



Fate of soil organic matter: Influence of the different stabilisation processes

Katell Quenea

► To cite this version:

Katell Quenea. Fate of soil organic matter: Influence of the different stabilisation processes. Environmental Sciences. sorbonne université, 2019. tel-03978539

HAL Id: tel-03978539

<https://cnrs.hal.science/tel-03978539>

Submitted on 8 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire présenté en vue de l'obtention
de l'habilitation à diriger des recherches

Par Katell Quénéa, Maître de conférences

Devenir de la matière organique des sols : Influence des différents processus de stabilisation

Devant le jury composé de :

Isabelle Basile-Doelsch	Rapporteur
Tiphaine Chevallier	Rapporteur
Abad Chabbi	Rapporteur
François Baudin	Examineur
Luc Abbadie	Examineur
Camille Dumat	Examinatrice
Sylvie Derenne	Invitée

Table des matières

Avant-propos.....	6
1. Introduction.....	8
1.1 La matière organique des sols.....	8
Importance de la MO dans le fonctionnement des sols	8
Les sources de la matière organique des sols	9
1.2 Caractérisation de la matière organique des sols	10
2. Devenir de la MO des sols	14
2.1 Influence de la composition chimique sur le devenir de la MO.....	15
2.1.1 Rôle des lipides.....	17
Les lipides issus de différentes fractions granulométriques d'un sol (Quenea et al., 2004)	19
Effet de la mise en culture sur les lipides (Quénéa et al., 2006d)	22
2.1.2 La matière organique chimiquement réfractaire	28
Caractérisation de la MOR (Quénéa et al., 2005a, 2006a).....	29
Evaluation de la résistance de la MOR (Quenea et al., 2005b; Quénéa et al., 2006b)	31
2.1.3 Les carbonisats (Quénéa et al., 2006c)	34
2.1.4 Stabilité et composition chimique.....	35
2.2 Influence des interactions organo-minérales sur le devenir de la MO	36
2.2.1 Rôle des vers de terre dans la structuration du sol.....	38
2.2.2 Effet des vers de terre sur le carbone organique du sol (Vidal et al., 2017)	39
2.2.3 Incorporation et devenir de la MO dans les agrégats biogéniques (Vidal et al., 2016b, 2017).....	42
2.3 Combinaison du rôle de la composition chimique et de la structure du sol sur le devenir de la MO.....	45
2.4 Perspectives.....	50
2.4.1 Rôle des turricules dans la protection de la MO	50
2.4.2 Effet de paramètres environnementaux sur le devenir de la MO incluse dans la structure du sol	58
3. Interactions matière organique- contaminants	61
3.1 MO et ETM	62
3.2 Perspectives concernant la MO et contaminants	68
Interaction MO-contaminants organiques au sein d'une rivière	68
Développement d'une technique de géophysique à l'étude des sites pollués.....	69
Influence d'une contamination en éléments trace sur le devenir de la MO du sol et influence sur leur mobilité	71

4. Conclusions et perspectives	74
5. Références	80
6. Curriculum détaillé	113
6.1 Parcours professionnel	113
6.2 Formation	113
Formation continue :	113
Formation académique	114
6.3 Activités de recherche	115
Pilotage ou participation à des programmes de recherche	115
Participation à des comités de pilotage de thèse	116
Participation à des jurys de thèse	116
Participation à des comités de lecture	116
6.4 Responsabilités administratives	116
6.5 Activités en enseignement	117
Responsabilités en enseignement	117
Encadrements d'étudiants	117
Valorisation des travaux ayant impliqués des stagiaires :	118
7. Liste des communications scientifiques	123
Annexe : Sélection de publications	129

Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Schéma récapitulant les différents aspects abordés lors de mes recherches sur le devenir de la MO.....	15
Figure 2 : schéma représentant les flux de carbone pendant la biodégradation de la biomasse terrestre, et temps de résidence approximatifs de C. Les proportions relatives de biomacromolécules / structures C sont indiquées par des tailles de police différentes (Selon Lorenz et al., 2007).....	16
Figure 3 : Chromatogrammes des lipides totaux extraits des trois fractions granulométriques	21
Figure 4 : Spectre RMN ^{13}C à l'état solide de la MOR du sol sous forêt.....	29
Figure 5 : Pyrochromatogramme de la MOR isolée du sol sous forêt	30
Figure 6 : Exemples de lien entre les différents processus de stabilisation de la MO et sa stabilité. Me^{n+} : ions métalliques.....	38
Figure 7 : Proportion de C marqué (C_{lab}) dans le sol après apport de racines ou de parties aériennes de Raygrass, en absence (NE) ou en présence € de vers de terre d'après Vidal et al. (2017). E : earthworm, NE : No earthworm	40
Figure 8 : Proportion de carbone organique du sol par rapport à la teneur initiale dans les mésocosmes 54 semaines après le début de l'expérimentation.	41
Figure 9 : A- Proportion de carbone organique des turricules par rapport à la teneur initiale en carbone du sol et B- Pourcentage de carbone marqué contenu dans les turricules (n=3)	43
Figure 10 : A-Agrégats organo-minéraux et bactériens de turricules observés par MET ; B- images NanoSIMS des ^{16}O , ^{28}S , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ illustrant la diversité de la matière organique dans les turricules (pour l'image isotopique, un masque a été appliqué pour supprimer la contribution de la résine époxy, en utilisant un seuil défini pour l'élément $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$	44
Figure 11: ACP réalisée à partir des analyses moléculaires de la MO des turricules. Les MO aérienne et racinaire ont été représentées. A- distribution des variables sur le cercle de corrélation ; B- distribution des échantillons de turricules (les nombres indiquant la date de prélèvement, les terres S, G et H, des composés issus de la lignine).	47
Figure 12: Interactions pouvant influencer la vitesse de dégradation de la MO dans les turricules	53
Figure 13: Schéma de l'expérimentation et des analyses envisagées.....	56
Figure 14 : Proportion C4/C dans les échantillons de surfaces des trois sols (M1, M2 et M3) en fonction de la fraction granulométrique	63
Figure 15 : $\delta^{13}\text{C}$ des sols de surface en fonction de la fraction granulométrique pour les trois sols	64
Figure 16 : Concentration en éléments trace extraite (mg.Kg^{-1}) du sol et des différentes fractions granulométrique par l'EDTA (-) et le $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (---)	66
Figure 17 : Pourcentage de carbone issu de la MO en C4 dans le sol et les différentes fractions granulométriques.....	66
Figure 18 : Schéma conceptuel généralisé montrant que la croissance et l'activité microbiennes dans les milieux poreux peuvent modifier les propriétés physicochimiques et, par conséquent, les signatures géophysiques (Atekwana et Atekwana, 2010)	70
Figure 19 : Actions envisagées lors du suivi de la MO marquée et issue de plantes contaminées	72
Figure 20 : Efficacité d'utilisation du carbone intégrant des dimensions temporelles et spatiales. CUE_p reflète le fonctionnement spécifique des taxons et la thermodynamique du métabolisme du carbone (MET). CUE_c intègre les facteurs environnementaux et microbiens affectant le métabolisme microbien. CUE_E décrit les émissions de carbone à long terme dues au CUE_p et au CUE_c (Geyer et al., 2016).....	76

Tableau 1 : Abondance relative de la MO et des lipides dans chaque fraction de sol.....	19
Tableau 2 : Teneur en carbone total et en carbone lipidiques dans les fractions granulométriques du sol avant et après mise en culture.....	24
Tableau 3 : Contribution du carbone du maïs au carbone total et au carbone lipidique, et évaluation du pourcentage de dégradation.....	25
Tableau 4 : Produits de pyrolyse utilisés pour l'ACP. Les origines probables et / la signification de chaque produit ou groupe de produits sont mentionnés	47
Tableau 5 : Concentrations en éléments trace métalliques (mg.Kg ⁻¹) et en carbone organique total des sols.....	62
Tableau 6 : Concentrations en éléments trace (mg.kg ⁻¹) dans les différentes fractions granulométriques des 3 sols de surface (0-30 cm)	64

Avant-propos

Ce mémoire est l'occasion de remercier les nombreuses personnes qui ont marqué ces années de recherche. Je leur suis bien entendu reconnaissante des échanges scientifiques et de leurs collaborations pour différents projets, mais aussi de leurs encouragements et de leur bonne humeur. J'ai rencontré tant de personnes sympathiques durant ces quelques années...

