du pH de la solution tant qu'il n'y a pas de mobilisation ou d'immobilisation de carbonates). Aussi, la quantité de CO₂ total (dissous + gazeux) produite dans un batch est calculée à partir de la formule suivante :

$$Q_{CO_2} = \left(\frac{P(CO_2)}{R \times T} \right) \times \left(V_a + \left(V_w \times \alpha_{CO_2} \times \left(1 + 10^{pH - pK_{a1}} \right) \right) \right)$$

où P(CO₂) est la pression partielle de CO₂ mesuré dans le batch (Pa), V_a le volume de gaz du batch (m³), V_w le volume de solution (m³), α_{CO₂} la constante de solubilité pour le CO₂ (0,85 mol.m⁻³ solution/mol.m⁻³ gaz), pH le pH de la solution de sol et pK_{a1} la première constante de dissociation pour H₂CO₃ (6,35).

Les taux de production totale de CO₂ (en mol.j⁻¹) en fonction du temps sont représentées Figures 3a et 3b pour les différentes conditions.

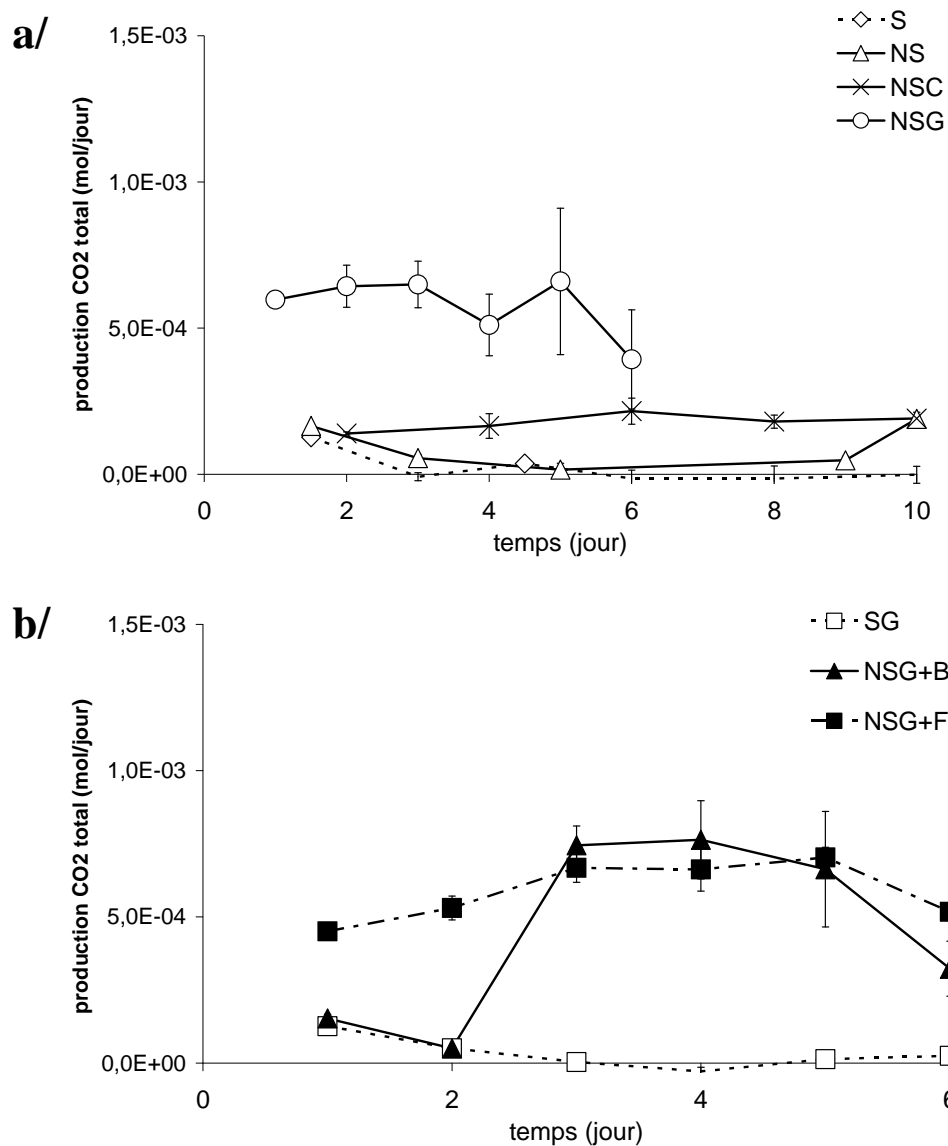


Figure 3a et 3b : Evolutions cinétiques de la production de CO₂ total (mol/jour). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Dans les conditions stériles (S et SG), pendant 1,5 jour d'incubation, il y a une production totale de CO₂ de $1,3 \times 10^{-4}$ mol/jour. Après cette date, la production de CO₂ est inférieure à la limite de détection ($< 0,05$ % atmosphérique). Cette production initiale est expliquée par la dissolution de CaCO₃ initialement présents dans l'échantillon de terre, et par l'équilibre CO₂ gazeux / CO₂ dissous. Une fois l'équilibre atteint (≤ 1 jour), il n'y a plus de production de CO₂

mesurable dans les batchs. Ainsi, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas d'activités microbiennes respiratoires aérobies dans les conditions S et SG.

Pour toutes les autres conditions non stériles, une production de CO₂ est mesurée au-delà du 1^{er} jour d'incubation. Dans la condition NS, la production totale de CO₂ est faible mais supérieure à celle des conditions stériles (Figure 3a), synonyme d'une activité microbienne respiratoire faible, mais présente. L'apport d'amendements carbonés a permis d'augmenter les activités microbiennes respiratoires, mais différemment en fonction du type d'amendement (cellulose ou glucose). Pour les conditions NSC et NSG, cette production est respectivement en moyenne 5 fois et 16 fois supérieure à celle de la condition NS. Pour la condition NSC, l'amendement cellulose a été choisi car il nécessite une hydrolyse préalable au catabolisme des monomères de glucose qui en résultent. Cette étape limitante est le fait de certains microorganismes seulement, dont des champignons en condition aérée (Hu et Van Bruggen, 1997 ; Schutter et Dick, 2001 ; Dilly, 2004). Dans cette condition, une production de CO₂ journalière régulière jusqu'à la fin de l'incubation ($1,8 \times 10^{-4}$ mol/jour) est observée. Au contraire, dans la condition NSG, le glucose est rapidement dégradé par les microorganismes. La production totale de CO₂ est donc très importante dès le 1^{er} jour de l'incubation ($5,9 \times 10^{-4}$ mol/jour), et constante jusqu'au 5^{ème} jour de l'incubation. Une diminution de la production journalière de CO_{2 total} est observée au 6^{ème} jour de l'incubation ($3,9 \times 10^{-4}$ mol/jour). Pour la condition NSG+F, la production de CO_{2 total} est également très importante dès le début de l'incubation ($4,5 \times 10^{-4}$ mol/jour), mais toutefois légèrement moindre que dans la condition NSG. Ce retard est rattrapé au 3^{ème} jour de l'incubation et atteint une production de $6,6 \times 10^{-4}$ mol/jour. Tout comme pour la condition NSG, une diminution de la production journalière de CO_{2 total} est observée au 6^{ème} jour de l'incubation ($5,1 \times 10^{-4}$ mol/jour). Pour la condition NSG+B, aucune activité microbienne respiratoire n'est mesurée durant les 2 premiers jours de l'incubation, la production de CO_{2 total} est équivalente à celle des conditions S et SG (dissolution des carbonates). Par la suite, la production de CO₂ augmente fortement entre le 2nd et le 3^{ème} jour de l'incubation ($7,4 \times 10^{-4}$ mol/jour), puis suit la même évolution que les conditions NSG et NSG+F, avec une chute de la vitesse de production de CO_{2 total} au dernier jour de l'incubation ($3,2 \times 10^{-4}$ mol/jour).

L'efficacité des inhibiteurs utilisés (streptomycine et cycloheximide) a déjà été démontrée, mais uniquement pour des expérimentations de 6 à 8 heures (Anderson et Domsch, 1975) et nos expérimentations se poursuivent sur 6 jours. Nous pouvons alors nous poser la question de l'efficacité des inhibiteurs dans nos conditions expérimentales. De plus, l'utilisation

d'inhibiteurs sélectifs comporte quelques limitations (Anderson et Domsch, 1975 ; Lin et Brookes, 1999) : (i) l'antibiotique utilisé n'est souvent pas suffisamment spécifique, (ii) il peut être inactivé par le sol ou dégradé par les microorganismes survivants, et (iii) l'élimination des microorganismes ciblés par l'antibiotique devient une source d'énergie additionnel pour les microorganismes restant. Aussi, à elle seule la mesure de la respiration ne permet pas de se prononcer sur l'efficacité des agents antibactérien et antifongique. Des analyses supplémentaires, comme la mesure de biomasse fongique ou le comptage des cellules bactériennes, discutées ultérieurement sont nécessaires pour confirmer ou non l'efficacité des traitements utilisés. Des dénombrements bactériens et fongiques suite à des mises en cultures sur des milieux spécifiques (Anderson et Domsch, 1975) auraient également permis de vérifier l'efficacité de l'inhibiteur, mais ceux ci n'ont pas été effectués.

Pour les 3 conditions non stériles avec un amendement glucose (NSG, NSG+F et NSG+B), la diminution de la vitesse de production totale ou globale de CO₂ mesurée à 6 jours d'incubation est cohérente avec l'évolution de la concentration en glucose dans les batch (Figure 4), présentée au paragraphe suivant. Le glucose est une source importante de carbone pour les microorganismes et, à 6 jours, la totalité ou la quasi-totalité du glucose a été consommée.

1.2.2 L'amendement glucose

Les évolutions de la consommation du glucose dans les conditions SG, NSG, NSG+F et NSG+B sont présentées Figure 4.

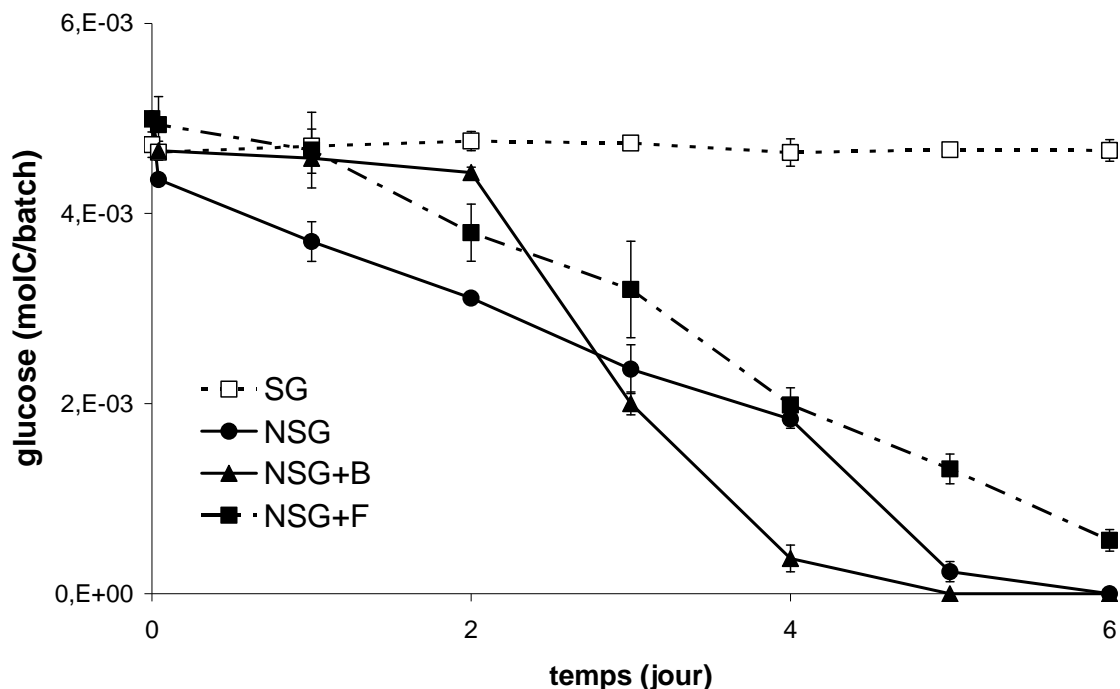


Figure 4 : Evolutions cinétiques de la concentration en glucose en solution (mol C/batch). Moyenne des trois réplicats \pm 1 écart-type.

Dans la condition SG, aucune consommation de l'amendement glucose (Figure 4) n'est observée ($5,0 \times 10^{-3}$ molC/batch). Il n'y a donc pas eu de dégradation biologique du glucose. Ce résultat témoigne de la stérilité du système.

Pour les conditions non stériles, dans la condition NSG, tout comme la production de CO_2 , la disparition du glucose est importante dès le premier jour ($3,7 \times 10^{-3}$ molC/batch restant en solution), puis relativement constante jusqu'à 5 jours d'incubation. La totalité du glucose initialement mis en solution est consommée en 6 jours. Les traitements antibactérien et antifongique ont diminué la consommation de glucose au début de l'incubation. Dans la condition NSG+F, le retard observé dans la production de CO_2 est également observé dans la disparition du glucose. En effet, il reste $4,9 \times 10^{-3}$ molC/batch au 1^{er} jour de l'incubation. Dans la condition NSG+B, la quantité de glucose, initialement mis en solution ($5,0 \times 10^{-3}$ molC/batch) reste relativement constante durant les trois premiers jours d'incubation. A partir du 3^{ème} jour d'incubation, la disparition du glucose en solution est plus importante que dans les deux autres conditions (x3). La totalité du glucose est consommé au 5^{ème} jour d'incubation. Nous pouvons alors supposer que les bactéries sont majoritairement responsables de la dégradation du glucose en début d'incubation car la plus faible consommation initiale du glucose est mesurée dans la condition NSG+B. Dans ce cas,

l'antifongique aurait également eu un effet sur certaines populations bactériennes, expliquant ainsi le retard observé dans la condition NSG+F par rapport à la condition NSG.

1.3 La caractérisation microbiologique

1.3.1 La biomasse totale

La biomasse totale du sol ($\mu\text{g C/g sol}$) est en moyenne de $69 \pm 40 \mu\text{g C/g sol sec}$ avant incubation (T_0), pour les toutes les conditions. Les évolutions cinétiques des biomasses totales C après incubation sont présentées Figure 5. L'importance des écart-types observés est liée à la grande variabilité entre les réplicats. Ceci peut être dû à l'hétérogénéité de l'échantillon de terre à l'échelle des 5 g utilisés pour l'analyse.

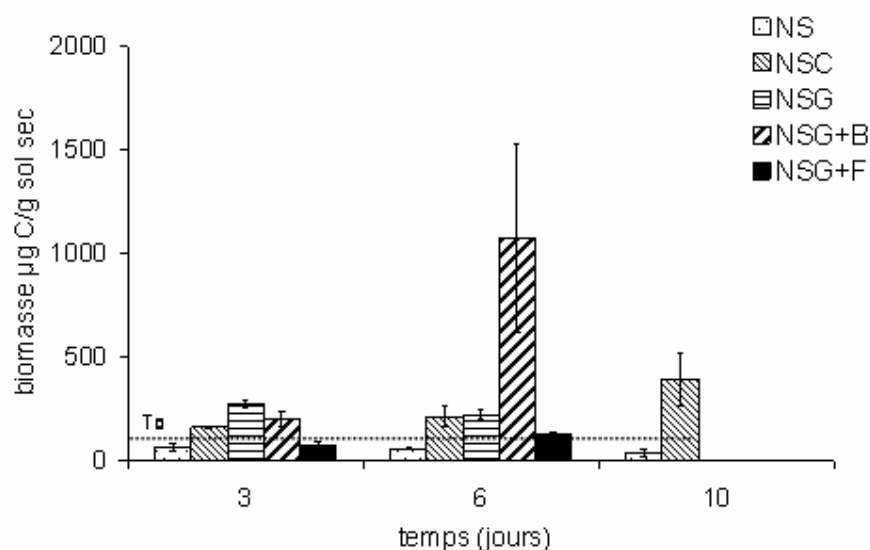


Figure 5 : Evolutions cinétiques de la biomasse C totale ($\mu\text{g C/g sol sec}$). La ligne horizontale en pointillé représente la valeur de biomasse C du sol avant l'incubation (T_0). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

La biomasse totale du sol, appelée biomasse C (B_C), est proportionnelle à la quantité mobilisée de C d'origine microbienne (E_C) par $B_C = E_C / K_{EC}$. E_C est obtenue par différence entre le C organique extrait d'un échantillon de sol fumigé et celui extrait d'un sol témoin. K_{EC} , correspondant à la fraction extractible du C de la biomasse microbienne (après fumigation), sa valeur est variable selon les auteurs. La constante K_{EC} utilisée dans nos calculs est égale à 0,45 (Vance et al., 1987). Ainsi, la détermination de la biomasse totale C par fumigation extraction n'est qu'une approximation de la biomasse réelle, notamment car elle nécessite l'utilisation d'une constante semi-empirique (K_{EC}). Dans la littérature, les valeurs de

biomasse totale C sont très dispersées. La gamme de valeurs peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de $\mu\text{g C/g sol sec}$ en fonction du type de sol, de la profondeur, du coefficient K_{EC} utilisé, etc....

Les valeurs de biomasse totale C pour la condition NS se situent parmi les valeurs basses ($< 100 \mu\text{g C/g sol sec}$) (Badalucco et al., 1997 ; Meyer et al., 1997 ; Schutter et Dick, 2001). Ce résultat était attendu car le sol est sableux et relativement pauvre en matière organique et minéraux argileux, ces compartiments étant connus pour être microbiologiquement très actifs. Cette faible biomasse est d'ailleurs cohérente avec la faible activité microbienne respiratoire mesurée (Figure 3). Pour les autres conditions, les amendements carbonés ont engendré une augmentation de la B_C . Tout comme la production de CO_2 , les cinétiques d'augmentation de la biomasse sont fonction du type d'amendement. Ainsi, pour la condition NSC, l'augmentation de biomasse totale est progressive durant l'incubation, alors que pour la condition NSG, elle est multipliée par 4 dès le 3^{ème} jour de l'incubation. Néanmoins, à 6 jours d'incubation, les biomasses totales sont identiques dans ces deux conditions (NSG et NSC) ($222 \mu\text{g C/g sol sec}$), alors que la production de CO_2 est 1,8 fois plus importante dans la condition NSG. Cette même quantité de biomasse semble avoir un rendement respiratoire différent, signe que ce sont des biomasses différentes.

Dans la condition NSG+F, l'augmentation de la B_C ($\times 1,8$) est plus faible que dans la condition NSG et a lieu plus tard, entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour de l'incubation. Ainsi, le décalage observé de 2 jours pour la production de CO_2 (Figure 3) et la consommation de glucose (Figure 4) est également observé pour l'augmentation de la biomasse. Dans la condition NSG+B, la valeur de B_C est fortement augmentée, d'un facteur 5, à partir du 3^{ème} jour et atteint plus de $1000 \mu\text{g C/g sol sec}$ au 6^{ème} jour de l'incubation. Ainsi, l'antibactérien a permis une forte augmentation de la biomasse en comparaison des autres conditions et si on suppose la bonne efficacité de l'inhibiteur, il s'agit a priori d'une augmentation de la biomasse fongique. La mesure de la biomasse fongique nous permettra de vérifier cette hypothèse.

1.3.2 La biomasse fongique

La biomasse fongique de l'échantillon de terre a été estimée à partir d'une mesure de l'ergostérol, composé spécifique de la membrane de nombreuses espèces de champignons, bien que certains champignons en soient dépourvus (Zhao et al., 2005). Avant tout traitement

(incubation ou stérilisation), l'échantillon de terre contenait en moyenne $46 \pm 7 \mu\text{g C}$ de biomasse fongique /g sol sec (BFC : C de la biomasse fongique) (T_0) (Figure 6).

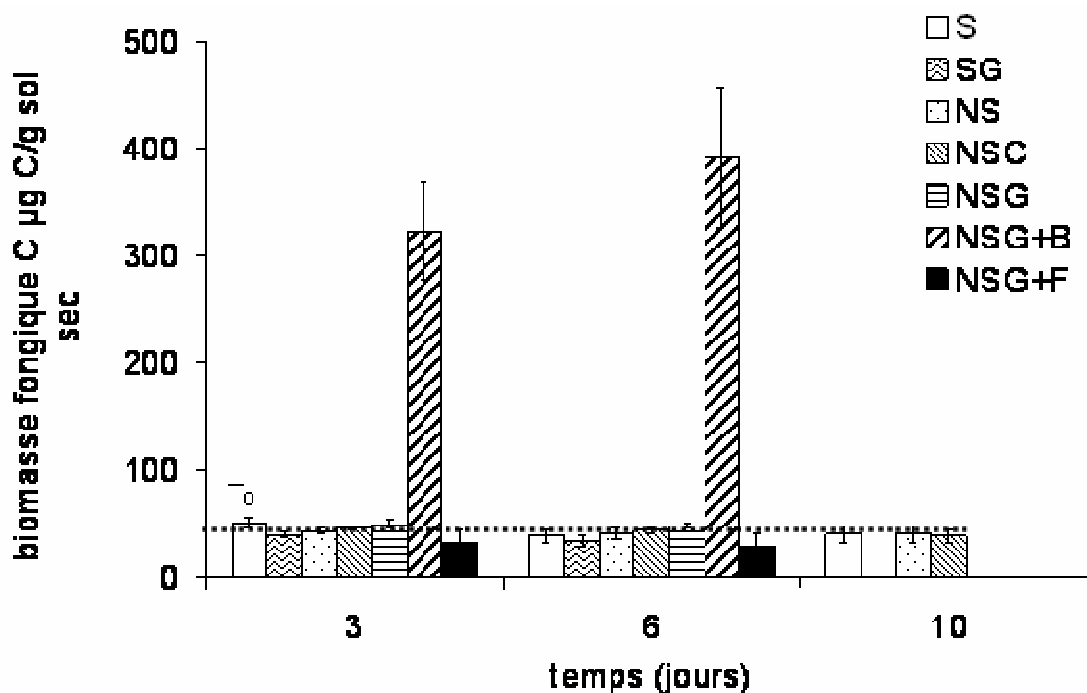


Figure 6 : Evolutions cinétiques de la biomasse fongique C ($\mu\text{g C/g sol sec}$). La ligne horizontale en pointillé représente la valeur de biomasse C du sol avant l'incubation (T_0). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type

La mesure d'une quantité d'ergostérol, dans les conditions stériles (S et SG), équivalente aux autres conditions, est surprenante. En effet, la présence de l'ergostérol est considérée comme un marqueur de la biomasse fongique vivante et une bonne estimation de l'activité métabolique des champignons dans le sol. Mille-Linbdlon et al. (2004) ont observé une dégradation photochimique de l'ergostérol issu de champignon mort de 43 % en 24 h. Néanmoins, lorsque que les échantillons sont protégés de la lumière, la dégradation n'est que de 34 % en 2 mois. La stérilité de nos échantillons ayant été vérifiée par diverses mesures (production de CO_2 , consommation de l'amendement glucose et ensemencement sur boîte de pétri), il semblerait que dans nos conditions expérimentales (incubation des systèmes dans le noir et cinétique de 6 à 10 jours) nous mesurons donc également de l'ergostérol, non dégradé, issu des champignons morts.

Concernant les conditions non stériles, durant toute la durée de l'incubation, la BFC est restée stable pour toutes les conditions, excepté pour la condition NSG+B. La stabilité de la biomasse fongique est plutôt surprenante pour la condition NSC. En effet, la cellulose a été

choisie pour stimuler plutôt le compartiment fongique. Néanmoins, une biomasse fongique C stable ne signifie pas que le compartiment fongique ne soit pas actif. Pour la condition NSG+B, la BFC est multipliée par 7 dès le 3^{ème} jour de l'incubation. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure que l'accroissement du compartiment fongique soit dû à la mort totale des bactéries et donc se prononcer sur l'efficacité totale de l'antibactérien. Par contre, avec cet antibactérien, la biomasse fongique est stimulée, ce qui est différent des autres conditions. En ce qui concerne la condition NSG+F, tout comme pour les conditions stériles, nous mesurons, avec étonnement, une quantité d'ergostérol, équivalente à celle mesurée dans les autres conditions. Sur ce point, il est difficile de conclure sur l'efficacité du traitement antifongique, à savoir s'il s'agit d'une BFC morte non dégradée ou si le traitement antifongique a été inefficace.

En combinant les valeurs de biomasse totale C (B_C) (Figure 5) et de biomasse fongique C (BFC) (Figure 6), il est possible d'estimer la part du compartiment fongique dans la biomasse totale, représentée Figure 7.

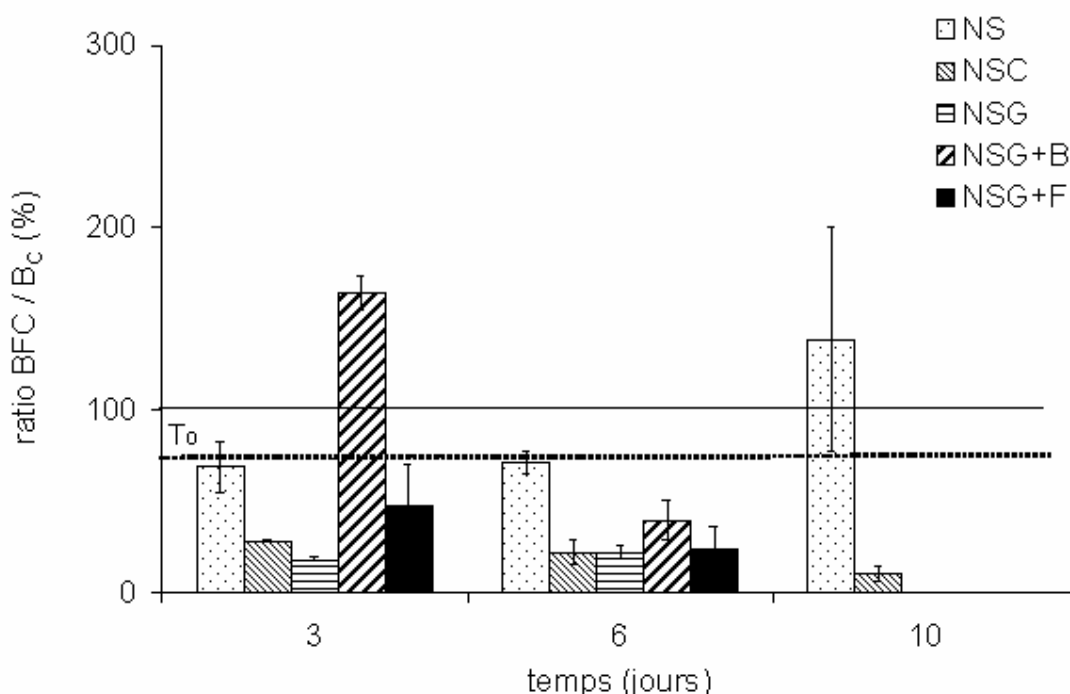


Figure 7 : Evolutions cinétiques du ratio BFC/ B_C . La ligne horizontale en pointillé représente la valeur du ratio avant l'incubation (T_0). La ligne en trait plein représente 100 %. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Le compartiment fongique représente environ 71 % de la biomasse totale, avant incubation (T_0) pour toutes les conditions. Cette valeur est cohérente avec celles généralement retrouvées dans la littérature (Djajakirana et al., 1996).

Dans la condition NS, le ratio est stable jusqu'à 6 jours d'incubation. L'augmentation importante du ratio BFC/B_C , à 10 jours d'incubation est expliquée par la diminution de la biomasse totale C et le maintien de la biomasse fongique C (vivante + morte). Dans les conditions amendées, NSC, NSG et NSG+F, le ratio diminue en fonction du temps avec différentes cinétiques en fonction des conditions, ne représentant plus que 9 % pour la condition NSC à 10 jours et 22 % pour les conditions NSG et NSG+F, à 6 jours. Ainsi, dans ces conditions, la biomasse bactérienne augmente au détriment de la biomasse fongique. Ce résultat était attendu pour la condition NSG+F, preuve de l'efficacité de l'antifongique. Par ailleurs, ce résultat confirme l'implication des bactéries dans la dégradation du glucose. Dans la condition NSG+B, le ratio BFC/B_C dépasse les 100 % au 3^{ème} jour de l'incubation (164 %). Cette incohérence peut être expliquée par la surestimation du compartiment fongique, induite par l'ergostérol non dégradé, issu de champignons morts, et par les incertitudes sur la valeur de K_{EC} et sur la teneur en ergostérol des champignons. Cette remarque est également valable pour les autres conditions. Néanmoins, c'est uniquement dans la condition NSG+B que la biomasse fongique C est suffisamment importante pour engendrer cette incohérence. Puis, le ratio diminue ensuite à 40 %. Ceci nous montre que l'antibactérien n'est réellement efficace sur les bactéries qu'en début d'incubation et que des bactéries résistantes à l'antibactérien se sont développées dans le système. Ainsi, l'augmentation de biomasse totale C précédemment constatée dans la condition NSG+B (Figure 5) n'est pas due au compartiment fongique, mais majoritairement au compartiment bactérien (60 %).

1.3.3 Le dénombrement bactérien

Le dénombrement bactérien, effectué par comptage des cellules bactériennes suite à une coloration à l'acridine orange, est présenté Figure 8, pour toutes les conditions, exceptées les conditions stériles.

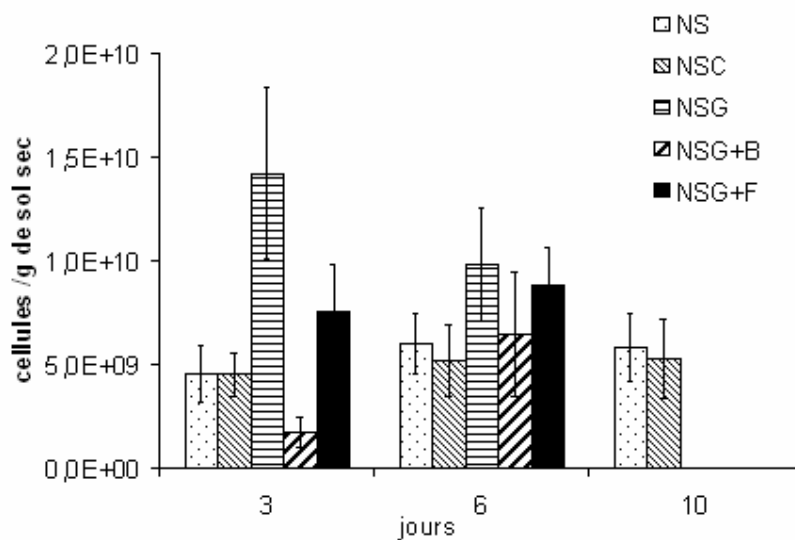


Figure 8 : Evolution cinétique de la densité bactérienne (nombre de cellules/ g sol sec). Moyenne des trois réplicas \pm 1 écart-type

Dans la condition NS, contrairement aux valeurs de la BC, les valeurs trouvées de densités bactériennes ($5,4 \times 10^9$ cellules /g sol sec en moyenne) sont stables durant toute l'incubation et supérieures à celles généralement reportées dans la littérature par ce mode de comptage (acridine orange, DAPI, Sybr green...) (Weinbauer et al., 1998 ; Dassonville et al., 2004). Toutefois, de fortes incertitudes sont reliées à ces valeurs. L'utilisation de cette méthode dans un sol ou un sédiment reste difficile à cause de la présence de nombreuses particules dont la fluorescence peut se confondre avec l'énumération des microbes (Kepner Jr et Pratt, 1994 ; Sunamura et al., 2003). De plus, elle est très dépendante de l'opérateur, principalement au niveau de l'énumération (choix des formes, tailles pour l'élimination des particules non microbiennes). Dans notre cas, l'opérateur a été le même pour toutes les énumérations. Nous pouvons supposer que le biais engendré est donc identique pour toutes les conditions et nous pouvons comparer les conditions entre elles, ainsi que leurs évolutions cinétiques.

Pour la condition NSC, la biomasse totale et la biomasse fongique sont respectivement supérieure et identique à celles de la condition NS ; nous nous attendions donc à une densité bactérienne supérieure, alors que les valeurs de densité bactérienne en nombre se sont avérées similaires. Néanmoins, il existe de multiples sources d'incertitudes notamment liées à des variations d'extractabilité du C microbien ou encore à l'importante incertitude relative à l'énumération de la densité bactérienne. La plus importante densité bactérienne ($1,4 \times 10^{10}$ cellules /g sol sec) est mesurée dans la condition NSG, au 3^{ème} jour de l'incubation. Ce

résultat confirme le résultat précédent, concernant le compartiment bactérien, favorisé par l'amendement glucose dans nos conditions expérimentales. Pour la condition NSG+F, La densité bactérienne est inférieure à celle de la condition NSG au 3^{ème} jour d'incubation, puis équivalente au 6^{ème} jour. Ce résultat montre un effet négatif sur les bactéries au début de l'incubation expliquant les différences observées dans cette condition vis-à-vis de la condition NSG dans les différentes analyses précédentes. Dans la condition NSG+B, au 3^{ème} jour de l'incubation, le nombre de cellules /g de sol sec est le plus faible ($1,8 \times 10^9$ cellules /g sol sec) puis augmente pour être équivalent aux autres conditions. Ce résultat confirme l'efficacité de l'antibactérien au début de l'incubation pendant au maximum 3 jours. Toutefois, des bactéries résistantes à l'antibiotique utilisé se sont développées dans le système.

1.3.4 La caractérisation des communautés bactériennes

La structure des communautés bactériennes du sol avant incubation, et après 3, 6 et 10 jours d'incubation, obtenue par électrophorèse sur gel dénaturant (DGGE- Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S est présentée Figure 9. A chaque temps (3, 6 et 10 jours), les 3 profils verticaux représentent les répliquats de chaque incubation en batch.

On considère couramment qu'une bande représente une population bactérienne majoritaire du système et que son intensité relative représente l'abondance relative de cette population particulière dans la structure de communauté. L'évolution des structures de communautés de chaque condition a été évaluée par une comparaison visuelle des différents profils. Toutefois, sachant qu'il est très difficile de reproduire exactement le même gradient dénaturant sur différents gels, des marqueurs spécifiques ont été utilisés pour permettre des comparaisons entre les différents gels. En fait, le nombre de bandes observées sur les profils ne peut pas être interprété comme le nombre exact de populations dans la communauté. En effet, due à la complexité des communautés bactériennes d'un sol, l'ADNr 16S de plusieurs populations bactériennes peut se retrouver dans une seule bande large, appelée « smear » (Nakatsu et al., 2000) et, inversement, une population bactérienne peut être représentée par plusieurs bandes (Ueno et al., 2001). Ainsi, en complément du profil des structures de communautés, une identification des populations bactériennes majoritaires a été effectuée. Les bandes séquencées sont repérées par des lettres en caractères minuscules pour les distinguer des numéros utilisés dans la publication (annexe I). Les populations bactériennes dont la séquence d'ADN est la plus proche de la séquence identifiée sont présentées Tableau 1. Deux bases de

données ont été utilisées pour l'identification des populations bactériennes : la première est une base de données très complète, librement accessible couramment utilisée pour les identifications, qui contient de nombreuses séquences d'organismes cultivés ou pas GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ; la seconde est une base locale développée par Richard Christen (CNRS, UMR 6543, Université de Nice, Laboratoire de Biologie Virtuelle, Parc Valrose, 06108 Nice) qui recense uniquement les bactéries cultivées.

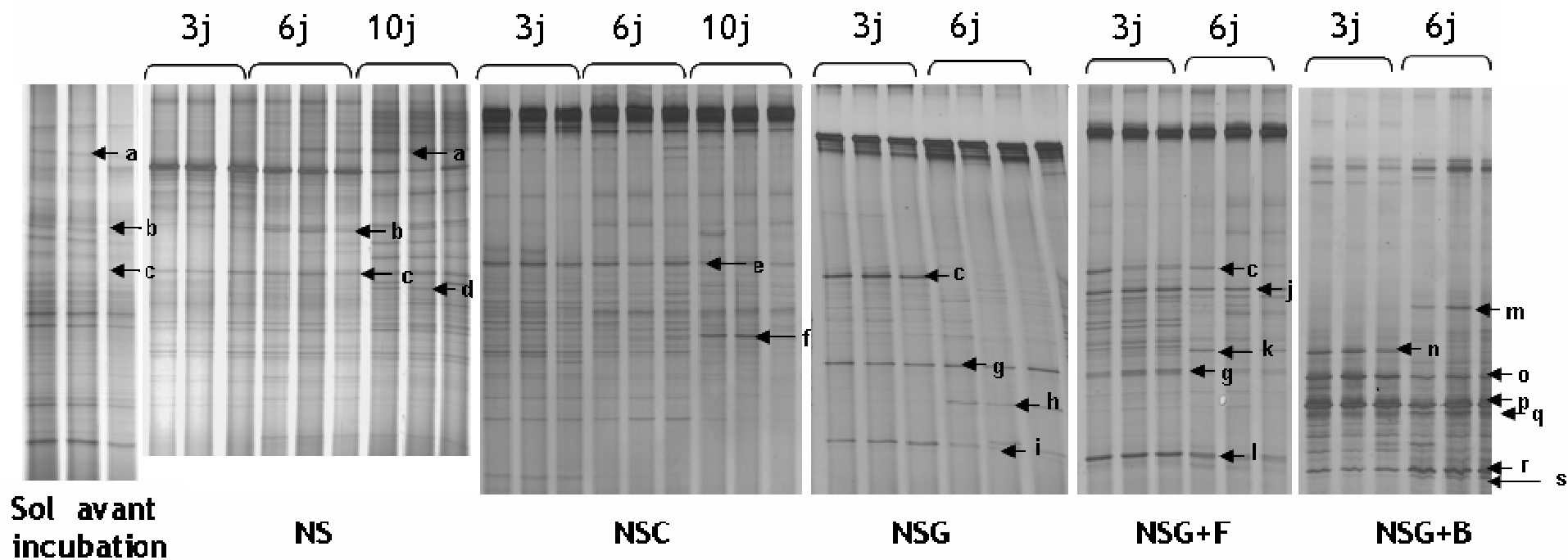


Figure 9 : Profils des fragments d'ADN bactérien 16S amplifié à partir du sol avant incubation, et après 3, 6 et 10 jours d'incubation pour toutes conditions, obtenus par DGGE. A chaque temps, 3 répliquats ont été amplifiés. Les flèches représentent les populations bactériennes remarquables.

Tableau 1 : Identification des populations bactériennes isolées par l'analyse de l'ADNr 16S. Les rapports entre parenthèse représentent le nombre de bases communes sur le nombre de bases utilisées, le fragment d'ADN amplifié complet comprenant 160 paires de bases.

		GeneBank	Bactéries cultivables
Condition	N°		
	bande		
NS	a	- Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone GASP-MB3W3_G10 (113/115)	- Flexibacter elegans (112/115)
		- Uncultured Sphingobacteriales cum 'Crenotrichaceae' bacterium clone GASP-MB3W2_C04 (113/115)	- Flexibacter japonensis (112/115) - Flexibacter filiformis (112/115)
	b	- Uncultured Sphingobacteria bacterium clone GASP-MA1W2_E09 (147/153)	- Algibacter gromivii (Flavobacteria) (123/132 et 19/19)
		- Algibacter gromivii strain KMM 6038 (Flavobacteria) (147/153)	
d	- Uncultured freshwater bacterium clone 965001H06.y1 (151/155)	- Prosthecobacter vanneervernii (Verrucomicrobiae) (150/151)	
	- Prosthecobacter FC2 (Verrucomicrobiae) (150/155)		
NSC	e f	Pas d'identification	
NSG	c	-Uncultured bacterium clone MA42_2003T8b_D12 (159/161)	- Flavobacterium johnsoniae (116/116 et 22/22)

		- Flavobacterium sp. WB 3.1-41 partial (158/161)	
	g	- Uncultured bacterium clone MA73_2004T8b_H11 (159/160)	- Flavobacterium pectinovorum (159/160)
	h	- Flavobacteriaceae bacterium JJ-1007 partial (158/159)	- Flavobacterium hercynium (154/155)
	i	- Uncultured Flavobacterium sp. clone Eur3.PT.3 (159/160) - Flavobacterium sp. PR11-2-7 (159/160)	- Flavobacterium pectinovorum (159/160)
NSG+F	c	- Uncultured bacterium clone MA72_2004T1d_E06 (158/161)	- Flavobacterium johnsoniae (116/116 et 36/39)
	j	- Uncultured Flavobacteriales bacterium clone MS011A1_A08 (152/155) - Flavobacterium sp. SB6 (152/155)	- Flavobacterium johnsoniae (73/73, 39/41 et 35/37)
	k	- Uncultured Flavobacteriales bacterium clone MS011A1_A08 (152/155) - Flavobacterium sp. SB6 (152/155)	- Flavobacterium johnsoniae (120/121 et 16/16)
	l	- Soil isolate KBS-EC3 (141/143) - Arthrobacter sp CN2 (137/138) - Micrococcus luteus strain B88 (137/138)	- Micrococcus xinjiangensis (87/87 et 50/50) - Arthrobacter boritolerans (87/87 et 50/50)
NSG+B	m	Pas d'identification	

n	- Paenibacillus sp. Ch-32 (158/159)	- Paenibacillus alikiterrae (113/114 et 44/44)
o	- Paenibacillus agaridevorans (158/159)	- Paenibacillus agaridevorans (114/114 et 44/44)
p	- Paenibacillus riograndensis (158/158) - Paenibacillus graminis (158/158)	- Paenibacillus graminis (158/158)
q	- Paenibacillus sp. X19 (158/158) - Paenibacillus graminis (157/158)	- Paenibacillus graminis (157/158)
r	- Paenibacillus sp. X19 (158/158) - Paenibacillus riograndensis (157/158) - Paenibacillus graminis (157/158)	- Paenibacillus graminis (157/158)
s	- Paenibacillus riograndensis (158/158) - Paenibacillus graminis (158/158)	- Paenibacillus graminis (158/158)

Les profils bactériens au 3^{ème} jour d'incubation (non présentés dans le chapitre précédent) montrent qu'il n'y a pas, ou peu, d'évolution dans la structure des communautés bactériennes entre 3 et 6 jours pour les conditions NS et NSC, alors que le profil évolue pour la condition NSG (Figure 9). L'identification des populations bactériennes (Tableau 1) a montré que des populations spécifiques se sont développées dans chaque condition. Les mêmes populations bactériennes, ou du même genre, sont généralement retrouvées pour les deux bases de données, ceci permettant de confirmer les résultats obtenus.

Pour la condition NS, nous pouvons noter que les bandes b et c sont présentes durant toute l'incubation alors que les bandes a et d n'augmentent d'intensité qu'au 6^{ème} et au 10^{ème} jour respectivement. Les bandes a et d semblent ne pas être présentes avant ces dates. Toutefois, il ne peut pas y avoir d'« apparition » de populations, les bandes étaient

certainement présentes avec des intensités trop faibles pour être détectées, et devaient correspondre à des populations minoritaires. Les populations des bandes a et b ont été identifiées comme faisant partie du phylum des *bacteroidetes*, ce phylum comptant trois classes (*Bacteroides*, *Flavobacteria* et *Sphingobacteria*). Les genres *Flexibacters* (a) et les *Algibacter* (b) identifiés font partie, respectivement des classes des *Sphingobacteria* et des *Flavobacteria*. Toutes ces populations bactériennes ont déjà été identifiées dans des échantillons environnementaux (sol, eau...). La bande d a été identifiée comme faisant partie du phylum des *Verrumicrobia*. Ce phylum représente une part importante de la microflore du sol (Pereira et al., 2006).