Cela concerne particulièrement mes collègues du laboratoire Métis : Maryse, Thanh Thuy, Marie, Sylvie, Christelle : merci pour ces discussions quotidiennes, parfois sérieuses, parfois beaucoup moins, mais tellement agréables. Yannick, Loïc, les ATER de choc qui ont partagé également ces quelques années avec nous et qui sont inoubliables. Sans oublier bien sûr les étudiants qui ont effectué leur stage ou thèse au sein de l'équipe : sarah, jihane, mélanie, priscillia, Alexandre, Pierre, Aliénor... J'ai également apprécié de travailler avec les collègues « EPHEins » de Métis : Elodie, Fabrice, Hélène. Les membres de l'équipe Geoprocess qui essaient régulièrement de m'initier à la géophysique : Damien, Julien, Ludovic.

Merci également aux autres collègues de Métis avec lesquels je n'ai pas forcément développé de projet de recherche mais avec qui j'interagis régulièrement pour les enseignements, leur aide régulière, leur participation aux différentes UE pour lesquelles je les ai sollicités : Danièle, Vincent, Ludo, Valérie. Je n'oublie pas mes collègues d'IEES Paris avec qui je collabore également régulièrement et avec qui j'ai toujours autant de plaisir à travailler : Julie, Naoise, David, Jérôme, Thomas, Véronique. Et puis je n'oublie pas non plus toutes les personnes rencontrées et avec qui j'ai plaisir à discuter: Joëlle, Béatrice, Pierre, Odile, Claude, les anciens de l'ENSCP, Arnaud, fred, Marie-France, Cornélia, Patricia, Claire, Pierre, Cyril, Luc, et qui m'ont tous d'une manière ou d'une autre apporté quelque chose.

Je suis également redevable aux étudiants, doctorant ou stagiaires, qui ont participé aux travaux présentés dans ce document. Merci notamment à Alix pour ces discussions de travail, enfermées dans ton bureau qui finissaient malgré tout souvent en fou-rire.

Enfin, je remercie également sincèrement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche.

Partie 1 : Introduction

1. Introduction

Si l'intérêt des Hommes pour les sols est très ancien, leur étude, ou pédologie, en tant que science ne date que des travaux de Doukouchaev en 1883 (Boulaine, 1983).

Leur localisation à l'interface entre atmosphère, lithosphère et hydrosphère est à l'origine de la multiplicité de réactions et d'échanges qui s'y déroulent. Les sols constituent donc un milieu complexe auquel de nombreuses disciplines, allant de la biologie à l'agronomie ou encore la géologie et l'hydrologie, s'intéressent. De plus, selon les processus étudiés, les échelles de temps ou d'espace considérées varient de l'échelle nanométrique au bassin versant, et des processus pouvant être très rapides (quelques minutes) à d'autres qui ne sont mis en évidence que sur des dizaines ou centaines d'années.

Ces dernières décennies l'importance des sols dans les services écosystémiques rendus, tels que l'approvisionnement en nourriture, la régulation de la ressource en eau, le recyclage des nutriments, la régulation du climat, ont été inventoriés et évalués (Adhikari et Hartemink, 2016; Jónsson et Davíðsdóttir, 2016). De nombreuses études soulignent ainsi le rôle primordial des sols dans la biosphère. Les sols sont majoritairement constitués d'éléments minéraux, cependant, la matière organique (MO) des sols est un constituant déterminant pour la mise en place des services écosystémiques fournis par les sols. Ainsi, les constituants des sols, aussi bien minéraux qu'organiques (dont les organismes du sol), et leurs interactions sont les éléments clés de la compréhension du fonctionnement (physique, chimique et biologique) de ce milieu mais aussi de son évolution dans le temps.