Dans la condition NSC, les bandes e et f représentent deux populations parmi les populations enrichies du système. La bande e est présente au 3^{ème} jour d'incubation et diminue en intensité au 10^{ème} jour, synonyme d'une diminution d'abondance, et la bande f augmente d'intensité au 10^{ème} jour. Il n'a malheureusement pas été possible d'identifier les populations bactériennes, à cause d'une superposition de plusieurs populations regroupées sous la même bande. Afin d'éviter ce type de problèmes (superposition de plusieurs populations, répartitions statistiques...), la technique du clonage-séquençage peut être utilisée. Cette technique permet de cloner les brins d'ADNr 16S un par un, puis de les séquencer après mise en culture. Néanmoins, cette technique, coûteuse en temps et matériellement, n'a pas pu être effectuée, compte tenu du nombre important d'échantillon.

Dans la condition NSG, les bandes c, g, h et i représentent les populations les plus enrichies du système. Une évolution cinétique est observée entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour d'incubation, identifiée principalement par une disparition la bande c et une augmentation d'intensité de la bande h. Toutes les populations bactériennes identifiées font partie du genre *Flavobacterium*. Nous pouvons donc conclure que, pour les bandes identifiées, le glucose a permis un enrichissement du genre *Flavobacterium* dans l'échantillon de terre étudié, alors que plusieurs genres sont présents dans la condition NS, sans traitement spécifique. Cette sélection du glucose a déjà été observée précédemment (Padmanabhan et al., 2003).

En comparant les conditions NSG et NSG+F, les bandes c et g sont communes aux deux conditions, alors que les bandes j, k et l ne sont présentes que dans la condition NSG+F. Les populations *Micrococcus* et *Arthrobacter*, identifiées dans la bande l sont des bactéries aérobies, faisant partie du phylum des *Actinobacteria* et retrouvées principalement dans les sols (Prescott et al., 2003). Les bandes j et k sont identifiées comme faisant également partie du genre *Flavobacterium* (phylum des *bacteroidete*). Tout comme dans la condition NSG, le glucose a donc permis à des bactéries du genre *Flavobacterium* de se développer

préférentiellement et l'antifongique a permis à d'autres populations bactériennes de se développer dans le milieu, certainement due à la levée de quelques compétiteurs fongiques (et/ou bactériens, en moindre mesure). La double identification de la bande c permet de confirmer qu'il s'agit de la même population bactérienne (*Flavobacterium johnsoniae*). Par ailleurs, nous pouvons également remarquer que la même population bactérienne est identifiée (*Flavobacterium johnsoniae*) sur deux bandes ne se trouvant pas à la même hauteur. Ceci est expliqué par le fait que certaines populations bactériennes ont dans leur ADN plusieurs opérons ribosomiques ayant une variabilité de séquence qui est mise en évidence sur les gels. Ainsi, la même population bactérienne peut être identifiée au niveau de plusieurs bandes situées à différentes hauteurs dans le gel.

Dans la condition NSG+B, des communautés bactériennes résistantes au bactéricide utilisé ont été mises en évidence, au travers des bandes m à s. Alors qu'au 6^{ème} jour d'incubation, les bandes n et o diminuent d'intensité, voire disparaissent pour la bande n, les bandes m, r et s s'intensifient. Tout comme pour les bandes e et f dans la condition NSC, l'identification de la bande m n'a pas été possible à cause de la superposition des populations. Toutes les populations identifiées, de la bande n à s, sont des *Paenibacillus* faisant partie du phylum des *Firmicutes* et de la classe des *Bacilles*. Ce sont des bactéries aérobies facultatives à Gram positif capable de sporuler et de produire de nombreuses exoenzymes ainsi que des antibiotiques. Nous pouvons donc supposer que ces populations appartenant au genre *Paenibacillus* ont été sélectionnées dans ce traitement en partie à cause de leur résistance à l'antibiotique utilisé (streptomycine).

La diversité bactérienne, de milieux naturels, intervenant dans la réduction du sélénium a été caractérisée dans deux études (Lucas et Hollibaugh, 2001 ; Siddique et al., 2006). Dans notre étude, aucune population bactérienne commune avec ces travaux n'a été identifiée. Toutefois, il est difficile de comparer nos études car dans les travaux publiés, la source de sélénium est le séléniate et les concentrations étudiées sont 10 et 100 fois plus importantes que celle utilisée dans notre étude (10^{-6} mol.L⁻¹). Le Se, à forte concentration, peut avoir exercé une forte pression de sélection sur les bactéries. De plus, contrairement à l'étude de Siddique et al. (2006), nous n'avons pas effectué d'analyses afin de vérifier la capacité des populations identifiées à réduire le sélénite et ou le séléniate. Par ailleurs, dans ces deux études d'importantes diversités génétiques ont été caractérisées, montrant ainsi qu'il existe un grand nombre de populations bactériennes capable de réduire le sélénium, et/ou

simplement résistantes au Se, en fonction du milieu, des sources de C disponibles, de la concentration en Se.

Pour conclure sur ces différentes analyses, tous les résultats obtenus ont confirmé la mise en place d'états microbiologiques différents dans les différentes conditions, quantitativement (Figure 5, Figure 6 et Figure 8) et qualitativement (Figure 3, Figure 9 et Tableau 1). Ces différents états sont les suivants :

- Aucune activité microbienne n'a été mise en évidence dans les conditions S et SG. La stérilité a été confirmée par (i) l'absence de production de CO₂, (ii) un pH stable, (iii) aucune croissance bactérienne lors de l'ensemencement sur boîte de pétri et (iv) l'absence de consommation de glucose pour la condition SG.
- La condition NS était caractérisée par un état microbiologique relativement stable. La biomasse (50 µg C/g sol sec) et l'activité respiratoire (3,9×10⁻⁵ mol/ jour), étaient inférieures à celles des autres conditions non stériles. Le compartiment fongique représentait en moyenne, en quantité de C, 70 % de la biomasse totale. La densité bactérienne, supérieure à celles généralement reportées dans la littérature, était en moyenne de 5,4×10⁹ cellules /g sol sec et les différentes populations bactériennes identifiées faisaient partie des phylums *Bacteroidetes* et *Verrumicrobia* ayant déjà été détectés dans des échantillons de sol, d'eau
- La condition NSC présentait une activité microbienne intermédiaire entre les conditions NS et NSG. L'apport de cellulose, a permis une production de CO₂ journalière régulière jusqu'à la fin de l'incubation (1,8×10⁻⁴ mol/jour), qui était 5 fois supérieure à celle de la condition NS, ainsi qu'une augmentation progressive de biomasse totale (390 µg C/g sol sec à 10 jours d'incubation). Contrairement à ce qui était attendu, la biomasse fongique est restée stable durant toute l'incubation et ne représentait plus, en quantité de C, que 9 % de la biomasse totale après 10 jours. Néanmoins, une biomasse fongique stable ne signifie pas que ce compartiment ait été inactif. Bien que les densités bactériennes aient été similaires à celles de la condition NS, les différences de profils observés sur gel de structure des communautés nous laissent supposer que les populations bactériennes étaient différentes dans ces deux conditions. Malheureusement, les populations bactériennes ciblées n'ont pas pu être identifiées.
- La condition NSG a présenté des activités microbiennes importantes dès le début de l'incubation et supérieures aux autres conditions non stériles, que ce soit la production de CO₂ (5,9×10⁻⁴ mol/jour) 16 fois supérieure à celle de la condition NS, la consommation de glucose, la dynamique de la biomasse totale multipliée par 4 dès le

- 3^{ème} jour. Compte tenu des similitudes entre les conditions NSG et NSG+F et du rapport biomasse fongique/biomasse totale (22% à 6 jours), nous pouvons supposer que les bactéries sont les microorganismes prédominants dans la condition NSG. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une sélection du genre bactérien *Flavobacterium* par le glucose.
- Dans la condition NSG+F, les différentes analyses ont montré une certaine efficacité de l'antifongique. Néanmoins, il n'est pas possible d'affirmer son efficacité totale, car nous mesurons une biomasse fongique non nulle mais, comme en condition stérile, il pouvait s'agir du maintien de l'ergostérol dans le milieu. Pendant les deux premiers jours, des différences ont été observées par rapport à la condition NSG pour toutes les analyses (production de CO₂, biomasse totale, consommation de glucose, densité bactérienne) ; elles montraient l'effet de l'antifongique sur les microorganismes du sol. Ces différences se sont rapidement effacées et les tendances sont devenues similaires à celles de la condition NSG à partir du 3^{ème} jour d'incubation. Tout comme dans la condition NSG, le glucose a permis au genre *Flavobacterium* de se développer préférentiellement. Le traitement antifongique a certainement permis à d'autres populations bactériennes de se développer dans le milieu.
 - Dans la condition NSG +B, l'antibactérien a été efficace au début de l'incubation (\leq à 3 jours) avec une forte augmentation du compartiment fongique ($\times 7$), facilitée par l'absence de certains compétiteurs bactériens. Toutefois, l'antibactérien n'a pas été efficace à 100% car des populations bactériennes du genre *Paenibacillus*, résistantes à l'antibiotique, se sont développées dans le système et la biomasse bactérienne représente 60 % de la biomasse totale au 6^{ème} jour de l'incubation.

Par conséquent, nous pouvons ainsi accéder à l'impact de ces différents états microbiologiques sur la distribution du Se entre les phases gazeuse, liquide et solide dans le sol, en fonction du temps.

1.4 Le sélénium

Dans ce paragraphe, nous présentons les résultats relatifs à la distribution du Se entre les phases gazeuse, liquide et solide.

1.4.1 Le Se en phase gazeuse

Nous présentons ici (Figure 10), les cinétiques de volatilisation de Se. Ces résultats complémentaires montrent des cinétiques différentes pour chaque condition. A cause de la forte solubilité du DMSe, Zhang and Frankenberger Jr (1999) supposent qu'environ 96 % du Se volatil est piégé dans la phase aqueuse d'un système ennoyé. Dans nos conditions expérimentales, nous pouvons supposer que la quantité de Se volatilisé est sous-estimée, mais nous avons tenté de limiter cette sous-estimation par la remise en équilibre des compartiments dissous et gazeux (*via* l'agitation), toutes les 10 min durant la purge atmosphérique des batch.

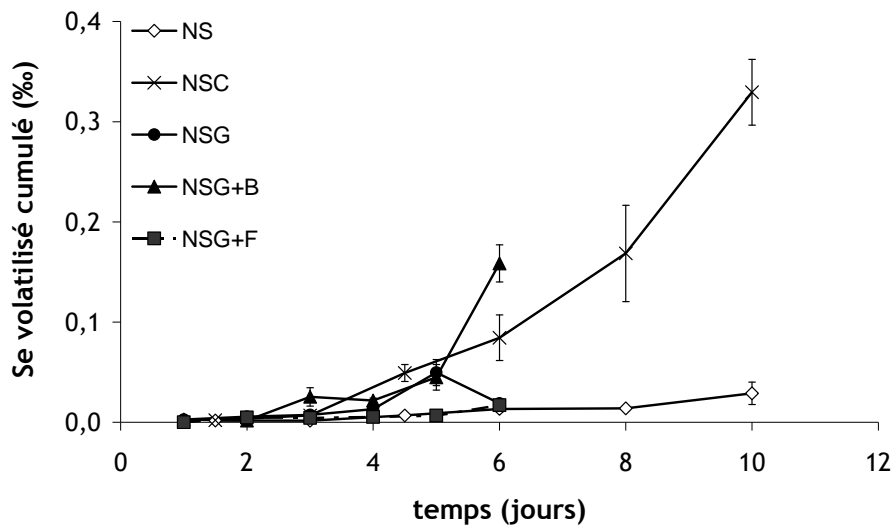


Figure 10: Cinétique des quantités cumulées de sélénium volatilisé (exprimée en ‰ du Se introduit dans le batch). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Aucune volatilisation n'a été détectée dans les conditions stériles (S et SG). Ces résultats confirment que la volatilisation du Se est un processus biotique. Dans toutes les conditions non stériles, la volatilisation cumulée mesurée de Se était comprise entre 0,002 ‰ (correspondant à $7,3 \times 10^{-4} \mu\text{g Se.kg}^{-1} \text{sol}$) après 1,5 jours d'incubation et 0,3 ‰ de Se volatil cumulé après 10 jours d'incubation (correspondant à $1,3 \times 10^{-1} \mu\text{g Se.kg}^{-1} \text{sol}$). Les faibles valeurs de volatilisation sont cohérentes avec la faible biomasse totale (Figure 5). Pour la

condition NS, la production de Se volatil n'était pas constante dans le temps. Elle prenait pour valeur moyenne 0,003 ‰ /jour entre 3 et 8 jours, puis augmentait à 0,007 ‰ /jour entre 8 et 10 jours. Des études précédentes (Karlson et Frankenberger Jr, 1988 ; Calderone et al., 1990) ont montré qu'un amendement organique permettait d'augmenter la volatilisation du Se. Ainsi, nous nous attendions à une volatilisation plus importante dans les conditions amendées, NSG et NSC, par rapport à la condition NS et à une volatilisation maximale dans la condition NSG qui favorisait le plus les activités microbiennes. Dans la condition NSG, la quantité de Se volatilisée a bien été supérieure à celle de la condition NS, mais elle était inférieure à celle de la condition NSC. De plus, dans la condition NSG, la quantité de Se volatil mesurée à 5 jours (0,05 ‰) est supérieure à la quantité mesurée à 6 jour (0,02 ‰). Ce résultat aberrant pourrait s'expliquer par l'inversion des données entre 5 et 6 jours. Dans la condition NSC, alors que la quantité de Se volatil est identique à la condition NSG après 3 jours d'incubation, elle augmente brusquement à partir de 4,5 jours et atteint 0,3 ‰ au 10^{ème} jour. Dans le chapitre précédent, nous avons fait l'hypothèse que la volatilisation était un processus exclusivement microbien (bactéries et/ou champignons). Nous avons d'abord supposé que le compartiment fongique pouvait avoir augmenté après l'apport de cellulose (Hu et Van Bruggen, 1997) et que ce pool microbien serait responsable de la volatilisation du Se (Abu-Erreish et al., 1968). L'hypothèse d'une augmentation du pool fongique avec l'apport de cellulose n'a pas été confirmée par l'expérience. De plus, l'ajout du fongicide (condition NSG+F) n'a pas affecté la quantité de Se volatilisée (en comparaison à la condition NSG). Toutefois, dans la condition NSG+B après 6 jours d'incubation, la biomasse fongique était multipliée par 7 et la quantité de Se volatilisée était 9 fois plus importante que dans la condition NSG et 2 fois plus importante que dans la condition NSC. Ce résultat est opposé à certains résultats trouvés dans la littérature où les auteurs notent une plus forte volatilisation du Se dans les expériences avec antifongique (Zieve et Peterson, 1981 ; Thompson-Eagle et Frankenberger Jr, 1991 ; Azaizeh et al., 1997). Au contraire, Abu-Erreish (1968) supposait que les champignons étaient les principaux acteurs de la volatilisation du Se. L'expérimentation avec antibactérien (NSG+B) montre l'importance du compartiment fongique dans les processus de volatilisation du Se pour notre sol d'étude.

La littérature assimile souvent, la volatilisation à un processus de détoxification (Zhang et Frankenberger Jr, 1999). Nos résultats vont à l'encontre de cette interprétation, car la concentration en Se utilisée dans notre étude (400 µg.kg⁻¹ sol sec) est non toxique pour les microorganismes (Dungan et Frankenberger Jr., 2000).

1.4.2 Le Se en phase liquide

Dans la condition S, un équilibre apparent atteint dès la première heure d'incubation (50 ± 1 % de Se total en solution) (Figure 11). Les résultats obtenus dans la condition SG confirment également cet équilibre rapide (46 ± 1 % de Se retenu à une heure). Ainsi, les interactions abiotiques entre le Se et les particules du sol (organiques et minérales) sont rapides (≤ 1 heure) et conduisent à un équilibre d'environ 50 % du Se retenu en phase solide.

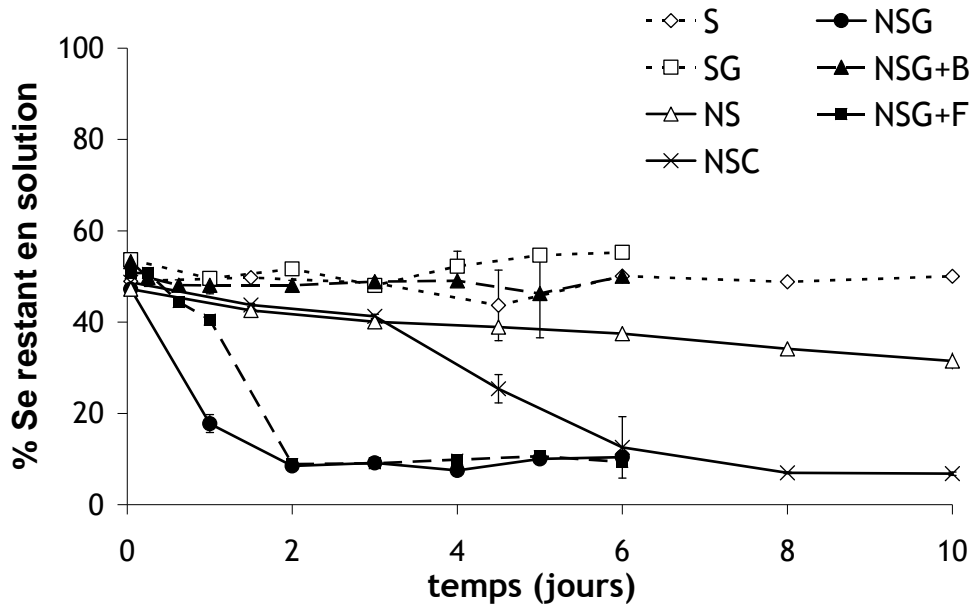


Figure 11 : Evolution du pourcentage Se total (non filtré) restant en solution en fonction du temps - Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Pour les conditions non stériles, la quantité de Se retenue par le sol augmente dans le temps, avec des cinétiques dépendant de l'ajout ou non d'un amendement carboné et du type d'amendement. Pour la condition NS où les microorganismes ne sont pas stimulés par un apport carboné, une cinétique de rétention relativement lente est observée, avec une diminution de 15 % du Se en solution entre 1h et 10 jours d'incubation. Pour la condition NSG, l'augmentation de Se retenu par la phase solide est la plus rapide, et l'équilibre entre phase liquide et solide est atteint après 2 jours d'incubation, 5 % du Se restant en solution. Dans la condition NSC, une double cinétique de disparition du Se est observée : entre 1 et 3 jours, une cinétique de disparition lente (environ 2%/ jour), similaire à celle de la condition NS, puis entre 3 et 6 jours d'incubation une accélération brutale de la disparition du Se (-30 %). La durée d'incubation de 10 jours permet de confirmer qu'un équilibre apparent entre la phase solide et la phase liquide a bien été atteint après 6 jours d'incubation (cf annexe I). Dans

l'article (annexe I), nous avons supposé que la double cinétique pouvait être expliquée par la succession de différentes populations microbiennes, bactériennes puis fongiques, intervenant dans la dégradation de la cellulose (Hu et Van Bruggen, 1997 ; Schutter et Dick, 2001). Néanmoins, le compartiment fongique ne semble pas être à l'origine de l'augmentation de rétention du Se sur la phase solide. En effet, dans la condition NSG+B, l'augmentation du compartiment fongique n'a pas induit d'augmentation de la rétention du Se. Les résultats sont identiques à ceux de la condition S. Dans cette condition et contrairement à la condition NSG, l'augmentation de la biomasse bactérienne, au delà du 3^{ème} jour d'incubation, n'a pas augmenté la rétention du Se. Dans la condition NSG+F, le comportement du Se est identique à celui de la condition NSG, mais, tout comme pour les activités bactériennes, un retard de 2 jours est observé : 40 ± 1 % du Se était toujours présent en phase liquide dans cette condition, alors qu'il ne restait seulement que 17 ± 1 % dans la condition NSG. Ainsi, la quantité et la nature des bactéries ont une importance dans la rétention du Se : toutes les populations bactériennes n'induisent pas systématiquement une augmentation de la rétention du Se, comme par exemple dans la condition NSG+B.

En complément de ces résultats, nous présentons le pourcentage de Se présent en phase liquide après filtration de la solution à $0,22 \mu\text{m}$ (Figure 12).

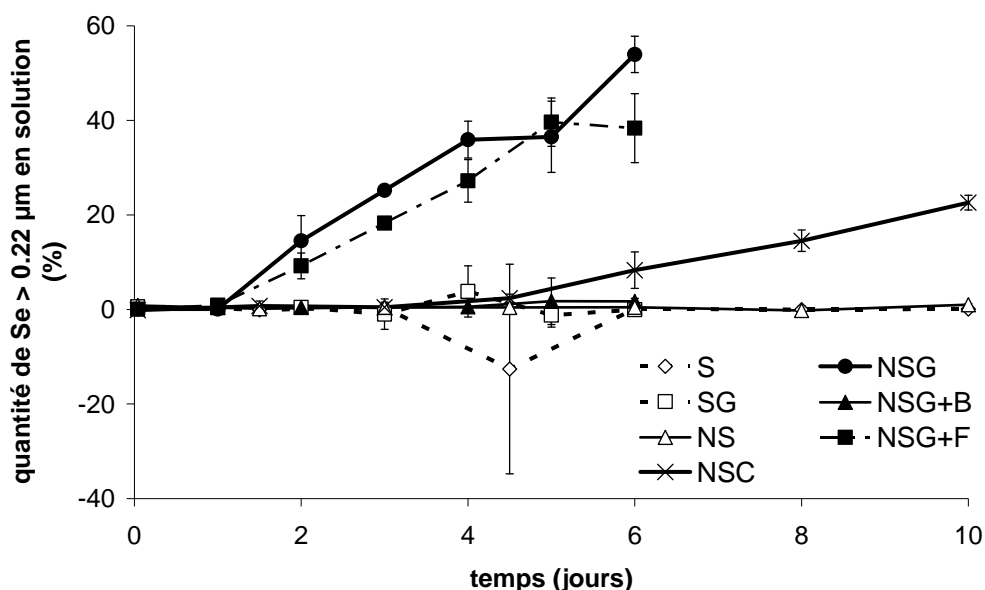


Figure 12: Quantité de Se > 0,22 µm dans le surnageant du batch, exprimée en pourcentage du Se total dans le surnageant. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Dans les conditions stériles (S et SG) et non stérile non amendée (NS) ou avec antibactérien (NSG+B), il n'y a pas de Se colloïdal immobilisé sur des particules supérieures

à 0,22 μm dans le surnageant des batch durant toute l'incubation. Dans la condition NSG+B, les populations bactériennes résistantes à l'antibiotique (*Paenibacillus*) semblent n'avoir eu aucun effet sur le Se, contrairement aux populations bactériennes du genre *Flavobacterium* qui se sont développées dans les conditions avec amendement glucose. Dans les autres conditions, NSC, NSG et NSG+F, les activités bactériennes ont permis la formation de Se colloïdal ($> 0.22 \mu\text{m}$) dans les surnageants des batchs. Pour la condition NSC, nous avons supposé dans l'article (annexe I) qu'il n'y avait pas de Se colloïdal, la quantité mesurée à 6 jours étant faible (8 %). Or après 10 jours, cette quantité représente 23 % du Se initialement en solution. Nous pouvons noter que c'est dans ces trois conditions que le compartiment bactérien s'est initialement développé au détriment du compartiment fongique. Nous pouvons alors envisager que le Se retrouvé dans la fraction supérieure à 0,22 μm se trouve soit sous formes de granules de Se(0), soit incorporé dans les microorganismes. Nous savons que le Se peut être réduit en Se(0) par les bactéries même en condition oxygène. Ces granules peuvent être localisés à l'intérieur et/ou à la surface des cellules bactériennes (Garbisu et al., 1996) et/ou dans le milieu de culture (Garbisu et al., 1996 ; Oremland et al., 2004). Dans ces deux cas, le Se se retrouve dans la fraction colloïdale filtrée à 0,22 μm car les bactéries ne passent pas la barrière des filtres de 0,22 μm (seuil de stérilité par définition) et les granules de Se(0) mesurent en moyenne 0,3 μm (Oremland et al., 2004). Malheureusement, la concentration de Se utilisée dans cette étude est trop faible pour permettre l'utilisation de techniques microscopiques (MET, MEB)³ ou spectroscopiques (XAS)⁴ pour vérifier la présence de granules de Se(0).

Ainsi, nous pouvons conclure que les bactéries sont responsables de cette fraction colloïdale. Le Se colloïdal se trouve dans la phase aqueuse, et peut, à ce titre être transporté avec la phase liquide lorsque les conditions le permettent (type d'écoulement, géométrie du milieu poreux ...). Par ailleurs, le Se(0), insoluble, est considéré comme la forme la moins toxique du Se (Garbisu et al., 1996), mais l'oxydation du Se(0) sous formes oxydées (Se(IV) et Se(VI)), toxique, est possible. Malgré des processus d'oxydation plus lents que ceux de la réduction (Jayaweera et Biggar, 1996) et une oxydation du Se(0) en Se(IV) par les microorganismes très peu étudiée (Sarathchandra et Watkinson, 1981 ; Losi et Frankenberger Jr, 1998), la voie de transport colloïdal (sous forme de Se(0)) n'est cependant pas à négliger, ainsi que le transport *via* la cellule microbienne (sous forme de Se(IV)).

³ MET : Microscopie Electronique à Transmission - MEB : Microscopie Electronique à Balayage,

⁴ XAS : X-ray Absorption Spectroscopy

Nous avons également mesuré le sélénite (Se(IV)) présent dans la fraction dissoute ($< 0,22 \mu\text{m}$). L'évolution de la concentration en sélénite en fonction du temps, exprimée en pourcentage du Se dissous, est présentée Figure 13. Les mesures du Se(IV) n'ont pas été effectuées pour les conditions NSG+F et NSG+B.

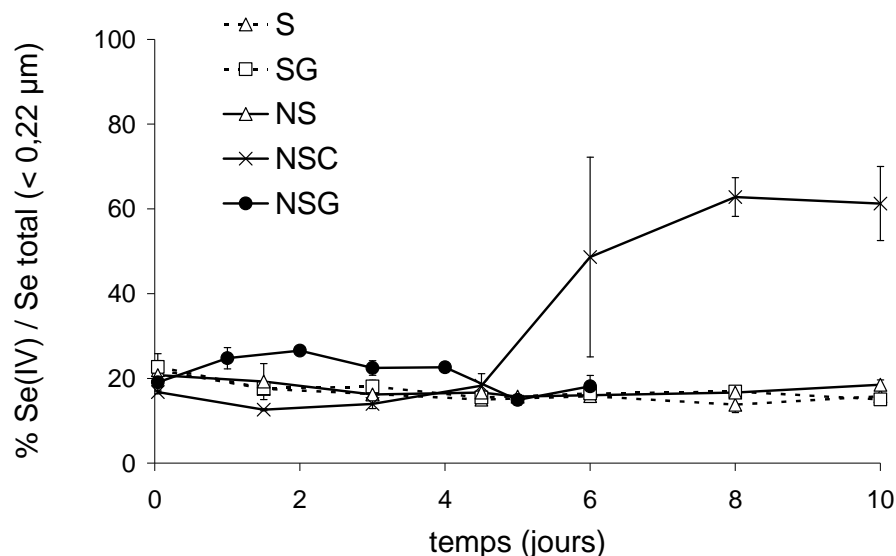


Figure 13 : Evolution du sélénite (Se(IV)) présent en phase dissoute, exprimé en pourcentage du sélénium total dissous, mesuré via le ^{75}Se . Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Pour toutes les conditions, dès la première heure d'incubation, le Se(IV) ne représente que 20 % du Se mesuré. Ce pourcentage est resté constant durant toute l'incubation, excepté pour la condition NSC. Dans cette dernière, à partir du 6^{ème} jour, la proportion de Se(IV) augmente puis se stabilise à 62 % au 8^{ème} jour de l'incubation.

Dans nos conditions expérimentales, la présence d' O_2 exclut une réduction abiotique et la faible durée d'incubation (≤ 1 heure) exclut une oxydation abiotique en Se(VI), les processus d'oxydation étant plus lents que les processus de réduction (Jayaweera et Biggar, 1996). Dans les échantillons naturels, des interférences, causées par des composés organiques dissous avec la méthode de dosage utilisée ont été constatées, engendrant ainsi une sous-estimation de la quantité de Se(IV) (Roden et Tallman, 1982 ; Séby, 1994). Ainsi, en accord avec Février et al. (2007), qui ont également constaté une perte rapide de sélénite (-70 %) dès la mise en contact avec la phase solide, l'explication d'une interaction entre les composés organiques dissous et le sélénite semble l'hypothèse la plus probable. Ainsi, il existe dans la fraction dissoute, du Se(IV) « libre » (20 %) et des espèces séléniées (Se(IV)), autre que du Se(IV) « libre » (80 %).

Afin d'expliquer l'augmentation du pourcentage de Se(IV) dans la fraction dissoute, nous présentons l'évolution du pourcentage de Se(IV) dissous en fonction du Se initialement mis en solution et l'évolution du pourcentage de Se total dissous en fonction du Se initialement mis en solution (Figure 14).

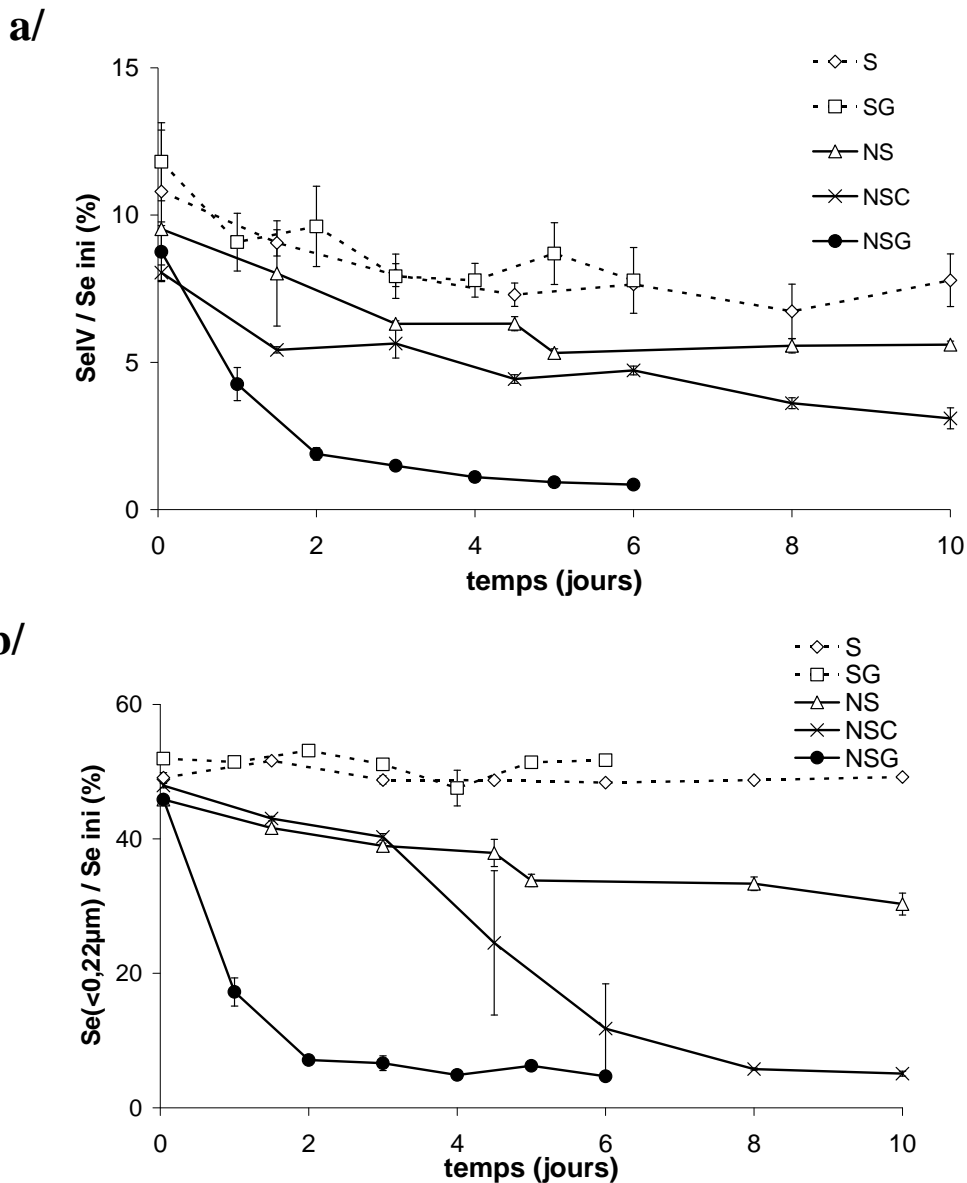


Figure 14 : Evolution cinétique des concentrations relatives en pourcentage de (a) Se(IV) et (b) Se total dissous (<0,22 μm). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type. Se ini : Concentration initiale en Se dans le surnageant du batch.

Dans toutes les conditions, exceptée la condition NSC, les évolutions relatives cinétiques des concentrations en Se(IV) et Se total (<0,22 μm) sont similaires. Pour la condition NSC, alors que la concentration en sélénite diminue faiblement (- 5 %), la diminution de la concentration en Se dissous total est beaucoup plus importante (- 43 %). Ainsi, l'augmentation du ratio Se(IV)/Se total observée Figure 13 est due, non pas à une augmentation de la quantité de sélénite, mais à une diminution du Se dissous total. Cette diminution est liée à une

immobilisation d'espèces sélénées solubles autre que le Se(IV) « libre ». Le même type de résultat a été observé par Février et al. (2007), mais avec un sol brut, sans amendement. Ces auteurs proposaient alors deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : (i) une interaction directe entre les microorganismes et les espèces sélénées solubles autre que le Se(IV) « libre », comme l'assimilation et/ou la réduction biotique de ces espèces en Se(0), et/ou (ii) une transformation de ces espèces due aux changements physico-chimiques en solution induits par les microorganismes, suivi de leur immobilisation abiotique ou biotique. La première hypothèse permet d'expliquer la diminution du Se dissous total ; en effet, nous avons mis en évidence une réaction directe entre le Se et les bactéries engendrant la formation de Se dans la fraction supérieure à 0,22 μm (Figure 12). Toutefois, le faible pourcentage de Se supérieur à 0,22 μm mesuré dans la condition NSC par rapport aux autres conditions (NSG et NSG+F) laisse supposer que l'assimilation et/ou la réduction biotique n'est pas le processus majoritaire pour expliquer la diminution du ratio Se(IV)/Se total. La seconde hypothèse (immobilisation du Se découlant des changements physico-chimiques en solution) semble plus probable ; en effet, dans cette condition, nous avons observé une augmentation de la rétention du Se sur la phase solide à partir du 3^{ème} jour d'incubation, coïncidant avec la diminution de la concentration en Se dissous total.

1.4.3 Le Se en phase solide

Les évolutions cinétiques de la répartition solide du Se dans le sol pour toutes les conditions sont présentées Figure 15. Les résultats sont normalisés en pourcentage du Se retenu dans la phase solide.

La distribution en phase solide du Se dans l'échantillon de terre est obtenue en réalisant des extractions séquentielles selon le protocole de Coppin et al. (2006) modifié. Brièvement, 3 étapes font intervenir des extractants dont la force est croissante de façon à cibler les fractions de Se retenues dans le sol de plus en plus « fortement ».

- La fraction 1, extraite avec K_2HPO_4 , représente a priori le Se(IV) adsorbé à la surface des minéraux et/ou des composés organiques ;
- la fraction 2, extraite avec NaOH, représente le Se lié à la matière organique et/ou aux oxydes de fer, indépendamment de son degré d'oxydo-réduction,
- la fraction 3, extraite avec Na_2SO_3 , représente le Se élémentaire Se(0), et
- la fraction 4 représente le Se résiduel, restant dans le sol à la suite des 3 extractions.

Par rapport au protocole de Coppin et al. (2006), nous n'avons effectué ni l'extraction avec CaCl_2 supposée donner accès au Se soluble, ni l'extraction avec NaOCl ciblant le Se associé

aux composés organiques réfractaires. Généralement, la fraction "Se soluble" (extraction avec de l'eau ou un sel comme CaCl_2 ou KCl) extrait majoritairement du séléniate (Martens et Suarez, 1997 ; Wright et al., 2003). Dans notre étude, le Se est injecté sous forme de sélénite. De plus, un potentiel d'oxydo-réduction de 350 mV, un pH moyen inférieur à 7 et des temps d'incubation courts (de 1 h à 10 j) rendent une oxydation en séléniate très peu probable (Masscheleyn et al., 1990). Par ailleurs, le Se associé aux composés organiques réfractaires se retrouve dans la fraction 4 de notre protocole (Se résiduel).

Les extractions chimiques séquentielles ou parallèles sont souvent critiquées pour leur manque de sensibilité, et surtout leur manque de sélectivité (Wright et al., 2003). En conséquence, les quantités de Se extraites doivent être interprétées avec prudence. Néanmoins malgré les différents artefacts, les extractions chimiques restent un bon outil pour estimer en routine la distribution solide du Se au laboratoire, surtout pour de telles concentrations, trop faibles pour utiliser des outils microscopiques (MET, MEB) ou spectroscopiques (EXAFS)...

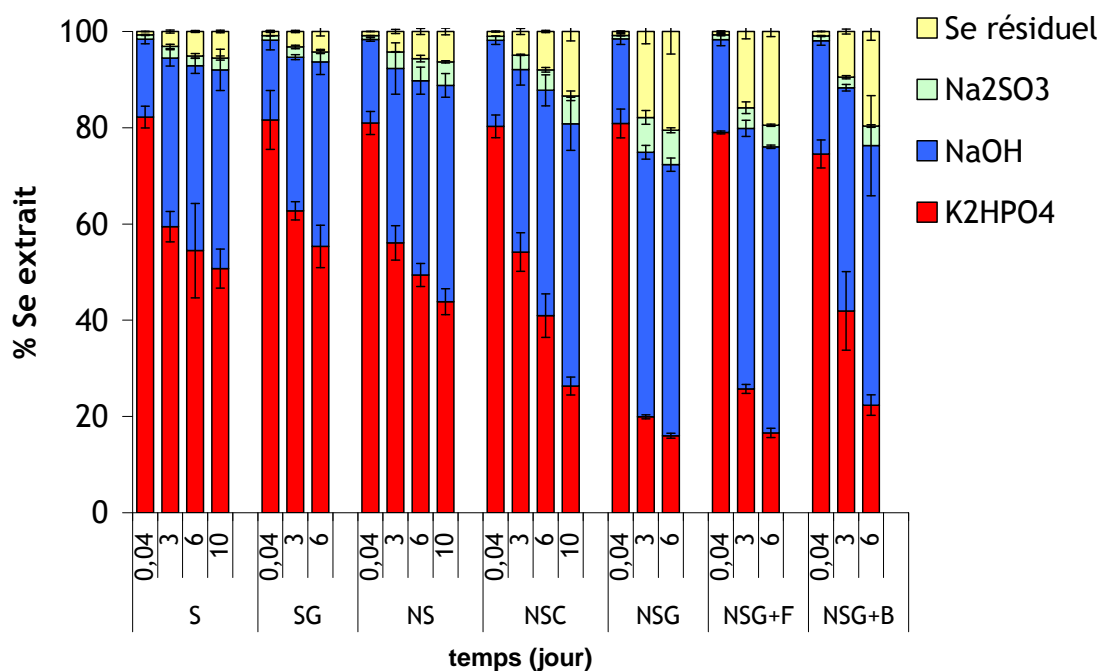


Figure 15 : Evolution dans le temps de la répartition solide du Se pour toutes les conditions. Moyenne des trois réplicas, exprimé en % du Se retenu en phase solide \pm 1 écart-type.

La répartition solide du Se, après 1 h d'incubation, est identique dans toutes les conditions, stériles et non stériles, excepté pour la condition NSG+B. Le sélénium se retrouve principalement dans la fraction extraite à K_2HPO_4 (81 %) et dans la fraction extraite avec NaOH (16 %). Les pourcentages de Se élémentaire et résiduel sont négligeables (< 1%). Alors que les mécanismes de rétention rapide (≤ 1 heure) sont supposés être de l'adsorption de surface (Duc et al., 2006), seulement 81 % du Se est retrouvé dans la fraction échangeable avec les phosphates. Ce résultat peut être attribué à un manque d'efficacité de l'extraction aux phosphates (une seule étape, non répétée). En effet, Wright et al. (2003) ont montré que l'extraction aux phosphates ne remet en solution qu'une partie du Se(IV) adsorbé et que l'efficacité est augmentée lorsque le protocole est répété plusieurs fois.

Dans les conditions stériles (S et SG), alors que l'équilibre entre les phases solide et liquide est atteint, une redistribution abiotique entre les différentes phases solides est observée. Cette redistribution est caractérisée principalement par une diminution de la fraction extraite à K_2HPO_4 au profit des 3 autres fractions. Les études cinétiques complètes de la distribution du Se en phase solide dans les conditions stériles montrent que cette redistribution est progressive dans le temps et qu'elle se stabilise à partir du 6^{ème} jour d'incubation. A 10 jours d'incubation, le Se est retrouvé principalement dans les fractions extraites par K_2HPO_4 (51 %) et par NaOH (41 %). Le sélénium élémentaire et le Se résiduel augmentent et représentent respectivement 2 % et 5 %. L'évolution cinétique de la distribution solide nous permet de supposer que la rétention abiotique du Se dans ce sol est un mécanisme en deux temps. Dans un premier temps, le Se est majoritairement adsorbé sur les particules du sol tels que les oxydes de Fe ou la matière organique (correspondant au 81 % de Se extrait avec K_2HPO_4 après 1 h d'incubation), la fraction adsorbée évoluant ensuite vers une forme plus fortement liée avec les particules de sol par la formation d'un complexe non échangeable avec les phosphates. En outre, les cinétiques d'évolutions et les quantités de Se extrait par les différents d'extractants sont identiques dans les deux conditions stériles (S et SG) ; dans ces conditions, le glucose ne modifie pas les interactions entre le Se et la phase solide. Par ailleurs, le pourcentage non nul de Se extrait à Na_2SO_3 , supposé être du Se élémentaire, est étonnant : la stérilité exclut une réduction biotique et les conditions oxydantes ne sont pas en faveur d'une réduction abiotique, bien qu'elle ne puisse pas totalement être exclue. Aussi, il est probable que le Se extrait à Na_2SO_3 ne soit pas du Se élémentaire, mais un résidu de l'étape précédente (Ponce De Leon et al., 2003), ou encore des séléniures organiques (Wright et al., 2003 ; Chen et al., 2006).

Les cinétiques pour les conditions non stériles montrent que la distribution solide du Se évolue également en fonction du temps, mais avec une plus grande amplitude et plus rapidement que dans les conditions stériles. Dans la condition NS, la redistribution en phase solide est progressive dans le temps. Après 10 jours d'incubation, le Se est retrouvé en quantité équivalente dans la fraction extraite par K_2HPO_4 et dans la fraction extraite à NaOH (environ 45 %). Le sélénium élémentaire et le Se résiduel augmentent et représentent respectivement 5 % et 6 %. Dans la condition NSC, la distribution évolue qualitativement de manière similaire à la condition NS (diminution de la fraction par K_2HPO_4 au profit des autres fractions), mais plus rapidement et avec une plus grande amplitude. A 10 jours d'incubation, le Se est retrouvé majoritairement dans la fraction extraite par NaOH (55 %). Le sélénium élémentaire et le Se résiduel augmentent et représentent respectivement 6 et 13 %. Dans la condition NSG, l'évolution du Se dans la phase solide est la plus rapide ; l'équilibre semble être atteint vers le 3^{ème} jour d'incubation. Le sélénium est retrouvé principalement dans la fraction extraite avec NaOH (56 %) et dans la fraction de sélénium résiduel (20 %). De plus, c'est dans cette condition que nous retrouvons la plus importante quantité de Se élémentaire (7 %). Dans la condition NSG+F, un retard par rapport à la condition NSG est observé à 3 jours d'incubation. Après 6 jours d'incubation, la distribution solide est quasiment identique. Le retard observé à 3 jours d'incubation est cohérent avec les résultats observés précédemment (activités microbiennes et cinétique de disparition du Se en phase liquide). Dans la condition NSG+B après 1 h d'incubation, la répartition du Se en phase solide est légèrement différente des autres conditions. Le sélénium se retrouve en quantité moindre dans la fraction extraite à K_2HPO_4 (75 % au lieu de 80 %) et un peu plus importante dans la fraction extraite avec NaOH (24 % au lieu de 17 %). Néanmoins, compte tenu des incertitudes, ces différences ne sont pas suffisamment importantes pour être significatives. Par ailleurs, alors que la quantité de Se en solution ne diminue pas durant la durée de l'incubation (Figure 11) (comme pour les conditions stériles), la redistribution du Se en phase solide est plus importante que la redistribution abiotique des conditions stériles. Après 6 jours d'incubation, la répartition solide du Se est quasiment identique à la condition NSG+F. D'après les analyses microbiologiques, nous avons montré que l'antibactérien n'était efficace que pour les deux premiers jours de l'incubation et que des populations bactériennes (*Paenibacillus*) s'étaient développés par la suite. Alors que ces populations bactériennes ne semblent pas avoir d'effet sur la rétention du Se (Figure 11), elles contribuent à la redistribution du Se en phase solide, comme le montrent ces résultats (Figure 15).

Dans toutes conditions, une importante quantité de Se résiduel est retrouvée (de 5 à 20 %). Dans notre protocole expérimental, nous n'avons pas effectué l'extraction à NaOCl, théoriquement effectuée en dernier. Cette extraction doit principalement solubiliser le sélénium associé à la matière organique réfractaire, difficilement attaquable et contenant en partie les humines. Nous retrouvons ainsi ce pool dans la fraction « Se résiduel ». Par ailleurs, c'est plus particulièrement dans les conditions NSG, NSG+F et NSG+B, que nous retrouvons les quantités les plus importantes (20 %). Nous pouvons supposer que la dégradation du glucose par les microorganismes a engendré une augmentation de cette matière organique réfractaire à laquelle s'est associé le Se.

Nous confirmons ainsi que les microorganismes du sol stabilisent la rétention du Se en phase solide. Les bactéries provoquent des redistributions rapides entre pools de Se en phase solide, aboutissant à une rétention plus forte du Se immobilisé. De plus, nous pouvons également conclure que la présence de Se élémentaire, représenté par la fraction extraite à Na_2SO_3 , résulte essentiellement d'une réduction biotique.

1.4.5 Le Se lié à la biomasse

Le sélénium lié à la biomasse est présenté Figure 16, pour toutes les conditions (excepté les conditions stériles) après 3, 6 et 10 jours d'incubation.

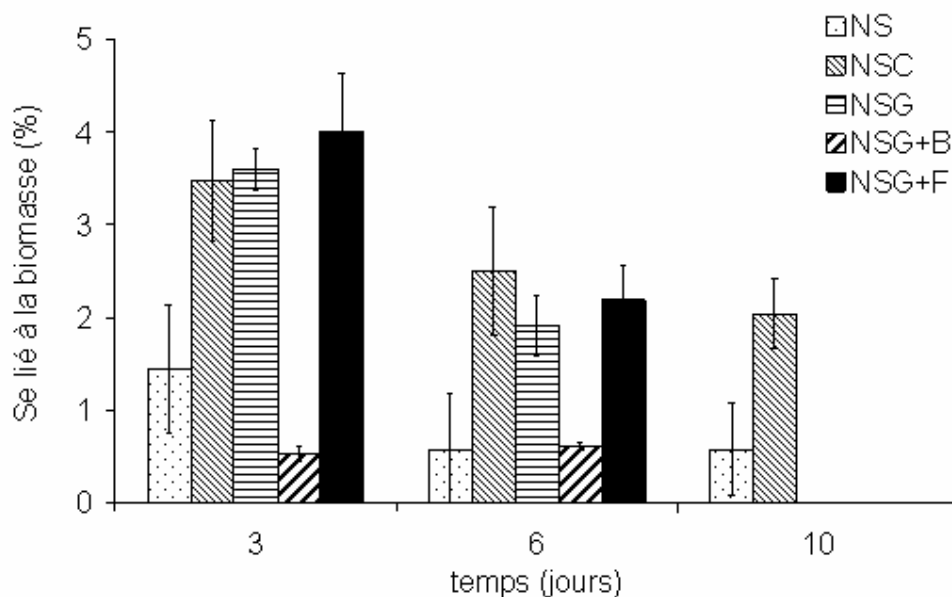


Figure 16 : Sélénium lié à la biomasse, exprimé en pourcentage du Se total mis en solution. Moyenne des trois réplicats \pm 1 écart-type.

Dans la condition NS, après 3 jours d'incubation le Se lié à la biomasse représente 1,5 % du Se initialement mis en solution. Cette quantité diminue et ne représente plus que 0,5 % après 6 et 10 j d'incubation. Pour les conditions NSC, NSG et NSG+F, le Se lié à la biomasse représente environ 3,5 % du Se initialement mis en solution après 3 jours d'incubation. Cette quantité diminue à environ 2 % après 6 jours et 10 jours d'incubation pour la condition NSC. Dans la condition NSG+B, le Se lié à la biomasse ne représente que 0,5 % du Se initial après 3 et 6 jours d'incubation. Nous pouvons supposer qu'il existe des interactions directes entre le Se et les bactéries, plutôt qu'avec les champignons. En effet, c'est dans la condition NSG+B, où il y a peu de bactéries en début d'incubation, que nous retrouvons la plus faible quantité de Se lié à la biomasse. Aucune relation entre la quantité de biomasse et le Se lié à cette biomasse n'a pu être mise en évidence. Ceci est certainement dû au fait que les biomasses sont radicalement différentes dans les conditions expérimentales. Nous pouvons ainsi conclure que la qualité de la biomasse a une plus grande importance que la quantité en ce qui concerne les interactions directes entre Se et microorganismes. De plus, dans les 3 conditions NSC, NSG et NSG+F, la quantité de Se lié à la biomasse diminue avec le temps alors que le Se colloïdal (Figure 12) ainsi que le Se(0) quantifié par les extractions séquentielles (Figure 15) augmentent. Nous pouvons alors supposer que le Se lié aux bactéries est réduit en Se(0), qu'il peut être ensuite (i) expulsé de la cellule bactérienne suite à la lyse des cellules bactériennes ou *via* des processus d'expulsion (Garbisu et al., 1996 ; Losi et Frankenberger Jr, 1998) et se retrouver ainsi dans la fraction liquide Se colloïdal et donc potentiellement mobile mais également en partie se retrouver dans la phase solide et donc beaucoup moins mobile.

2. Conclusion

Nous voulions obtenir différents états microbiologiques et différencier ces différents états par un jeu de données complémentaires sur les dynamiques microbiennes. Nous avons pu montrer (i) le développement préférentiel des compartiments fongique ou bactérien grâce à des mesures de biomasse totale et de biomasse fongique, (ii) l'inefficacité de l'antibactérien au-delà de 2 jours, grâce aux dénombrements bactériens, (iii) confirmer des différences de structure des communautés bactériennes avec la DGGE.

Nous avons suivi le devenir de sélénite dans le sol en fonction de ces différents états microbiologiques. Ce complément d'étude a confirmé que la rétention du Se dans un sol en condition oxygène résulte d'un ensemble de processus abiotiques et biotiques. Les processus abiotiques contribuent, majoritairement et rapidement, à la rétention du Se sur la phase solide

(> 50 % de rétention dès 1 h d'incubation) principalement suite à des adsorptions. Mais il existe une redistribution abiotique en phase solide (en faveur d'une plus forte rétention) qui se stabilise en quelques jours. Cela se traduit par une diminution de la fraction échangeable au profit des autres fractions. La fraction extraite à K_2HPO_4 représente, initialement, 81 % du Se retenu en phase solide et diminue à 50 %.

L'impact direct et/ou indirect des microorganismes sur le Se n'est observable que pour des temps d'incubation supérieurs à 1 h. On observe ainsi de la volatilisation de Se, une augmentation de la quantité de Se retenue dans le sol et de la force de cette rétention. Les cinétiques de ces réactions sont dépendantes des microorganismes présents (bactéries et champignons) ainsi que de leurs activités. Même sans stimulation par un amendement organique, la mobilité du Se dans un sol diminue par rapport à une condition stérile. Cette mobilité réduite est caractérisée par une augmentation faible, mais continue (i) de la quantité de Se retenue (69 % du Se est retenu sur la phase solide après 10 j) et (ii) de la force de rétention du Se en phase solide (la fraction extraite à K_2HPO_4 ne représente plus que 44 % du Se retenu en phase solide). Dans nos conditions expérimentales, lorsque les activités microbiennes sont stimulées avec un amendement organique simple comme le glucose ou plus complexe comme la cellulose, le compartiment bactérien se développe préférentiellement et représente 78 et 91 % de la biomasse totale respectivement pour les conditions NSG et NSC. Les activités bactériennes engendrent alors une diminution de la mobilité du Se plus importante que dans le sol non amendé. Les vitesses de transformations du Se (rétention et redistribution en phase solide) sont corrélées aux vitesses de développement des bactéries. Les cinétiques les plus rapides sont observées dans la condition NSG, où le glucose est rapidement dégradé par les microorganismes. L'expérimentation avec antifongique a confirmé le rôle des bactéries dans toutes les transformations du Se. L'hypothèse de la formation de Se colloïdal, sous formes de granules de $Se(0)$ provenant d'une réduction bactérienne a été proposée pour les conditions où le compartiment bactérien est le plus actif (NSG, NSG+F et NSC). Néanmoins, cette transformation ne contribue pas pour autant à une diminution de la mobilité du Se. En effet, le Se colloïdal se trouve dans la fraction soluble, et peut, à ce titre être transporté avec la phase liquide. La condition avec antibactérien a montré que le compartiment fongique n'intervient pas dans les processus de rétention du Se en phase solide. Des populations bactériennes, différentes des autres conditions, se sont développées dans le système et contrairement aux autres conditions n'ont pas engendré d'augmentation de rétention. Ce résultat montre ainsi l'importance de la nature des microorganismes dans les processus de rétention du Se. En revanche, nous pouvons supposer qu'elles sont à l'origine de

la redistribution en phase solide, similaire aux autres conditions. Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, à la fois bactéries et champignons sont capables de volatiliser le Se, conduisant ainsi à une dissémination possible du Se hors du système sol. Toutefois, les quantités de Se volatilisée sont faibles, de l'ordre de 0,02 ‰ pour une condition non amendée, et sont totalement dépendantes des microorganismes présents. Nos résultats mettent en évidence en particulier le rôle du compartiment fongique dans ce processus de volatilisation.

3. Références

- Abu-Erreish, G.M., Whitehead, E.I., Olson, O.E., 1968. Evolution of volatile selenium from soils. *Soil Science* 106, 415-420.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1975. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Canadian Journal of Microbiology* 21, 314-322.
- Azaizeh, H.A., Gowthaman, S., Terry, N., 1997. Microbial selenium volatilization in rhizosphere and bulk soils from a constructed wetland. *Journal of Environmental Quality* 26, 666-672.
- Badalucco, L., De Cesare, F., Grego, S., Landi, L., Nannipieri, P., 1997. Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1135-1143.
- Calderone, S.J., Frankenberger Jr, W.T., Parker, D.R., Karlson, U., 1990. Influence of temperature and organic amendments on the mobilization of selenium in sediments. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 615-620.
- Chen, Y.W., Li, L., D'Ulivo, A., Belzile, N., 2006. Extraction and determination of elemental selenium in sediments-A comparative study. *Analytica Chimica Acta* 577, 126-133.
- Coppin, F., Chabroulet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J., 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* 42, 379-386.
- Dassonville, F., Renault, P., Valles, V., 2004. A model describing the interactions between anaerobic microbiology and geochemistry in a soil amended with glucose and nitrate. *European Journal of Soil Science* 55, 29-45.
- Dilly, O., 2004. Effects of glucose, cellulose, and humic acids on soil microbial eco-physiology. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 261-266.
- Djakirana, G., Joergensen, R.G., Meyer, B., 1996. Ergosterol and microbial biomass relation ship in soil. *Biology and Fertility of Soil* 22, 299-304.
- Duc, M., Lefevre, G., Fedoroff, M., 2006. Sorption of selenite ions on hematite. *Journal of Colloid and Interface Science* 298, 556-563.

- Dungan, R.S., Frankenberger Jr., W.T., 2000. Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1353-1358.
- Février, L., Martin-Garin, A., Leclerc, E., 2007. Variation of the distribution coefficient (Kd) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity* 97, 189-205.
- Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T., Buchanan, B.B., 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* 132, 199-202.
- Hu, S., Van Bruggen, A.H.C., 1997. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of ¹⁴C-labeled cellulose in soil. *Microbial Ecology* 33, 134-143.
- Jayaweera, G.R., Biggar, J.W., 1996. Role of redox potential in chemical transformations of selenium in soils. *Soil Science Society of America Journal* 60, 1056 - 1063.
- Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., 1988. Effects of carbon and trace element addition on alkylselenide production by soil. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1640-1644.
- Kepner Jr, R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Review* 58, 603-615.
- Lin, Q., Brookes, P.C., 1999. An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1969-1983.
- Losi, M.E., Frankenberger Jr, W.T., 1998. Microbial oxidation and solubilization of precipitated elemental selenium in soil. *Journal of Environmental Quality* 27, 836-843.
- Lucas, F.S., Hollibaugh, J.T., 2001. Response of sediment bacterial assemblages to selenate and acetate amendments. *Environmental Sciences and Technology* 35, 528-534.
- Martens, D.A., Suarez, D.L., 1997. Selenium speciation of soil/sediment determined with sequential extractions and hydride generation atomic absorption spectrophotometry. *Environmental Science and Technology* 31, 133-139.
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H., 1990. Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. *Environmental Science and Technology* 24, 91-96.
- Meyer, K., Joergensen, R.G., Meyer, B., 1997. The effects of reduced tillage on microbial biomass C and P in sandy loess soils. *Applied Soil Ecology* 5, 71-77.
- Mille-Lindblom, C., von Wachenfeldt, E., Tranvik, L.J., 2004. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59, 253-262.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V., Ovreas, L., 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1382.

- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S., 2004. Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 52-60.
- Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J.R., Tsai, C.S., Park, W., Jeon, C., Madsen, E., 2003. Respiration of ¹³C-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ¹³C-labeled soil DNA. *Applied and Environmental microbiology* 69, 1614-1622.
- Pereira, R.M., Silveira, E.L., Scaquitto, D.C., Pedrinho, E.A.N., Val-Moraes, S.P., Wickert, E., Carareto-Alves, L.M., Gertrudes, E., Lemos, M., 2006. Molecular characterization of bacterial population of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 439-447.
- Ponce De Leon, C.A., DeNicola, K., Bayon, M.M., Caruso, J.A., 2003. Sequential extractions of selenium soils from Stewart Lake: Total selenium and speciation measurements with ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 435-440.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*. DeBoeck & Larcier, Bruxelles.
- Roden, D.R., Tallman, D.E., 1982. Determination of inorganic selenium species in groundwaters containing organic interferences by ion chromatography and hybride generation/atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 54, 307.
- Sarathchandra, S.U., Watkinson, J.H., 1981. Oxidation of elemental selenium to selenite by *Bacillus megaterium*. *Science* 211, 600-601.
- Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1481-1491.
- Séby, F., 1994. Optimisation de méthodes analytiques pour la spéciation du sélénium inorganique dans les eaux et les sols. Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.
- Siddique, T., Zhang, Y., Okeke, B.C., Frankenberger Jr, W.T., 2006. Characterization of sediment bacteria involved in selenium reduction. *Bioresource Technology* 97, 1041-1049.
- Sunamura, M., Maruyama, A., Tsuji, T., Kurane, R., 2003. Spectral imaging detection and counting of microbial cells in marine sediment. *Journal of Microbiological Methods* 53, 57-65.
- Thompson-Eagle, E.T., Frankenberger Jr, W.T., 1991. Selenium biomethylation in an alkaline, saline environment. *Water Research* 25, 231-240.
- Ueno, H., Ishii, I., 2001. Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 65.

- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- Weinbauer, M.G., Beckmann, C., Holfe, M., 1998. Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminium oxides membranes filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 5000-5003.
- Wright, M.T., Parker, D., Amrhein, C., 2003. Critical evaluation of the ability of sequential extraction procedures to quantify discrete forms of selenium in sediments and soils. *Environmental Science and Technology*.
- Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality* 28, 1321-1326.
- Zieve, R., Peterson, P.J., 1981. Factors influencing the volatilization of selenium from soil. *Science of the Total Environment* 19, 277-284.
- Zhao, X.R., Lin, Q., Brookes, P.C., 2005. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 37, 311-317.

CHAPITRE IV – INCUBATION DE SOL EN CONDITIONS ANOXIQUES

Avant propos ...

Dans le chapitre précédent, nous avons tenté de déterminer l'impact relatif des paramètres géochimiques et microbiologiques d'un sol, en condition oxique, sur le comportement du sélénium, présent à une faible concentration ($0,4 \text{ mg Se.kg}^{-1}_{\text{sol}}$). Ces expériences ont montré que le sélénium était retenu, très rapidement (≤ 1 heure) sur la phase solide et majoritairement par des processus abiotiques ($51 \pm 1 \%$). Les activités microbiennes affectent le comportement du Se pour des temps d'incubation plus long (quelques jours) et dépendent de la quantité et de la qualité des microorganismes présents (communautés bactériennes et fongiques). D'une part, les microorganismes favorisent la volatilisation du Se, même présent à faible concentration, et d'autre part, ils augmentent la quantité de Se retenu en phase solide ainsi que la force de rétention (diminution de la fraction Se(IV) adsorbé échangeable avec les phosphates). De plus, certaines activités bactériennes induisent la formation de Se colloïdal (fraction $> 0,22 \mu\text{m}$), étant soit du sélénium élémentaire insoluble et/ou du sélénium associé à des bactéries. Par ailleurs, ces expériences nous ont permis de valider le design et le protocole expérimental ainsi que la complémentarité des différentes analyses microbiologiques effectuées pour caractériser aux mieux les différents états microbiologiques.

Le but de ce chapitre est de déterminer l'impact relatif des paramètres géochimiques et microbiologiques d'un sol sur le comportement du sélénium, mais à présent en condition anoxique.

Le sol étudié, la concentration en Se et le design (type batch) sont identiques à ceux utilisés en condition oxique. Nous avons suivi la distribution d'une contamination en Se dans les conditions suivantes : une condition stérile (S), une condition contrôle, sans amendement (C) et une condition amendée avec une solution nutritive (glucose, nitrate d'ammonium, sulfate de potassium) (G). En parallèle de ces conditions, 3 conditions supplémentaires, amendées avec la même solution nutritive que la condition G, ont été effectuées en parallèle et le Se a été injecté à différents moments de l'incubation (2j, 6j et 10j), de manière à cibler différentes activités bactériennes (G_2, G_6 et G_10).

Dans ces différentes conditions et périodiquement au long de l'incubation, nous avons caractérisé les paramètres géochimiques (pH, E_H , atmosphère gazeuse et composition de la

solution) et les paramètres microbiologiques (dénombrement bactérien et structure des communautés bactériennes, dénombrement des bactéries fermentaires, dénitrifiantes, ferri-réductrices et sélénio-réductrices) du sol. La mobilité du Se a été estimée au travers de sa distribution entre les phases liquide, solide et gazeuse. Tout comme en condition oxygène, la distribution du Se au sein de la phase solide a été obtenue par des extractions séquentielles.

Initialement ce chapitre était présenté sous la forme d'un article qui sera soumis à *Soil Biology and Biochemistry* ultérieurement. Néanmoins, toujours pour des raisons d'homogénéité de langue du manuscrit (intégralement en français), l'article a dû être déplacé en annexe (Annexe II). Aussi, nous conseillons fortement la lecture de la publication (annexe II) au préalable de ce chapitre, qui ne reprend, en français, que la partie « Résultats et Discussion » de l'article.

1. Résultats et Discussion

1.1 Evolutions géochimiques et microbiologiques

Pour des raisons de clarté, nous présentons ici uniquement les résultats concernant les conditions S, C et G car les différentes date d'injection du Se (2j, 6j et 10j) n'ont pas affectées les paramètres géochimiques et microbiologiques de nos systèmes.

1.1.1 La condition stérile (S)

Dans cette condition, la stérilité a été vérifiée par la non production de gaz (CO_2 , N_2O , H_2 ou CH_4). De plus, nous avons mesuré aucune production de composés organiques, anions et cations minéraux en solution. Le pH de la solution diminue de 7,7 à 7,4 et le E_H reste stable (360 mV) durant toute la durée de l'incubation (Fig. 1a et 1b).

1.1.2 La condition control (C)

Dans la condition control, les activités bactériennes présentes n'ont pas modifié les paramètres géochimiques (E_H et pH) comparé à la condition S (Fig. 1a et 1b). Une activité bactérienne respiratoire est mesurée via une production de CO_2 constante (Fig. 2) (de $1,7 \times 10^{-4}$ mol C.batch⁻¹ au jour 2 à $3,6 \times 10^{-4}$ mol C.batch⁻¹ au jour 15). Aucune production de N_2O , H_2 ou CH_4 , ni de composés organiques ou minéraux n'ont été observé en solution.

La densité bactérienne, estimée par comptage direct, reste stable à $7,4 \times 10^9$ bactérie.g⁻¹ de sol entre les jours 2 et 15. De façon similaire, le nombre de bactéries fermentaires, ferri-réductrice et séléno-réductrices sont stables durant toute l'incubation à $2,9 \times 10^4$ bactérie.g⁻¹ de sol, $1,7 \times 10^5$ bactérie.g⁻¹ de sol, $3,8 \times 10^2$ bactérie. g⁻¹ de sol et $1,7 \times 10^3$ bactérie.g⁻¹ de sol respectivement.

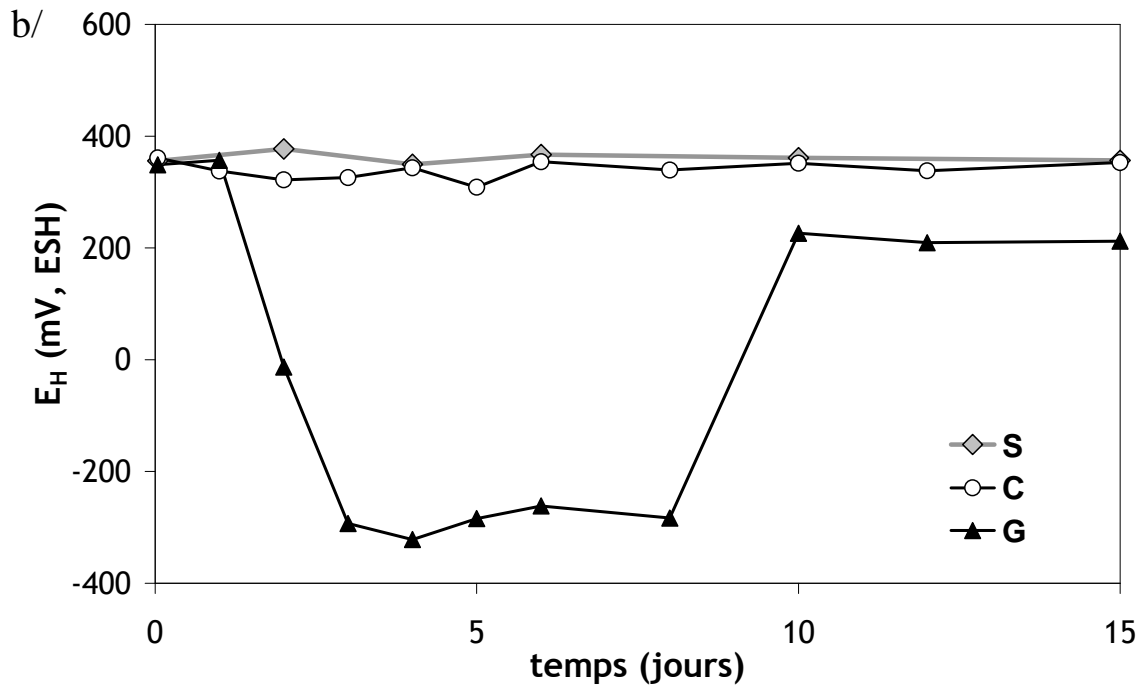
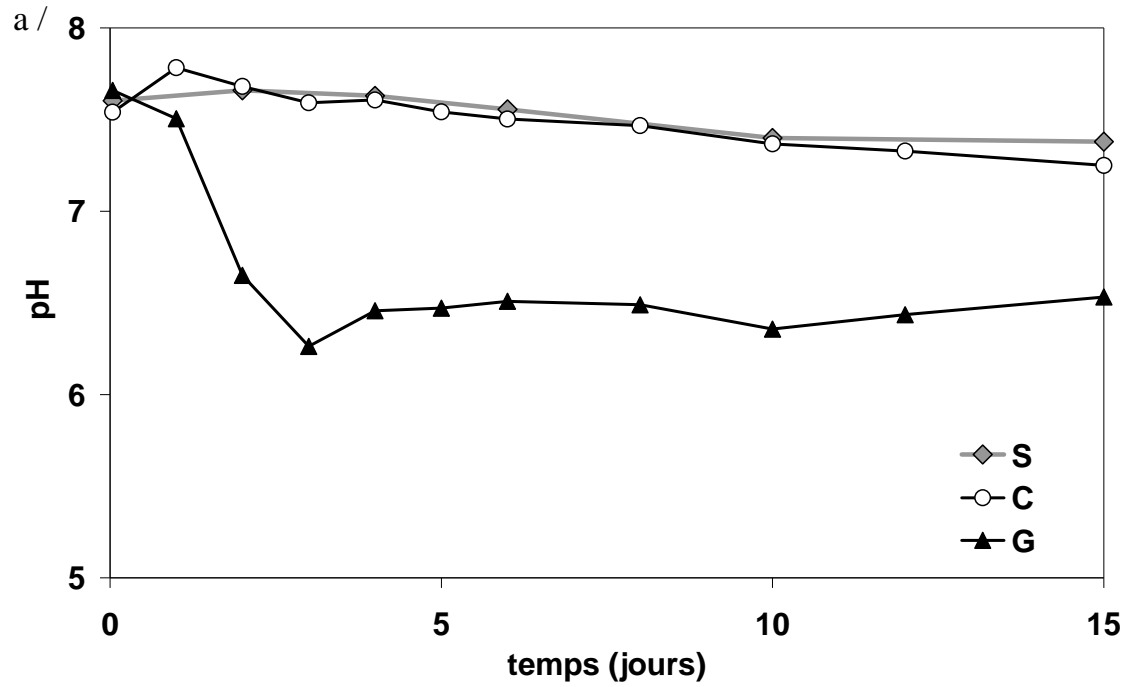


Figure 1: Evolution du pH and E_H pour les conditions S, C et G a/ pH; b/ E_H . Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

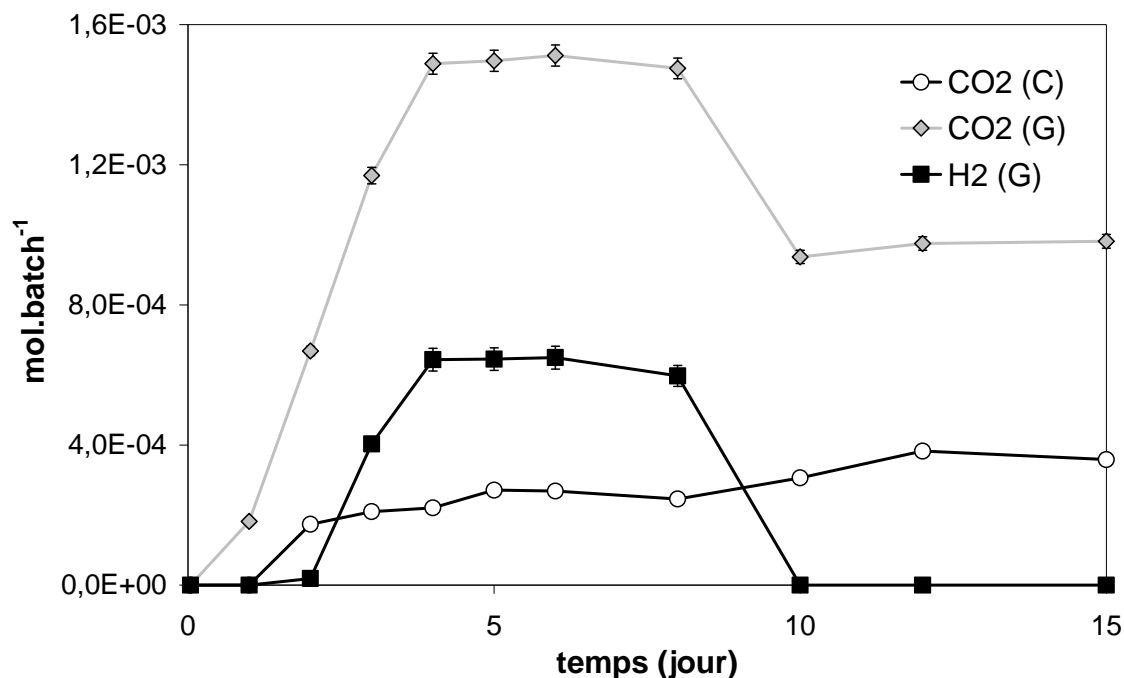


Figure 2: Evolution de la production de gaz pour les conditions C et G (mol.batch⁻¹). Moyenne des trois réplicats \pm 1 écart-type.

La structure des communautés bactériennes du sol après 1h, 2, 6, 10 et 15 jours d'incubation, obtenue par électrophorèse sur gel dénaturant (DGGE- Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S est présentée Figure 3 pour les conditions C et G. A chaque temps, les 3 profils verticaux représentent les réplicats de chaque incubation en batch.

Pour la condition C, aucune évolution majeure n'est observée entre les triplicats. Les profils évoluent durant les premiers jours d'incubation (disparition des bandes 1 et 2) et se stabilisent rapidement après le 2^{ème} jour d'incubation.

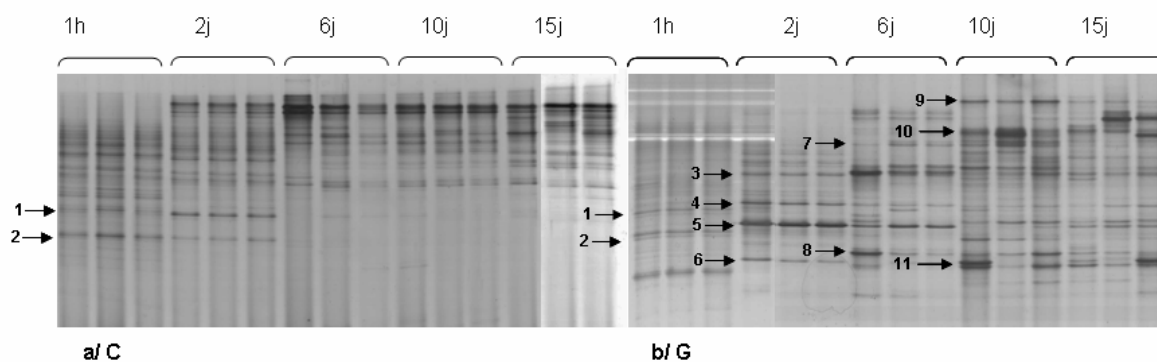


Figure 3: Profils des fragments d'ADN bactérien 16S amplifié à partir du sol obtenu par DGGE a/ condition C et b/ condition G. A chaque temps, 3 répliquas ont été amplifiés. Les flèches représentent les populations bactériennes remarquables.

1.1.3 La condition amendée (G)

L'apport d'un amendement glucosé a induit une diminution de pH et du E_H durant les trois premiers jours de l'incubation (Fig. 1a et 1b). Un état fortement réducteur (-280 mV) est observé entre le 3^{ème} et le 8^{ème} jour de l'incubation, puis la valeur de E_H retrouve une valeur « oxydante » (220 mV) après le 10 j d'incubation. Cette évolution du E_H est due à la formation de donneurs et d'accepteurs d'électrons dans le système (Fig. 4), induite par les activités bactériennes suite à l'amendement glucose. Dans la littérature, la valeur de E_H mesurée est souvent différente de celle supposée par les données thermodynamiques et les couples oxydant-réducteurs présents dans le système. Ceci est dû à la simultanéité de plusieurs activités microbiennes et à la nature complexe des phases minérales souvent méconnues (Runnells et Lindberg, 1990; Picek et al., 2000; Gao et al., 2002; Alewell et al., 2006). Néanmoins, selon les équations et les données thermodynamiques de Sposito (1989) et les concentrations en espèces N, Fe et H, nous supposons que trois couples oxydant-réducteurs contrôlent la valeur de E_H dans nos conditions. Ainsi, le E_H est, tout d'abord, contrôlé par $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ durant la période 0-2 jours (valeur théorique calculée +400 mV), puis par H^+/H_2 durant la période 3-8 jours (valeur théorique calculée -350 mV) et enfin par $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ durant la période 9-15 jours (valeur théorique calculée 170 mV).

L'amendement glucose a induit une augmentation de la production de CO₂ (x7) par rapport à la condition C (Fig. 2), mais de façon surprenante la densité bactérienne est identique. Cependant, la méthode utilisée pour le dénombrement bactérien reste difficile et peu adaptée pour les bactéries du sol à cause du grand nombre de particule auto-fluorescente du sol (Kepner JR et Pratt, 1994; Sunamura et al., 2003). Ainsi, nous pouvons supposer que nous avons surestimé le nombre de bactérie et que cette surestimation a masqué l'augmentation de la densité bactérienne dans la condition G.

Les profils des structures des communautés bactériennes du sol obtenus par DGGE sont présentés fig. 3 pour la condition G. Tout comme pour la condition C, aucune différence n'est observée entre les triplicats. Les profils de DGGE des conditions C et G sont similaires après 1 h d'incubation (bandes 1 et 2) et différent à partir du 2^{ème} jour d'incubation. Nous pouvons supposer que la disparition des bandes 1 et 2, présentes seulement au début de l'incubation, peut être attribuée à la mort des bactéries aérobies strictes. En effet, le sol n'a pas été pré-incubé en anoxie avant l'incubation, les bactéries aérobies strictes et facultatives sont donc présentes dans le système au début de l'incubation. Dans la condition G, la stabilisation des profils de DGGE apparaît plus tard que dans la condition C (entre 6 et 10 jours d'incubation). Les évolutions temporelles des profils observées dans la condition G suggèrent des processus anaérobique successifs dû à la dégradation du glucose.

De plus, les résultats des dénombrements des bactéries dénitrifiantes et fermentaires cultivables confirment une évolution temporelle de ces populations fonctionnelles. En effet, le nombre de bactéries cultivables dénitrifiantes augmente de $2,1 \times 10^6$ to $2,5 \times 10^7$ bactéries. g⁻¹ de sol durant les six premiers jours, puis diminue à partir du jour 10 pour atteindre $8,2 \times 10^4$ bactéries. g⁻¹ de sol au jour 15. Le nombre de bactéries fermentaires cultivables est compris entre $2,1 \times 10^6$ to $7,2 \times 10^6$ bactéries. g⁻¹ de sol durant les dix premiers jours de l'incubation, puis diminue jusqu'à $1,9 \times 10^4$ bactéries. g⁻¹ de sol au jour 15. Aucune augmentation n'est observé dans le nombre de bactéries ferri-réductrices par rapport à la condition C ($\sim 3 \times 10^1$ bactéries. g⁻¹ de sol), malgré la réduction du fer (cf. fig. 5) observée dans la condition G. Compte tenu de la faible quantité de Fe(II) mesurée en solution, ce résultat n'est pas surprenant. De plus, ce résultat peut également s'expliquer par les hypothèses suivantes :

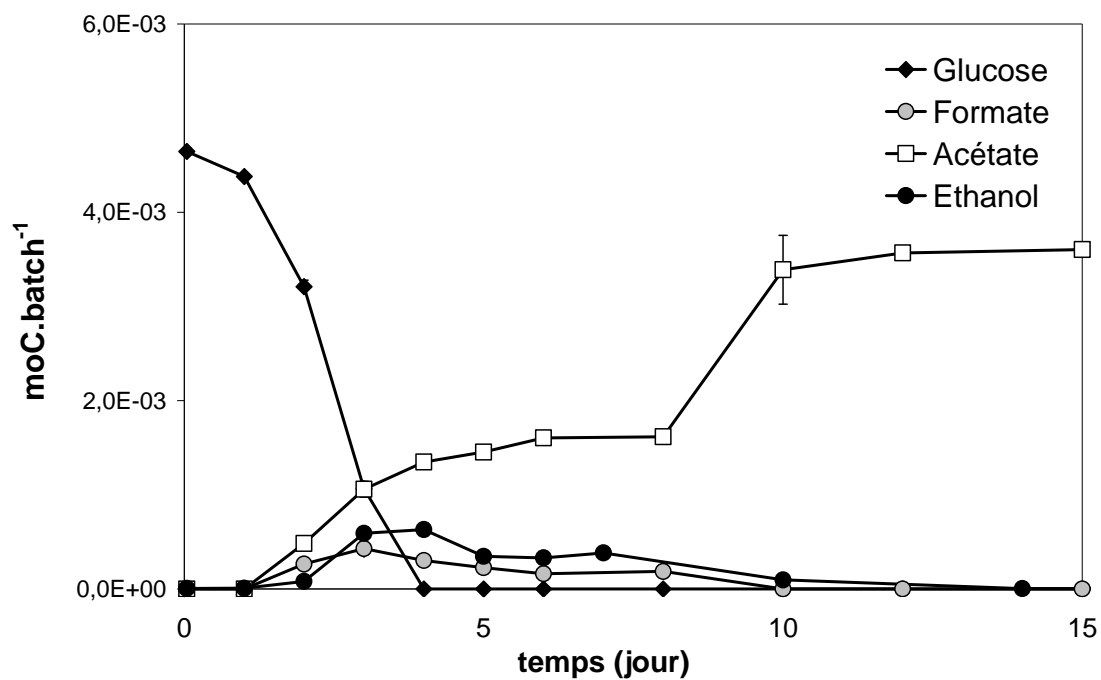
- un milieu de culture trop sélectif et/ou une faible cultivabilité des bactéries ferri-réductrices.

- d'autres communautés bactériennes fonctionnelles peuvent également réduire le fer comme les activités dénitrifiantes ou fermentaires (Seeliger et al., 1998), mais ne sont pas cultivables dans un milieu spécifique aux bactéries ferri-réductrices.

Aucune évolution n'a été observée dans le nombre de bactéries sélénio-réductrices dans la condition G par rapport à la condition C (entre 8×10^2 et 1×10^3 bactéries. g^{-1} de sol), malgré la présence de H_2 ou de lactate qui peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons lors de la réduction du sélénite (Switzer Blum et al., 1998; Stolz et Oremland, 1999). De plus, le nombre de bactéries sélénio-réductrices est similaires à celui observés par Haudin (2006) dans un sol sans apport de Se. Cette faible densité bactérienne peut donc être expliquée par la faible concentration en Se utilisée (10^{-6} mol L^{-1}).

Les évolutions de CO_2 et de H_2 (Fig. 2), des concentrations des composés organiques (glucose, formiate, acétate), de l'éthanol (Fig. 4a), des anions et des cations minéraux (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) (Fig. 4b) nous ont permis de décrire cinq processus microbiens anaérobiques successifs, récapitulés fig. 5. Le traitement des données pour conclure à ces processus est détaillé Annexe II.

a/



b/

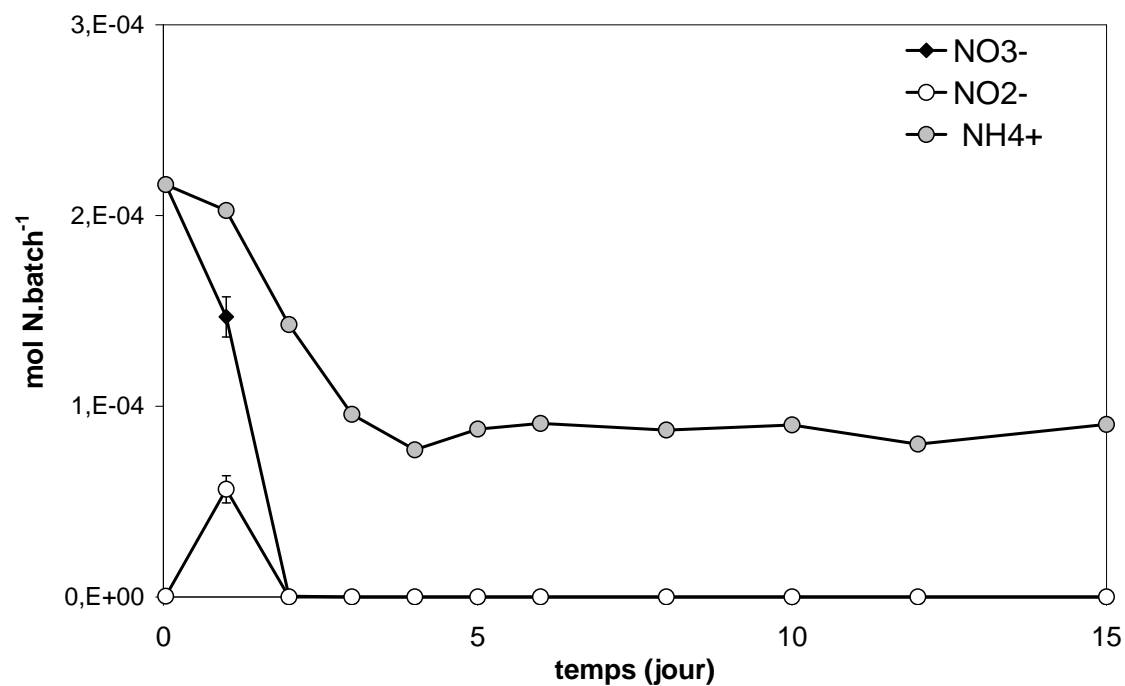
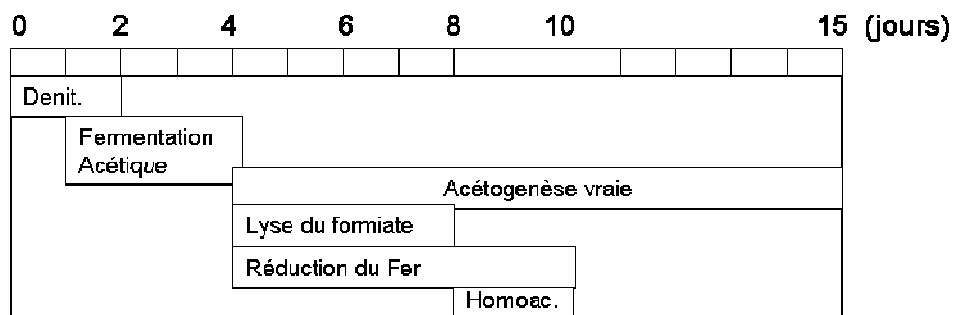


Figure 4 : Evolution des paramètres biogéochimiques de la condition G. a/ Glucose, Formiate, Acétate et Ethanol (mol C.batch⁻¹) and b/ Nitrate, Nitrite et Ammonium (mol N.batch⁻¹)

Durant la période 0-2 jours, la dénitrification (Annexe II, Table 1, Eq. 1) explique la majorité de la consommation des nitrate, mais seulement 5,6 % de la consommation du glucose. La consommation du glucose est bien corrélée à la production des acides organiques (butyrate, formiate et acétate), du CO₂ et de l'éthanol. Contrairement à l'étude de Dassonville et al. (2004), la production de butyrate est très faible comparé à la production d'éthanol dans notre condition. Ainsi, nous supposons que la consommation du glucose est principalement due à de la fermentation acétique (Annexe II, Table 1, Eq. 3) et en moindre mesure à de la fermentation butyrique (Annexe II, Table 1, Eq. 4). Durant la période 1-4 jours, la disparition du glucose est approximativement équivalente à la production de un tiers de « CO₂ + formiate » (36,8 % au lieu de 33,3 %), mais non équivalente avec les deux tiers de la production d'éthanol, acétate et butyrate (41,4 %). Toutefois, il est possible que l'éthanol soit en partie perdu par évaporation durant le stockage des échantillons (même si les échantillons ont été congelés). Néanmoins, nous pouvons conclure que le glucose est consommé par de la fermentation acétique (et butyrique en moindre mesure) et que ni l'acétate, ni le butyrate ou l'éthanol ne sont minéralisés. Durant la période 4-6 jours, la diminution du formiate et de l'éthanol est expliquée (i) par de l'acétogénèse vraie transformant de l'éthanol en acétate (Annexe II, Table 1, Eq. (7)) et (ii) par la lyse du formiate (Annexe II, Table 1, Eq. (5)). L'oxydation du formiate (Annexe VI, Table 1, Eq. (5)) est exclue à cause de l'absence de NO₃⁻ durant cette période. La réduction du Fe(III) en Fe(II) ($3,6 \times 10^{-6}$ mol.batch⁻¹) est expliquée par la respiration microbienne avec oxydation de H₂ (Annexe II, Table 1, Eq. (12)). Les oxydations de l'éthanol ou du butyrate, avec la réduction concomitante du Fe(III) en Fe(II) (Annexe II, Table 1, Eq. (10) and (11)) sont exclues car la quantité d'électrons nécessaires pour ces réactions est deux fois supérieures à la production de H₂ réelle (nécessaire pour la réduction de Fe(III) en Fe(II)). Le système est en équilibre durant la période 6-8 jours. Durant la période 8-10 jours, la production de Fe(II) ne représentant que 1 % de la consommation de H₂, l'homoacétogénèse est principalement responsable de la disparition de H₂. Ainsi, nous avons vérifié que l'homoacétogénèse et l'acétogénèse vraie expliquent la majorité de la production d'acétate. Après le 10^{ème} jour d'incubation, nous supposons qu'il n'y a pas de processus métaboliques supplémentaires expliquant la production d'acétate et la consommation de l'éthanol. Aucune sulfato-réduction n'a été observé durant toute l'incubation.