1.1 La matière organique des sols

Importance de la MO dans le fonctionnement des sols

La prise en compte de la MO dépend en partie du contexte dans lequel elle est étudiée. A l'échelle du cycle biogéochimique du carbone (C), la MO représente un compartiment essentiel, notamment dans le cycle continental du C et la régulation du climat. En effet, elle constitue un stock de 2350 Gt de C dans les 3 premiers mètres du sol (Jobbágy and Jackson, 2000) soit 3 fois le stock de C atmosphérique et 4 fois le stock de C contenu dans la biosphère. Par conséquent, si le sol peut constituer un puits de C important, la MO des sols peut également être une source de C atmosphérique importante. Le Quéré et al. (2009) ont estimé que $1.5 \pm 0.7 \text{ Pg C an}^{-1}$ sont émis suite au changement d'usage des sols, ce qui fait de la MO terrestre la 2^{ème} source de CO₂ anthropique. Du fait notamment de la mise en culture, certains sols ont donc perdu une part importante de C (Poeplau et al., 2011), estimée entre 1/3

et 2/3 du stock initial ou 30-40 tonnes de C/ha (Lal, 2004). L'augmentation du CO₂ atmosphérique qui en résulte a des conséquences importantes à l'échelle globale sur le climat. Aussi, Lal (2004) a-t-il promu une meilleure utilisation des sols afin que d'y séquestrer du C pour pouvoir atténuer les augmentations de CO₂ atmosphérique même si ce potentiel de séquestration est limité.

A l'échelle d'une parcelle agricole ou d'un profil de sol, c'est surtout pour les fonctions qu'elle remplit que la MO est étudiée. La MO de sols est une source de nutriments pour les organismes du sol (bactéries, champignons, faune, racines, etc...) et est garante de la fertilité des sols grâce aux possibles interactions avec les éléments minéraux en solution dans le sol permettant leur stockage à des échelles de temps diverses. Elle est fondamentale dans la structuration du sol. Du fait de cette structuration, joue indirectement un rôle dans la circulation de la solution du sol et des gaz, et donc sur le potentiel de rétention en eau du sol et son aération. La stabilité de la structure du sol est liée à la MO (quantité et nature de la MO) et influe fortement sur la susceptibilité à l'érosion des sols. La MO des sols possède des propriétés chimiques qui induisent une forte réactivité vis-à-vis des composés du sol tant minéraux qu'organiques. Des interactions se mettent en place influant la mobilité ou la rétention des divers éléments du sol (nutriments mais aussi contaminants) par exemple. Ainsi, en retenant les contaminants en solution dans l'eau du sol, la MO des sols est garante de la qualité de l'eau. Cependant pour comprendre et estimer l'influence de la MO dans les différentes fonctions du sol il est nécessaire de mieux connaître la MO : sa composition et son devenir.

Les sources de la matière organique des sols

La matière organique des sols a pour principale source les apports de végétaux à la fois des parties aériennes, à la surface du sol, ou souterraines via la senescence de racines ou via rhizodéposition (Kuzakov and Domanski, 2000; Kögel-Knabner, 2016). La proportion des apports aériens et racinaires peut différer fortement selon les couverts végétaux (forêts, prairies, agricoles), le climat, l'usage des sols, et en contexte agricole, du mode de gestion. La variation de ces contributions aériennes et racinaires a été bien documentée dans l'article de synthèse de Paul (2016). Cependant la MO provient également des apports de la faune et des microorganismes s'y développant. En effet, les microorganismes contribuent également de façon significative au stock de MO. Cette contribution de la biomasse microbienne a été réévaluée récemment et semble beaucoup plus importante que celle considérée auparavant (Simpson et al., 2007; Grandy and Neff, 2008; Sollins et al., 2009; Mambelli et al., 2011;

Miltner et al., 2012; Kallenbach et al., 2016), la grande majorité étant composée de nécromasse bactérienne (Miltner et al., 2012). Liang et Balser (2010) ont estimé que la nécromasse pouvait contribuer jusqu'à 80% du carbone organique du sol.

Les résidus organiques apportés au sol sont ensuite transformés au cours d'une biodégradation partielle, sous l'action de la faune du sol et des microorganismes. La MO est donc constituée d'un mélange de résidus organiques à divers degrés de dégradation. Ainsi au cours du temps, les résidus organiques du sol et donc leur composition chimique évoluent jusqu'à leur minéralisation complète.

1.2 Caractérisation de la matière organique des sols

La diversité des sources de la MO des sols et son évolution au cours du temps conduisent à la formation d'une MO dont la complexité et la diversité rendent sa caractérisation difficile. Néanmoins, la caractérisation précise de la MO des sols est essentielle pour déterminer les mécanismes impliqués dans sa stabilisation, pour prédire sa dynamique et éventuellement pour fournir des recommandations sur les pratiques visant à compenser l'augmentation du CO₂ ou à améliorer la gestion de la fertilité du sol.