Denit. : dénitrification - - *Homoac.* : homoacétogenèse

Figure 5: Grandes voies métaboliques anaérobies dans la condition G.

1.2 Le selenium

1.2.1 La rétention du Se et spéciation en phase aqueuse

Les évolutions cinétiques de la rétention du Se sur la phase solide sont présentées Fig. 6.

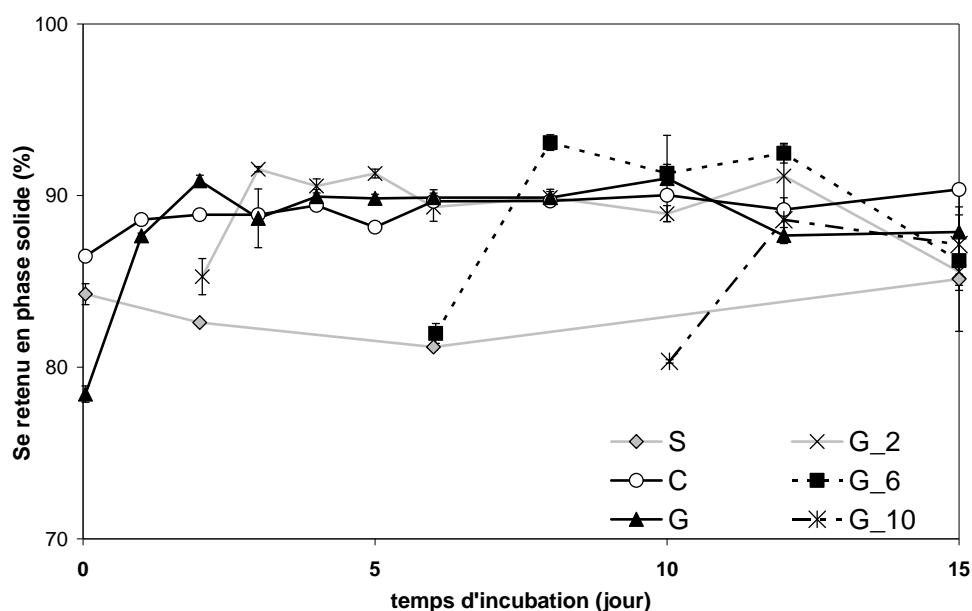


Figure 6: Evolution du pourcentage de Se retenu sur la phase solide. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Dans la condition stérile (S), les interactions abiotiques entre le Se et le sol sont rapides, elles ont lieu durant la première heure d'incubation. Contrairement au Tc (Begg et al., 2007), l'immobilisation du Se est principalement abiotique, 84 ± 2 % du Se est retenu par le sol stérile. Dans les conditions non stériles (C, G, G_2, G_6 and G_10), les activités bactériennes (brutes ou stimulées) n'ont pas augmenté significativement la quantité de Se

retenu par la phase solide. De plus, dans les conditions amendées, quelque soit la date d'injection du Se (0, 2, 6 ou 10 jours), les évolutions cinétiques sont identiques, un équilibre entre les phases solide et liquide est atteint après 1 ou 2 jours d'incubation avec 89 ± 2 % de Se retenu.

En complément de ces résultats, le ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$, dans la fraction dissoute ($< 0,2 \mu\text{m}$) est présentée Fig. 7. Pour toutes les conditions, le Se total aqueux, $[\text{Se total}]$, ne représente plus que 10 à 20 % du Se initialement mis en solution ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), dès 1h d'incubation.

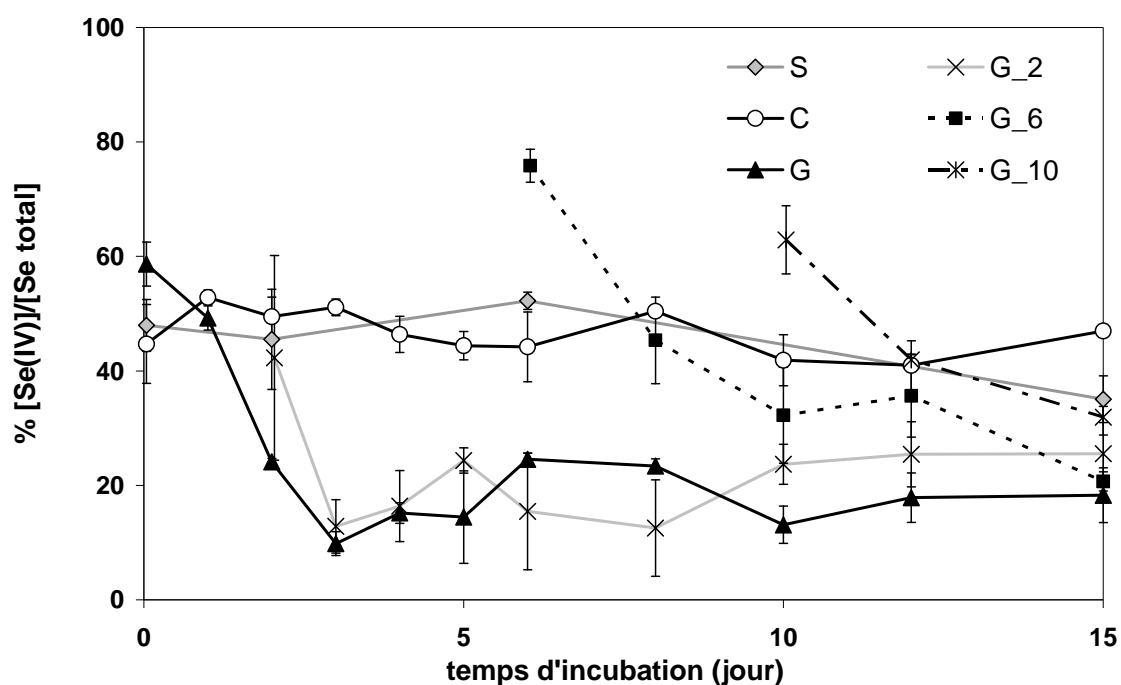


Figure 7: Evolution du ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ (%) en solution. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.

Dans toutes les conditions, une forte modification de la spéciation aqueuse est observée. Le sélénite ne représente que de 20 % à 50 % du Se total. Compte tenu de la valeur du E_H initial (360 mV) (sauf pour G_6), une réduction abiotique du Se(IV) n'est pas envisageable dans nos conditions. Des résultats similaires ont déjà été observés par Février et al (2007), en condition oxiq. Les auteurs ont supposé que des interactions rapides entre la les composés organiques dissous du sol et le Se(IV) interféraient lors de la mesure du Se(IV) par génération d'hydrure (Roden et Tallman 1982, Ferri et Sangiorgio, 1996). Néanmoins, dans la condition G_6, le ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ est initialement supérieur aux autres

conditions ($76 \pm 3\%$) alors que le potentiel est le plus réducteur (-280 mV). Nous pouvons alors supposer que des espèces anioniques présentes à cette date (formiate, acétate) peuvent interagir avec les composés organiques dissous du sol à la place de SeO_3^{2-} . Ainsi, le Se(IV) est « libre » en solution et peut être quantifié par la génération d'hydrure.

Alors que dans les conditions S et C, le sélénite ne représente que 50 % du Se total durant toute la durée de l'incubation, dans les conditions G, G_2, G_6 et G_10 une diminution du ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ dans le surnageant des batchs est observé (Fig. 7). Dans la condition G, le ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ diminue de $58 \pm 3\%$ à $18 \pm 5\%$ durant les trois premiers jours de l'incubation. Dans les autres conditions amendées (G_2, G_6 and G_10), quelque soit la date d'injection du Se, les évolutions cinétiques du ratio sont comparables à la condition G. D'après le diagramme pH- E_H , le sélénium élémentaire (Se(0)) et les séléniures (Se (-II)) prévalent en conditions réductrices. De plus, en présence de Fe(II), le sélénite peut être réduit abiotiquement en séléniures métalliques (FeSe ou FeSe₂) (Bruggenam, 2002). Compte tenu de la valeur réductrice de E_H dans les conditions G, G_2 et G_6 (Fig. 1), nous pouvons envisager une réduction abiotique du Se(IV) en Se(0) ou Se(-II). Mais, dans la condition G_10, malgré un potentiel oxic (220 mV), le ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ diminue également. De plus des espèces réduites, comme Fe(II) restent présentes en solution à ce potentiel dit « oxic ». Par ailleurs, notre période expérimentale (15 jours) semble trop courte pour pouvoir observer une réduction abiotique (Lee et al., 2007). De plus, la faible concentration en Se utilisée nous prive de l'utilisation de méthodes spectroscopiques ou microscopiques pour de meilleures investigations. Ainsi, tous ces résultats suggèrent que la spéciation du Se dans un sol est plus complexe que ne le propose un diagramme de Pourbaix pH- E_H .

Comme les interactions entre le Se(IV) et les composés organiques dissous ou la réduction abiotique du Se(IV) ne suffisent pas pour expliquer la diminution du ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$, nous pouvons supposer que cette diminution est due à une réduction biotique. En conditions anoxiques, le Se(IV) peut être utilisé comme accepteur d'électrons (Garbisu et al., 1996) ou réduit indépendamment de la chaîne de transport des électrons (Lortie et al., 1992). Le faible nombre de bactéries séléno-réductrices dénombrées suggère que d'autres populations bactériennes, qui ne peuvent pas croître dans le milieu de culture choisi (Annexe V), participent à la réduction du Se(IV), comme cela a déjà été suggéré par Kessi (2006). Plus particulièrement, nous savons que les bactéries sulfato-réductrices ont la capacité de réduire de faible quantité de Se(IV) (Hockin et Gadd, 2003). Mais, malgré la présence de sulfate dans nos expériences amendées, aucune sulfato-réduction n'a été observée. De plus, quelque soit l'activité bactérienne présente au moment de l'injection du Se, le ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$

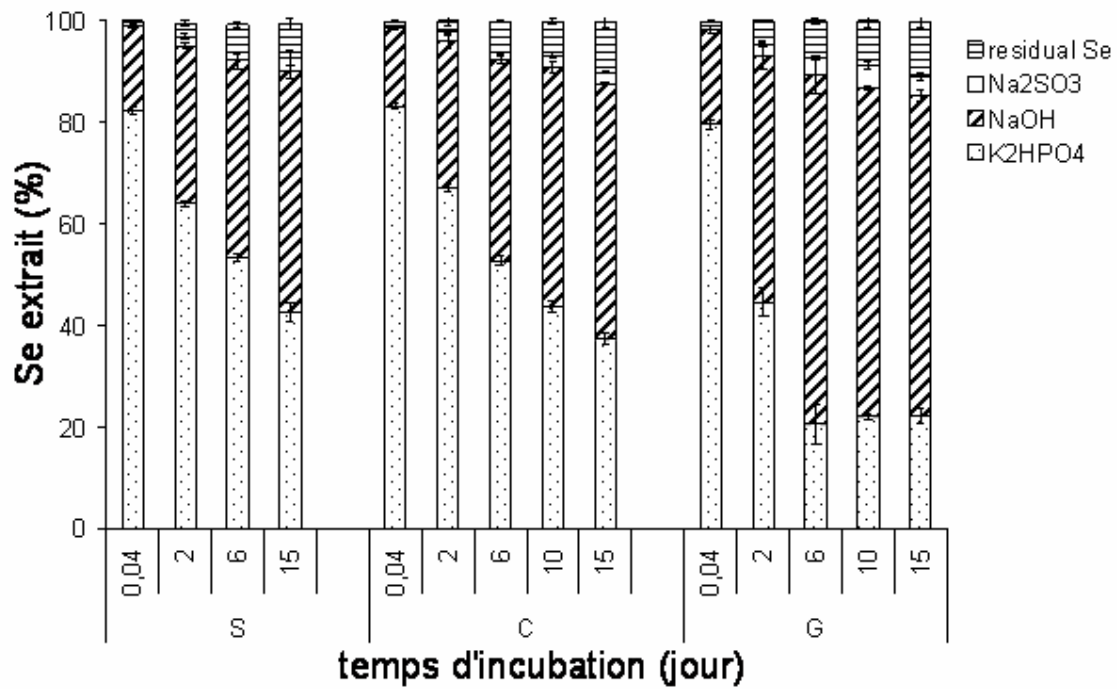
diminue de façon similaire (Fig. 7). Ainsi, nous pouvons alors supposer que différentes populations bactériennes sont capables de réduire de faibles quantités de Se(IV) quelque soit leur activité.

1.2.2 Le selenium en phase solide

Pour toutes les conditions, la somme du Se extrait dans les différentes étapes des extractions séquentielles représente 100 ± 20 % du Se initialement introduit dans le batch. Pour des raisons de clarté, les quantités de Se extraites à chaque étape sont exprimées en pourcentage de la quantité de Se total extrait cumulé (i.e. la somme des 4 étapes). Les évolutions cinétiques de la distribution solide du Se sont présentées Fig. 8a pour les conditions S, C et G et Fig. 8b pour les conditions G_2, G_6 and G_10.

Dans la condition stérile (S), après 1h d'incubation, le Se retenu par la phase solide est principalement retrouvé dans la fraction échangeable avec les phosphates (82 %) et dans la fraction extraite avec NaOH (16 %). Les pourcentages de Se élémentaire et de Se résiduel sont négligeables (< 1%). La distribution solide du Se évolue ensuite dans le temps. La fraction échangeable avec les phosphates diminue progressivement et atteint 43 % au 15^{ème} jour de l'incubation, alors que la fraction extraite avec NaOH augmente à 48 %. Les fractions Se élémentaire et Se résiduel augmentent mais restent faibles à respectivement 3 % et 7 %. Dans la condition C, les activités bactériennes ne modifient pas la distribution du Se entre les différents composants de la phase solide ; les résultats sont similaires à ceux de la condition S à tous les temps de l'incubation. Dans ces deux conditions (S et C), la distribution du Se entre les différents composants de la phase solide et l'évolution de cette distribution sont similaires à celles observées par Darcheville et al. (2008) (annexe I). Comme une réduction abiotique semble peu probable à 360 mV, nous pouvons raisonnablement considérer que l'explication de l'immobilisation abiotique du Se est également valable dans nos conditions. Ainsi, dans un premier temps, le Se est rapidement adsorbé sur les particules du sol, puis cette fraction adsorbée évolue ensuite vers une forme plus fortement liée avec les particules de sol par la formation d'un complexe non échangeable avec les phosphates. Cette hypothèse a également été suggérée dans des études précédentes portant sur les cinétiques de sorption du Se sur les composants du sol (Barrow et Whelan, 1989; Zhang et Sparks, 1990). Tout comme les travaux de Duc et al. (2006), nos résultats suggèrent que les processus de rétention du Se sont plus complexes qu'une simple adsorption de surface.

a/



b/

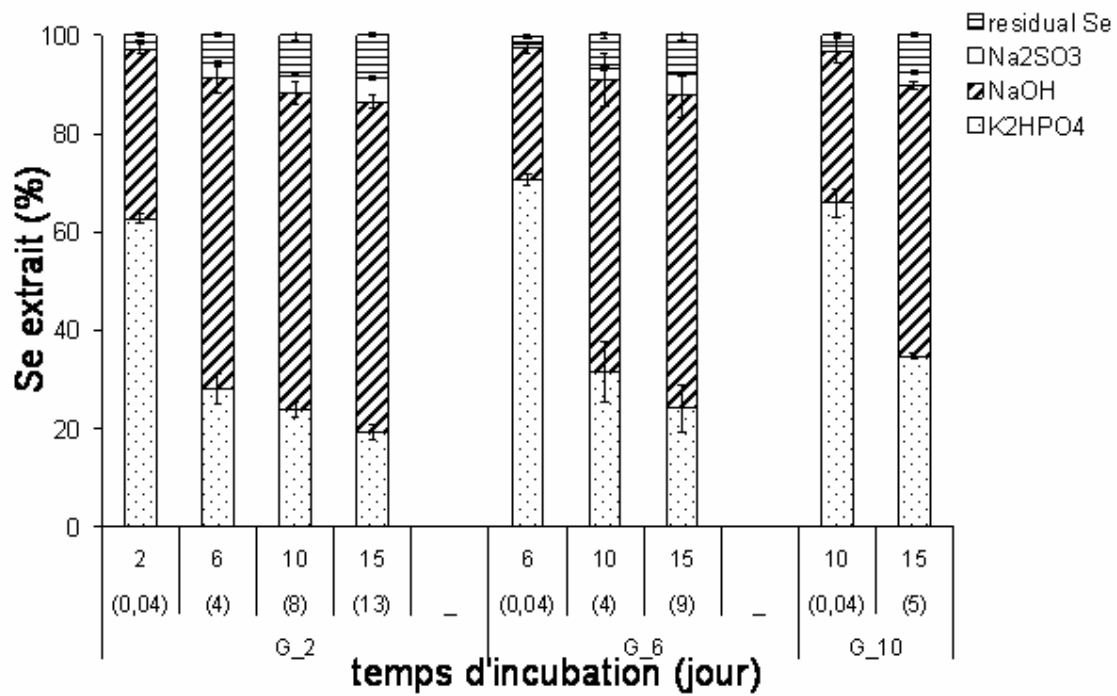


Figure 8: Evolution de la distribution solide du Se. (a) conditions S, C et G (b) conditions G₂, G₆ et G₁₀. Les valeurs entre parenthèses représentent le temps de contact en jour entre le sol et le Se.

Pour les conditions amendées (G, G_2, G_6 and G_10), la distribution solide du Se est similaire à celle de la condition S après 1h d'incubation. Néanmoins, des différences apparaissent entre ces conditions pour les temps d'incubation plus longs. Dans la condition G, la redistribution du Se entre les différents composants de la phase solide est plus rapide comparée aux conditions S et C. Au 2^{ème} jour d'incubation, la distribution solide du Se dans la condition G est similaire à celle observée dans la condition C au 15^{ème} jour de l'incubation. Dans la condition G, le pourcentage de Se retrouvé dans la fraction échangeable avec les phosphates continue à diminuer avec le temps en faveur du Se retrouvé dans la fraction extraite à NaOH. Au 15^{ème} jour de l'incubation, la fraction échangeable avec les phosphates et la fraction extraite à NaOH représentent respectivement 22 % et 63 %. Les fractions Se élémentaire et Se résiduel augmentent et représentent respectivement 4 % et 11 %. La redistribution du Se entre les différents composants de la phase solide dans les conditions G_2, G_6 and G_10 suivent la même évolution cinétique que la condition G. Ainsi, la stimulation des activités bactérienne a accéléré la redistribution du Se entre les différents composants de la phase solide, en faveur d'une plus forte rétention. De plus, quelque soit l'activité bactérienne présente au moment de l'injection du Se, la redistribution du Se est similaire dans toutes les conditions. Ce résultat suggère que le temps est le principal facteur intervenant dans le contrôle de la stabilisation du Se dans le sol.

1.2.3 Le sélénium en phase gazeuse

Aucune volatilisation du Se n'a été observée dans la condition S, confirmant ainsi que la volatilisation du Se est un processus strictement biotique. La volatilisation du Se est très souvent négligée en condition anoxique (Doran and Alexander 1977, Guo 1999), même si elle a déjà été observée pour des sols incubés avec N₂ (Reamer and Zoller, 1980). De plus, la volatilisation du Se est généralement assimilée à un processus de détoxification (Hassoun et al., 1995). Dans les conditions non stériles C et G, des quantités similaires de Se volatil sont mesurées, mais en faible quantité. La volatilisation augmente avec le temps et atteint $9 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-3} \%$ au jour 10. Aucune production de Se volatil n'est mesurée au-delà du 10^{ème} jour d'incubation. La faible quantité de Se volatil, mesurée grâce au traceur radioactif ⁷⁵Se, peut être expliquée par la faible concentration en Se(IV) utilisée ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), considérée comme non toxique pour la plupart des microorganismes (Dungan and Frankenberger Jr., 2000). Néanmoins, la quantité de Se volatilisée a probablement été sous-estimée car le DMSe, (principale espèce de Se volatil) est très soluble (Zhang and Frankenberger Jr 1999). Ainsi,

dans nos conditions expérimentales anoxiques, la volatilisation du Se n'est pas seulement un mécanisme de protection pour purifier l'environnement.

Dans la condition G_2, les espèces volatiles du Se ne sont produites que durant les 4 premiers jours d'incubation avec Se, soit entre le jour d'injection du Se (jour 2) et le jour 6 ($9 \times 10^{-3} \text{ ‰} \pm 4 \times 10^{-3}$ du Se total). Dans la condition G_6, la production de Se volatil augmente de $3 \times 10^{-3} \text{ ‰} \pm 1 \times 10^{-3}$ au jour 10 (4 jours après l'injection du Se) à $1 \times 10^{-2} \text{ ‰} \pm 1 \times 10^{-3}$ au jour 15 (9 jours après l'injection du Se). Dans la condition G_10, la volatilisation du Se n'est mesurée uniquement au jour 15 (5 jours après l'injection du Se) et est inférieure aux conditions ($3 \times 10^{-3} \text{ ‰} \pm 6 \times 10^{-4}$). Malheureusement, il n'est pas possible de relier clairement une activité bactérienne spécifique au processus de volatilisation du Se à cause du faible contraste obtenu entre les différentes conditions et la variabilité expérimentale entre les réplicats (jusqu'à 50 % dans certaines conditions).

2. Conclusion

Pour conclure, en conditions anoxiques, la rétention du Se est principalement due à des processus abiotiques. Le coefficient de distribution (K_d) correspondant est d'environ 50 l kg^{-1} , ce qui est caractéristique d'une espèce modérément mobile. Cette valeur se trouve dans la gamme de K_d ($5\text{-}50 \text{ l kg}^{-1}$), proposé par Roussel-Debet et Colle (2005). Néanmoins, des processus biotiques ayant des effets sur le comportement du Se ont été mis en évidence, comme une modification de la spéciation aqueuse (supposée être de la réduction biotique du Se(IV) en Se(0)), une accélération de la redistribution du Se entre les différents composants de la phase solide et de la volatilisation du Se. Excepté pour la volatilisation, tous ces processus biotiques contribuent à diminuer la mobilité du Se par une plus faible extraction du Se sorbé (diminution de la fraction échangeable avec les phosphates). Ce résultat est similaire à celui observé par Haudin (2006) dans des conditions réductrices. Aucun effet dû à une activité bactérienne spécifique ciblée n'a pu être observée. Lorsque le Se(IV) est présent à l'état de trace dans un sol, plusieurs activités bactériennes sont compétentes pour réduire le Se et le volatiliser.

3. Référence

- Alewell, C., Paul, S., Lischeid, G., Kusel, K., Gehre, M., 2006. Characterizing the redox status in three different forested wetlands with geochemical data. *Environmental Science and Technology* 40, 7609-7615.
- Barrow, N.J., Whelan, B.R., 1989. Testing a mechanistic model. VIII. The effects of time and temperature of incubation on the sorption and subsequent desorption of selenite and selenate by a soil. *Journal of Soil Science* 40, 29-37.
- Begg, J.D.C., Burke, I.T., Morris, K., 2007. The behavior of technecium during microbial reduction in amended soils from Dounreay, U.K. *Science of the Total Environment* 373, 297-304.
- Bruggeman, C., Maes, A., Vancluysen, J., Vandemussele, P., 2005. Selenite reduction in Boom clay: Effect of FeS₂, clay minerals and dissolved organic matter. *Environmental Pollution* 137, 209-221.
- Darcheville, O., Février, L., Haichar, F.Z., Berge, O., Martin-Garin, A., Renault, P., 2008. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 981-992.
- Dassonville, F., Godon, J.J., Renault, P., Richaume, A., Cambier, P., 2004. Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1417-1430.
- Doran, J.W., Alexander, M., 1977. Microbial transformations of selenium. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 31-37.
- Duc, M., Lefèvre, G., Fédoroff, M., 2006. Sorption of selenite ions on hematite. *Journal of Colloid and Interface Science* 298, 556-563.
- Dungan, R.S., Frankenberger Jr., W.T., 2000. Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1353-1358.
- Ferri, T., Sangiorgio, P., 2001. Selenium speciation in waters: Role of dissolved polysaccharides on the mobilization process. *Annali di Chimica* 91, 229-238.
- Février, L., Martin-Garin, A., Leclerc, E., 2007. Variation of the distribution coefficient (K_d) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity* 97, 189-205.

- Gao, S., Tanji, K.K., Scardaci, S.C., Chow, A.T., 2002. Comparison of redox indicators in a paddy soil during rice-growing season. *Soil Science Society of America Journal* 805-817.
- Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T., Buchanan, B.B., 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* 132, 199.
- Hassoun, B.S., Palmer, I.S., Dwivedi, C., 1995. Selenium detoxification by methylation. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 90, 133-142.
- Haudin, C.S., 2006. Conséquences de la variabilité spatiale et temporelle de l'anoxie sur le devenir du sélénium dans le sol. Thèse. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse,
- Hockin, S.L., Gadd, G.M., 2003. Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilm. *Applied and environmental microbiology* 69, 7063-7072.
- Kepner JR, R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews* 58, 603-615.
- Kessi, J., 2006. Enzymatic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Micobiology* 152, 731-743.
- Lee, C.-P., Jan, Y.-L., Wei, Y.-Y., Teng, S.-P., Hsu, C.-N., 2007. Anaerobic and aerobic sorption of cesium and selenium in mudrock. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 274, 145-151.
- Lortie, L., Gould, W., Rajan, S., McCready, R., Cheng, K., 1992. Reduction of Selenate and Selenite to Elemental Selenium by a *Pseudomonas stutzeri* Isolate. *Applied and environmental microbiology* 58, 4042-4044.
- Picek, T., Simek, M., Santruckova, H., 2000. Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. *Biology and Fertility of Soils* 31, 315-322.
- Reamer, D.C., Zoller, W.H., 1980. Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge. *Science* 208, 500-502.
- Roden, D.R., Tallman, D.E., 1982. Determination of inorganic selenium species in groundwaters containing organic interferences by chromatography and hybride generation/atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 54, 307.
- Roussel-Debet, S., Colle, C., 2005. Comportement de radionucléides (Cs, I, Sr, Se, Tc) dans le sol: proposition de valeurs de Kd par défaut. *Radioprotection* 40, 203-229.

- Runnells, D.D., Lindberg, R.D., 1990. Selenium in aqueous solutions: the impossibility of obtaining a meaningful Eh using a platinum electrode, with implications for modeling of natural waters. *Geology* 18, 212-215.
- Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R., Schink, B., 1998. A periplasmic and extracellular c-Type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *American Society of Microbiology* 3688-3691.
- Sposito, G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford University Press, New York, 277 p.
- Sunamura, M., Maryuama, A., Tsuji, T., Kurane, R., 2003. Spectral imaging detection and counting microbial cells in marine sediment. *Journal of microbiological methods* 53, 57-65.
- Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: Two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of Microbiology* 171, 19-30.
- Zhang, P., Sparks, D.L., 1990. Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at the goethite/water interface. *Environmental Science and Technology* 24, 1848-1858.
- Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality* 28, 1321-1326.

CHAPITRE V - DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact des paramètres géochimiques et microbiologiques d'un sol sur le Se (transformations, mobilité, cinétique des flux entre compartiments...). Plus particulièrement, il s'agissait de savoir quels paramètres affectaient la mobilité de cet élément. Cette étude visait à combler partiellement le manque de prise en compte des divers processus dans l'évaluation des impacts sanitaires, radiologiques ou chimiques liés au rejet de Se à l'état de trace dans un sol.

Pour cette étude, nous avons :

(1) effectué une synthèse de l'état de l'art en l'axant notamment (i) sur les effets des interactions entre composantes géochimique abiotique et microbiologique sur la mobilité du Se, et (ii) sur les réactions et transformations biotiques et abiotiques connues du Se ;

(2) mis au point une méthodologie expérimentale pluridisciplinaire pour remplir notre objectif de distinguer le rôle des composantes géochimique abiotique et microbiologique (activité bactérienne et/ou fongique) dans le contrôle du comportement du Se dans le sol ;

(3) réalisé deux séries d'incubations de sol, en système « batch », dans des conditions oxygènes et anoxiques, dans lesquelles nous avons suivi la distribution d'une contamination en Se.

Les incubations de sol ont été réalisées à partir d'un même échantillon de terre, provenant d'un sol sableux, prélevé autour de la centrale EDF de Creys-Malville (arrêtée depuis décembre 1998 et en cours de démantèlement). Le sol a été incubé, après avoir simulé une contamination en Se avec un apport de $0,4 \text{ mg Se.kg}^{-1}\text{sol sec}$, pour des durées allant de 1 h à 15 j, en conditions oxygène ou anoxique. Afin de pouvoir mesurer de très faibles quantités de Se, nous avons utilisé une solution de Se marquée au ^{75}Se (1000 Bq/ml). Pour chacune des conditions oxygène et anoxique, différentes incubations ont été réalisées sur du sol sans amendement organique (condition de référence) et après amendement pour stimuler les activités microbiennes bactériennes et/ou fongiques. Des incubations réalisées dans des conditions stériles (sol stérilisé par irradiation gamma) nous ont permis de différencier les processus biotiques des processus abiotiques.

Les différents systèmes obtenus ont été caractérisés par des mesures périodiques :

i. des paramètres géochimiques tel que le pH, le E_H , la composition de l'atmosphère gazeuse (O_2 , CO_2 , N_2 , N_2O , H_2 , CH_4), la composition de la solution (composés organiques et inorganiques) ; et

ii. des paramètres microbiologiques tels que la biomasse totale, la biomasse fongique, la densité bactérienne, la caractérisation de la structures des communautés bactériennes, le dénombrement de bactéries cultivables dénitrifiantes, fermentaires, SeO_3^{2-} -réductrices et FeIII-réductrices.

Ces mêmes systèmes ont fait l'objet de caractérisations fines des flux de Se entre phases liquide, solide et gazeuse. Concrètement :

- en phase gazeuse, nous avons mesuré la fraction de Se volatilisée,
- en phase liquide, nous avons mesuré les cinétiques d'immobilisation du Se et nous avons suivi les évolutions de Se soluble ($< 0,22 \mu m$) ou contenu dans la fraction supérieure à $0,22 \mu m$ (fraction colloïdale). Pour le Se soluble ($< 0,22 \mu m$), nous avons estimé sommairement la spéciation du Se par une mesure plus spécifique de la quantité de Se(IV) ;
- en phase solide, la quantité de Se immobilisé a été déduite des mesures de Se total dans le surnageant des batchs. La distribution du Se au sein dans la phase solide a été obtenue par des extractions séquentielles selon le protocole de Coppin et al. (2006) qui distingue quatre fractions avec dans l'ordre d'extraction : le Se(IV) échangeable avec HPO_4^{2-} , le Se lié à la matière organique et/ou aux oxydes métalliques (non extrait avec le pool précédent), le Se élémentaire Se(0), et le Se résiduel non extrait dans les pools précédents. Nous avons également quantifié la fraction de Se associé à la biomasse.

1. Rappels des principaux résultats

1.1 En condition stérile

Alors que nous nous attendions à ce que le sol étudié soit peu réactif vis-à-vis du Se car il est composé à plus de 70% de quartz, les résultats montrent que ce sont principalement des processus abiotiques qui contribuent à la rétention du Se sur la phase solide (51% de rétention en condition oxygène et 84% en condition anoxique). Alors que les quantités retenues sont différentes, la distribution du Se en phase solide s'est avérée identique en condition oxygène et anoxique à tous les temps étudiés. En effet, avec l'échantillon de sol stérile, la présence ou l'absence d' O_2 dans le milieu n'a pas engendré de modifications affectant les

paramètres géochimiques du sol tels que le pH ou le E_H , ce qui peut expliquer l'analogie des résultats dans la distribution en phase solide entre ces conditions.

D'un point de vue quantitatif, la rétention abiotique du Se s'est avérée rapide : le taux maximal retenu par le sol stérile est atteint dès la 1^{ère} heure de contact. En revanche, d'un point de vue qualitatif, une évolution temporelle de la distribution du Se au sein des différents pools a été constatée. Pour des temps courts (1 h), le Se était retenu principalement par des mécanismes d'adsorption surfacique (80 % de Se échangeable), les 20 % restant de Se immobilisé pouvant être attribués soit à un manque d'efficacité de l'extraction aux phosphates (une seule étape, non répétée), soit à un mécanisme de rétention autre que de l'adsorption de surface, montrant que la rétention du Se peut être un processus complexe. En effet, ces 20 % de Se restant sont retrouvés principalement dans la fraction 2 (extraite à NaOH). Cette fraction représente théoriquement le Se lié à la matière organique et/ou aux oxydes de métalliques, par un mécanisme autre qu'une adsorption de surface et indépendamment de son degré d'oxydoréduction. Cette distribution initiale évolue ensuite en faveur d'une plus forte rétention du Se dans le sol. Cela se traduit par une diminution de 80 à 45 % de la fraction échangeable au profit des autres fractions. La rétention du Se dans le sol étudié apparaît donc comme un mécanisme en deux temps, y compris pour des conditions purement abiotiques. Tout d'abord une adsorption de surface, puis une évolution de cette fraction Se adsorbée vers une forme plus fortement liée avec les particules de sol, soit par diffusion soit par la formation d'un complexe de sphère interne non échangeable avec les phosphates.

1.2 En conditions non stériles

Que ce soit en conditions oxiques ou anoxiques, nous n'avons relevé aucun effet toxique du ^{75}Se sur la production de CO_2 , ni d'effet sur la structure des communautés bactériennes. La concentration en sélénite utilisée ($0,4 \text{ mg Se.kg}^{-1}\text{sol sec}$) ne se situait pas dans la gamme des concentrations toxiques pour les microorganismes. Pareillement, Haudin (2006) et Février et al. (2007) n'avaient observé aucune modification sur les activités respiratoires aérobies d'un sol lors de l'incubation avec des concentrations en sélénite plus importantes, allant jusqu'à $5 \text{ mg Se.kg}^{-1}\text{sol sec}$

La réactivité du Se dans un sol « non stérile » dépend des microorganismes présents et de leurs activités. La méthodologie mise en place nous a permis (i) de caractériser au mieux les différents états microbiologiques obtenus dans les différentes incubations et (ii)

d'identifier les processus majeurs gouvernant la mobilité du Se dans chacune des incubations, oxiques et anoxiques.

1.2.1 Incubations en conditions oxiques

Le sol étudié se caractérise par une biomasse qui se situe parmi les valeurs basses de la littérature ($< 100 \mu\text{g C/g sol sec}$) (Badalucco et al., 1997 ; Schutter et Dick, 2001). Ce résultat était attendu car le sol est sableux et relativement pauvre en matière organique et en minéraux argileux, ces compartiments étant connus pour être des « habitats » préférentiels de la microflore du sol. Cette biomasse est composée à environ 70 % de champignons. Différentes populations bactériennes ont été identifiées comme faisant partie des phylums des *bacteroidetes* et des *Verrumicrobia*, espèces ayant déjà été identifiées dans des échantillons de sol.

Différentes activités microbiennes ont pu alors être stimulées par l'ajout de 2 amendements carbonés différents : la cellulose et le glucose. Ces composés ont engendré une augmentation de la biomasse et de la respiration différemment : ainsi, la production de CO_2 était multipliée respectivement par 5 et 16 suite à l'apport de cellulose et glucose. De manière qualitative, le développement de populations bactériennes a été spécifique à chacun de ces deux amendements. Afin de différencier les rôles des processus bactériens et des processus fongiques vis-à-vis du comportement du Se, des expérimentations avec amendement glucose et ajout d'un bactéricide ou d'un fongicide ont été effectuées. Les résultats obtenus ont été interprétés avec prudence car l'utilisation d'un bactéricide ou d'un fongicide ne permet pas d'exclure totalement les microorganismes ciblés. Les résultats ont montré que l'antibactérien a été efficace au début de l'incubation (\leq à 3 jours) : une forte augmentation du compartiment fongique ($\times 7$) était observée après 6 j d'incubation mais, au delà du 3^{ème} jour d'incubation, des populations bactériennes du genre *Paenibacillus*, résistantes à l'antibactérien, se sont développées dans le système. L'effet de l'antifongique sur les microorganismes du sol a été visible durant les deux premiers jours de l'incubation. Tout comme dans la condition avec amendement glucose, le glucose a permis à des bactéries du genre *Flavobacterium* de se développer préférentiellement et l'antifongique a permis à d'autres populations bactériennes de se développer dans le milieu, certainement due à la levée de quelques compétiteurs fongiques (et/ou bactériens, en moindre mesure).

Dans ces conditions oxiques, la non-stérilité du système induisait une diminution de la mobilité du Se (par rapport aux conditions stériles). Par ailleurs, les cinétiques

d'immobilisation du Se sont corrélées aux vitesses de développement des microorganismes. Ainsi dans la condition sans stimulation microbienne, 69 % du Se est retenu par la phase solide après 10 jours d'incubation. La valeur de Se retenu augmente à 95 % dès 2 jours d'incubation en présence de glucose et un équilibre entre phase liquide et solide semble atteint. Le pool bactérien semble avoir été le principal acteur de cette augmentation. Toutefois, toutes les populations bactériennes ne contribuent pas nécessairement à la rétention du Se puisque des populations bactériennes du genre *Paenibacillus* se sont développées dans la condition avec antibactérien et n'ont pas engendrées d'augmentation de rétention du Se sur la phase solide.

Tout comme en condition stérile, une redistribution du Se au sein des différents composants de la phase solide est observée, allant vers une plus forte rétention (diminution de la fraction de Se échangeable). Alors que pour un sol non amendé en C organique, la redistribution du Se dans la phase solide est proche de celles observées pour les conditions stériles, elle est beaucoup plus importante dans les conditions amendées (diminution de 80 à 25 % de la fraction échangeable). Ce résultat montre ainsi l'importance de la nature des microorganismes dans les processus de rétention du Se. Tout comme la rétention sur la phase solide, le développement du pool bactérien semble être à l'origine de l'augmentation de la force de rétention du Se au sein de la phase solide.

Deux autres processus ont pu être mis en évidence. Ces processus résultent tous deux de réactions directes entre Se et microorganismes et conduisent cette fois-ci à une augmentation de la mobilité du Se dans le sol.

- Dans les conditions expérimentales où le compartiment bactérien a été favorisé, nous avons mesuré du Se de taille colloïdale ($> 0.22 \mu\text{m}$). La réduction abiotique du Se étant peu probable dans nos conditions oxygènes, ce résultat peut être interprété comme une preuve d'interaction directe Se-bactéries. Deux hypothèses peuvent expliquer ce constat : il peut s'agir de granules de Se(0) expulsées de la cellule bactérienne suite à une réduction (Garbisu et al., 1996 ; Oremland et al., 2004), ou de Se incorporé dans les bactéries (Garbisu et al., 1996). Malheureusement, la concentration de Se utilisée dans cette étude est trop faible pour permettre l'utilisation de techniques microscopiques ou spectroscopiques qui permettraient d'identifier la nature du Se colloïdal. Néanmoins, nous avons pu mesurer une fraction de sélénium associée à la biomasse. Elle atteint plus de 3 % du sélénium total pour un sol amendé en glucose. Dans toutes les conditions, la quantité de sélénium associée à la biomasse tend à diminuer avec le temps. Contrairement à l'étude de Chabrouillet (2007), nous n'avons pas pu corréler cette quantité à la quantité totale de microorganismes présents. Les

expériences avec bactéricide et fongicide, nous laissent fortement supposer que le sélénium est plutôt associé à la biomasse bactérienne plutôt qu'à la biomasse fongique. Le Se sous forme colloïdal et le Se lié aux bactéries se trouve dans la fraction soluble, et peut, à ce titre, être transporté avec la phase liquide vers les horizons de sol plus profonds et la nappe phréatique.

- L'autre processus mis en évidence est la volatilisation du sélénium conduisant ainsi à une dissémination possible du sélénium hors du système sol. Les résultats montrent qu'à la fois bactéries et champignons sont capables de volatiliser le Se. Toutefois, les quantités de sélénium volatilisé sont faibles, de l'ordre de 0,02 ‰ au 6^{ème} jour d'incubation pour une condition non amendée. Néanmoins, compte tenu de notre design expérimental, une sous-estimation de la volatilisation du sélénium est possible car une part importante du Se volatilisé a pu être piégée en phase liquide car le DMSe est une espèce très soluble (Zhang et Frankenberger Jr, 1999). De plus les quantités volatilisées sont totalement dépendantes des microorganismes présents. Le compartiment fongique, lorsqu'il est favorisé, est un important producteur de Se volatil (de l'ordre de 0,16 ‰ au 6^{ème} jour d'incubation).

1.2.2 Incubations en conditions anoxiques

En condition anoxique, nous avons supposé que la biomasse est majoritairement bactérienne et donc nous avons négligé le compartiment fongique (Prescott et al., 2003). Les dénombrements bactériens du sol brut ont montré la présence de bactéries fermentaires ($2,9 \times 10^4$ bactéries. g^{-1} sol) et dénitrifiantes ($1,7 \times 10^5$ bactéries. g^{-1} sol). Malheureusement, l'identification des populations bactériennes ciblées dans la structure des communautés bactériennes n'a pas été possible. D'autre part, le potentiel d'oxydo-réduction du sol s'est maintenu à une valeur oxydante (360 mV) durant toute la durée d'incubation témoignant d'une matière organique du sol (< 1 %) pas suffisamment disponible pour permettre des processus métaboliques respiratoires.

Contrairement aux conditions oxydantes, un seul amendement a été utilisé en condition anoxique, le glucose. Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier l'enchaînement des processus métaboliques liés à la dégradation du glucose. Dans un second temps, nous avons injecté le Se à différents moments de l'incubation (au début de l'incubation, à 2j, 6j et 10j) correspondant à la présence des différentes activités métaboliques afin d'étudier leur effet spécifique sur les transformations du Se.

L'enchaînement de processus métaboliques liés à la dégradation du glucose a pu être clairement identifié dans le temps. Liés à la solution nutritive (glucose, NO_3NH_4 et K_2SO_4), les processus de dénitrification et de fermentation sont prépondérants au début de l'incubation (0 et 4 jours). Ils expliquent respectivement la disparition des nitrates durant les deux premiers jours et la formation d'éthanol, d'acétate et de formiate jusqu'au 4^{ème} jour. La lyse du formiate n'est pas instantanée et se déroule entre le 4^{ème} et le 8^{ème} jour de l'incubation, produisant du CO_2 et de l' H_2 dans l'atmosphère du batch. L'acétogénèse vraie débute au 4^{ème} jour de l'incubation et continue jusqu'à la fin de l'incubation (15 jours). Elle engendre une diminution d'éthanol et de butyrate ainsi qu'une importante production d'acétate et d' H_2 . La réduction du fer ne joue qu'un rôle mineur dans l'enchaînement des processus, ne mobilisant au maximum que $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de fer entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour d'incubation. L'homocétogénèse se déroule dans le système entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour d'incubation. Elle explique la disparition de l' H_2 et contribue à la production d'acétate. La méthanogénèse et la sulfato-réduction n'ont pas été détectées durant les 15 jours d'incubation.

La production de CO_2 et la production d'acides organiques ont engendré une acidification du système à partir du 3^{ème} jour d'incubation (diminution du pH de 7,7 à 6,5). Les différents processus métaboliques ont conduit à la production d'espèces réductrices dans le milieu modifiant ainsi le E_H du système. Trois couples semblent réguler l'état d'oxydo-réduction du système : entre 0 et 3 jours, le couple $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ à 360 mV, puis le couple H_2/H^+ entre le 3^{ème} et le 8^{ème} jour à -280 mV et enfin le couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ à 220 mV entre le 8^{ème} jour et la fin de l'incubation.

Contrairement aux conditions oxygènes, la présence des microorganismes dans le sol brut n'a pas contribué à une augmentation de la quantité de sélénium retenue. Ce résultat peut être expliqué par une rétention abiotique sur sol stérile proche de la quantité maximale de rétention du sol ($89 \pm 1 \%$). Pour le sol brut, la redistribution du Se au sein des différents composants de la phase solide est identique aux conditions stériles. La stimulation des activités bactériennes par l'ajout de glucose n'a pas engendré de différence significative sur la quantité de Se retenue en phase solide, mais a engendré une redistribution en phase solide plus rapide, et a contribué à une plus forte augmentation de la force de rétention au sein de la phase solide (diminution de la fraction échangeable avec les phosphates de 59 % durant les 15 jours d'incubation).

En conditions anoxiques amendées, nous avons mesuré une diminution de la quantité de Se(IV) en solution. Nous avons alors supposé qu'une réduction bactérienne de Se(IV) en Se(0) avait lieu. En effet, une réduction abiotique semble peu probable compte tenu de la

durée d'expérimentation (15 jours) trop courte, même en conditions très réductrices (-280 mV) et en présence de Fe^{2+} en solution. Néanmoins, celle-ci ne peut pas être totalement exclue. Contrairement à ce qui était attendu, il n'y a pas eu de production plus importante de Se(0) (détectable par les extractions séquentielles) par rapport aux conditions oxygènes. Les quantités de Se extraites avec Na_2SO_3 ne dépassent pas 5 % et aucune production de Se colloïdal n'a été observée.

La volatilisation du Se est souvent négligée en anoxie (Doran et Alexander, 1977 ; Zhang et Frankenberger Jr, 1999 ; Haudin, 2006), bien qu'elle ait déjà été observée dans des sols incubés sous N_2 (Reamer et Zoller, 1980). De plus, ce processus est souvent assimilé à un mécanisme de détoxication. Dans toutes nos conditions non stériles, nous avons mesuré une production de Se volatil. Cette quantité est toutefois inférieure aux quantités mesurées en conditions oxygènes (0,009 ‰ cumulé au 10^{ème} jour d'incubation contre 0,3 ‰ avec un amendement cellulose). La stimulation des activités bactériennes n'a pas augmenté la production de Se volatil. D'autre part, des expérimentations complémentaires (effectuée lors du stage d'Astrid Calamel) ont montré que la ré-oxygénation d'un sol brut, incubé en condition anoxique, stoppe la production de Se volatil, suggérant ainsi l'intervention de bactéries anaérobies strictes dans le processus de volatilisation en condition anoxique.

Dans les conditions amendées, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet plus marqué des activités microbiennes stimulées sur la rétention du Se, sa distribution au sein des composants de la phase solide ou sa volatilisation, et ce pour les différents processus métaboliques spécifiques qui ont été ciblés (injections différées du Se).

2. Discussion sur la méthodologie et les résultats obtenus

2.1 Méthodologie

Généralement, il existe principalement deux types d'approches dans les études de la mobilité d'un élément dans un sol : soit les composantes du sol sont étudiées séparément, soit le sol est étudié dans toute sa complexité. Dans le premier cas, que ce soit sur les composantes microbiologiques (cultures de bactéries, champignons...) ou géochimiques (phases minérales et organiques), ces études visent à appréhender des mécanismes très fins en terme de réactivité tel que les processus de réduction et/ou de volatilisation pour les microorganismes (Garbisu, 1996 ; Frankenberger Jr et Karlson, 1994 ; Ranjard et al., 2002) ou les processus de sorption pour les phases solides (Bar-Yosef et Meek, 1987 ; Zhang et Sparks, 1990 ; Jacquier et al., 2001). Dans le second cas, la réactivité du Se est étudiée d'un point de vue macroscopique (isothermes, Kd), au détriment quasi-total des processus microbiologiques

intervenant. Dans le cas des radionucléides (Koch-Steindl et Pröhl, 2001 ; Ashworth et al., 2008 ; Um et Serne, 1993), uniquement les paramètres physico-chimiques tels le E_H , le pH, la teneur en eau et les teneurs en phases minérales et organiques sont considérés pour évaluer la mobilité de ces éléments dans les sols.

Dans notre étude, nous avons voulu étudier la mobilité d'un élément, le Se, dans un sol dans sa globalité. Ce que nous avons cherché à apporter en plus par rapport à toutes les études déjà existantes, c'est la prise en compte simultanée des composantes géochimiques et microbiologiques du sol, pas seulement d'un point de vue macroscopique, mais de les identifier et de les nommer, quand cela était possible. Ainsi, nous avons développé une méthodologie expérimentale pluridisciplinaire avec des outils géochimiques (mesure de E_H , pH, analyse de gaz et de solutions...) et microbiologiques (dynamique de croissance de biomasses spécifiques, caractérisation des communautés bactériennes et identification des populations, identification des processus métaboliques...) nous permettant d'identifier les différents paramètres impliqués. Toute la difficulté de cette étude pluridisciplinaire a été de manier différents domaines mais aussi différentes échelles d'approches.

A titre d'exemple, la méthodologie mise en place nous a permis, dans un premier temps, de contraindre le sol d'étude dans différents états où nous avons fait varier les paramètres géochimiques et/ou microbiologiques tout en les identifiant. Nous avons ainsi montré que la mobilité du Se dans un sol est majoritairement contrôlée par des processus géochimiques. Par ailleurs, la méthodologie complète nous a permis des observations précises : les processus microbiologiques ont un rôle sur la spéciation du Se en solution et donc sa mobilité. En conditions oxygènes, les bactéries sont responsables de la formation de Se colloïdal. En conditions anoxiques, le Se(IV) en solution diminue, probablement réduit en Se(0) sous l'action des bactéries. Ainsi, ce n'est plus forcément du Se(IV) qui rentre en contact avec les couches de sol sous-jacente au point de contamination. De plus, alors qu'en conditions oxygènes, nous avons mis en évidence que la réactivité du Se était fonction des microorganismes présents, en conditions anoxiques, les différentes activités bactériennes ciblées (dénitrification, fermentation, réduction du fer, homoacétogénèse et acétogénèse vraie), impliquant différentes populations bactériennes, n'ont pas eu d'effets significatifs sur le comportement du Se.

Cette méthodologie peut donc être appliquée en routine au laboratoire pour d'autres éléments dont la mobilité est sensible au E_H mais aussi aux activités microbiennes tels que Tc, U, Cr, As, Sr, I, Cd... (Um et Serne, 1993 ; Koch-Steindl et Pröhl, 2001 ; Ishii et al, 2004 ; Wang and Stauton, 2005 ; Ashworth et Shaw, 2006 ; Ashworth et al., 2008).

2.2 Système batch

Parmi les objectifs de cette étude, nous souhaitons aboutir à une meilleure compréhension des processus géochimiques et microbiologiques affectant la mobilité du Se dans un sol. Nous avons alors fait le choix de nous placer dans un système batch. Ce système nous paraissait le plus approprié car il nous permettait de:

- travailler sur des systèmes homogènes, nous permettant de négliger les gradients de concentration en gaz et solutions,
- réaliser des calculs de bilans pour faciliter l'identification des processus microbiologiques,
- caractériser des cinétiques réactionnelles,
- et effectuer un grand nombre d'expérimentations.

Néanmoins, Ashworth et Shaw (2006) ont montré toutes les limites et incertitudes associées à l'utilisation d'un système batch pour l'étude de la mobilité des contaminant dans les sols (Kd). Tout d'abord, le système batch nécessite un excès de solution ce qui n'est pas représentatif d'une véritable solution de sol. Puis, les cinétiques « courtes » des études en batch ne sont pas toujours suffisantes permettre aux réactions de s'effectuer.

De plus, le système batch a entraîné des artefacts non désirés tel que :

- l'accumulation de CO₂, qui dans nos conditions entraine une diminution du pH (Stumm et Morgan, 1996) non négligeable car la rétention du Se est pH-dépendante. Cet artefact a pu être atténué en condition oxygène grâce au renouvellement de l'atmosphère des batchs.
- l'accumulation de H₂ qui peut temporairement inhiber des réactions comme par exemple les réactions d'acétogénèse (Dolfing, 1988).
- l'agitation et la suspension des microorganismes susceptible de perturber les fonctions microbiennes.
- la dissolution du DMS_e, espèce volatile du Se majoritaire, en phase aqueuse entraînant une sous-estimation des quantités volatilisées.

2.3 Caractérisation du compartiment bactérien

En condition anoxique, nous avons identifié les processus métaboliques majoritaires engendrés par la dégradation du glucose. Nous souhaitons associer à ces processus des dynamiques fonctionnelles et des populations bactériennes.

Les dynamiques fonctionnelles ont été étudiées par la technique d'estimation statistique du Nombre le Plus Probable (NPP). Cette méthode comporte des limitations intrinsèques (Tate, 1995), dont nous avons conscience :

- la variabilité due à la précision des procédures de dilution ;
- la capacité de croissance des microorganismes durant l'incubation ;
- la sélectivité des milieux de culture plus ou moins restrictive.

De plus, moins de 1 % des bactéries du sol sont cultivables sur des milieux de culture artificiels. Cette méthode nous a tout de même permis d'obtenir des tendances dans les dynamiques fonctionnelles coïncidant avec les processus métaboliques identifiés.

Nous avons également pu bénéficier d'une technique de microbiologie moléculaire pour obtenir la structure des communautés bactériennes à partir d'un fragment du gène codant pour l'ARN16S extrait d'un échantillon de sol. Nous avons ainsi obtenu un profil de bandes, où l'on considère couramment qu'une bande représente une population bactérienne majoritaire du système et l'intensité relative de chaque bande représente l'abondance relative de cette population particulière dans la structure de communauté. Afin de relier les processus identifiés à des populations bactériennes, un certain nombre de bandes (les plus intenses) ont été séquencées. Malheureusement, cette technique ne donne qu'une information semi-qualitative et comporte quelques artefacts :

- seules les communautés bactériennes majoritaires du système sont détectées (Muyzer et al., 1993) ;
- due à la complexité des communautés bactériennes d'un sol, l'ADNr 16S de plusieurs populations bactériennes peut être compris dans une seule bande large, appelée « smear » (Nakatsu et al., 2000) et inversement, une population bactérienne peut être représentée par plusieurs bandes (Ueno et al., 2001).

Ainsi, à cause d'un regroupement trop important de populations bactériennes sous une seule bande, l'identification des populations bactériennes en conditions anoxiques n'a pas été possible.

La méthode du « clonage-séquençage » (Talbot et al., 2008) nous aurait permis d'éviter ce genre d'inconvénient, mais plus coûteuse en temps et en matériel, elle ne garantissait pas non plus l'identification des populations responsables des processus métaboliques identifiés. Les avancées récentes dans le domaine des méthodes moléculaires tentent de cibler des gènes

fonctionnels (Talbot et al., 2008), mais ces méthodes restent encore limitées par la spécificité taxonomique des sondes.

2.4 Etude d'un élément à l'état de trace

Un des intérêts de notre travail était l'étude du Se à l'état de trace dans un sol. Pour pouvoir accéder à de faibles concentrations en Se, l'utilisation de l'isotope radioactif ^{75}Se était indispensable. Toutefois, l'utilisation d'un isotope radioactif amène aussi quelques contraintes. Dans nos expérimentations, le ^{75}Se utilisé en conditions oxiques et anoxiques n'était pas issu de la même source. La source de sélénite utilisée pour les conditions oxiques était plus ancienne (7 mois) que celle utilisée pour les conditions anoxiques, utilisée immédiatement après réception. Bien que l'état d'oxydation de la solution de sélénite (stable + ^{75}Se) ait été vérifié par spectrométrie d'adsorption atomique couplé à une génération d'hydrure (GH-AAS) dans des « blancs » (batch sans sol) pour les conditions oxiques et anoxiques, un faible pourcentage d'oxydation du $^{75}\text{Se(IV)}$ en $^{75}\text{Se(VI)}$, en deçà du seuil de détection de la spectrométrie d'adsorption atomique ne peut être totalement exclu. Ceci expliquerait alors la différence de rétention du sélénium entre les conditions oxiques et anoxiques.

L'utilisation de Se à l'état de trace nous a également limité dans le choix des outils expérimentaux. Des méthodes spectroscopiques ou microscopiques permettent d'accéder aux différents états d'oxydation du Se directement dans l'échantillon solide ou aux différents types de complexes formés entre la phase solide et le Se, mais ces techniques nécessitent de fortes concentrations en Se ($> 10 \text{ mg.kg}^{-1}$). Aussi, nous avons utilisé la technique des extractions chimiques séquentielles pour accéder à la distribution du Se en phase solide. Les extractions chimiques (séquentielles ou parallèles) sont souvent critiquées pour leur manque de sensibilité mais surtout leur manque de sélectivité. De plus, nous sommes entièrement conscients que par cette technique, nous n'avons pas accès aux mécanismes géochimiques au sens strict, mais uniquement à une répartition possible du Se au sein des différents composants de la phase solide.

La faible concentration de Se utilisée dans cette étude n'a pas non plus permis d'accéder à tous les processus microbiologiques, comme par exemple l'utilisation de techniques microscopiques ou spectroscopiques pour valider ou non l'hypothèse de réduction du Se(IV) en Se(0) par l'observation de granules de Se(0) (Garbisu et al., 1996).

Au final, en étudiant le Se à l'état de trace, nous avons pu obtenir au mieux des corrélations entre les paramètres géochimiques d'un sol donné et la rétention du Se, entre le développement de biomasses et les cinétiques de réaction du Se, ou encore des tendances à l'immobilisation du Se dans le sol ou au contraire à la dispersion par la volatilisation.

Toutefois, il est, aujourd'hui encore, très difficile de caractériser et de différencier des processus tout en restant réaliste, c'est-à-dire sans découpler les différents composants, biotiques et abiotiques, du sol. En effet, les études portant sur la réactivité du Se sur les phases minérales pures d'un sol ou en culture bactérienne isolée apportent des éléments pour la compréhension des mécanismes, mais ne correspondent en aucun cas à un milieu réaliste, contenant de nombreuses interactions.

3. Perspectives

Tous ces résultats ouvrent à de nombreuses perspectives d'études :

- Les processus abiotiques observés dans cette étude sont caractéristiques du sol étudié. Ainsi l'étude de la réactivité du Se pour d'autres types de sols avec des propriétés physico-chimiques différentes permettrait de confirmer, ou non, les tendances observées ici. Des études menées au LRE sur d'autres sols agricoles ont montrés des tendances similaires (Chabrouillet, 2007 ; Février et al., 2007)

- Nous avons vu que d'un point de vue macroscopique, pour le sol brut, les conditions d'oxydo-réduction du sol n'étaient pas fortement différentes entre les incubations anoxiques et oxiques. Aussi, nous nous sommes demandés si l'aération d'un sol incubé en condition anoxique engendrerait une remobilisation du Se. Cette étude a été réalisée avec du sol brut, sans amendement, par Astrid Calamel lors d'un stage effectué dans notre laboratoire. Les résultats n'ont pas montré de désorption du Se vers la solution du sol suite à l'aération du sol. Une perspective à ce travail pourrait être d'exacerber les conditions de pré-incubation anoxique, par l'ajout d'un amendement glucosé car nous avons vu que la stimulation des microorganismes engendre à la fois un état géochimique plus réduit et une plus forte rétention du Se au sein de la phase solide.

- L'étude de l'autre forme soluble du Se, le Se(VI) connu pour être beaucoup plus mobile dans un sol, est inévitable pour une caractérisation plus complète de la réactivité du Se dans un sol. En effet, le Se(VI) ne s'adsorbe pas ou très peu sur les composants de la phase solide (Neal et Sposito, 1989), mais il existe une possibilité de réduction en Se(IV) et

d'interaction directe avec les bactéries. Quelles sont ces cinétiques de réaction ? Nous savons également que les bactéries qui réduisent le Se(IV) ne sont pas nécessairement les mêmes que celles qui réduisent le Se(VI) (Lloyd et al., 2002). Quel impact cela aura-t-il sur les processus biotiques ? Le compartiment fongique a-t-il la même capacité à volatiliser le Se(VI) que le Se(IV) ?

- La réalisation d'expérimentations sur colonnes de sol, apporterait un complément d'informations sur la mobilité du Se dans un milieu plus représentatif du milieu naturel avec des variations hydriques, des micro-niches anoxiques, la proximité de différentes populations microbiennes ...

- Enfin tous les résultats obtenus dans cette étude pourront contribuer à l'amélioration des modèles radioécologiques couramment utilisés pour décrire le devenir du Se dans les sols et pour évaluer ses impacts sanitaires, radiologiques et chimiques. En effet, ces modèles sont basés essentiellement sur des lois mathématiques simples modélisant un équilibre entre les composants du système, par exemple, dans notre cas, entre phase solide du sol et solution du sol, par le coefficient de distribution, K_d . La formulation du K_d repose sur un certain nombre d'hypothèses dont la notion d'équilibre et des phénomènes de sorption/désorption instantanés et réversibles. Or, nos résultats ont montré qu'il est important de tenir compte de la cinétique dans les processus de rétention du Se et de distribution au sein des différents composants de la phase solide. De plus, même si la réversibilité des réactions n'a pas été directement étudiée dans nos expérimentations, nos résultats ont montré qu'il existe une évolution du Se au sein des différents composants de la phase solide, allant dans le sens d'une immobilisation du Se. Ces résultats suggèrent alors une certaine irréversibilité des processus de sorption. De plus, nos résultats ont montré qu'une partie du Se pouvait être volatilisée. Or, ce processus n'est jamais pris en compte dans les modèles radiologiques, peut être parce que les quantités volatilisées sont relativement faibles et ne modifient pas l'équilibre solide/liquide. Néanmoins, ce processus de volatilisation contribue à une dispersion du Se dans l'environnement, et ceci peut avoir des conséquences sanitaires et radiologiques importantes dans le cas de Se radioactif (^{79}Se ou ^{75}Se).

Tous nos résultats sont en accord avec ceux d'Ashworth et al. (2008), qui ont montré dans une étude récente, en colonne de sol, que les interactions entre la teneur en eau, le potentiel d'oxydo-réduction et la spéciation du Se doivent être considérées pour la modélisation du transport et du devenir du Se dans l'environnement.

4. Références

- Ashworth, D.J., Moore, J., Shaw, G., 2008. Effects of soil type, moisture content, redox potential and methyl bromide fumigation on Kd values of radio-Selenium in soil. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 1136-1142.
- Ashworth, D.J., Shaw, G., 2006. Effects of moisture content and redox potential on in situ Kd values for radio-iodine in soil. *Science of the Total Environment* 359, 244-254.
- Badalucco, L., De Cesare, F., Grego, S., Landi, L., Nannipieri, P., 1997. Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1135-1142.
- Bar-Yosef, B., Meek, D., 1987. Selenium adsorption by kaolinite and montmorillonite. *Soil Science* 144, 11-19.
- Chabroulet, C., 2007. Etude de la remobilisation d'éléments traces à partir d'un sol de surface contaminé: Influence du vieillissement des composés organiques du sol sur la remobilisation du sélénium. Thèse. Université Joseph Fourier - Grenoble I,
- Coppin, F., Chabroulet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J., 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* 42, 379-386.
- Dolfing, J., 1988. Acetogenesis. *Biology of anaerobic microorganisms*, John Wiley & Sons: 417-469.
- Doran, J.W., Alexander, M., 1977. Microbial transformations of selenium. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 31-37.
- Février, L., Martin-Garin, A., Leclerc, E., 2007. Variation of the distribution coefficient (Kd) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity* 97, 189-205.
- Frankenberger Jr, W.T., Karlson, U., 1994. Soil management factors affecting volatilization of selenium from dewatered sediments. *Geomicrobiology Journal* 12, 265-278.
- Garbisu, T., Ishii, T., Leighton, B.B., Buchanan, , 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* 132, 199-204.
- Haudin, C.S., 2006. Conséquences de la variabilité spatiale et temporelle de l'anoxie sur le devenir du sélénium dans le sol. Thèse. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse,

- Ishii, N., Tagami, K., Enomoto, S., Uchida, S., 2004. Influence of microorganisms on the behavior of technetium and other elements in paddy soil surface water. *Journal of Environmental Radioactivity* 77, 369-380.
- Jacquier, P., Meier, P., Ly, J., 2001. Adsorption of radioelements on mixtures of minerals - Experimental study. *Applied Geochemistry* 16, 85-93.
- Koch-Steindl, H., Prohl, G., 2001. Considerations on the behaviour of long-lived radionuclides in the soil. *Radiation and Environmental Biophysics* 40, 93-104.
- Lloyd, J.R., Chesnes, J., Glasauer, S., Bunker, D.J., Livens, F.R., Lovley, D.R., 2002. Reduction of actinides and fission products by Fe(III)-reducing bacteria. *Geomicrobiology Journal* 19, 103-120.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V., Ovreas, L., 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1382.
- Neal, R.H., Sposito, G., 1989. Selenate adsorption on alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* 53, 70-74.
- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S., 2004. Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 52-60.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*. DeBoeck & Larcier, Bruxelles.
- Ranjard, L., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S., Cournoyer, B., 2002. Methylation of inorganic and organic selenium by the bacterial thiopurine methyltransferase. *Journal of Bacteriology* 184, 3146-3149.
- Reamer, D.C., Zoller, W.H., 1980. Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge. *Science* 208, 500-502.
- Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1481-1491.
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1996. *Aquatic Chemistry; Chemical equilibria and rates in natural waters*. John Wiley & sons, Inc., New York.

- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Massé, D.I., 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* 42, 513-537.
- Tate, L.R., 1995. *Soil microbiology*. John Wiley & sons, Inc., New York.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y., 2001. Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 65-68
- Um, W., Serne, R.J., 2005. Sorption and transport behavior of radionuclides in the proposed low-level radioactive waste disposal facility at the Hanford site, Washington. *Radiochimica Acta* 93, 57-63.
- Wang, G., Staunton, S., 2005. Evolution of Sr distribution coefficient as a function of time, incubation conditions and measurement technique. *Journal of Environmental Radioactivity* 81, 173-185.
- Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality* 28, 1321-1326.
- Zhang, P., Sparks, D.L., 1990. Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at the goethite/water interface. *Environmental Science and Technology* 24, 1848-1858.

ANNEXE I – Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states

Article accepté dans la revue *Journal of Environmental Radioactivity* :

O. Darcheville, L. Février, F.Z. Haichar, O. Berge, A. Martin-Garin, P. Renault, 2008, Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states, *Journal of Environmental Radioactivity* 9, 981-992

Abstract

The aim of this study was to investigate the role of microorganisms on the behaviour of selenium in natural soil maintained under strictly aerobic conditions. Six-day batch experiments were performed with soils constrained to different microbiological states, either by sterilisation or by adding organic substrates. Selenium was added to the soil as selenite. The distribution of selenium in the gaseous, liquid and solid phases of the batch was measured. Selenium partitioning between the various solid phases was investigated by chemical sequential extractions. Active microorganisms played major effects on the distribution of selenium within the soil. On the one hand, microorganisms could promote selenium volatilisation (in relatively small amounts), leading to the spreading of selenium compounds outside the soil. On the other hand, microbial activities increased both amount of selenium retained by the soil and the strength of its retention (less exchangeable selenium), making selenium less susceptible to remobilisation.

Keywords: selenium, soil, volatilisation, sequential extraction, solid-liquid distribution, bacterial community structure, biotransformation

1. Introduction

Selenium is an essential trace element for living organisms but it becomes rapidly toxic since its concentration range between deficiency and toxicity is very narrow (Barceloux, 1999). Its long-lived radio-isotope ^{79}Se (half-life 3.77×10^5 years) (Bienvenu et al., 2007) is found in nuclear wastes that may be buried, in the future, in deep geological formations (ANDRA, 2005). The assessment of environmental radiological and chemical risk associated to selenium input in soils requires a good understanding of its behaviour and more specifically of its distribution among the different components of a soil (gaseous, liquid, and solid phases, plus organic and inorganic fractions).

Selenium speciation in soil depends on numerous factors, such as pH, E_H , and soil solution composition, that are controlled by soil mineralogy and soil microbial activities. Selenium exists in four oxidation states - selenate (+VI), selenite (+IV), elemental selenium (0) and selenide (-II) - and various inorganic and organic forms. Selenate is highly soluble and is predominant in highly oxic conditions (Fio et al., 1991). Selenite is the most likely oxidation state in oxic and suboxic soil (Lakin, 1972), and is more strongly sorbed than selenate on soils and sediments (Ahlrichs and Hossner, 1987). Several studies have demonstrated that selenite can sorb onto apatite (Monteil-Rivera et al., 2000), iron oxyhydroxides (Balistrieri and Chao, 1990; Zhang and Sparks, 1990; Su and Suarez, 2000), manganese and aluminium oxides (Schulthess and Hu, 2001; Foster et al., 2003), and clays (Bar-Yosef and Meek, 1987). Generally, selenium sorption is higher for acidic conditions than for alkaline ones (Neal et al., 1987). Under anoxic conditions, elemental selenium and selenide are thermodynamically stable; elemental selenium is insoluble and selenide can precipitate as nearly insoluble metal selenides (Lakin, 1972). But selenide compounds also include several organic ones that can be produced either under aerobic or anaerobic conditions (Guo et al., 2000). Microorganisms (aerobic and anaerobic bacteria, fungi) can greatly affect the behaviour of selenium by direct or indirect mechanisms. Some bacterial species can incorporate selenium by replacement of sulphur in proteins (Stolz and Oremland, 1999), reduce selenate or selenite in elemental selenium stored in bacteria or excreted in the media (Garbisu et al., 1996; Oremland et al., 2004), or produce volatile methylated compounds (Zhang and Frankenberger Jr, 1999). Microorganisms can also impact selenium behaviour by modifying various geochemical characteristics including pH, E_H , as well as metal speciation

(Dassonville and Renault, 2002). Most research has focused on isolation of bacteria reducing selenite despite several studies having demonstrated that these isolates often represent a very small fraction of natural communities (Torsvik et al., 1998). However, only a few studies have tried to characterise bacteria directly acting on selenium behaviour in natural environment (Siddique et al., 2006).

The study presented here is part of a wider research program, which aims at evaluating the selenium behaviour in soils under aerobic and anaerobic conditions. Only the first part of this program devoted to the aerobic conditions is presented here. Therefore the objectives of this study were (i) to constrain the microbiological states of a sandy soil under aerobic conditions, (ii) to understand the distribution of selenium between the gaseous, liquid and solid phases and (iii) if possible, to correlate this distribution to the microbiological state of the soil.

Different soil microbiological states were obtained by sterilisation (no microbiological activity) and by the addition of two organic substrates (glucose and cellulose) which were compared to the basic raw soil condition with no amendment. Distribution of selenium within these four treated soils was assessed by batch experiments maintained under aerobic condition over 6 days. Selenium was quantified in gaseous, liquid and solid phases of the batch. In addition, a physical fractionation of selenium at the threshold of 0.22 μm was performed in the liquid phase and the fractionation of selenium in the solid phase was studied by chemical sequential extractions.

2. Materials and methods

2.1 Soil

The soil used for experiments came from the Rhone borders (Isère, France). It was air dried, sieved (< 2 mm) and stored at 4 °C until use. The physical and chemical properties of the soil used for experiments (< 2 mm) are given in Table 1. The main properties are a high sand content (81.2%), an alkaline pH and a low amount of organic C. The major mineralogical components are quartz, iron oxi-hydroxides (hematite, magnetite and goethite) and phyllosilicates (chlorite and mica).

Table 1. Physical and chemical properties of the soil

<i>Parameter</i>	
Particle size distribution	
sand (50-2000 μm)	81.2 %
silt (2-50 μm)	10.9 %
clay (< 2 μm)	7.9 %
pH	7.74
CEC Metson ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	4.28
Organic C (g kg^{-1})	9.94
CaCO_3 (g kg^{-1})	6.51
Conductivity (mS cm^{-1})	0.053
Total Se (mg kg^{-1})	0.126

For sterile conditions, sterilisation of the soil was achieved by gamma irradiation from a ^{60}Co source (40 kGy). This method was reputed to be highly efficient and preferred to other chemical or autoclaving methods that affect chemical and physical properties of the soil (McNamara et al., 2003). After irradiation, the soil was kept for at least 8 weeks before use (Lensi et al., 1991), and sterilisation efficiency was checked by plate technique (Lensi et al., 1991).

2.2 Solution composition and amendments

Selenium was used as selenite ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) in the form of Na_2SeO_3 labelled with ^{75}Se (γ -emitter, 1000 Bq mL^{-1} , Isotope Products) used as a tracer for stable selenium. The concentration of selenium was chosen to be in the range of environmentally relevant concentrations (ATSDR, 2003). For all solutions the ionic strength was adjusted to $8.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ with KCl, and the pH was adjusted to 7.7 with NaOH. Solutions used in sterile conditions were filtered at 0.22 μm prior to their addition to the soil.

Glucose was added in solution to obtain 5 g glucose kg^{-1} dry soil and cellulose was added as powder directly mixed with the soil (4.5 g cellulose kg^{-1} dry soil). Glucose is the most common carbon substrate used in the literature as it is often considered as a

representative of a simple root exudate and is easily degraded by numerous microorganisms. Cellulose is a major plant cell wall component known to be a more recalcitrant nutrient, only degraded by specific microorganisms including fungi (Schutter and Dick, 2001; Dilly, 2004). Both organic amendments were accompanied with an addition of nitrate (KNO_3 in solution) in a C-to-N ratio of 15 to avoid nitrogen deficiency during soil microbial growth (Tate, 1995).

2.3 Batch experimental conditions

Four conditions were tested, referenced as "S" for the condition with the sterile soil (no microbiological activity), "NS" for the condition with the non-sterilised soil with no amendment, "NSC" and "NSG" for the condition with the non-sterilised soil with, respectively, cellulose and glucose amendments.

Batch experiments were performed in 250 mL polycarbonate centrifuge bottles closed with septum stoppers. Thirty grams of dry soil were mixed with 150 mL of selenite solution (with or without the amendments according to the condition studied) in aerobic condition and shaken at 300 rpm on an orbital shaker (KS 250 basic, IKA) at constant temperature ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) for 6 days. Such a duration was chosen to permit the development of microbial activities in the soil. To maintain aerobic conditions, the oxygen ratio in the bottles was maintained at 15-20 % (checked by gas chromatography measurement) by renewing the bottle atmosphere with air. When needed, the bottle was aerated three times for 10 min, with a flow rate of 50 mL min^{-1} .

Triplicates were made for each treatment at all incubation time. At the end of experiment, the liquid and solid phases were separated by centrifuging at 4700 g for 20 min (Sorvall® superspeed). The supernatants were analysed for Se and the pellets were divided into 3 aliquots for biomass, bacterial community diversity and selenium solid distribution analyses. The pellet subsamples for bacterial diversity analyses were kept frozen (-20°C) until analysis.

2.4 Selenium distribution

2.4.1 Gaseous phase

Volatile selenium species were purged during the aeration of the bottles and trapped on activated charcoal filters at the output of the aeration system. The efficiency of activated charcoal for trapping volatile methylated selenium species has been proven in previous studies (Karlson and Frankenberger Jr, 1988). These charcoal filters had been placed in a standard geometry that allows direct determination of the quantities of volatile ^{75}Se that have

been accumulated on the filters during the 6 days of experiments by γ -spectrometry (UP-Ge, Canberra-Eurisys, detection limit: 0.2 Bq per counting vial). The detection limit for selenium measurements by γ -spectrometry correspond to the volatilisation of 0.00013 % of the Se input in the batch.

2.4.2 Liquid phase

Selenium was quantified in the supernatant of the batch after 1 h of incubation and then daily. For this kinetic monitoring, several batch experiments were realised in parallel. The supernatant was divided into two fractions for selenium analyses, filtered or not at 0.22 μm (Nalgene®, polyethersulfone). Each fraction was analysed by liquid scintillation counting using an ultra-low background spectrometer (Quantulus 1220, Wallac®, detection limit: 30 mBq) for ^{75}Se determination.

Se retained by the soil was calculated as the difference between the initial and final activities of ^{75}Se in supernatant and was expressed as a percentage of the initial ^{75}Se activity in the aqueous phase. A solid-liquid distribution coefficient, K_d (L kg^{-1}), for Se retention was also calculated according to the following equation:

$$K_d = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{C_e \cdot m}$$

with C_0 and C_e the initial and final aqueous ^{75}Se activities in the batch supernatants filtered at 0.22 μm (Bq L^{-1}), m the dry soil mass (kg) and V the solution volume (L).

2.4.3 Solid phase

Solid distribution of selenium was determined twice, after 1 h of incubation and after 6 days, by sequential extractions using a procedure based on Coppin et al. (2006). Briefly this sequential extraction procedure (Table 2) distinguishes four fractions: specifically adsorbed selenite - or phosphate-exchangeable selenium - (step 1), selenium associated with organic matter (step 2), elemental selenium (step 3), and residual selenium (step 4). For step 1 to 3, Se was quantified by the measurement of ^{75}Se activity in each extract by liquid scintillation. Residual selenium was quantified by the measurement of ^{75}Se activity in the pellet remaining after the step 3 by γ -spectrometry.

Table 2. Summary of sequential extraction procedure.

<i>Step</i>	<i>Presumed extracted phase</i>	<i>Reactant</i>	<i>Condition</i>
1	Adsorbed Se(IV)	0.1 mol L ⁻¹ K ₂ HPO ₄	4 h – 20°C – 10/1 (v/m) ^a
2	Organic Se	0.1 mol L ⁻¹ NaOH	15 h – 20°C – 10/1 (v/m) ^a
3	Elemental Se	0.25 mol L ⁻¹ Na ₂ SO ₃	4h – ultrasound bath – 10/1 (v/m) ^a

^a v/m (mL g⁻¹) is the ratio of the solution to the mass of the dry soil.

2.5 Microbiological analyses

Estimation of microbial biomass and bacterial community structure analysis were performed on the soil before and at the end of the experiments (day 6) for each soil treatment (except sterile condition).

2.5.1 Microbial biomass measurement

Microbial biomass-C was estimated using a chloroform fumigation extraction based on the method of Vance et al. (1987). The soil sample was divided into two subsamples of 5 g. One subsample was fumigated with ethanol-free CHCl₃ for 24 hours. Following fumigation removal, soil organic carbon was extracted by adding 20 mL K₂SO₄ -0.5 mol L⁻¹ for 30 min. Organic carbon was extracted similarly from the non-fumigated subsample. Organic carbon in the extracts was measured with a Total Organic Carbon analyser (TOC 5000 Shimatzu, detection limit: 500 µg C L⁻¹).

Microbial biomass-C was calculated as: microbial biomass-C (µg C g⁻¹ dry soil) = Ec/K_{EC}, where Ec (µg C g⁻¹ dry soil) is the organic carbon extracted from the fumigated soil minus that extracted from the non-fumigated soil, and K_{EC} is the extractable part of microbial biomass C after fumigation. A value of 0.45 recommended by Joergensen (1996) was used for K_{EC}.

2.5.2 Analyses of bacterial diversity

The bacterial community structure diversity was analysed by Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) fingerprints of amplified 16S rRNA gene sequences after total soil DNA extraction.

DNA extraction was carried out on 0.5 g of soil using the Fast DNA spin kit for soil (ref. 6560-200- Q-biogen). To eliminate contaminants from the DNA solution, the GeneClean kit (ref. 1001-200 Qbiogen) was used for the DNA purification. 16S rRNA bacterial genes present in the soil DNA were amplified using a nested polymerase chain reaction (PCR) approach.

The purified soil DNA underwent the first run of PCR with the first set of primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', position 8-27 on the *E. coli rrs* gene), and S17 (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3', position 1492-1509 on the *E. coli rrs* gene). These universal bacterial primers gave PCR product containing nearly complete 16S rDNA sequences of approximately 1500 bp. This product underwent a second run with the second set of primers, 518r and 357F-GC, this last one attached with a GC clamp (Muyzer et al., 1993; Rangel-Castro et al., 2005). The size of the final PCR product is 233 bp. The PCR reaction system mix (50 μ L) included 41 μ L of sterile water, 5 μ L of buffer, 0.8 μ L of each primers (10 μ mol L⁻¹), 1 μ L of dNTP (10 m mol L⁻¹), 0.4 μ L of Taq polymerase (Taq, Sigma) and 1 μ L of the first PCR product DNA. After an initial denaturing phase at 94°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 53°C for 30 s, 72°C for 30 s were performed before the last phase at 72°C for 10 min. PCR products were analysed on agarose gel to estimate their concentration for DGGE analysis.

The soil bacterial 16S rDNA sequences obtained by nested PCR were separated by DGGE on polyacrylamide gels with 32-60% denaturing gradients (where 100 % denaturing contains 7 mol L⁻¹ urea and 40 % formamide) with the Dcode system (Bio-rad) according to the protocol of Muyzer et al. (1993) and Rangel-Castro et al. (2005). An equal amount of the PCR products were applied onto 1.5 mm thick vertical gel in 1X TAE (1X TAE: 0.04 mol L⁻¹ Tris-acetate, 0.002 mol L⁻¹ EDTA pH 8). Gels were run for 16 h at 75 Volt in 1X TAE buffer at a constant temperature of 60°C. The gel was silver-stained using the protocol described by Radojkovic and Kusic (2000) and scanning as described by McCaig et al. (2001). DGGE fingerprints obtained with DNA from the three treatments were visually analysed and compared to search for the differences in the bacterial community structures.

2.5.3 Sterility checking

For the S condition, at the end of each experiment, 100 μl of the batch mixture were put on 10 % TSA (trypticase soy agar) plate and incubated for 7 days at 25°C. In addition, the batch atmosphere was monitored for any gases consumption (mainly O₂) or production (mainly CO₂) due to microbial respiration by gas chromatographic measurements.

3. Results

3.1 Soil microbiological states

3.1.1 Sterility checking

For the S condition, the sterility was maintained during the whole experiments since no bacteria were ever observed on agar plate and no change in the batch atmosphere was detected (no consumption of O₂ and no gases production).

3.1.2 Microbial biomass

Microbial biomass-C in soils before experiments was $60 \pm 41 \mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil. On day 6, the microbial biomass-C in the NS condition remained similar to that before incubation ($55 \pm 1 \mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil), whereas organic amendments led to an increase of microbial biomass-C up to $214 \pm 49 \mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil and $220 \pm 27 \mu\text{g C g}^{-1}$ dry soil for the NSC and NSG conditions respectively.

3.1.3 Structure of the soil bacterial communities

The DGGE analyses are presented in Fig. 1 for the soil before experiments (T0) and after 6 days of incubation for the NS, NSC and NSG conditions. The DGGE banding pattern provided the structure of the soil bacterial community. Schematically, the relative intensity of each band represents the relative abundance of a particular population in the whole community. The evolution of the bacterial community structure in the batch experiments was evaluated by a visual comparison of DGGE banding patterns obtained on day 0 (T0) and those obtained on day 6 for the different conditions (NS-6, NSC-6, NSG-6).

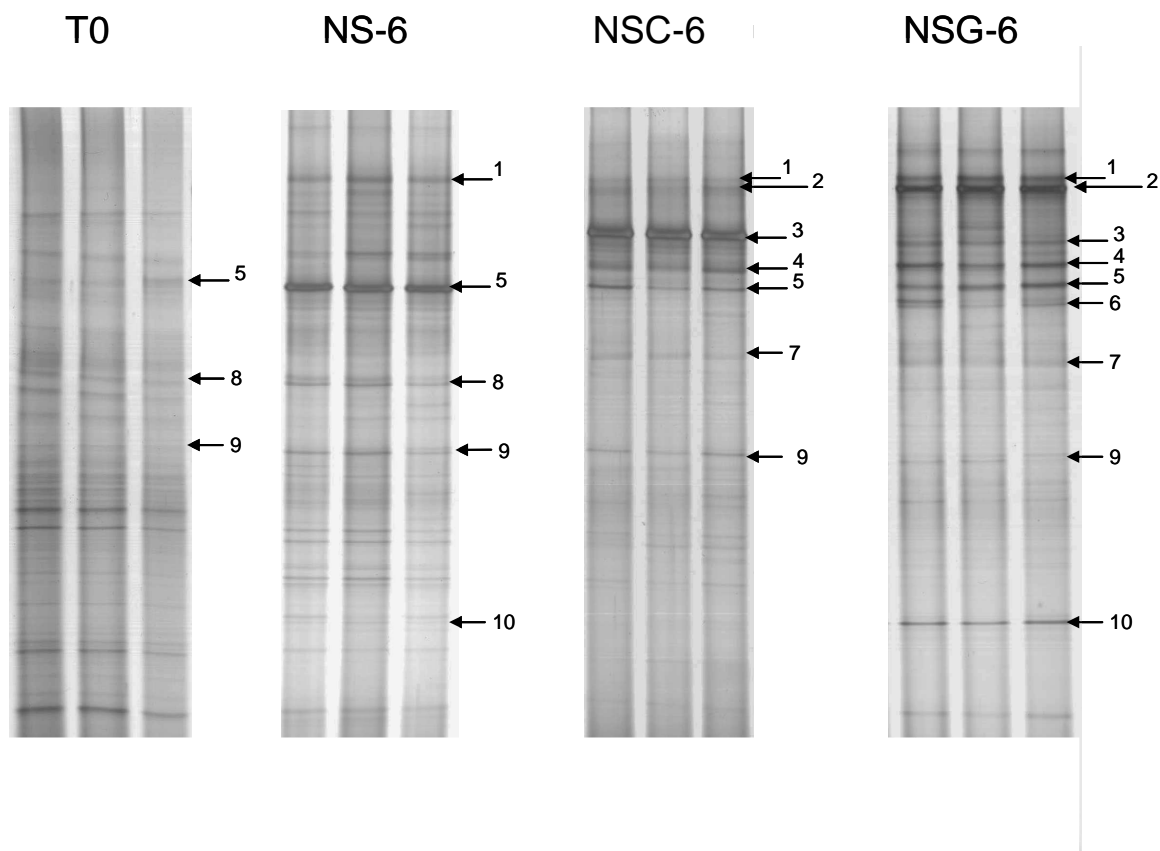


Fig. 1. Denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns of bacterial 16S rRNA genes amplified from soil triplicates before batch experiments (T0) and after 6 days of incubation for the non-sterile soil non amended (NS-6), the non-sterile soil amended respectively with cellulose (NSC-6) and with glucose (NSG-6). Numbers indicate remarkable bacteria communities.