L'étude de la MO peut se faire par une grande variété de techniques analytiques, et à des échelles très diverses. Les différentes techniques d'analyse permettent tant la caractérisation visuelle par l'observation directe, que la caractérisation de groupes fonctionnels ou de la composition moléculaire et elles ont été synthétisées par Quenea et al. (sous presse); Kögel-Knabner (2000); Derenne et Nguyen Tu, (2014); Chenu et al. (2015). Ces techniques peuvent être utilisées aussi bien pour étudier la MO dans sa globalité, que pour l'étude de certaines fractions isolées spécifiquement (densimétriques, granulométriques ou chimiques).

Afin de comprendre l'évolution de la MO au cours du temps et les processus conduisant à sa formation, il est intéressant de pouvoir suivre cette MO dans le temps. Ainsi, lors de l'étude du devenir de la MO dans les sols, une des difficultés rencontrées est la capacité à distinguer la MO nouvellement apportée de la MO présente originellement. Pour y parvenir, l'utilisation du marquage isotopique, par marquage naturel ou artificiel, s'est révélée particulièrement adaptée, ainsi que l'ont souligné Amelung et al. (2008) et Glaser (2005).

En effet, le temps de résidence de la MO des sols a été souvent estimé en utilisant les isotopes du carbone, ¹³C (Balesdent et al., 1987; Balesdent et Balabane, 1992; Balesdent et Mariotti, 1996) ou ¹⁴C (Trumbore et Druffel, 1995; Paul et al., 1997; Trumbore, 2009). Cette

estimation du temps de résidence peut être appliqué à l'évaluation de la MO totale du sol comme à certaines fractions (Puget et al., 1995; Besnard et al., 1996; Balesdent et al., 1998; Roscoe et al., 2001; Jolivet et al., 2006) ou encore à des composés spécifiques (Ayoma et al., 2000; Derrien et al., 2003; Bossuyt et al., 2004; Dignac et al., 2005; Glaser, 2005; Mendez-Millan et al., 2010b).

Cette estimation s'appuie notamment sur le marquage isotopique naturel résultant de la diversité des voies métaboliques chez les plantes. Selon leur métabolisme, qualifié de C₃ ou C₄ selon le nombre de carbones compris dans la première molécule carbonée synthétisée lors de la fixation de CO₂ au cours de la photosynthèse, les enzymes en jeu sont différentes et n'ont pas la même affinité pour le CO₂. Dans les deux types métaboliques, les organismes utiliseront de préférence le ¹²CO₂. Il y a donc discrimination entre le ¹³C et le ¹²C. La valeur du δ¹³C est exprimée par rapport à un standard (PDB) et se calcule de la façon suivante :

$$\delta^{13}\text{C}\text{‰} = [({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{échantillon}}/({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{référence}} - 1] \times 1000$$

Les plantes présentent des valeurs de δ¹³C autour de -27 ‰ et -12 ‰ (pour les métabolismes C₃ et C₄, respectivement (Bender, 1971; Smith and Epstein, 1971; O'Leary, 1981; Collister et al., 1994)). Dans le cas d'un changement de végétation impliquant des plantes C₃ et C₄, la valeur δ¹³C du sol C se déplace progressivement vers la nouvelle valeur de δ¹³C de la végétation. L'incorporation progressive du nouveau carbone marqué peut ensuite être calculée et le temps de résidence en est déduite (Balesdent and Mariotti, 1996). En conséquence, les différences dans les valeurs de δ¹³C ont été largement utilisées pour suivre la MO dans le sol total (Cerri et al., 1985; Martin et al., 1990), comme dans les fractions de sol (Balesdent et al., 1987; Gregorich et al., 1995; Balesdent et al., 1998).