The comparison between T0 and NS-6 DGGE profiles showed that the bacterial community structure in our batch system without amendment changed slightly in the course of time. The bands 1, 5, 8, and 9 represented the populations enriched in our batch system after 6 days. Changes in bacterial community structure were also observed when comparing T0 and NSC-6 and NSG-6 DGGE profiles. Bands 5 and 9 were present in all these DGGE profiles whereas bands 2, 3, 4 and 7 were detected only in DGGE profiles from NSC-6 and NSG-6. Glucose and cellulose treatments differed by the appearance of bands 6 and 10 in the NSG-6 profile and by the higher enrichment of band 3 in the NSC-6 profile and of band 2 in the NSG-6 profile respectively.

3.2 Distribution of selenium in the aqueous, liquid and solid phases of the batch

3.2.1 Selenium volatilisation

The cumulative volatilisation ratios of selenium during the 6 days are shown in Table 3. No volatilisation was measured in sterilised conditions. In the non-sterilised conditions, the ratios were very low, in the order of a few percent, but easily measurable thanks to the use of ^{75}Se -labelling. In amended conditions, the volatilisation rate depended on the nature of the amendment: glucose amendment did not increase significantly the rate of selenium volatilised compared to the non amended condition, whereas cellulose amendment significantly increased the volatilisation of selenium (by a factor of 6 compared to the non amended condition).

Table 3. Cumulative volatilised selenium in 6 days (% of Se input in the batch) – mean on 3 replicates \pm one standard deviation.

Condition	Cumulative volatilised selenium (%)
S	< DL
NS	0.0014 \pm 0.004
NSC	0.0087 \pm 0.024
NSG	0.0020 \pm 0.001

DL : detection limit

3.2.2 Selenium in the liquid phase

The kinetics of selenite retention are illustrated in Fig. 2 for all conditions. For the S condition, an apparent equilibrium between liquid and solid phases was reached after 1 h of incubation, leading to 51 ± 1 % of selenium retained by the sterile soil and a Kd value of $5.1 \pm 0.2 \text{ L kg}^{-1}$. At this time, the quantity of Se retained was nearly identical in all other conditions (ca 50 % of retention). After that period, differences between conditions occurred:

- For the NS condition, the selenium retention slightly increased linearly with time ($r^2 = 0.92$). On day 6, the retention was about 62 ± 2 %, corresponding to a Kd value of $11 \pm 1 \text{ L kg}^{-1}$.
- For the NSG condition, the retention rate of selenium increased rapidly and stabilised after 2 days of incubation with 95 ± 1 % of selenium retained on day 6. The corresponding Kd value was $98 \pm 5 \text{ L kg}^{-1}$.

- For the NSC condition, the selenium retention followed a biphasic kinetic process. Until day 3, the retention of selenium was similar to the retention in the NS condition. Then, the retention increased sharply between days 3 and 6, leading to 88 ± 6 % of selenium retained on day 6, with a corresponding K_d value of 47 ± 23 $L\ kg^{-1}$ (greater variability was obtained between the triplicates for this condition).

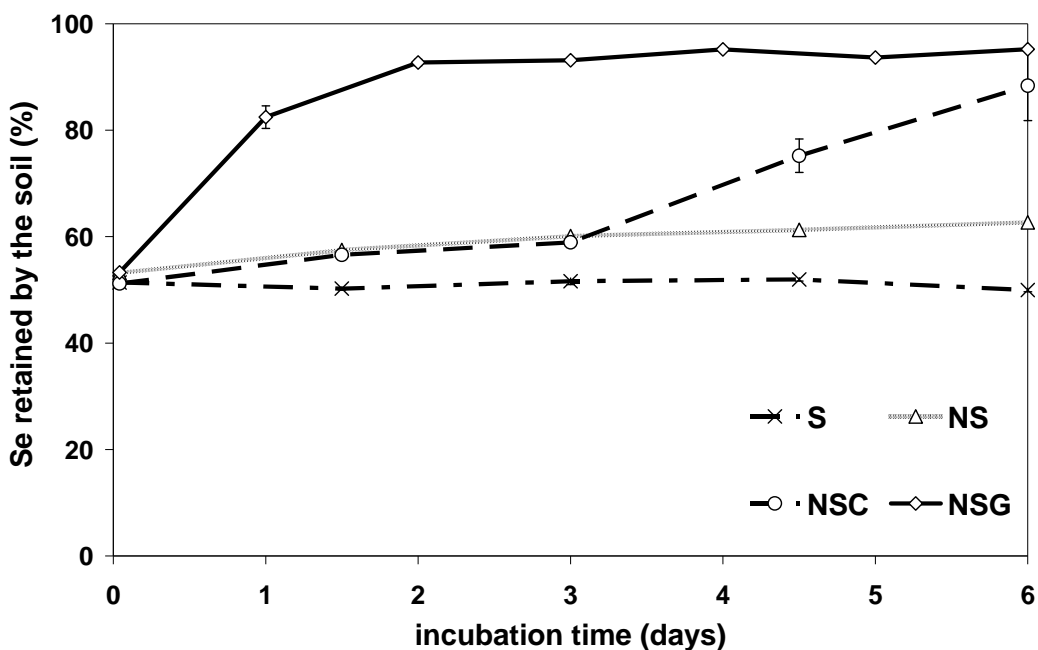


Fig. 2. Kinetics of Se retention in batch, expressed as a percentage of total selenium in the batch (error bars represent the standard deviation between triplicates).

Complementary to these results, the percentage of the selenium upper $0.22\ \mu m$ in the batch supernatants is presented in Fig. 3 for all conditions. In the S, NS and NSC conditions, no selenium in the batch supernatant was associated to particles greater than $0.22\ \mu m$ during all the incubation. These conditions differed from the condition amended with glucose. In the latter (NSG), a fraction of selenium in the batch supernatant was bound to particles having size larger than $0.22\ \mu m$ as from day 2, this fraction increasing with time: on day 6 this fraction was about 54 %.

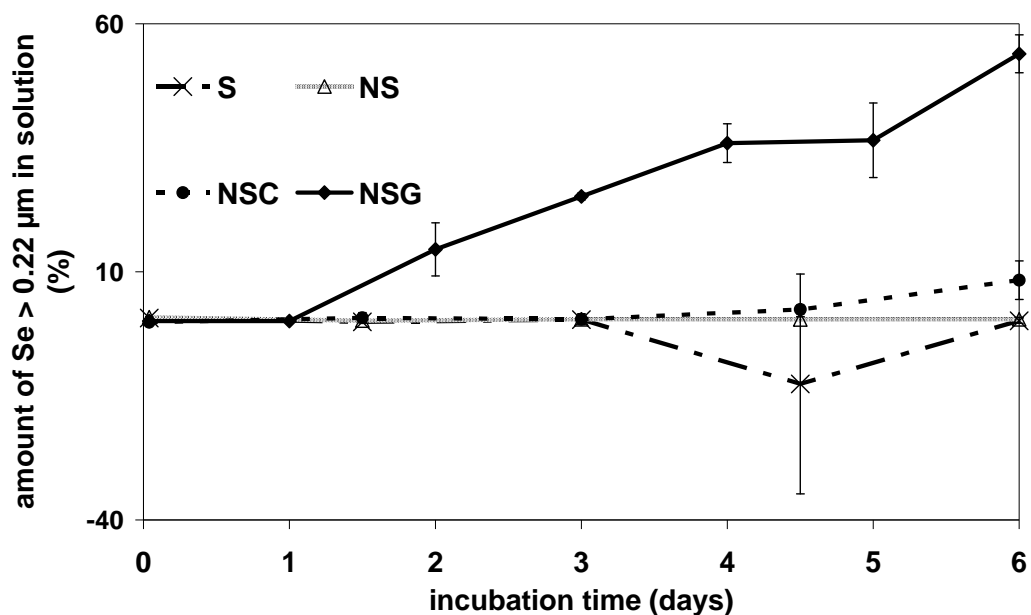


Fig. 3. Amount of Se > 0.22 μm in the batch supernatant, expressed as a percentage of total selenium in supernatant (error bars represent the standard deviation between triplicates)

3.2.3 Solid distribution of selenium

The solid distribution of selenium in the pellets after 1 h and on day 6 is presented in Table 4 for all conditions.

For the sterile condition (S), after 1 h of incubation, selenium retained by the soil was recovered mainly as adsorbed Se(IV) (77 %) and organic Se (15 %). The percentages of elemental selenium and residual selenium were negligible (<1%). This distribution evolved with time and, after 6 days, the amount of selenium recovered in the adsorbed fraction decreased to 52 % whereas the amount recovered in the organic fraction increased to 33 %. Elemental and residual selenium percentages were still low.

After 1 h of incubation, as in the liquid phase, the solid distributions of selenium in the non-sterile conditions (NS, NSC and NSG) were similar as in the S experiments.

On day 6, differences appeared between the S condition and the others. The percentage of selenium recovered in the adsorbed fraction tended to decrease in favour of the percentage of selenium recovered in the other fractions. This tendency was observed for all conditions but with different intensities. For the NS and NSC conditions, the solid distribution of selenium was similar. The selenium was mainly recovered as adsorbed Se(IV) (54 % and 39

% in the NS and NSC conditions respectively) and as organic Se (about 45 %). The percentages of selenium recovered as elemental selenium (about 4 %) showed a 2.5-fold increase compared to the results with the sterile soil. Finally the selenium recovered in the residual fraction increased slightly compared to the results in the sterile condition. For the condition with glucose amendment (NSG), the selenium distribution on day 6 was significantly different from the other conditions. Selenium retained by the soil was recovered mainly as organic Se (49 %). Correspondingly, the amount of selenium recovered as adsorbed Se(IV) decreased sharply to 14 %. On the other hand, the amount of selenium recovered as elemental selenium slightly increased (6 %) and that recovered in the residual fraction was significantly enhanced (17 %).

Table 4. Distribution of selenium within the solid phases, expressed as a percentage of total selenium retained by the soil - mean on 3 replicates (standard deviation)

	Condition	Adsorbed Se(IV)	Organic Se	Elemental Se	Residual Se
<i>1 h</i>	S	77.1 (1.7)	15.2 (0.6)	0.7 (0.13)	0.6 (0.06)
	NS	73.5 (1.5)	15.7 (0.3)	0.7 (0.02)	0.8 (0.05)
	NSC	73.8 (2.6)	16 (0.7)	0.8 (0.04)	0.7 (0.06)
	NSG	71.6 (1.8)	15.7 (0.8)	0.7 (0.16)	0.8 (0.13)
<i>6 days</i>	S	52 (3.3)	32.8 (0.9)	1.8 (0.13)	4.2 (0.17)
	NS	54.4 (2.6)	44.5 (3.1)	4.8 (0.75)	6.2 (0.67)
	NSC	39.1 (4.3)	44.7 (3.1)	4.1 (0.44)	7.6 (0.24)
	NSG	14 (0.5)	49.3 (1.2)	6.3 (0.45)	17.1 (1.5)

4. Discussion

The different soil treatments used in these experiments (sterilised soil, non-sterilised soil with no amendment, and non-sterilised soil with glucose or cellulose amendments) led to significantly different soil microbial biomass and/or diversity.

The microbial biomass values obtained in our soils were in agreement with those found in previous literature for a sandy soil with a low organic content and an alkaline pH (Badalucco et al., 1997). Whereas the non amended soil showed a relative stabilisation of its microbial biomass during the batch experiments, cellulose and glucose amendments involved a significant (Wilcoxon test, $p < 0.05$) increase in the microbial biomass compared to the

initial values (ca x14). In addition, analysis of the bacterial community profiles showed that each treatment favoured specific populations after 6 days (Fig. 1). Therefore, all these results enable us to assess the impact of the soil microbiological states on the gaseous, aqueous and solid distribution of selenium in the soil.

The results obtained for the sterile conditions were regarded as a reference for abiotic behaviour of selenium, although microbial activities can affect abiotic geochemistry of selenium in other conditions by changing some geochemical characteristics of the medium. For the sterile condition, selenium behaviour resulted from chemical interactions between mineral and organic soil particles and selenite input. These interactions were rapid, occurring mainly in the first hour of incubation and leading to 51 % of selenium retained (Fig. 2). The corresponding K_d value (5.5 L kg^{-1}) was close to the lower bound of the range $5\text{-}50 \text{ L.kg}^{-1}$ recommended by Roussel-Debet and Colle (2005) for this element in sand. It probably results from the soil composition (mainly quartz particles) and the alkaline pH that favour selenium mobility (Neal et al., 1987). While this fast retention mechanism was suspected to be adsorption at the surface of soil particles (Duc et al., 2006), only three-quarter of the selenium retained was recovered by phosphate exchange (Table 4). This could be attributed to an inefficiency of the phosphate extraction (in only one step, with no repeated extraction), involvement of selenium sorption on sites non-accessible to phosphate ions and/or selenium coprecipitation. However, the amount of selenium recovered as elemental and residual selenium was negligible (Table 4), in agreement with the short incubation time, the lack of microbial activity and the aeration that prevent abiotic reductions.

Whereas the equilibrium between the aqueous and solid phases was reached after the first hour of incubation, modifications of the selenium distribution in solid phases were observed after 6 days for this sterile condition. The main modification was a decrease of about 25 % in the selenium extracted with K_2HPO_4 balanced by an increase in the selenium extracted with NaOH (+ 18 %) and the enrichment of the residual fraction (+ 4 %) (Table 4). According to Coppin et al. (2006), the phase extracted by NaOH, called “organic selenium”, can also include selenium strongly bound to metallic oxides and the residual fraction includes selenium bound to the refractory organic matter. Although it is not possible to correlate results of sequential extractions with precise retention mechanisms, hypothesis concerning the selenium retention were proposed according to the differences obtained in the results of sequential extraction after 1 hour and 6 days of incubation. Thus we suggest that selenium was first retained onto soil particles (e.g. ferric oxides or organic matter) by a rapid surface

adsorption (77 % exchangeable with phosphate at 1 hour) and that a fraction of this adsorbed selenium evolved with time to form stronger binding within these particles either by diffusion into the solid or by the formation of an inner sphere complex non-exchangeable with phosphate. This hypothesis is supported by the results of previous studies on kinetics of selenium sorption (Barrow and Whelan, 1989; Zhang and Sparks, 1990). A small fraction of the selenium retained by the soil on day 6 was also recovered in the fraction called “elemental selenium” (2 %) (Table 4), although the abiotic reduction was avoided. However, this percentage was rather low and several studies (Ponce De Leon et al., 2003; Wright et al., 2003; Chen et al., 2006) found that Na_2SO_3 could also extract other forms of selenium. At the end, this abiotic redistribution among the solid phases led to a stronger retention of selenium in the soil, making selenium less susceptible to remobilisation. Such a result was ignored by many studies of selenium sorption in aerobic conditions which focused only on the apparent equilibrium reached between the liquid and solid phases.

Finally, for the sterile conditions, volatilisation of selenium was never detected (Table 3), suggesting that this reaction is a strictly biotic process.

The effect of the soil microbial activity on the selenium distribution appeared only for incubation time longer than 1 h. Firstly, for all non-sterile conditions, volatilisation of selenium occurred, but was very limited (Table 3). This low volatilisation could be explained by the low microbial biomass present in our soil, as well as the low selenium concentration used ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), which is not a toxic concentration for most microorganisms (Dungan and Frankenberger Jr., 2000). Moreover, the selenium volatilisation could have been underestimated in our experiments. Indeed dimethyl selenide (DMSe), the major Se gas species produced by volatilisation processes (Doran and Alexander, 1977), has a high solubility in water (24.4 g L^{-1}) (Karlson et al., 1994). Therefore, this species could have been trapped in the liquid phase before its emission to the atmosphere. This hypothesis was also suggested by Zhang and Frankenberger Jr (1999).

On the contrary to other studies (Karlson and Frankenberger Jr, 1988; Calderone et al., 1990), addition of organic substrates did not systematically enhance the volatilisation (Table 3). We assume that volatilisation of selenium was a microorganism (bacteria and / or fungi) dependent process. Indeed, the volatilisation was significantly enhanced in the NSC condition which was also characterized by a specific enrichment of band 3 in the DGGE profiles (Fig. 1). Contrarily, Karlson and Frankenberger Jr (1988) have shown that cellulose produces a minor increase of the volatilisation rate and attributed this result to the fact that cellulose is

degraded by few microorganisms due to its long chain structure. Nevertheless as no analyses of the bacterial communities structure were done in their soil, our results are hardly comparable. Moreover, fungi are also able to volatilise selenium (Abu-Erreish et al., 1968) and their activity could have been enhanced by an addition of cellulose. Further research is needed to study the bacterial and fungal contributions to selenium volatilisation.

Secondly, microbiological activity increased the amount of selenium retained by the soil (Fig. 2). When no amendment was added, the increase was small (from 51 % in the S condition to 62 % on day 6 in the NS condition). But when glucose or cellulose were added, nearly all the selenium was retained on day 6 (ca 90 % or more). According to the results obtained for microbial biomass-C (see section.3.1.2), the amount of selenium retained on day 6 seemed correlated to the quantity of microbial biomass developed in each condition. However, differences in the kinetics of selenium retention were observed for the two organic substrates used (Fig. 2). The glucose amendment, which was rapidly degraded by many microorganisms, involved a rapid increase in selenium retention (2 days), whereas there was a two-phase kinetics of selenium retention when cellulose amendment was used. This result could be explained by the cooperative activities of cellulose degrading microbes in the course of time, leading to the succession of different dominant populations (Hu and Van Bruggen, 1997; Schutter and Dick, 2001), which could control the kinetics of selenium retention.

Thirdly, microorganisms modified the solid distribution of the selenium in favour of a stronger retention within the soil (increase of the amount recovered as elemental selenium and residual selenium for all non-sterile conditions) (Table 4). The occurrence of elemental selenium in aerobic condition could result from direct interactions between selenium and microorganisms. Many authors have demonstrated that bacteria could reduce selenite to elemental selenium even in oxic condition (Garbisu et al., 1996) although most of these studies dealt with higher concentration of selenite than our. In addition, the composition of bacterial community had an impact on the selenium solid fractionation, as results obtained with glucose amendment were different from those in other conditions (Fig. 1). In this condition, the phosphate-exchangeable fraction of selenium was highly reduced to the benefit of the residual fraction and, to a lesser extent, the organic fraction and elemental selenium (Table 4). An intense microbial activity could explain this result. Firstly, direct interactions between selenium and microorganisms could include reduction of selenite to elemental selenium. Secondly, microbial activity could induce changes in selenium speciation and thus in selenium reactivity towards solid phases. They could also lead to a coating of solid phases

by organomolecules which could hinder the phosphate exchange processes at the surface of particles. Besides, effects of microbial activity were also highlighted by the recovery of a colloidal selenium fraction ($> 0.22 \mu\text{m}$) in the supernatant for the NSG condition. Such a result was in agreement with previous results from Février et al. (2007) As glucose is known to favour the development of bacteria producing exopolysaccharides, colloidal selenium could be the result of interaction between selenium and these molecules (Ferri and Sangiorgio, 2001), as well as elemental selenium formed by bacteria (Garbisu et al., 1996). Unfortunately the low concentration of selenium used in our study prevented us from using microscopic (transmission or scanning electron microscopy) or X-ray absorption spectroscopic techniques for further investigations.

5. Conclusion

Our study showed that the behaviour of selenium in soil was partially controlled by its microbial activity even under aerobic conditions. Whereas the retention of selenium was mainly explained by abiotic processes for the first hour of incubation and resulted not only from phosphate exchangeable adsorption, microbial activities affected selenium behaviour for longer incubations, depending on microorganisms abundance and on the microbial community structure. On the one hand, microorganisms could promote selenium volatilisation (in relatively small amounts), leading to the spreading of selenium compounds outside the soil. On the other hand, microbial activities increased both the amount of selenium retained by the soil and the strength of its retention (less exchangeable selenium), making selenium less susceptible to remobilisation.

Acknowledgements

This research has been financially supported by a joint program between the French Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and Electricité de France (EDF). It also received financial support from the French CNRS\INSU-ECCO program. The authors are grateful to Frédéric Coppin (IRSN) for helpful comments and to Marcel Morello and Danielle Poncet-Bonnard (IRSN) for ^{75}Se analyses.

References

- Abu-Erreish, G.M., Whitehead, E.I., Olson, O.E., 1968. Evolution of volatile selenium from soils. *Soil Science* 106, 415-420.
- Ahrlrichs, J.S., Hossner, L.R., 1987. Selenate and selenite mobility in overburden by saturated flow. *Journal of Environmental Quality* 16, 95-98.
- ANDRA, 2005. Dossier HAVL-Argile. Référentiel du comportement des radionucléides et des toxiques chimiques d'un stockage dans le callovo-oxfordien jusqu'à l'homme. site de Meuse/Haute-Marne. Tome 2/2. Juin 2005.C.RP.ASTR.04.0032.A.
- ATSDR, 2003. Toxicological profile for selenium U.S. Department of health and human service - Public Health Service
- Badalucco, L., De Cesare, F., Grego, S., Landi, L., Nannipieri, P., 1997. Do physical properties of soil affect chloroform efficiency in lysing microbial biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1135-1142.
- Balistreri, L.S., Chao, T.T., 1990. Adsorption of selenium by amorphous iron oxyhydroxide and manganese dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 739-751.
- Bar-Yosef, B., Meek, D., 1987. Selenium adsorption by kaolinite and montmorillonite. *Soil Science* 144, 11-19.
- Barceloux, D.G., 1999. Selenium. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* 37, 145-172.
- Barrow, N.J., Whelan, B.R., 1989. Testing a mechanistic model. VIII. The effects of time and temperature of incubation on the sorption and subsequent desorption of selenite and selenate by a soil. *Journal of Soil Science* 40, 29-37.
- Bienvenu, P., Cassette, P., Andreoletti, G., Be, M.M., Comte, J., Lèpy, M.C., 2007. A new determination of ⁷⁹Se half-life. *Applied Radiation and Isotopes* 65, 355.
- Calderone, S.J., Frankenberger Jr, W.T., Parker, D.R., Karlson, U., 1990. Influence of temperature and organic amendments on the mobilization of selenium in sediments. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 615-620.
- Chen, Y.W., Li, L., D'Ulivo, A., Belzile, N., 2006. Extraction and determination of elemental selenium in sediments-A comparative study. *Analytica Chimica Acta* 577, 126-133.
- Coppin, F., Chabroulet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J.P., 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: First results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* 42, 379-386.
- Dassonville, F., Renault, P., 2002. Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: A review. *Agronomie* 22, 51-68.

- Dilly, O., 2004. Effects of glucose, cellulose, and humic acids on soil microbial eco-physiology. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 261-266.
- Doran, J.W., Alexander, M., 1977. Microbial transformations of selenium. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 31-37.
- Duc, M., Lefèvre, G., Fédoroff, M., 2006. Sorption of selenite ions on hematite. *Journal of Colloid and Interface Science* 298, 556-563.
- Dungan, R.S., Frankenberger Jr., W.T., 2000. Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1353-1358.
- Ferri, T., Sangiorgio, P., 2001. Selenium speciation in waters: Role of dissolved polysaccharides on the mobilization process. *Annali di Chimica* 91, 229-238.
- Février, L., Martin-Garin, A., Leclerc, E., 2007. Variation of the distribution coefficient (K_d) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity*, in press.
- Fio, J.L., Fujii, R., Deverel, S.J., 1991. Selenium Mobility and distribution in irrigated and non irrigated alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* 55, 1313-1320.
- Foster, A.L., Brown, G.E., Parks, G.A., 2003. X-ray absorption fine structure study of As(V) and Se(IV) sorption complexes on hydrous Mn oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 1937-1953.
- Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T., Buchanan, B.B., 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* 132, 199-204.
- Guo, L., Jury, W.A., Frankenberger Jr, W.T., Zhang, Y., 2000. Characterizing kinetics of sequential selenium transformation in soil. *Journal of Environmental Quality* 29, 1041-1048.
- Hu, S., Van Bruggen, A.H.C., 1997. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of ¹⁴C-labeled cellulose in soil. *Microbial Ecology* 33, 134-143.
- Joergensen, R.G., 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EC} value. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 25-31.
- Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., 1988. Effects of carbon and trace element addition on alkylselenide production by soil. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1640-1644.

- Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., Spencer, W.F., 1994. Physicochemical properties of dimethyl selenide and dimethyl diselenide. *Journal of Chemical and Engineering Data* 39, 608-610.
- Lakin, H.W., 1972. Selenium accumulation in soils and its adsorption by plants and animals. *Geological Society of America Bulletin* 83, 181-190.
- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.M., Faurie, G., 1991. Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a gamma-sterilized soil. *Soil Biology & Biochemistry* 23, 367.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I., 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4554-4559.
- McNamara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A., Parekh, N.R., 2003. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* 24, 117-132.
- Monteil-Rivera, F., Fedoroff, M., Jeanjean, J., Minel, L., Barthes, M.G., Dumonceau, J., 2000. Sorption of selenite (SeO_3^{2-}) on hydroxyapatite: An exchange process. *Journal of Colloid and Interface Science* 221, 291-300.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Neal, R.H., Sposito, G., Holtzclaw, K.M., Traina, S.J., 1987. Selenite adsorption on alluvial soils: I. Soil composition and pH effects. *Soil Science Society of America Journal* 51, 1161-1165.
- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S., 2004. Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 52-60.
- Ponce De Leon, C.A., DeNicola, K., Bayon, M.M., Caruso, J.A., 2003. Sequential extractions of selenium soils from Stewart Lake: Total selenium and speciation measurements with ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 435-440.

- Radojkovic, D., Kusic, J., 2000. Silver Staining of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Gels. *Clinical Chemistry* 46, 883-884.
- Rangel-Castro, J.I., Killham, K., Ostle, N., Nicol, G.W., Anderson, I.C., Scrimgeour, C.M., Ineson, P., Meharg, A., Prosser, J.I., 2005. Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology* 7, 828-838.
- Roussel-Debet, S., Colle, C., 2005. Comportement de radionucléides (Cs, I, Sr, Se, Tc) dans le sol: proposition de valeurs de Kd par défaut. *Radioprotection* 40, 203-229.
- Schulthess, C.P., Hu, Z., 2001. Impact of chloride anions on proton and selenium adsorption by an aluminum oxide. *Soil Science Society of America Journal* 65, 710-718.
- Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1481-1491.
- Siddique, T., Zhang, Y., Okeke, B.C., Frankenberger Jr, W.T., 2006. Characterization of sediment bacteria involved in selenium reduction. *Bioresource Technology* 97, 1041-1049.
- Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 615-627.
- Su, C., Suarez, D.L., 2000. Selenate and selenite sorption on iron oxides: An infrared and electrophoretic study. *Soil Science Society of America Journal* 64, 101-111.
- Tate, R.L., 1995. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Øvreas, L., 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64, 53-62.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- Wright, M.T., Parker, D., Amrhein, C., 2003. Critical evaluation of the ability of sequential extraction procedures to quantify discrete forms of selenium in sediments and soils. *Environmental Science and Technology* 37, 4709-4716.
- Zhang, P., Sparks, D.L., 1990. Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at the goethite/water interface. *Environmental Science and Technology* 24, 1848-1858.

Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality* 28, 1321-1326.

ANNEXE II – Effects of microbial dynamics activities on Se fate in an anaerobic sandy soil amended with glucose

Cette annexe correspond à un article qui sera soumis à la revue Soil Biology and Biochemistry.

Abstract

The objectives of this study were firstly to describe the main anaerobic microbial processes which occurred in a sandy soil supplemented with an electron donor (glucose) and electron acceptors (NO_3^- and SO_4^{2-}) and secondly to investigate the effects of these main microbial processes on selenite behaviour in anoxia. Anoxic batch incubations with soil and selenite ($10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) were performed over a 15 days period with (i) sterilised soil and solution to distinguish abiotic process, (ii) non sterile raw soil, without amendment, as control and (iii) non sterile soil with a glucose amendment. In addition, parallels glucose amended treatments were performed and selenite was supply after 2 days, 6 days and 10 days of incubation to target specific microbial processes. Along the incubation, E_H , pH and indicators of bacterial dynamics and activities were measured. Selenium behaviour was carried out by its distribution in the gaseous, liquid and solid phase of soil microcosms. The main anaerobic microbial processes implied in the degradation of glucose and NO_3^- were (i) denitrification (0-2 days) and (ii) fermentation (0-4 days), (iii) formate lyses between 4 and 8 days, (iv) true acetogenic which began on day 4 and continue until the end of incubation and (v) homoacetogenesis between 8 and 10 days of incubation. Sulphate reduction was neither observed during the incubation. In anoxic environment, the retention of selenium was mainly explained by abiotic processes (soil composition, time). In the amended treatments, biotic effects on Se fate were highlighted, such as modification of the Se aqueous speciation (assumed as biotic reduction of Se(IV) into Se(0)), a speed up of the Se redistribution between the different solid phases (in favour to a lesser extractability of sorbed Se) and volatilisation of Se. None effect due to specific bacterial activities targeted have been observed.

1. Introduction

Redox reactions affect the behaviour and mobility of numerous compounds in earth surface environments such as soil (Sposito, 1989). This is the case for selenium, which exist as various mineral and organic compounds that differ from each other by their oxidation level and mobility (Masscheleyn et al., 1990). Besides its occurrence in natural soil (from 0.03 to 0.8 mg.kg⁻¹) (Tamari, 1998), selenium is also present in high-level radioactive waste (0.04 %) (Bruggeman et al., 2005) into long-life radioactive isotope form, ⁷⁹Se (3.77 10⁵ years) (Bienvenu et al., 2007). In oxic condition, Se is present in soluble forms, selenate (VI) and selenite (IV) (Lakin, 1972), although, selenite is more strongly sorbed than selenate on soils and sediments. Under reducing conditions, elemental insoluble selenium and selenide are the thermodynamically stable forms (Lakin, 1972). Both biotic and abiotic processes can modify the oxidation state and chemical form of Se (Séby et al., 1998). Selenium can be reduced microbiologically into Se(0) or to volatile methylated species (DMSe) (Garbisu et al., 1996; Zhang and Frankenberger Jr, 1999). It can be also reduced chemically depending to the soil E_H and pH values (Masscheleyn et al., 1990).

Although soils are generally well-aerated, they contain nearly always anoxic microsites (Tiedje et al., 1984), and anaerobic conditions prevail in particular cases, including flooded soils (rice paddies, wetland) and heavy organic amended soils (spreading organic residues). Under aerobic condition, O₂ is used by microorganisms as a terminal electron acceptor in respiratory reactions, which enable to mineralise organic compounds with CO₂ and H₂O as end products (Prescott et al., 2003). The change from aerobic to anaerobic metabolism should occur at O₂ concentrations of less than 1% (Alewell et al., 2006). Under anaerobic condition, O₂ can be "replaced" by N-oxides (NO₃⁻, NO₂⁻, N₂O), oxidised metals (Mn(IV), Fe(III), S-oxides (SO₄²⁻ ...) and CO₂ in respiratory reactions. In addition, with non-respiratory other catabolic activities they enable denitrification, fermentation, Fe and Mn reduction, homoacetogenesis, sulphate reduction ... (Tanji et al., 2003; Dassonville et al., 2004). These different anaerobic reductions involve different microorganisms which are facultative and/or obligate anaerobes (Prescott et al., 2003). In anoxic conditions, geochemical reaction and microbial processes are closely linked. On the one hand, microbial activities affect geochemical parameters including (i) pH via the H⁺ or CO₂ production, (ii) E_H by modifying the principal redox couples such as NO₃⁻/NO₂⁻, Fe³⁺/Fe²⁺, H⁺/H₂ ... (iii) the solution

composition by the production of organic acid including acetate, propionate and butyrate. In addition, abiotic redox reactions often favoured thermodynamically but not kinetically are catalysed by microorganisms. On the other hand, geochemical reactions impact on microbiological activities by (i) the bioavailability of nutrients, (ii) the feasibility of microbial reactions via inhibition by chemical species and thermodynamic regulation (NO_3^- , H_2 , CO_2 ...) (Dolfing, 1988; Picek et al., 2000).

The first objective of this study was to describe the main anaerobic microbial processes which occurred in a sandy soil supplemented with an electron donor (glucose) and electron acceptors (NO_3^- and SO_4^{2-}). The second objective was to investigate the effects of these main microbial processes on selenite behaviour in anoxia. The study was carried out using batch incubation with a sandy soil amended with glucose. Non amended and sterilised treatments were used as control for biotic and abiotic effects respectively. To assess the identification of the main microbial metabolic pathways, we used a combination of geochemical (E_H , pH, gas productions and content in some organic and mineral compounds) and microbial parameters (total number of bacteria, number densities in cultivable fermentative, SeO_3^{2-} -reducing, FeIII-reducers and denitrifying bacteria and molecular analysis of bacterial diversity). Selenium behaviour in the soil was carried out by its distribution in the gaseous, liquid and solid phase of soil microcosms.

2. Materials and methods

2.1 Soil and applied solutions

The soil was sampled from the Rhone riversides (Isère, France), between 5 and 30 cm depth. At the sampling time (December 2004), the moisture of the sampled layer was about 12 %, and the soil was covered with grass. It was air dried at a residual moisture content of 4 % (wt / dry wt after drying at 105°C during 48 h), sieved (< 2 mm) and stored at 4°C until use. Soil main properties were as follows: 812 g kg⁻¹ sand, 109 g kg⁻¹ silt, 79 g kg⁻¹ clay, and 1 g kg⁻¹ organic C. The soil pH water was 7.7. Most abundant minerals were quartz, iron oxides (hematite, magnetite and goethite) and phyllosilicates (chlorite and mica). Two days before the beginning of incubations, the soil was humidified at 17 % (wt / wt) with milliQ water.

An aliquot of stored soil was sterilised by a γ -irradiation of 40 kGy, using a ⁶⁰Co source. After irradiation, the soil was kept for at least 8 weeks before use in order to avoid residual enzymatic activities (Lensi et al., 1991), and sterilisation efficiency was checked by

plating 200 µl of homogenised soil suspension on 10 % tryptic soy agar (Sigma) plates and by measuring gas production (mainly CO₂).

Three solutions were used for the different experiments: (i) a 8.5 mM KCl solution at pH 7.7, (ii) a nutrient solution containing glucose, K₂SO₄ and NH₄NO₃ (5.5 mM, 5.5 mM and 1.4 mM respectively) and having a ionic strength of 1.8 10⁻² mol l⁻¹ and a pH equal to 7.7 and (iii) a selenite solution (10⁻⁴ mol Na₂SeO₃ l⁻¹) labelled with ⁷⁵Se (γ--emitter, 10⁵ Bq ml⁻¹, Isotope Products). To insure anoxic condition, the KCl and the nutrient solutions were deoxygenated with N₂ bubbling during 2 hours.

2.2 Batch incubation and measurements

Batch incubations were performed in 250 mL polycarbonate centrifuge bottles closed with septum stoppers. The bottles were filled in a glove box under N₂ atmosphere with 30 g of soil moisted at 17 % (wt / wt), 144 ml of either KCl or nutrient solution, and 1.5 ml of selenite solution to obtain 10⁻⁶ mol Na₂SeO₃ l⁻¹ and 1000 Bq ml⁻¹ in the bottle. Three treatments were defined below:

- a sterilised treatment (+S), with sterilised KCl and selenite solutions, in order to assess for the effects of abiotic processes ;
- a control treatment (C) with KCl and selenite solutions, used to characterize the effect of biogeochemical processes in absence of nutrient supply ;
- amended treatments (G), with nutrient and selenite solutions. In these treatments, selenite was supplied either simultaneously to nutrient solution (G), or 2 d (G_2), 6 d (G_6), or 10 d (G_10) after supplying the nutrient solution in order to target specific microbial processes.

The bottles were then incubated at constant temperature (25°C ± 2°C) in darkness and continually shaken at 300 rpm on an orbital shaker (KS 250 basic, IKA) during 15 days. Triplicates were made for each condition and incubation time. Incubation times with selenite were 15 days for C, S and G and 13, 9, 5 days for G_2, G_6 and G_10.

Measurements were performed at periodical dates during the incubations and dealt with:

- the gaseous headspace composition including volatil Se and gas production after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 and 15 d ;

- the solution, with its pH and E_H , Se content and speciation, and the concentrations of some organic compounds (acetate, formate ...) and other mineral ones (NO_3^- , Fe^{2+}) after 1 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 and 15 d ;
- the solid phase including Se distribution and microbiology :
 - chemical properties of Se in solid phase according to serial extractions after 1h, 2, 6, 10 and 15 d of incubation ;
 - soil microbiology, with the density number of all bacteria and the molecular analysis of bacterial diversity after 2, 6, 10 and 15 d of incubation, and the density numbers of some functional communities (denitrifiers, fermentative FeIII-reducers and SeO_3^{2-} -reducers bacteria) after 1 h, 2, 6, 10 and 15 d of incubation.

2.3 Analytical procedures

- Gas phase

Gas measurements (CO_2 , N_2 , N_2O , H_2 , CH_4) were performed on a gas chromatograph HP 6890 (Hewlett Packard, Les Ulis, France) fitted with a thermal conductivity detector, and Porapak Q (80-100 μm mesh, 1.8 m) and sieve molecular (5 Å, 1.8 m) columns coupled to an integration software, HP Chemstation. Carrier gas was He. Relative uncertainties were about 1 % (3 % for H_2). After having vigorously shaken the bottles to ensure equilibrium between gas and liquid phases, 500 μl of gas were sampled with a syringe of 500 μl that can be closed (500 R-V6GT, SGE), 200 μl being thereafter injected in the gas chromatograph.

Volatile Se species were trapped, after pH and E_H measurement, on activated charcoal filters (Karlson and Frankenberger Jr, 1988) by flushing the batch atmosphere 3 times for 10 min with N_2 . The charcoal filters, located at the output of the flushing system, had been placed in a standard geometry that allows direct determination of the quantities of volatile ^{75}Se that have been accumulated on the filters by γ -spectrometry (UP-Ge, Canberra-Eurisys, detection limit: 0.2 Bq per vial). The detection limit for ^{75}Se measurements by γ -spectrometry corresponds to the volatilisation of 0.0013 % of the Se input in the batch

- Liquid phase

Before trapping Se compounds on activated charcoal filters, the pH and soil's redox potential (E_H) were measured in the slurry suspension through the septum. pH was measured with a needle combination pH microelectrode MI 41410–Ag/AgCl reference

(Microelectrode®) and redox potential (E_H) was measured with another needle microelectrode MI 800-41410–Ag/AgCl reference (Microelectrode®). Absolute uncertainties were lower than 0.02 pH unit and 50 mV for the E_H on the measure itself, and pH and E_H measurements always stabilised in less than 1 min.

Before the separation of liquid phase from solid phase in treatments (C) and (G), 6 ml of homogenised slurry suspension were then sampled in order to enumerate cultivable bacteria (see Microbial measurements). For other measurements, the liquid and solid phases were firstly separated by centrifuging the polycarbonate bottles at 4600 g during 20 min (Sorvall® superspeed). The bottles were then opened in the glove box to maintain anoxic condition, and the supernatant was thereafter divided into aliquots that were used for solution characterisations. The pellets were thereafter divided into 3 aliquots for biomass, bacterial community diversity and Se solid distribution analyses. Pellet subsamples for bacterial diversity analyses were kept frozen (-20°C) until analysis.

The concentrations in small organic acids were measured by an ionic chromatography (DX-120, Dionex, USA) fitted with a Dionex AS 11HC - 4 mm column with a detector of pulsed conductivity, and ethanol amounts were determined by ionic chromatography (Dionex DX-600) fitted with a CARBOPAK-MA1 column and a pulsed amperometry detector.

Glucose concentration was measured using the GAGO20 kit (Sigma) with colorimetric measurement at 540 nm (Dubois et al., 1956), total NH_4^+ after exchange of adsorbed NH_4^+ with a K_2SO_4 solution (5 g of soil was shaken during 30 min with 20 ml of K_2SO_4 , 0.5 mol l⁻¹) using the kit Spectroquant® 1.14752.0001 (Merck) and colorimetric measurement at 630 nm (Pansu and Gautheyrou, 2003), and mobilised Fe(II) concentration using colorimetric absorption at 540 nm after Fe(II) complexation with O-phenantroline.

Selenium was quantified periodically in the supernatant of the batch. The solution was analysed by liquid scintillation counting using an ultra-low background spectrometer (Quantulus 1220, Wallac®, detection limit: 30 mBq) for ⁷⁵Se determination. Selenium retained by the soil was estimated as the difference between the initial and final activities of ⁷⁵Se in supernatant and was expressed as a percentage of the initial ⁷⁵Se activity in the aqueous phase. In addition, specific selenite (Se(IV)) concentration in the aqueous phase filtered at 0.22 µm was quantified using hydride generation-quartz furnace atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer, FIAS-100/AAS 4110-ZL, detection limit 0.5 µg l⁻¹) in HCl (10 % v/v) and with NaBH₄ as reducing agent.

- Selenium speciation in solids

Solid distribution of Se was periodically determined by sequential extractions using a procedure based on Coppin et al. (2006). Experimental procedure was detailed in Darcheville et al. (2008). Briefly this sequential extraction procedure distinguishes four fractions: phosphate-exchangeable Se (step 1), Se extracted with NaOH (step 2), elemental Se (step 3), and residual Se (step 4). For step 1 to 3, Se was quantified by the measurement of ^{75}Se activity in each extract by liquid scintillation. Residual Se was quantified by the measurement of ^{75}Se activity in the pellet remaining after the step 3 by γ -spectrometry.

- Microbial characterisations

In control treatment (C) and amended treatment (G), 6 ml of homogenised soil suspension were sampled in order to enumerate cultivable fermentative bacteria, SeO_3^{2-} -reducers, FeIII-reducers and denitrifiers by the most probable number (MPN) method. 6 ml of selective and appropriate media were initially distributed through a sterile rubber stopper in sterile hungate tubes, previously degassed with N_2 and autoclaved. 6 ml of the batch homogenised soil suspension, before centrifugation, were dispensed in selective media. Successive 10-fold dilutions were done in the appropriate media (Annexe VI, thesis version). 9 dilutions and 5 replicates by dilution were done. All tubes were incubated for 14 days at 25°C in the dark. After this period, tubes were scored positive or negative for the presence or absence of relevant functional communities according to the following criteria:

- the presence of fermentative bacteria was checked by visual observation of trouble in the media (Ben Dhia Thabet et al., 2004) ;
- the presence of denitrifiers was checked by the disappearance of NO_3^- and NO_2^- , using colorimetric method at 600 nm with Morgan's solution (Cannavo et al., 2002);
- the presence of FeIII-reducers was checked by the appearance of FeII in solution measured by a colorimetric method at 540 nm (O-phenantroline method) ;
- the presence of SeO_3^{2-} -reducers was checked positively if any colour modification of the medium (red) resulting from SeO_3^{2-} reduction was observed.

Bacterial enumeration and confidence levels were determined from experimental results using statistical MPN tables (Alef and Nannipieri, 1995).

Other measurements were performed on the centrifugation pellets. Densities of bacteria was assessed by direct cell counts performed in treatments (C) and (G) by

epifluorescence microscopy using acridine orange staining (3,6-bis [dimethylamino]acridium chloride, Sigma). For each bottle, an aliquot of centrifugation pellet corresponding approximately to 0.5 g of solids was sampled and weighted after homogenisation, then diluted with 4.5 ml of sterilized water, stabilised with 1 % of formamide (vol/vol) (Sigma) and stored at 4°C in the dark until analyses. The soil suspensions were serially diluted 10-fold in sterilized water. These samples were stained with acridine orange (AO) at 0.1 % (vol/vol) at room temperature for 2 min with avoiding direct light. One ml of the stained sample was filtered in 9 mL of sterilised water through 0.2 µm GTBP filters (Isopore, membrane filters, Millipore) to ensure uniform cell distribution on the filter surface. The filter was rinsed once with 2 ml of isopropanol to eliminate the excess of AO, then twice with 10 ml of sterilized water. The filter was put on a slide, supplemented with one drop of fluoromount-G and covered with a clear glass cover slip. Cells were observed using a ECLIPSE E600 microscope (Nikon) equipped with a mercury light, excitation filter (FITC filter ; λ_{\max} excitation =490 nm, λ_{\max} emission =525 nm) and a 100x plan oil lens. The numbers of bacteria N (cell g^{-1} soil) were estimated from counts of 10 microscopic fields with roughly 15 to 20 cells per field.

$$N = \frac{nxS}{s} dx \left(\frac{V_T}{V_F} \right) / M$$

where n is the average number of cell/field, S is the surface of filtration (201 mm²), s is the area of the microscopic field (8.07x10⁻³ mm²), d is the dilution factor, V_T and V_F are respectively the total volume of homogeneous soil suspensions (around 5 ml) and the volume of diluted sample filtered (around 1 ml) and M is the amount of dry soil used for the experimental procedure (around 0.5 g).

The bacterial community structure was analysed in treatments (C) and (G) by Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) fingerprints of amplified 16S rDNA gene sequences after total soil DNA extraction. DNA extraction was carried out on 0.5 g of soil using the Fast DNA spin kit for soil (ref. 6560-200- Q-biogen). To eliminate contaminants from the DNA solution, the GeneClean kit (ref. 1001-200 Qbiogen) was used for the DNA purification. 16S rDNA bacterial genes present in the soil DNA were amplified using a nested polymerase chain reaction (PCR) approach. The purified soil DNA underwent the first run of PCR with the first set of primers fD1 and S17. These universal bacterial primers gave PCR product containing nearly complete 16S rDNA sequences of approximately 1500 bp. This product underwent a second run with the second set of primers, 518r and 357F-GC to

generate 233 bp products for DGGE analysis (Muyzer et al., 1993; Rangel-Castro et al., 2005; Haichar et al., 2007). The soil bacterial 16S rDNA sequences obtained by nested PCR were separated by DGGE on polyacrylamide gels with 32-60 % denaturing gradients with the Dcode system (Bio-rad) according to the protocol of Muyzer et al. (1993) and Rangel-Castro et al. (2005). Gels were run for 16 h at 75 Volt in 1X TAE buffer at a constant temperature of 60°C (Haichar et al., 2007). The gel was silver-stained and scanning as described by McCaig et al. (2001). DGGE fingerprints obtained with DNA from the C and G treatments were visually analysed and compared to search for the differences in the bacterial community structures.

2.4 Data treatment for metabolic pathway

In order to identify and quantify main metabolic pathways in the condition (G) supplied with nutrients, as well as to delimit them in time and check for the possibility of time overlapping, we used a few chemical equations (Table 1) based on the review of (Dassonville and Renault, 2002). Retained equations described only balanced reactions for observed metabolic pathways: denitrification (Table 1, Eq. (1)) and dissimilative reduction of NO_3^- into NH_4^+ (Table 1, Eq. (2)), acetic and butyric fermentations (Table 1, Eq. (3), (4)) with the subsequent lysis or oxidation of formate (Table 1, Eq. (5), (6)), true acetogenesis from ethanol and butyrate (Table 1, Eq. (7), (8)), homoacetogenesis (Table 1, Eq. (9)), and Fe reduction (Table 1, Eq. (10), (11), (12)). We ignored other catabolic pathways, including other fermentations (e.g. alcoholic and lactic fermentations), SO_4^{2-} reduction and methanogenesis. For NO_3^- reduction, we calculated the maximum glucose consumptions $\Delta Q_{\text{M-d}}(\text{glucose})$ and $\Delta Q_{\text{M-dr}}(\text{glucose})$ (in mol C bottle⁻¹) through denitrification and dissimilation reduction into NH_4^+ , Eq (1) and (2) respectively:

$$\Delta Q_{\text{M-d}}(\text{glucose}) = 6 \times \left(\frac{5}{24} \times Q_i(\text{NO}_3^-) \right) \quad (13)$$

$$\Delta Q_{\text{M-dr}}(\text{glucose}) = 6 \times \left(\frac{10}{12} \times Q_i(\text{NO}_3^-) \right) \quad (14)$$

Where $Q_i(\text{NO}_3^-)$ was the initial amount of NO_3^- (mol.bottle⁻¹). The period of N-oxide reduction was easily assessed with the disappearance of NO_3^- . In contrast, it was difficult to assess the relative contributions of denitrification and dissimilative reduction of NO_3^- into NH_4^+ since produced NH_4^+ was partially assimilated during the growth of anaerobic bacteria. However, we roughly estimated the maximum microbial immobilisation $Q_{\text{M-im}}(\text{NH}_4^+)$ of NH_4^+

over the period of NO_3^- consumption assuming that the yield for glucose assimilation in such condition was about 20 % and the ratio C/N of fermentative bacteria was about 8:

$$Q_{\text{M-im}}(\text{NH}_4^+) = 0.2 \times \frac{1}{8} \times \frac{12}{14} \times Q_i(\text{glucose}) \quad (15)$$

As long as N is immobilized exclusively from the NH_4^+ pool, we can estimate the relative contribution of dissimilative reduction of NO_3^- into NH_4^+ (DR_{ratio}) with the following equation, over the period of NO_3^- consumption.

$$\text{DR}_{\text{ratio}} = \frac{\Delta Q(\text{NH}_4^+) + Q_{\text{M-im}}(\text{NH}_4^+)}{-\Delta Q(\text{NO}_3^-)} \quad (16)$$

Where $\Delta Q(\text{NH}_4^+)$ was the production of NH_4^+ over the period of NO_3^- consumption.

Since glucose consumption through N-oxide reduction was low, we tried to assess the relative contribution of acetic and butyric fermentations. Since formate accumulation led to a production of CO_2 either through formate lysis (Table 1, Eq. (5)) or through formate oxidation (Table 1, Eq. (6)), we checked whether the disappearance of glucose (in mol C bottle⁻¹) was balanced by the production of 1 third of formate+ CO_2 (in mol C bottle⁻¹) and 2 thirds of ethanol, acetate and butyrate (in mol C bottle⁻¹). The amount of CO_2 was assessed with the following equation:

$$Q_{\text{CO}_2} = \left(\frac{P(\text{CO}_2)}{R \times T} \right) \times \left(V_a + \left(V_w \times \alpha_{\text{CO}_2} \times \left(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}} \right) \right) \right) \quad (17)$$

where $P(\text{CO}_2)$ was the partial pressure of CO_2 in the bottles (Pa), V_a the volume of gas in the bottle (m³), V_w the volume of water (m³), α_{CO_2} the solubility constant for CO_2 (mol m⁻³ water mol m⁻³ air), pH the pH of the batch, and pK_1 the first dissociation constant for H_2CO_3 ($\text{pK}_1 = 6.35$). Since true acetogenic transformation of ethanol or butyrate led to the production of acetate without concomitant production of CO_2 (Table 1, Eq. (7) and (8)), the production of ethanol, acetate and butyrate Q_{EAB} was expressed in mol C:

$$Q_{\text{EAB}} = (Q(\text{ethanol})) + (Q(\text{acetate})) + (Q(\text{butyrate})) \quad (18)$$

Where $Q(\text{ethanol})$, $Q(\text{acetate})$ and $Q(\text{butyrate})$ were the quantities of ethanol, acetate and butyrate respectively (in mol C bottle⁻¹). Q_{EAB} would correspond to 2/3 of the glucose consumed through fermentation as long as acetic and butyric fermentations predominated, and neither acetate, butyrate nor ethanol were mineralized. Fermentations and true acetogenic transformations were delimited in times with the increase in the Q_{EAB} value.

The lysis of formate (Table 1, Eq. (5)) and the true acetogenic transformation of butyrate and ethanol led to the production of H_2 (Table 1, Eq. (7) and (8)) that can reduce Fe(III) into Fe^{2+}

through microbial respiration (Table 1, Eq. (12)). Maximum amounts of produced H₂ correspond to 4 times the amounts of glucose fermented in mol, i.e. 2/3 mol of H₂ may be produced per each mol C-glucose fermented. However, ethanol and butyrate may be oxidised into acetate with the reduction of Fe(III) into Fe²⁺ without transient H₂ production (Table 1, Eq. (10) and (11)). As long as Fe(III) reduction led exclusively to mobilised Fe²⁺ (neither precipitation of Fe(II) solids nor Fe²⁺ important adsorption on cation exchange sites), we can estimate the consumption of C-glucose, H₂ or e⁻ required for this reduction and use variation in Fe mobilisation to note the beginning and the end of Fe(III) microbial reduction:

$$\Delta Q_{M-Fe}(H_2) = \frac{1}{2} \times \Delta Q_m(Fe) \quad (19)$$

where $\Delta Q_{m-Fe}(H_2)$ is the amount of H₂ required to reduce the excess in mobilised Fe, assuming it was the exclusive electron donor and $\Delta Q_m(Fe)$ the amount of Fe mobilised.

As long as H₂ partial pressure exceeded about 10⁴ Pa, it was not possible to observe ethanol consumption to produce acetate through true acetogenesis (Dolfing, 1988). H₂ partial pressure could decrease through homoacetogenesis (Table 1, Eq. (9)) and acetate production increase through simultaneous homoacetogenesis and true acetogenic biotransformation. It was possible to check whether homoacetogenesis and true acetogenesis explained most of acetate accumulation in the second half of our experiment by comparing the accumulated acetate over limited period $\Delta Q(\text{acetate})$ with on the one hand the decrease in H₂ or CO₂ bottle content and on the other hand the decrease in the bottle ethanol content: as long as homoacetogenesis and true acetogenesis explained most of acetate accumulation, we have:

$$\Delta Q(H_2) = 2 \times \Delta Q(\text{CO}_2 + \text{formate}) \quad (20a)$$

$$\Delta Q(\text{acetate}) = -\left(\frac{1}{2} \times \Delta Q(H_2)\right) - \Delta Q(\text{ethanol}) \quad (20b)$$

where $\Delta Q(\text{CO}_2 + \text{formate})$ and $\Delta Q(\text{ethanol})$ is the amount of (CO₂+formate) and ethanol that respectively disappeared during the same period.

3. Results

3.1 Geochemical and microbial evolutions

For clarity, we present only result for S, C and G treatments, since the time of Se supply (G_2, G_6 and G_10) did not affect microbial and geochemical temporal evolutions of our systems.

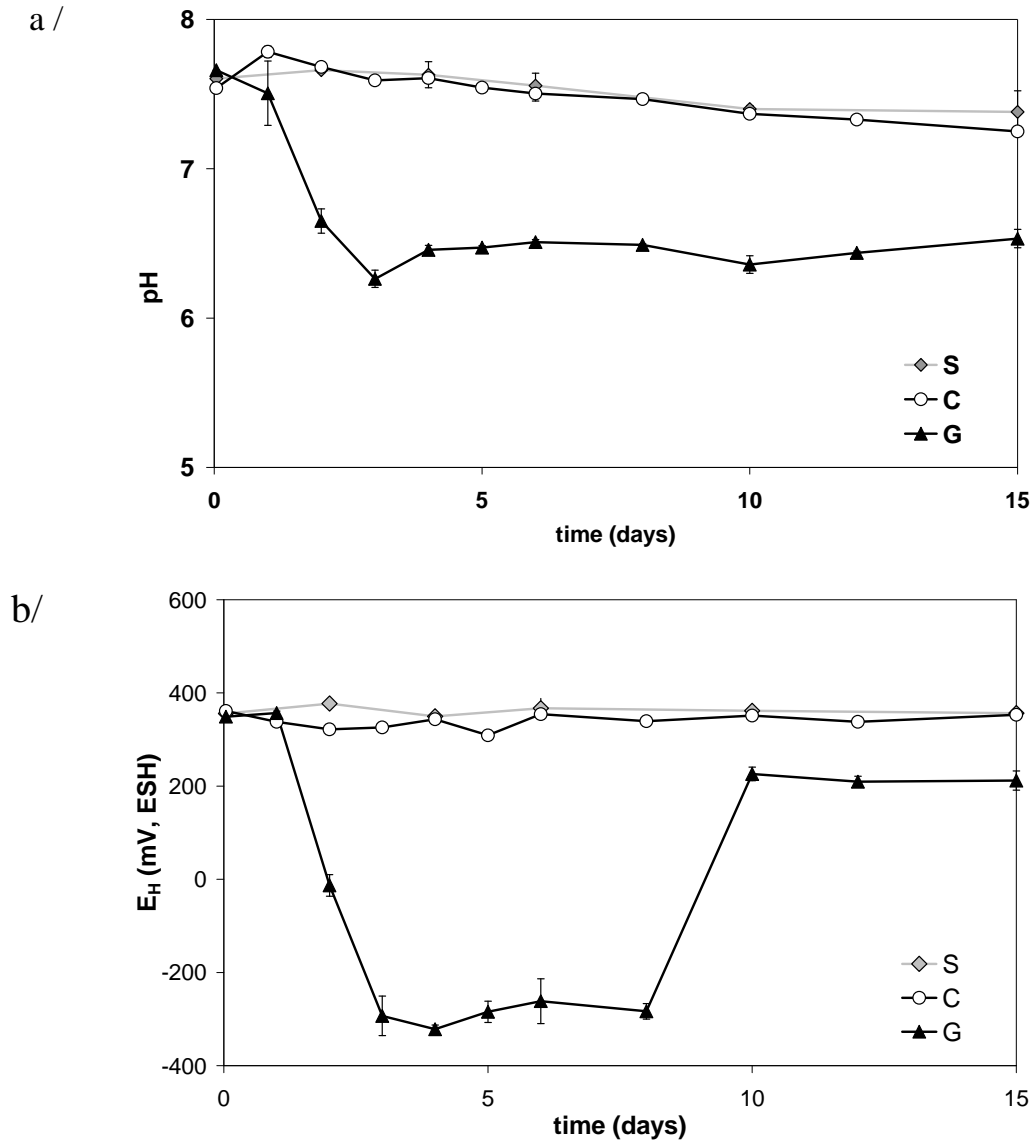


Figure 1: Evolution of pH and E_H with time for treatment S, C and G experiments. Vertical bars represent one standard deviation (σ) between triplicates: a/ pH; b/ E_H

3.1.1 The sterilised treatment (S)

In the S treatment, the sterility was checked by the no gas production (CO_2 , N_2O , H_2 or CH_4). In addition, neither organic compounds, nor mineral anions (Cl^- excepted provided from KCl solution) and Fe(II) in solution were observed in this condition. The pH of the homogenised soil solution decreased slowly from 7.7 to 7.4 and the E_H remained unchanged (360 mV) during the incubation (Fig. 1a and 1b).

3.1.2 The control treatment (C)

In the control (C treatment), the bacterial activities did not modify the geochemical parameters measured (E_H and pH) compared to the S treatment (Fig. 1a and 1b). A respiratory bacterial activity was measured by a constant CO_2 production during the incubation (Fig. 2) (from $1.7 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle $^{-1}$ on day 2 to $3.6 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle $^{-1}$ on day 15). No gas production of N_2O , H_2 or CH_4 , neither production of organic compounds, mineral anions and Fe(II) in solution were observed.

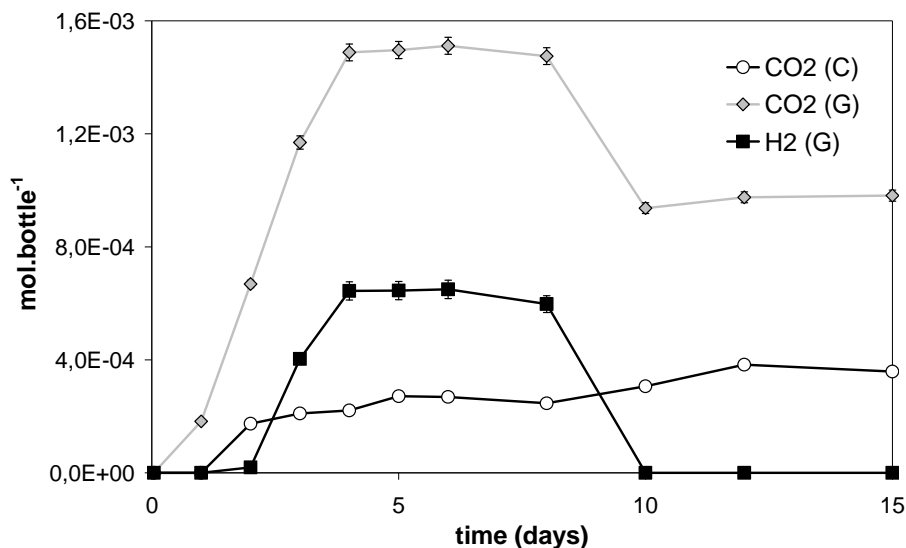


Figure 2: Evolution with time of gas for C and G experiments (mol bottle $^{-1}$).

The total number of bacteria estimated by direct count remained stable at $7.4 \cdot 10^9$ bacteria g^{-1} from day 2 to day 15. Similarly, the number of fermentative, denitrifying, FeIII-reducers and Se-reducing bacteria were stable all along the incubation at $2.9 \cdot 10^4$ bacteria g^{-1} soil, $1.7 \cdot 10^5$ bacteria g^{-1} soil, $3.8 \cdot 10^2$ bacteria g^{-1} soil and $1.7 \cdot 10^3$ bacteria g^{-1} soil respectively.

The DGGE analyses are presented in Fig. 3. No major variation was observed in DGGE patterns triplicate. The DGGE patterns evolved the first days of incubation (disappearance of bands 1 and 2) and stabilised rapidly after 2 d of incubation.

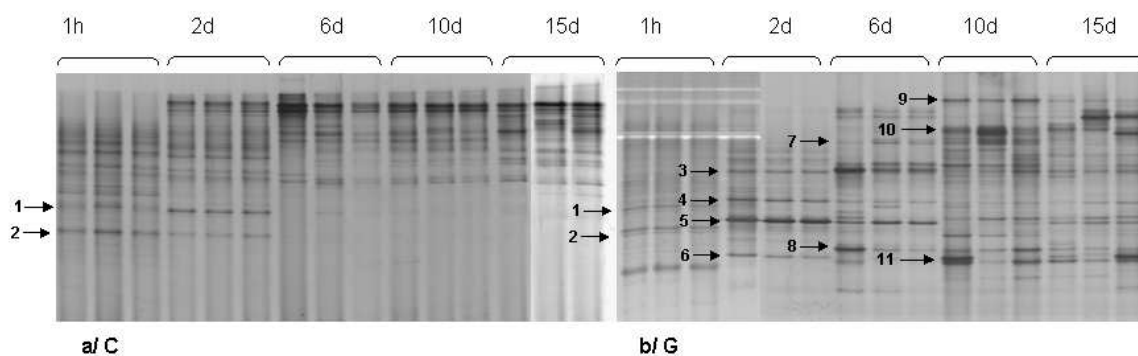


Figure 3: DGGE Patterns a/ C treatment and b/ G treatment

3.1.3 The amended treatment (G)

In the G treatment, the amendment supply induced a decrease of pH (Fig. 1a) and E_H (Fig. 1b) during the first 3 days of incubation. A strong reducing state (-280 mV) was observed between 3 and 8 days, then the E_H values increased up to “oxic” values (220 mV) after 10 d of incubation.

The CO_2 production was 7-fold higher than in the C treatment and was not constant during the incubation (Fig. 2). Four phases were clearly observed: a production during the 1-4 d period (until $1.5 \cdot 10^{-3}$ mol bottle⁻¹), equilibrium between 4 and 8 d, a decrease until day 10 ($9.4 \cdot 10^{-4}$ mol bottle⁻¹), then a second equilibrium. The H_2 concentration followed the same kinetic evolution than the CO_2 concentration, but in lesser quantity (Fig. 2) and had totally disappeared on day 10.

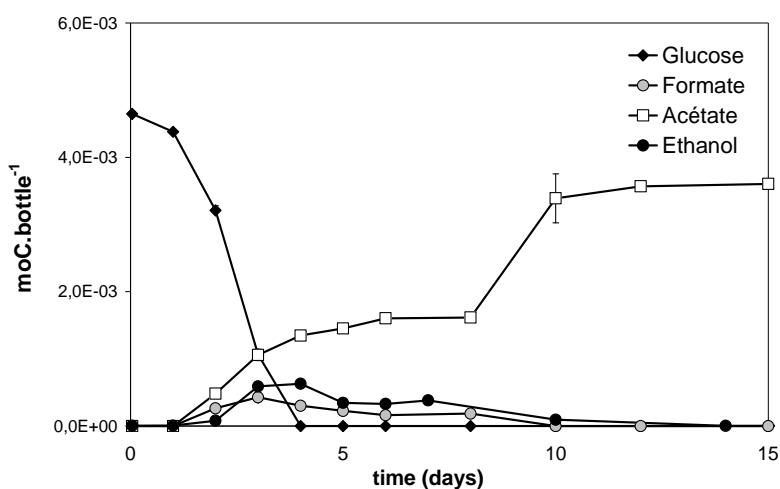
The total number of bacteria estimated by direct count remained stable and was not significantly different from the C treatment. At the opposite, kinetic evolutions were observed for fermentative and denitrifying bacteria number. The number of fermentative bacteria was between $2.1 \cdot 10^6$ to $7.2 \cdot 10^6$ bacteria g⁻¹ soil during the ten first days, then decreased until $1.9 \cdot 10^4$ bacteria g⁻¹ soil at day 15. The number of denitrifying bacteria increased from $2.1 \cdot 10^6$ to $2.5 \cdot 10^7$ bacteria g⁻¹ soil during the six first days, then decreased from day 10 and reached $8.2 \cdot 10^4$ bacteria g⁻¹ soil at day 15. No evolution was observed for FeIII-reducers ($\sim 3 \cdot 10^1$ bacteria g⁻¹ soil) and Se-respiring bacteria ($\sim 8 \cdot 10^2$ to $1 \cdot 10^3$ bacteria g⁻¹ soil) during the incubation.

The DGGE analyses are presented in Fig. 3. Similarly to C treatment, no major variation was observed in DGGE patterns triplicate. The DGGE pattern in the C and G treatments were

different from day 2. Thus, the structures of soil bacterial communities were different between the two treatments. The stabilisation of the DGGE pattern appeared more lately than C treatment (between 6 and 10 days of incubation). The evolutions of the structures of bacterial communities were more numerous with apparition of bands 3, 4, 5 and 6 on day 2, bands 7 and 8 on day 6 and bands 9, 10 and 11 on day 10. In addition, some bands, such as the band 6, disappeared or decreased in intensity during the incubation.

Changes in the concentration in solution of some organic compounds, ethanol (Fig. 4a), mineral anions and cations (Fig. 4b) were also observed.

a/



b/

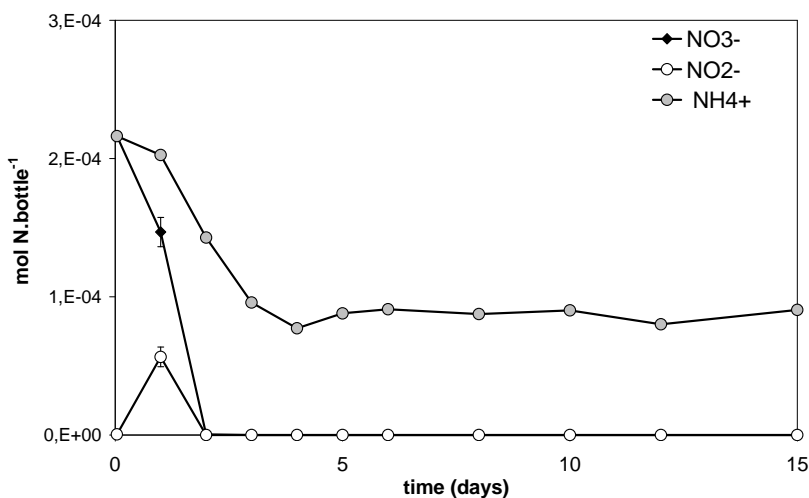


Figure 4 : Evolution with time of biochemical parameters in the G treatment. a/ Glucose, Formate, Acetate and Ethanol (mol C bottle⁻¹) and b/ Nitrate, Nitrite and Ammonium (mol N bottle⁻¹)

No sulphate consumption was observed during the incubation. NO_3^- (initially $2.16 \cdot 10^{-4}$ mol N) disappeared in the first 2 days of incubation (Fig 3b) whereas NO_2^- appeared in solution on day 1 ($5.65 \cdot 10^{-5}$ mol N) then totally disappeared on day 2 (Fig 3b). NH_4^+ (initially $2.16 \cdot 10^{-4}$ mol N) slightly decreased to $1.43 \cdot 10^{-4}$ mol N after 2 days of incubation. During these 2 days, the estimate of biomass N immobilisation $Q_{\text{M-im}}(\text{NH}_4^+)$ was about $3.5 \cdot 10^{-5}$ mol N. Consequently, the relative contribution of dissimilative reduction of NO_3^- into NH_4^+ (eq 16) was negligible (0.3 %) and denitrification was expected to explain most of NO_3^- fate during this period. Denitrification was thus used to calculate a maximum glucose consumptions $Q_{\text{M-d}}(\text{glucose})$ of about $2.7 \cdot 10^{-4}$ mol C (i.e. 5.6 % of initial glucose amount). During the 0-2 days period, glucose (initially $4.8 \cdot 10^{-3}$ mol C) decrease was about $1.6 \cdot 10^{-3}$ mol C, and we observed accumulations of acetate ($4.8 \cdot 10^{-4}$ mol C), lactate ($3.9 \cdot 10^{-5}$ mol C), butyrate ($2.8 \cdot 10^{-6}$ mol C), ethanol ($8.0 \cdot 10^{-5}$ mol C) and formate ($2.6 \cdot 10^{-4}$ mol C) that began after the second day of incubation (Fig. 3a). During the same period, total CO_2 accumulation (Fig. 2) approximately balanced glucose consumption minus organic acid and ethanol production ($6.7 \cdot 10^{-4}$ mol C instead of $7.8 \cdot 10^{-4}$ mol C). During the 1-4 d period, glucose totally disappeared, acetate, ethanol and formate amounts reached $1.3 \cdot 10^{-3}$ mol C bottle⁻¹, $6.3 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle⁻¹ and $3.0 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle⁻¹, respectively and the other organic acid accumulated to a lesser extent. The production of CO_2 + formate after 4 days of incubation corresponded approximately to 36.8 % of glucose consumption (instead of 33.3 %), whereas the Q_{EAB} value did not balance the consumption of glucose minus CO_2 + formate production: it corresponded only to 41.4 % of glucose consumption (instead of 66.7 %). During the 4-6 d period, we noted a decrease in ethanol amount of $3.0 \cdot 10^{-4}$ mol C.bottle⁻¹, that nearly balanced the accumulation of acetate production which was about $2.6 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle⁻¹ (Table 1, Eq. 7). We also observed a decrease of formate amount of $1.4 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle⁻¹ contributing to a production of CO_2 and H_2 (Table 1, Eq. 5). In addition, we observed an additional mobilisation of Fe(II) of about $3.6 \cdot 10^{-6}$ mol bottle⁻¹. The amount of H_2 , $\Delta Q_{\text{M-Fe}}(\text{H}_2)$, required to reduce the mobilised Fe(II) was $1.8 \cdot 10^{-6}$ mol bottle⁻¹. At last, we observed an increase in butyrate ($6.4 \cdot 10^{-5}$ mol C bottle⁻¹), and a decrease in lactate ($8.4 \cdot 10^{-5}$ mol C bottle⁻¹) that was nearly balanced by the accumulation of propionate ($1.1 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle⁻¹). During the 6-8 days period, the quantities of formate, acetate, ethanol, CO_2 and H_2 remained stable. Between 8-10 days period, the acetate production ($1.8 \cdot 10^{-3}$ mol C bottle⁻¹), nearly balanced with the $\Delta Q(\text{acetate})$ ($1.3 \cdot 10^{-3}$ mol C bottle⁻¹) explained by homoacetogenesis and true acetogenesis and calculated from the decreases of ethanol ($2.9 \cdot 10^{-4}$ mol C bottle⁻¹) ($\Delta Q(\text{ethanol})$) and of H_2 ($6.0 \cdot 10^{-4}$ mol C

bottle⁻¹), to which we added the consumption of H₂ produced from formate consumption (1.4 10⁻³ mol C bottle⁻¹). Fe(II) concentration increased linearly since day 10 and reached 1.1 10⁻⁵ mol bottle⁻¹. Beyond 10 days, we noted an additional production of acetate with a decrease in ethanol and organic acid that began in the following order: ethanol, butyrate and propionate. Fe(II) remained stable at an average of 1.10 10⁻⁵ mol after this date.

3.2 Selenium fate: distribution in the gaseous, liquid and solid phases

3.2.1 Selenium retention and aqueous speciation

The kinetics of selenite retention are illustrated in Fig. 5. For the S treatment, an apparent equilibrium between liquid and solid phases was reached after 1 h of incubation, leading to the retention of 84 ± 2 % of selenium by the sterile soil. In the non sterile treatments (C, G, G_2, G_6 and G_10), bacterial activities did not increase significantly the retention of Se. The retention processes were also rapid (1 h of incubation) and led to 82 ± 3 % of Se retained by the solid phase. In addition, whatever the dates of Se supply in the amended treatments (0, 2, 6 or 10 days) the kinetic evolutions of the Se retention were similar. After one or two days of incubation, equilibrium between liquid and solid phases was reached leading to 89 ± 2 % of Se retained.

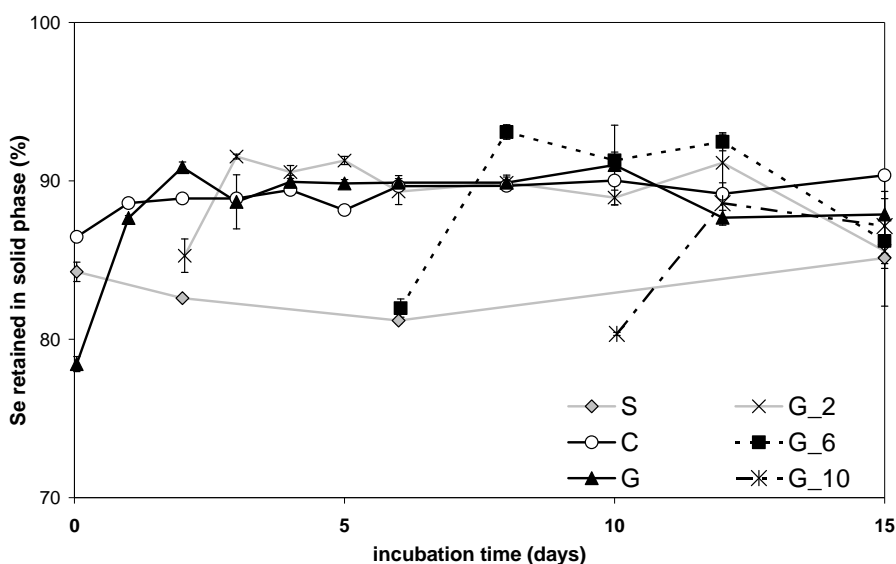


Figure 5: Evolution with time of Se retained by the solid phase. Vertical bars represent one standard deviation (σ) between triplicates.

Complementary to these results, the $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ ratio in the batch supernatants below $0,2 \mu\text{m}$ is presented in Fig. 6. Total aqueous Se, $[\text{Se total}]$, represented only 10 to 20 % of Se initially supplied ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol Se l}^{-1}$). In the S treatment, the ratio was stable all along the incubation and was equal to $45 \pm 4 \%$. Results obtained in the C treatment were comparable to results obtained in the sterilized treatment. Thus, bacterial activities involved in the C treatment did not modify the $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ ratio. At the opposite, in the G treatment, the glucose amendment induced a decrease of the $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ ratio from $58 \pm 3 \%$ to $18 \pm 5\%$ during the first three days of incubation. In the other amended treatments (G_2, G_6 and G_10), whatever the date of Se supply (2, 6 or 10 days), the evolutions of the $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ ratio were comparable to the G treatment. However, in the G_6 treatment, the ratio $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ was initially higher than in the others conditions ($76 \pm 3\%$).

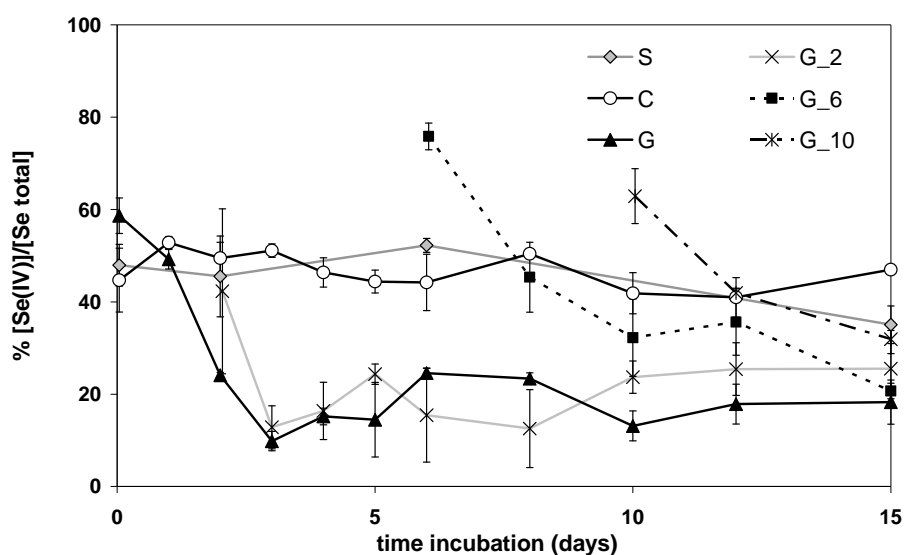


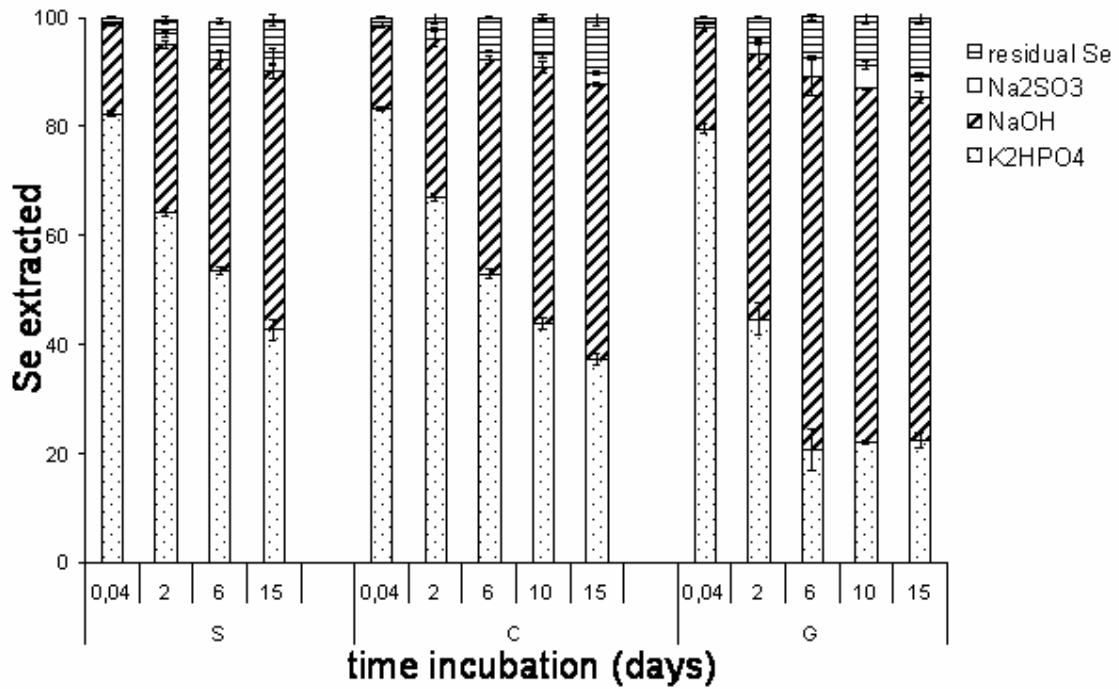
Figure 6: Evolution with time of percentage of $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se total}]$ in solution. Vertical bars represent one standard deviation (σ) between triplicates

3.2.2 Selenium in the solid phase

For all conditions, the sum of selenium extracted in the different steps of the sequential extraction procedure represented $100 \pm 20 \%$ of the selenium initially supplied in the batch. Then, for clarity, the amounts of Se extracted in each steps of sequential extraction were expressed as percentage of the cumulative amount of Se recovered (i.e. the sum of the 4 steps). The evolutions of the selenium solid distribution with time in the pellets are presented for the S, C and G conditions and for G_2, G_6 and G_10 conditions in Fig. 7a and 7b respectively.

For the sterile treatment (S), after 1 hour of incubation, selenium retained by the soil was recovered mainly in the fraction exchangeable with phosphate (82 %) and in the NaOH extracted fraction (16 %). The percentages of elemental selenium and residual selenium were negligible (< 1%). Then, the selenium distribution in the solid phase evolved with time. The phosphate exchangeable fraction decreased progressively and reached 43 % after 15 days, whereas the amount recovered in the NaOH extracted fraction increased to 48 %. Elemental selenium and residual Se fractions increased but were still low, reaching 3 % and 7 % respectively. In the C treatment, bacterial activities did not disturb the selenium distribution between the different solid components; results were similar than those obtained to S treatment at all time of incubation. In all amended treatments (G, G_2, G_6 and G_10), the solid distribution of Se was similar to the one of S treatment after the first hour of incubation. However, differences between these treatments appeared after this time of incubation. In the G treatment, the solid redistribution between the different solid phases was more rapid compared to C treatment. On day 2, the solid distribution of Se in the G treatment was similar to the one observed in C treatment after 15 days of incubation. In the G treatment the percentage of selenium recovered in the phosphate exchangeable fraction continued to decrease with time in favour of the percentage of selenium recovered in the other fractions. On day 15, the phosphate exchangeable fraction reached 22 % and the amount recovered in the NaOH extracted fraction was 63 %. Elemental selenium and residual Se fractions represented 4 % and 11 % respectively. The redistribution of Se between the different solid phases in G_2, G_6 and G_10 treatments followed the same evolution than in the G treatment. In addition, the kinetics of Se redistribution were similar between these treatments.

a/



b/

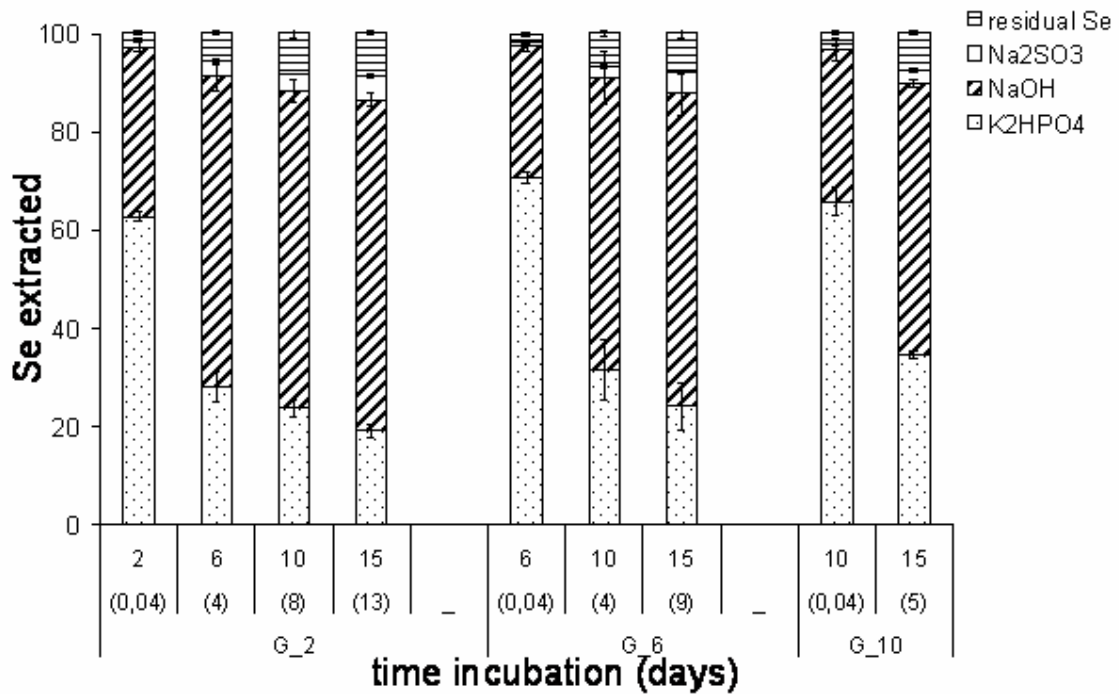


Figure 7: Evolution with time of Se solid distribution. Vertical bars represent one standard deviation (σ) between triplicates (a) S, C and G treatments (b) G₂, G₆ and G₁₀ treatments

3.2.3 Selenium volatilisation

No volatilisation was measured in the S treatment. Thus, volatilisation of Se was a biotic process. In the C and G treatments, the quantities of Se volatilised were very low, in the order of a few ‰ of the total Se. This level was however well quantified thanks to the use of ⁷⁵Se-labelling. The evolutions of selenium volatilisation were similar in C and G conditions. The quantities of volatile selenium increased with time, and reached $9 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-3}$ ‰ on day 10. No production of volatile Se was recorded after day 10. Similarly, in the G_2 treatment, the volatile species of selenium were produced only during four days of incubation, between the date of Se supply (day 2) and day 6 ($9 \cdot 10^{-3}$ ‰ \pm $4 \cdot 10^{-3}$ of the total Se). In the G_6 treatment, the production of volatile Se increased from $3 \cdot 10^{-3}$ ‰ \pm $1 \cdot 10^{-3}$ on day 10 (4 days of incubation) to $1 \cdot 10^{-2}$ ‰ \pm $1 \cdot 10^{-3}$ on day 15 (9 days of incubation). In the G_10 treatment, volatilisation of selenium was measured only on day 15 (5 days after the Se supply) and was lower than the other condition ($3 \cdot 10^{-3}$ ‰ \pm $6 \cdot 10^{-4}$).

4. Discussion and conclusion

4.1 Microbial and Geochemical evolutions

The glucose amendment involved an increase in the respiratory bacterial activities compared to the control values (ca x7), but surprisingly, none of the number of bacteria. However, the direct count method for soils bacteria remains difficult because of the presence of many autofluorescent particles (Kepner Jr and Pratt, 1994; Sunamura et al., 2003). Then, we may assume that there was an overestimate of bacterial biomass that could mask an increase of bacterial biomass. The DGGE fingerprint characterised specific bacterial populations (1 - 2 % of soil bacteria), but not a complete coverage of soil bacterial diversity (Muyzer et al., 1993). The disappearances of bands 1 and 2, present only at the beginning of the incubation in the C and G treatments, was attributed to the death of obligate aerobe bacteria. Indeed, the soil was not pre-incubated in anoxia before incubation, obligate and facultative aerobe bacteria were thus present in the system at the beginning of incubation. The temporal evolution in the G treatment can be explained by a successive anaerobic microbial process due to the glucose degradation. The MPN results of denitrifying and fermentative cultivable bacteria confirmed a temporal evolution for these functional populations. No increase of the number of FeIII-reducers bacteria have been observed in the amended

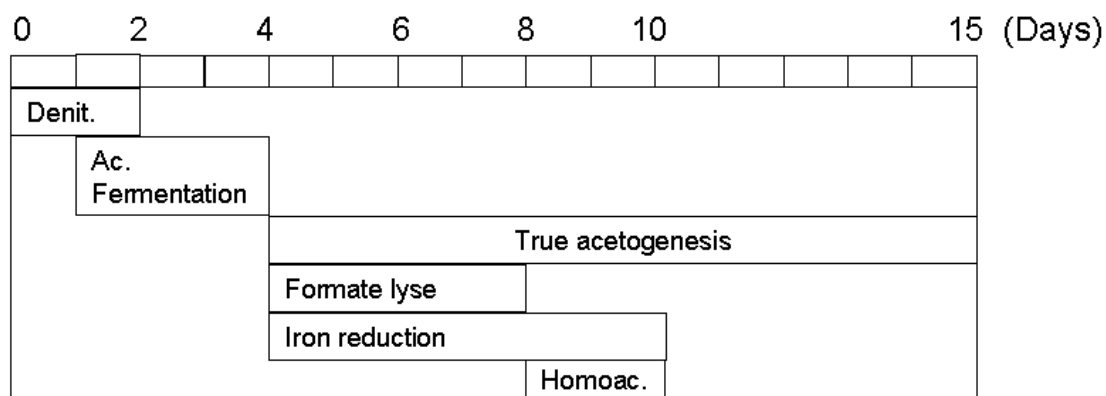
treatment compared to control, suggesting the absence of this bacterial activity. But, Fe(III) reduction was measured in the G treatment. As regard to the low Fe(II) concentration measured in this amended treatment, this result was not surprising. In addition, this result can be also explained by the following hypothesis:

- a too selective medium and/or the low cultivability of FeIII reducers.
- bacteria of other functional communities were also able to reduce iron, such as denitrifying or fermentative bacteria (Seeliger et al., 1998) but were not cultivable on FeIII-reducers selective medium.