Selon le même objectif, le marquage isotopique artificiel utilise des MO qui ont été enrichies artificiellement en ¹³C lors de leur croissance (Bird et al., 2008; Mambelli et al., 2011; Haddix et al., 2016; Vidal et al., 2017). L'utilisation de MO marquée artificiellement permet de s'affranchir du changement de végétation C₃/C₄ et de limiter les effets de dilution du signal isotopique dans le sol. Aussi, l'incubation de MO enrichies artificiellement en ¹³C et/ou ¹⁵N a été fréquemment utilisée pour étudier les processus biogéochimiques en jeu dans les sols (Boutton, 1996; Angers et al., 1997; Kuzyakov et Domanski, 2000; Bird et al., 2008; Girardin et al., 2009; Mambelli et al., 2011; Haddix et al., 2016; Vidal et al., 2017). De plus, des mesures de δ¹³C au niveau moléculaire peuvent également être réalisées en combinant la spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS) à d'autres méthodes analytiques, telles

que la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie liquide suivie d'une combustion en ligne (GC-C-IRMS et LC-C-IRMS) ou Pyrolyse GC-C-IRMS. De telles analyses ont permis une meilleure compréhension du devenir des molécules spécifiques (O'Malley et al., 1997; Lichtfouse et al., 1998; Derrien et al., 2003; Dignac et al., 2005; Amelung et al., 2008; Lichtfouse, 1995; O'Malley et al., 1997; Meir-Augenstein, 1999; Cayet et Lichtfouse, 2001; Derrien et al., 2003; Dignac et al., 2005, Amelung et al., 2008).

Une meilleure connaissance de la MO est nécessaire afin de pouvoir apporter des éléments de réponse aux enjeux actuels de maintien des services écosystémiques dans lesquels la MO des sols joue un rôle. En effet, la complexité chimique de la MO des sols induit une réactivité importante de celle-ci, que cela soit vis-à-vis de sa capacité à être biodégradée par les organismes, à interagir avec les éléments minéraux du sol ou même avec certains contaminants. Cette connaissance passe par la caractérisation de la MO et la prise en compte de ses interactions avec les autres constituants du sol et leur évolution temporelle.

Mes travaux de recherche concernent essentiellement le devenir de la matière organique (MO) dans les sols. J'ai abordé ce sujet par diverses approches expérimentales et analytiques, associées à des techniques de caractérisation chimique de cette MO. Tout d'abord, je présenterai mes travaux réalisés dans le but d'évaluer la stabilité de différentes fractions de la MO, puis le rôle de structures biogéniques du sol sur ce devenir sera abordé. Je présenterai ensuite des résultats sur les interactions entre des contaminants inorganiques et la MO et envisagerai l'apport de l'étude de la MO sur l'évaluation du devenir de contaminants qui peuvent y être associés. Je finirai ce rapport sur quelques réflexions et voies de recherche qui m'intéressent particulièrement.

Partie 2 :

Devenir de la MO des sols

2. Devenir de la MO des sols

Du fait de son rôle fondamental, de nombreuses études s'intéressent au devenir et à la dynamique de la MO des sols au cours du temps. La plupart des modèles s'accordent à distinguer différents compartiments de la MO ayant des temps de résidence très variables, et donc une stabilité dans le temps très différente. Cependant les mécanismes impliqués dans la stabilisation de la MO dans les sols restent discutés (Mikutta et al., 2006; Marschner et al., 2008; Von Lützow and Kögel-Knabner, 2010; Kleber et al., 2011; Schmidt et al., 2011; Dungait et al., 2012; Cotrufo et al., 2013). Toutefois un consensus semble émerger. Différents mécanismes jouent un rôle, mais leurs influences diffèrent selon l'échelle de temps considérée. Si la composition chimique de la source de MO influence sa biodégradation à l'échelle de la dizaine d'année, ce sont les interactions organo-minérales qui influent sa dynamique à long terme, même si celles-ci peuvent elles-même être conditionnées par la composition chimique de la MO (Lützow et al., 2006; von Lützow et al., 2008; Kögel-Knabner and Amelung, 2014). De plus, l'importance relative de ces différents mécanismes reste à déterminer. En effet, si la composition moléculaire conditionne la biodégradabilité de la MO par les microorganismes, leur activité dépendra également des conditions environnementales (pH, température, humidité, oxygène), et de l'accessibilité aux organismes, voire aux enzymes, qui reste déterminante (Ekschmitt et al., 2008; Schimel and Schaeffer, 2012).