Despite the presence of H₂ and/or lactate in the G treatment, which can be used such as electron donors for selenite reduction (Switzer Blum et al., 1998; Stolz and Oremland, 1999), no significant difference in Se-reducing bacteria density was observed between C and G treatments ($2 \cdot 10^3$ bacteria g⁻¹soil). In addition, the number of Se-reducing bacteria was similar to what has been found by Haudin (2006) in a soil without selenium supply. These small density numbers could be explained by the low Se concentration used. But, despite the absence of specific Se-reducing bacteria, the other bacterial activities present in the amended treatment had an effect on the Se behaviour (reduction, volatilisation ...).

Evolutions of gas composition, organic and mineral compounds allowed us to describe five successive anaerobic microbial processes involved in the degradation of glucose (G treatment). During the 0-2 days period, denitrification (Table 1, Eq. 1) explained most of nitrate consumption but only 5.6 % of glucose consumption. The glucose consumption was closely related to the production of organic acid (butyrate, formate, acetate), CO₂ and ethanol production. Contrary to Dassonville et al. (2004), the production of butyrate was very low compared to the production of ethanol in our condition. Consequently, we assumed that glucose consumption was mostly due to acetic fermentation (Table 1, Eq. 3) and in a lesser extend to butyric fermentation (Table 1, Eq. 4). During the 1-4 days period, the disappearance of glucose was approximately balanced with the production of 1 third of formate + CO₂ (36.8 % instead of 33.3 %), but not balanced with 2 thirds of ethanol, acetate and butyrate productions (41.4 %). It was thought that ethanol may have been partly lost by evaporation during the storage of samples even if they were frozen. Nevertheless, we assumed that glucose was consumed through acetic and butyric fermentations and neither acetate, butyrate nor ethanol were mineralized. During the 4-6 days period, the decrease of ethanol and formate was explained (i) by true acetogenic transformation of ethanol into acetate (Table 1, Eq. (7)) and (ii) by the formate lyse (Table 1, Eq. (5)). The formate oxidation (Table 1, Eq. (6)) was

excluded because of the absence of NO_3^- . The reduction of Fe(III) into Fe(II) ($3.6 \cdot 10^{-6}$ mol.bottle $^{-1}$) was explained by microbial respiration with the oxidation of H_2 (Table 1, Eq. (12)). Ethanol and butyrate oxidation with concomitant reduction of Fe(III) into Fe(II) (Table 1, Eq. (10) and (11)) were excluded because the amount of transferred e^- necessary to these reactions was to 2 times higher than the maximum production of H_2 . The system was in balance during the 6 to 8 days period. During the 8-10 days period, the Fe(II) production consumed only 1 % of the total H_2 . In addition, homoacetogenesis was mostly responsible of the H_2 decrease. Thus, we checked that homoacetogenesis and true acetogenesis explained most of acetate production. After 10 days, we assumed that there was no additional pathway as true acetogenesis explained the production of acetate with the decrease of ethanol. Neither sulphate reduction was observed during the incubation. All these successive metabolic pathways are resumed on Fig. 8.



Denit. : denitrification - *Ac. Fermentation* : acetic fermentation – *Homoac.*: homoacetogenesis

Figure 8: Metabolic pathways in G treatment.

In the amended treatments, the bacterial processes induced the formation of electrons donors and acceptors in the system (Fig. 3), which led to an evolution of the E_H . In the literature, the E_H value measured is often different than those expected by the thermodynamics data and the redox couples present in the system. This is due to the superimposition of several type of microbial processes which can take place in the same time and to the complex nature of the mineral phase mixtures often unknown (Runnells and Lindberg, 1990; Picek et al., 2000; Gao et al., 2002; Alewell et al., 2006). However, according to the equation and the thermodynamics data of Sposito (1989) and the concentrations of N, Fe and H species, we assumed that three couples of electrons donors and acceptors controlled the redox potential in our conditions. Thus, the redox potential was first

controlled by $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ during the 0-2 days period (theoretical calculated value : about + 400 mV), then by H^+/H_2 during the 3-8 days period (theoretical calculated value : about -350 mV) and then by $\text{Fe}(\text{OH})_3/\text{Fe}^{2+}$ during the 9-15 days (theoretical calculated value : about 170 mV).

4.2 Selenium behaviour

The results obtained for the sterile conditions were taken as a reference for abiotic behaviour of selenium, although microbial activities can affect indirectly abiotic geochemistry of selenium by changing some geochemical characteristics in other conditions. For the sterile condition, selenium behaviour resulted from chemical interactions between mineral and organic soil particles and selenite input. The interactions between soil and selenite were rapid, occurring mainly in the first hour of incubation. Contrary to Tc (Begg et al., 2007), Se immobilisation was mainly abiotically mediated. Bacterial activities (raw or stimulated) did not increase the quantity of Se retained onto the solid phase (Fig. 5).

As the results obtained in S and C treatments for the Se solid distribution and for the evolution of the solid distribution with time were similar to those obtained by Darcheville et al. (2008) and because an abiotic reduction seemed unlikely at 360 mV, we reasonably considered that the abiotic immobilisation of Se was suitable in our anoxic conditions. Thus we suggested that selenium was first mainly retained onto soil particles by a rapid surface adsorption and then that a fraction of adsorbed selenium evolved with time to form stronger bounds within these particles by the formation of a complex non-exchangeable with phosphate. This hypothesis was also supported by the results of previous studies on kinetics of selenium sorption (Barrow and Whelan, 1989; Zhang and Sparks, 1990). As Duc et al. (2006), our results suggested that the process of Se retention was more complex than a simple surface adsorption.

Bacterial activities were involved in the volatilisation of Se. This process was usually negligible in anoxic conditions (Doran and Alexander 1977; Guo et al. 1999), but it was previously observed in soil exposed to nitrogen (Reamer and Zoller, 1980). In addition, volatilisation was also often assimilated to a detoxification process (Hassoun et al., 1995) In our anoxic conditions, volatilisation of Se resulted of a direct interaction between bacteria and selenite and was not only a protective mechanism to detoxify their environment. Indeed, the low selenium concentration used ($1 \mu\text{mol l}^{-1}$), was not a toxic concentration for most microorganisms (Dungan and Frankenberger Jr, 2000). In addition, the low concentration of

Se can explain the low quantities of volatile Se measured (from 10^{-3} to 10^{-2} ‰). However, the selenium volatilisation was probably underestimated because dimethyl selenide (the main selenium volatile species) is very soluble in water (Zhang and Frankenberger Jr 1999). It was not possible to relate clearly any specific bacterial activity to Se volatilisation processes because of the poor contrast we got between our conditions and the experimental variability observed between replicates (until 50 % of many values).

In the S and C treatments, there was a strong modification of speciation of the remnant aqueous selenium. Selenite accounted for only 50 % of the total aqueous selenium during all the experiment. As regard to the E_H value (360 mV), an abiotic reduction was unlike in our conditions. A similar result was observed by Février et al (2007) in oxic condition. The authors hypothesized that a rapid binding between dissolved organic matter and Se(IV) interfered in the selenite measurement by hydride generation-quartz furnace atomic absorption spectrometry (Roden and Tallman, 1982; Ferri and Sangiorgio, 1996).

The stimulation of bacterial activities with a glucose amendment (G, G_2, G_6 and G_10 treatments) induced a decrease of the $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se(total)}]$ ratio in the batch supernatant (Fig. 6). According to pH- E_H diagram, elemental selenium (Se(0)) and selenide (Se(-II)) prevail in reducing condition. In addition, in presence of Fe(II), selenite could be reduced abiotically and precipitate in the metallic selenide salt (FeSe ou FeSe₂) (Bruggenam et al., 2002). Thus, because E_H was reductive in the G, G_2 and G_6 treatments (Fig. 1), we could supposed an abiotic reduction of Se(IV) into Se(0). But, in the G_10 treatment, despite the E_H oxic (220 mV), the $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se(total)}]$ ratio decrease too. In addition, reducing species such as Fe(II) remained in solution at this “oxic” potential. Our experimental period (15 days) was probably too short to observe an abiotic reduction (Lee et al., 2007). And, the low concentration of Se used prevented us from using microscopic (transmission or scanning electron microscopy) or X-ray absorption spectroscopic techniques for further investigations. In the G_6 treatment, the initial $[\text{Se(IV)}]/[\text{Se(total)}]$ ratio in the batch supernatant was higher than other conditions (76 % \pm 3), whereas the E_H was the most reducing (-280 mV). Then, we supposed that the anionic organic compounds present at this date (formate, ethanol and acetate) interacted with soil dissolved organic matter instead of SeO₃²⁻. Then, Se(IV) was “free” in the aqueous phase and was quantified by hydride generation. So, these results suggested that Se speciation in soil was more complex than those purposed by a pH- E_H diagram. Because interactions between soil dissolved organic matter and Se(IV) or abiotic reduction of Se(IV) were not sufficient

alone to explain the dynamic of [Se(IV)]/[Se(total)] ratio, we assumed that the decrease of the ratio [Se(IV)]/[Se(total)] in the batch supernatant was due to a biotic reduction. In anoxic conditions, selenite has been reported to be used as an electron acceptor (Garbisu et al., 1996) or to be reduced independently of dissimilatory electron transport (Lortie et al., 1992). The low number of Se-respiring bacteria suggested that other bacteria, that did not grow in the chosen culture medium, participated in selenite reduction as suggested by Kessi (2006). Particularly, sulphate reducing bacteria have the capacity to enzymatically reduce small quantity of selenium (Hockin and Gadd, 2003). But, despite the presence of sulphate in some of our experiments, no SO_4^{2-} reduction was observed. In addition, whatever the bacterial activity present when the Se was supply, the decrease of the [Se(IV)]/[Se(total)] ratio was similar (Fig. 6). Thus we assumed that various bacterial were able to reduce the small quantities of Se(IV) into Se(0) whatever their activities.

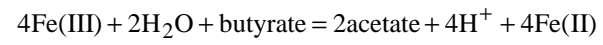
In the amended treatments, the stimulated bacterial activities speed up the Se redistribution between the different solid phases, always in favour of a stronger retention of Se. Whatever the bacterial activities which occurred on the date of Se supply, the kinetics of Se redistribution were similar. This result suggested that the time was the main factor which controls the stabilisation of Se in the soil.

To conclude, in anoxic conditions, the retention of selenium was mainly due to abiotic processes. The corresponding distribution coefficient between soil and solution (K_d) was about 50 l kg^{-1} and was characteristic of moderately mobile species. This value fell well in the ranged of K_d values ($5\text{-}50 \text{ l kg}^{-1}$) (Roussel-Debet and Colle, 2005). Nevertheless, biotic effects on Se fate were highlighted, such as modification of the Se aqueous speciation (assumed as biotic reduction of Se(IV) into Se(0)), a speed up of the Se redistribution between the different solid phases and volatilisation of Se. Excepted for the volatilisation, this biotic processes contributed to decrease the mobility of Se by a lesser extractability of sorbed Se (decrease of the amount recovered as the phosphate-exchangeable fraction). This result was similar to that observed by Haudin (2006) in reducing environment. None effect due to specific bacterial activities targeted have been observed. When selenite was present at trace level, various bacterial activities were competent to reduce selenite to elemental selenium and to volatilise Se.

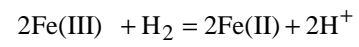
Table 1: Balance reaction

Equ.	Microbial reaction
	N-oxide reductions
1	$5 \text{ glucose} + 24\text{NO}_3^- + 24\text{H}^+ = 30\text{CO}_2 + 42\text{H}_2\text{O} + 12\text{N}_2$
2	$\frac{10}{3} \text{ glucose} + 4\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{CO}_2 + 3\text{acetate} + 12\text{formate} + 4\text{NH}_4^+$
	Glucose fermentation and formate fate
3	$\text{glucose} + \text{H}_2\text{O} = 2\text{formate} + \text{acetate} + \text{ethanol}$
4	$\text{glucose} = \text{butyrate} + 2\text{formate}$
5	$\text{formate} = \text{CO}_2 + \text{H}_2$
6	$\text{formate} + \text{NO}_3^- = \text{CO}_2 + \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
	True acetogenesis
7	$\text{ethanol} + \text{H}_2\text{O} = \text{acetate} + 2\text{H}_2$
8	$\text{butyrate} + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{acetate} + 2\text{H}_2$
	Homoacetogenesis
9	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{acetate} + 2\text{H}_2\text{O}$
	Fe reduction
10	$4\text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O} + \text{ethanol} = \text{acetate} + 4\text{H}^+ + 4\text{Fe(II)}$

11



12



References

- Alef, K., Nannipieri, P., 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Anaerobic microbial activities in soil. London, Academic Press.
- Alewell, C., Paul, S., Lischeid, G., Kusel, K., Gehre, M., 2006. Characterizing the redox status in three different forested wetlands with geochemical data. *Environmental Science and Technology* 40, 7609-7615.
- Barrow, N.J., Whelan, B.R., 1989. Testing a mechanistic model. VIII. The effects of time and temperature of incubation on the sorption and subsequent desorption of selenite and selenate by a soil. *Journal of Soil Science* 40, 29-37.
- Begg, J.D.C., Burke, I.T., Morris, K., 2007. The behavior of technecium during microbial reduction in amended soils from Dounreay, U.K. *Science of the Total Environment* 373, 297-304.
- Ben Dhia Thabet, O., Fardeau, M.-L., Jouliau, C., Thomas, P., Garcia, J.-L., Ollivier, B., 2004. *Clostridium tunisiense* sp. nov., a new proteolytic, sulfur-reducing bacterium isolated from an olive mill wastewater contaminated by phosphogypse. *Anaerobe* 10, 185-190.
- Bienvenu, P., Cassette, P., Andreoletti, G., Be, M.M., Comte, J., Lepy, M.C., 2007. A new determination of ⁷⁹Se half-life. *Applied Radiation and Isotopes* 65, 355-364.
- Bruggeman, C., Maes, A., Vancluysen, J., Vandemussele, P., 2005. Selenite reduction in Boom clay: Effect of FeS₂, clay minerals and dissolved organic matter. *Environmental Pollution* 137, 209-221.
- Cannavo, P., Richaume, A., Renault, P., Emblanch, C., Bertuzzi, P., Lafolie, F., 2002. Denitrification in the upper vadose zone layers: a comparison between a fluvic hypercalcaric cambisol and a haplic calcisol. *Agronomie* 22, 479-488.
- Coppin, F., Chabroulet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J., 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* 42, 379-386.
- Darcheville, O., Février, L., Haichar, F.Z., Berge, O., Martin-Garin, A., Renault, P., 2008. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. *Journal of Environmental Radioactivity* 99, 981-992.
- Dassonville, F., Renault, P., 2002. Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: A review. *Agronomie* 22, 51-68.

- Dassonville, F., Godon, J.J., Renault, P., Richaume, A., Cambier, P., 2004. Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1417-1430.
- Dolfing, J., 1988. Acetogenesis. *Biology of anaerobic microorganisms*, John Wiley & Sons: 417-469.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Gao, S., Tanji, K.K., Scardaci, S.C., Chow, A.T., 2002. Comparison of redox indicators in a paddy soil during rice-growing season. *Soil Science Society of America Journal* 805-817.
- Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T., Buchanan, B.B., 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* 132, 199.
- Haichar, F.E.Z., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Marol, C., Marais, M.F., Mougel, C., Ranjard, L., Balesdent, J., Berge, O., 2007. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environmental Microbiology* 9, 625-634.
- Hassoun, B.S., Palmer, I.S., Dwivedi, C., 1995. Selenium detoxification by methylation. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 90, 133-142.
- Haudin, C.S., 2006. Conséquences de la variabilité spatiale et temporelle de l'anoxie sur le devenir du sélénium dans le sol. Thèse. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse,
- Hockin, S.L., Gadd, G.M., 2003. Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7063-7072.
- Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., 1988. Effects of carbon and trace element addition on alkylselenide production by soil. *Soil Science Society of America Journal* 52, 1640-1644.
- Kepner JR, R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews* 58, 603-615.
- Kessi, J., 2006. Enzymatic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Micobiology* 152, 731-743.
- Lakin, H.W., 1972. Selenium accumulation in soils and its adsorption by plants and animals. *Geological Society of America Bulletin* 83, 181-190.

- Lee, C.-P., Jan, Y.-L., Wei, Y.-Y., Teng, S.-P., Hsu, C.-N., 2007. Anaerobic and aerobic sorption of cesium and selenium in mudrock. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 274, 145-151.
- Lensi, R., Lescure, C., Steinberg, C., Savoie, J.M., Faurie, G., 1991. Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a gamma-sterilized soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 367.
- Lortie, L., Gould, W., Rajan, S., McCready, R., Cheng, K., 1992. Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 4042-4044.
- Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H., 1990. Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. *Environmental Science and Technology* 24, 91-96.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I., 2001. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4554-4559.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2003. *L'analyse du sol*. Springer-Verlag France, Paris,
- Picek, T., Simek, M., Santruckova, H., 2000. Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. *Biology and Fertility of Soils* 31, 315-322.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*. DeBoeck & Larcier, Bruxelles,
- Rangel-Castro, J.I., Killham, K., Ostle, N., Nicol, G.W., Anderson, I.C., Scrimgeour, C.M., Ineson, P., Meharg, A., Prosser, J.I., 2005. Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudates utilization by soil microorganisms. *Environmental Microbiology* 7, 828-838.
- Roussel-Debet, S., Colle, C., 2005. Comportement de radionucléides (Cs, I, Sr, Se, Tc) dans le sol: proposition de valeurs de Kd par défaut. *Radioprotection* 40, 203-229.
- Runnells, D.D., Lindberg, R.D., 1990. Selenium in aqueous solutions: the impossibility of obtaining a meaningful Eh using a platinum electrode, with implications for modeling of natural waters. *Geology* 18, 212-215.

- Séby, F., Potin-Gautier, M., 1998. Assessing the speciation and the biogeochemical processes affecting the mobility of selenium from a geological repository of radioactive wastes to the biosphere. *Analisis* 26, 193 - 198.
- Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R., Schink, B., 1998. A periplasmic and extracellular c-Type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to others acceptors or to partner bacteria. *American Society of Microbiology* 3688-3691.
- Sposito, G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.
- Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 615-627.
- Sunamura, M., Maryuama, A., Tsuji, T., Kurane, R., 2003. Spectral imaging detection and counting microbial cells in marine sediment. *Journal of Micobiological Methods* 53, 57-65.
- Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J.F., Oremland, R.S., 1998. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: Two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of Microbiology* 171, 19-30.
- Tamari, Y., 1998. Methods of analysis for the determination of selenium in biological, geological, and water sample. *Environmental Chemistry of Selenium*. Frankenberger Jr, W. T. and Engberg, R. New York, Marcel Dekker Inc.: pp 27-46.
- Tanji, K.K., Gao, S., Scardaci, S.C., Chow, A.T., 2003. Characterizing redox status of paddy soils with incorporated rice straw. *Geoderma* 114, 333-353.
- Tiedje, J.M., Sexstone, A.J., Parkin, T.B., Revsbech, N.P., Shelton, D.R., 1984. Anaerobic processes in soil. *Plant and Soil* 76, 197-212.
- Zhang, P., Sparks, D.L., 1990. Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at the goethite/water interface. *Environmental Science and Technology* 24, 1848-1858.
- Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T., 1999. Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. *Journal of Environmental Quality* 28, 1321-1326.

ANNEXE III - Liste des Figures

Chapitre I – Etat de l’art

Figure 1 – Constituants formant un sol et quelques exemples d’interactions entre les différents constituants (inspiré de Calvet (2003a)).	7
Figure 2 – Domaines pe-pH observés pour les sols accessibles aux microorganismes (Sposito, 1989; Calvet, 2003b)	10
Figure 3 – Séquence des métabolismes microbiens intervenant dans un sol en fonction du pe (Calvet, 2003b)	14
Figure 4 – Différents mécanismes de sorption d’un ion sur la phase solide du sol (inspirée de (Sparks, 2003))	19
Figure 5 – Principales interactions entre un élément (E) et les microorganismes conduisant à la solubilisation et/ou à l’insolubilisation de cet élément.	20
Figure 6 – Les 6 dernières colonnes du tableau périodique des éléments.	21
Figure 7 – Diagramme E_H -pH pour le Se à une concentration de 10^{-6} mol.L-1.	25
Figure 8 – Principe expérimentale d’obtention de l’isotherme de sorption (appelée isotherme d’adsorption dans le schéma) (Calvet, 2003a).	34

Chapitre II – Matériels et Méthodes

Figure 1 – Schéma récapitulatif de la méthodologie de l’étude et des analyses effectuées.	53
Figure 2 – Système « batch » : flacon à centrifugation de 250 ml équipé d’un septum.	54
Figure 3 – Mesure du potentiel d’oxydo-réduction du système au travers du septum.	63
Figure 4 - Principe du dénombrement par NPP (dans cet exemple une dilution au 10^6 entre chaque série de tubes, avec 5 tubes par dilution + 1 témoin).	71

Chapitre III-2 Incubation de sol en conditions oxygènes

Figure 1a et 1b : Evolutions cinétiques du potentiel d'oxydo-réduction E_H (mV) par rapport à l'électrode standard à H_2 . Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.....	81
Figure 2a et 2b : Evolutions cinétiques du pH. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	82
Figure 3a et 3b : Evolutions cinétiques de la production de CO_2 total (mol/jour). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	84
Figure 4 : Evolutions cinétiques de la concentration en glucose en solution (mol C/batch). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	87
Figure 5 : Evolutions cinétiques de la biomasse C totale (μg C/g sol sec). La ligne horizontale en pointillé représente la valeur de biomasse C du sol avant l'incubation (T_0). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	88
Figure 6 : Evolutions cinétiques de la biomasse fongique C (μg C/g sol sec). La ligne horizontale en pointillé représente la valeur de biomasse C du sol avant l'incubation (T_0). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.....	90
Figure 7 : Evolutions cinétiques du ratio BFC/ BC. La ligne horizontale en pointillé représente la valeur du ratio avant l'incubation (T_0). La ligne en trait plein représente 100 %. Moyenne des trois réplicas ± 1 écart-type.	91
Figure 8 : Evolution cinétique de la densité bactérienne (nombre de cellules/ g sol sec). Moyenne des trois réplicas ± 1 écart-type	93
Figure 9: Profils des fragments d'ADN bactérien 16S amplifié à partir du sol avant incubation, et après 3, 6 et 10 jours d'incubation pour toutes conditions, obtenus par DGGE. A chaque temps, 3 répliquas ont été amplifiés. Les flèches représentent les populations bactériennes remarquables.	96
Figure 10 : Cinétique des quantités cumulées de sélénium volatilisé (exprimée en % du Se introduit dans le batch). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	105
Figure 11 : Evolution du pourcentage Se total (non filtré) restant en solution en fonction du temps - Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	107
Figure 12 : Quantité de Se $> 0,22 \mu m$ dans le surnageant du batch, exprimée en pourcentage du Se total dans le surnageant. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	108
Figure 13 : Evolution du sélénite (Se(IV)) présent en phase dissoute, exprimé en pourcentage du sélénium total dissous, mesuré via le ^{75}Se . Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	110

Figure 14 : Evolution cinétique des concentrations relatives en pourcentage de (a) Se(IV) et (b) Se total dissous (<0,22 µm). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type. Se ini : Concentration initiale en Se dans le surnageant du batch.	112
Figure 15 : Evolution dans le temps de la répartition solide du Se pour toutes les conditions. Moyenne des trois réplicats, exprimé en % du Se retenu en phase solide ± 1 écart-type.	114
Figure 16 : Sélénium lié à la biomasse, exprimé en pourcentage du Se total mis en solution. Moyenne des trois réplicats ± une 1 écart-type.	117

Chapitre IV - Incubation de sol en conditions anoxiques

Figure 1: Evolution du pH and E _H pour les conditions S, C et G a/ pH; b/ E _H . Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.	128
Figure 2: Evolution de la production de gaz pour les conditions C et G (mol.batch ⁻¹). Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type..	129
Figure 3: Profils des fragments d'ADN bactérien 16S amplifié à partir du sol obtenus par DGGE a/ condition C et b/ condition G. A chaque temps, 3 répliquas ont été amplifiés. Les flèches représentent les populations bactériennes remarquables.	130
Figure 4 : Evolution des paramètres biogéochimiques de la condition G. a/ Glucose, Formiate, Acétate et Ethanol (mol C.batch ⁻¹) and b/ Nitrate, Nitrite et Ammonium (mol N.batch ⁻¹).	133
Figure 5: Grandes voies métaboliques anaérobies dans la condition G.....	135.
Figure 6: Evolution du pourcentage de Se retenu sur la phase solide. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type..	135
Figure 7: Evolution du ratio [Se(IV)]/[Se total] (%) en solution. Moyenne des trois réplicats ± 1 écart-type.....	136
Figure 8: Evolution de la distribution solide du Se. Vertical bars represent one standard deviation (σ) between triplicates (a) conditions S, C et G (b) conditions G_2, G_6 et G_10 . Les valeurs entre parenthèses représentent le temps de contact entre le sol et le Se.....	139

ANNEXE IV - Liste des Tableaux

Chapitre I – Etat de l’art

Tableau 1 – Exemples de quelques réactions de réduction observées dans les sols neutres pour une gamme de pe donnée (d’après Sposito, 1989).	10
Tableau 2 – Exemples de biotransformations produits par les divers microorganismes présents dans les sols (modifié d’après Stengel, 1998 et Prescott et al., 2003).	13
Tableau 3 – Teneur en sélénium de quelques sols.	22
Tableau 4 – Emissions mondiales de Se issues principalement de sources anthropiques au milieu des années 1990, par continent et en tonnes/ans (Dudzinska-Huczuk et Bolalek, 2007).	23
Tableau 5 – Concentrations minimales d’inhibition (MIC) en Se(IV) et Se(VI) pour les bactéries résistantes et sensibles isolées sur deux sites, Kesterson Reservoir (K) (riche en Se) et Volta Reservoir (V) (pauvre en Se) (modifié d’après Burton et al., 1987).	30
Tableau 6 – Valeurs par défaut de K_d ($L.kg^{-1}$) pour le sélénium en fonction du type de sol (modifié d’après Roussel-Debet et Colle, 2005).	36
Tableau 7 – Phases communes retrouvées dans quelques protocoles d’extractions séquentielles.	38

Chapitre II-Matériels et Méthodes

Tableau 1 – Caractéristiques physico-chimiques de l’échantillon de terre.	56
Tableau 2 – Caractéristiques minéralogiques de l’échantillon de terre.....	56
Tableau 3 – Incubation en conditions oxygènes.....	58
Tableau 4 – Incubation en conditions anoxiques.....	59
Tableau 5 – Etapes des extractions séquentielles.	62
Tableau 6 – Mélange de gaz étalons utilisés pour la calibration du CPG.....	64
Tableau 7 – Modifications du protocole d’utilisation du kit de dosage GAGO20 (Sigma).	65

Chapitre III-2- Incubation de sol en conditions oxiqes

Tableau 1 : Identification des communautés bactériennes isolées par l'analyse de l'ADNr 16S. Les rapports entre parenthèse représentent le nombre de bases communes sur le nombre de bases utilisées, le fragment d'ADN amplifié complet comprenant 160 paires de bases.97

ANNEXE V - Analyse par CPG

- **Caractéristiques techniques du CPG (Hewlett Packard 6890)**

Détecteur	Catharomètre
Température du détecteur	250 °C
Gaz vecteur	Hélium (qualité 6.0)
Débit gaz vecteur	28 mL/min
Colonne pour la séparation	colonne remplie Porapak Q (80-100 µm, 6'x1/8'') tamis moléculaire (5 Å, 60-80 µm, 6'x1/8'')
Température du four	50 °C
Volume injecté	200 µL

Le schéma interne du CPG est détaillé dans la figure suivante. Le tamis moléculaire est utilisé pour séparer les pics de N₂ et d'O₂. Néanmoins, les gaz de volume plus important (CO₂, N₂O) ne doivent pas passer dans le tamis moléculaire pour ne pas le détériorer. Une vanne de commutation (vanne 2) permet donc l'ouverture ou la fermeture du tamis moléculaire lors du passage des gaz.

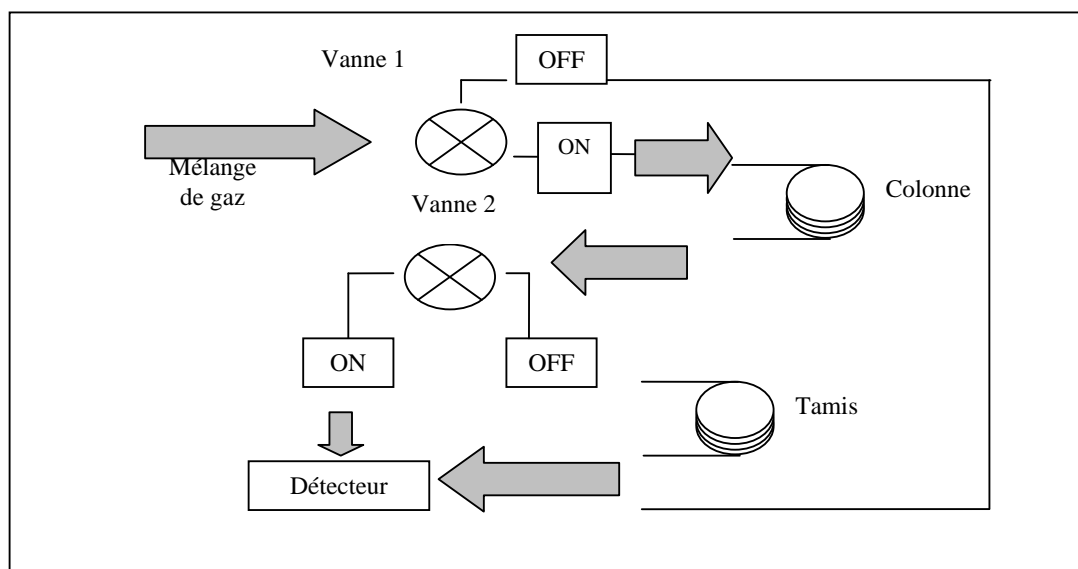


Schéma de l'analyse en CPG

La programmation de l'analyse est récapitulée dans le tableau ci-dessous.

Programme de l'analyse des gaz en CPG

Temps (min)	Etat des vannes	Détails de l'analyse
Initial (0)	Vanne 1 ON Vanne 2 OFF	Passage de tous les gaz dans la colonne. Arrivée des petits gaz (H ₂ , O ₂ , N ₂ , Kr et CH ₄) dans le tamis avant les gaz plus volumineux (CO ₂ , N ₂ O).
1,8	Vanne 2 ON	La vanne 2 commute pour fermer l'entrée du tamis moléculaire, piégeant ainsi les petits gaz à l'intérieur, sauf H ₂ déjà arrivé au détecteur. Les gaz volumineux, ne passant pas par le tamis, arrivent au détecteur.
3,1	Vanne 2 OFF	La vanne 2 commute de nouveau pour ouvrir le tamis. Les petits gaz, séparés, arrivent au détecteur.

Remarque : l'ordre d'arrivée des gaz est H₂, CO₂, N₂O, O₂, N₂, Kr et CH₄

ANNEXE VI - Compositions des milieux anaérobies utilisées pour le dénombrement.

Composition pour 1L de milieu anaérobie	Milieu pour bactéries fermentaires	Milieu pour bactéries nitrato-réductrices	Milieu pour bactérie FeIII-réductrices	Milieu pour bactéries sélénoréductrices
Tryptic Soy Broth		15 g		
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O			1.044 g	
NH ₄ Cl	1 g		3.338 g	1 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g			0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g			0,3 g
KCl	0,1 g		0.222 g	0,1 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1 g		0.291 g	0,1 g
MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,5 g			0,5 g
Extrait de levure	1 g			0,1 g
Oligo-éléments	10mL (Balch, 1979)	1mL (Balch, 1979)	1mL (élément trace)	1mL (Widdel, 1981)
NaCl	1 g			
L-Cystéine	0,5 g			
Résazurine	1 mL			
Accepteur d'électron		NaNO₃ (5 mM)	Citrate de FeIII (20 mM)	Na₂SeO₃ (10 mM)
Substrat	Glucose 5 mM		Lactate 25 mM Acétate 27 mM Pyruvate 26 mM	Lactate 20 mM
Solution d'élément trace (qsp 1L H ₂ O)				
			0.01 g	
Na₂MoO₄, 2H₂O				
MnCl₂			0.02 g	
CoSl₄			0.0002 g	
ZnSO₄, 7H₂O			0.01 g	
CuSO₄, 5H₂O			0.002 g	

- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, L.R., Wolfe, R.S., 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiological Reviews 38, 940-944.

- Widdel, F., Pfenning, N., 1981. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decomposes fatty acids. I Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen.no., sp. nov. Archives of Microbiology 129, 395-400.

ANNEXE VII – Propriétés physico-chimiques du sol

Analyses effectuées par l'INRA (Arras)

Granulométrie sans décarbonatation (NF X 31-107)	
Fraction	g/kg
Argile (< 2µm)	79
Limons fins (2/20 µm)	69
Limons grossiers (20/50 µm)	40
Sables fins (50/200 µm)	92
Sables grossiers (200/2000 µm)	720

Carbone (C) total (NF ISO 10694)	10,7 g/kg
Azote (N) total (NF ISO 13878)	0,775 g/kg
Calcaire (CaCO ₃) total (NF ISO 10693)	6,51 g/kg
pH eau (NF ISO 10390)	7,74
pH KCl (NF ISO 10390)	7,06
CEC Metson (NF X 31 130)	4,28 cmol+/kg
CEC Colbatihexamine (NF X 31 130)	4,38 cmol+/kg
Conductivité 1/25 (m/v) à 25°C	0,013 mS/cm
Conductivité 1/5 (m/v) à 25°C	0,053 mS/cm

Eléments totaux (mg / kg)	
Plomb (Pb)	19,3
Cadmium (Cd)	0,141
Etain (Sn)	1,23
Chrome (Cr)	43,6
Cuivre (Cu)	8,45
Nickel (Ni)	14,3
Zinc (Zn)	97,4
Manganèse (Mn)	396
Soufre (S)	159
Arsenic (As)	6,14
Sélénium (Se)	0,126
Eléments totaux (g / 100 g)	
Phosphore (P ₂ O ₅)	0,0601
Aluminium (Al)	2,38
Calcium (Ca)	0,595
Fer (Fe)	1,14
Potassium (K)	0,861
Magnésium (Mg)	0,226
Sodium (Na)	0,371
Silicium (Si)	39
Titane (Ti)	0,119

ANNEXE VIII – Propriétés minéralogiques du sol

Analyses effectuées par le BRGM (Orléans)

Légende :

TA : Très Abondant

A : Abondant

M : Moyen

P : Présent

F : Faible

R : Rare

T : Trace

Valeurs entre parenthèses : répartition en poids

Observations sous binoculaire

- **Fraction > 1 mm (1,48 %)**

- débris végétaux : P
- magnétite en inclusion dans silicate et dans hydroxyde de fer : T
- verre noir opaque : R
- grès à glauconie et hydroxyde de fer inclus : T
- agrégat et scorie noire vitreuse bulleuse : R
- débris de roche à quartz dominant et chlorite : R
- carbonate crème : P
- éclat de silex ou silice fine laiteuse : F
- débris de roche à biotite, feldspath, quartz (type gneiss) : F
- quartz laiteux : A
- roche microgrenue mélanocrate siliceuse : P
- hydroxyde de fer dont goethite : T
- feldspath laiteux : F
- débris de roche verte à amphibole et plagioclase : R

- **Fraction 0,2 - 1 mm (72,72 %)**

Dont :

- Fraction < 2,85 (séparation densimétrique au bromoforme) (99 %)

- feldspath laiteux : F
- éclats de verre noir opaque : T
- hydroxyde de fer : R
- fibres végétales : T
- agrégats gris terreux friable : T
- éclat siliceux rouge (type jaspe) : T
- quartz limpide ou laiteux : TA

- éclats de silex : F
- carbonate crème : T
 - Fraction ferromagnétique (0,01 %)
- verre noir opaque : R
- oxyhydroxyde de fer : M à A
- pyrite rétrotransformée en hématite : T
- silicate à inclusion de magnétite : M à A
 - Fraction 2,85 – 3,3 (séparation densimétrique au diiodométhane) (0,78 %)
- verre noir opaque (abondance Si et Fe): M
- muscovite : T
- chlorite : R
- grenat : R
- amphibole : R
- épidote : M à A
- hydroxyde de fer : P
- feldspath (plagioclase laiteux) : M à A
- tourmaline brune : F
- grain vert opaque (silicate) : P
- grain jaune limpide (gehlenite) : P
- sillimanite : T
- agrégat vitreux noir à liant hydroxyde de fer : T
 - Fraction > 3,3 (séparation densimétrique au diiodométhane) (0,40 %)
- rutile :R
- leucoxène : F
- disthène : T
- zircon limpide : T
- minéraux incolores limpides (gehlenite probable) : T
- sphène : T
- grain laiteux (abondance Ca) : T
- zircon violacé limpide (zircon $ZrSiO_4$) : T
- grain brun noir pierreux (sphène) : R
- verre noir opaque (abondance Fe): P
- hydroxyde de fer : R
- épidote : M
- grenat almandin : A
- ilménite : R
- hématite : T
- amphibole (hornblende): T
- grain tabulaire bleu (disthène probable + FeO) : T
- lamelle opaque gris bleu (abondance Si) : T
- staurotide : T

- **Fraction 50 - 200 µm** (11,74 %)

Dont :

- Fraction < 2,85 (séparation densimétrique au bromoforme) (94,30 %)
 - fibres et débris végétaux : R
 - muscovite : T
 - sphères noires opaques friables : R
 - verre noir opaque : R
 - grain siliceux rouge (type jaspe) : T
 - feldspath laiteux : P
 - chlorite : T
 - carbonate : T
 - quartz : TA
- Fraction ferromagnétique (0,14 %)
 - magnétite : A
 - oxyhydroxyde de fer : R
- Fraction 2,85 – 3,3 (séparation densimétrique au diiodométhane) (0,78 %)
 - verre noir opaque : P à M
 - chlorite : T
 - tourmaline : R
 - amphibole : R
 - pyroxène vert clair : T
 - épidote : A
 - hydroxyde de fer : F
 - sillimanite : T
 - silicate indifférenciés (quartz, gehlenite)
 - muscovite : T
 - grain jaune limpide (gehlenite) : P
 - grain violacé bleu tabulaire : T
 - carbonate crèmes : T
- Fraction > 3,3 (séparation densimétrique au diiodométhane) (3,66 %)
 - rutile :R
 - verre noir opaque : R
 - staurotide : T
 - grain rouge (arséniate de plomb) : T
 - tourmaline brune : T
 - épidote : M
 - disthène : T
 - ilménite : T
 - leucoxène : T
 - biotite : T
 - chlorite : T
 - grains automorphes limpides, prismatiques fumés à jaunâtre (gehlenite) : R
 - grenat almandin : TA

- **Fraction < 50** (14,06 %)

Les phases cristallines identifiées par diffractométrie des rayons X sont les suivantes :

- quartz
- plagioclase
- microline
- et phyllosilicates probables tels que chlorite et micas

Conclusions

Les différents contrôles réalisés par microscopie électronique, rayons X et infrarouge permettent de confirmer la présence d'oxydes et d'hydroxydes tels que ilménite (FeTiO_3), magnétite (Fe_3O_4), hématite (Fe_2O_3) et goethite ($\text{FeO}(\text{OH})$). Il n'a pas été vu de chromite dans cet échantillon mais le chrome existe bien en substitution probable du fer dans la magnétite. Aucun oxyde de manganèse ni d'aluminium n'a été identifié dans cette étude.

Résumé

Le sélénium (Se) est naturellement présent dans l'environnement. Élément essentiel aux êtres vivants à faibles concentrations, il devient rapidement toxique avec leurs augmentations. Un de ses isotopes radioactifs, le ^{79}Se est présent dans les déchets radioactifs dont le stockage géologique profond est envisagé. Dans le sol, le Se existe sous de multiples formes et sa mobilité est affectée par le potentiel d'oxydoréduction et les activités microbiennes. Très peu d'études ont porté sur sa réactivité à l'état de trace. Nous avons réalisé un travail permettant de distinguer les principaux processus géochimiques abiotiques et microbiologiques impliqués dans le devenir du sélénite (Se(IV)) à l'état de trace dans le sol. Cette étude était basée sur des incubations en batch de boues de sol contaminées artificiellement en Se(IV) à hauteur de $0,4 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ sol sec et soumises à des conditions oxygène ou anoxique. Les incubations ont concerné des lots de sol stérilisé et des lots de sol non stérile, avec ou sans amendement organique pour stimuler alors les activités microbiennes. Pour chaque incubation, nous avons suivi la distribution du Se entre les phases solide, liquide et gazeuse. Nous avons par ailleurs suivi les évolutions géochimiques de la solution, la composition de l'atmosphère gazeuse des flacons et la microflore du sol. Les résultats ont montré que le Se apporté à l'état de trace est relativement peu mobile dans le sol étudié. Les processus géochimiques ont un rôle majeur dans le contrôle de la mobilité du Se. Au cours du temps, certaines transformations abiotiques en phase solide aboutissent à une immobilisation de plus en plus forte du Se. Les processus microbiologiques contribuent à augmenter cette immobilisation au sein de la phase solide. Néanmoins, en conditions oxygène et anoxique, certains processus microbiens peuvent être, responsables, dans une moindre mesure, d'une dispersion du Se dans la biosphère par la production de composés volatils.

Abstract

Selenium (Se) is naturally present in the environment. Se is essential for living organisms at trace concentrations, but it becomes rapidly toxic with their increases. The ^{79}Se radioactive isotopes of Se, is found in nuclear wastes that may be buried in deep geological formations. In soil, Se exists in many forms and its mobility is affected by the redox potential and microbial activity. Very few studies have focused on Se behaviour at trace concentration. We have tried to distinguish the major abiotic geochemical and microbiological processes involved in the fate of trace selenite (Se(IV)) in a soil. The study was based on batch incubation in oxic or anoxic conditions of slurry suspension artificially contaminated with Se (IV) to $0.4 \text{ mg Se.kg}^{-1}$ dry soil. The incubation involved sterilized and non-sterile soil samples with or without organic amendment to stimulate microbial activities. For each incubation, we followed the distribution of Se between solid, liquid and gaseous phases as well as the geochemical evolution of the solution, the composition of the atmosphere gas bottles and the soil microflora. The results showed that Se was relatively few mobile in the soil studied. Geochemical processes played a major role in controlling the Se mobility. Over time, some abiotic transformations in the solid phase contributed to increase the Se immobilisation. The microbiological processes contributed to this increase in the solid phase. Moreover, in oxic as in anoxic conditions, some microbial processes were responsible, to a lesser extent, for a dispersion of Se in the atmosphere by the production of volatile compounds.