Au cours de mes projets de recherche, j'ai abordé aussi bien le rôle de la composition chimique que celui des interactions organo-minérales sur le devenir de la MO des sols (Figure 1). Aussi je vous présente ci-dessous ma contribution à une meilleure connaissance du devenir de la MO à travers quelques résultats obtenus au cours de mes travaux.

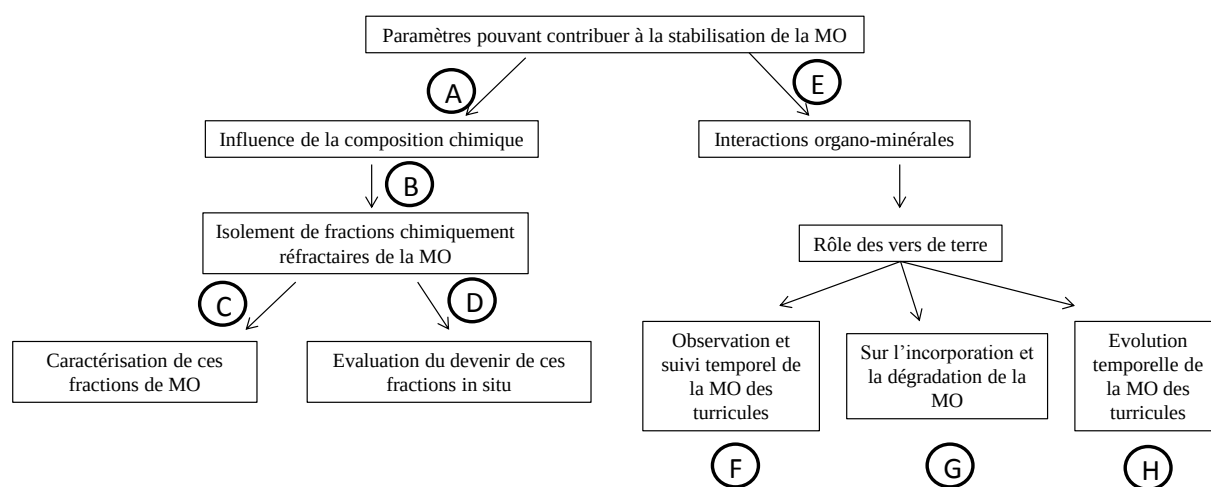


Figure 1 : Schéma récapitulant les différents aspects abordés lors de mes recherches sur le devenir de la MO

2.1 Influence de la composition chimique sur le devenir de la MO

Historiquement, la différence de temps de résidence a tout d'abord été mise en lien avec la composition chimique de la MO. L'hypothèse selon laquelle la composition chimique de la MO conditionne sa biodégradabilité a plusieurs origines. Elle est basée sur une analogie des processus de préservation de la MO sédimentaire et de la MO des sols (Hedges and Oades, 1997).

En effet, Tegelaar et al. (1989) ont démontré une préservation sélective de la MO dans les sédiments par comparaisons morphologiques et chimiques entre des microorganismes existants et leurs homologues fossiles. Par la suite, des hydrolyses chimiques furent utilisées pour simuler sa dégradation. La MO résistante à ces hydrolyses était alors considérée comme une MO réfractaire (ou récalcitrante) et résistante à la dégradation. L'analyse de MO sédimentaire réfractaire a également montré que la MO préservée présentait un important degré d'aliphatité (Hatcher et al., 1983; Gelin et al., 1999; Stankiewicz et al., 2000) et que cette aliphatité augmentait au cours de son évolution. Par ailleurs, ces résultats et les modèles résultants sur la préservation de la MO sédimentaire faisaient alors écho au concept d'humification de la MO des sols. Ce mécanisme, reposant sur des réactions de dégradation-recondensation et impliquant des monomères phénoliques dérivés de la lignine a été proposé comme voie de formation des MO du sol et formerait également des composés hautement aromatiques de masse moléculaire élevée appelés acides humiques, fulviques et humine (Zech et al., 1989). L'étude de ces molécules humiques révéla également une forte aliphatité (Martin et al., 1995; Almendros et al., 1996; Lichtfouse et al., 1998). Ainsi, le rôle potentiel de la voie de préservation sélective de composés dans les sols a été envisagé (Baldock et al., 1992; Kögel-Knabner et al., 1992, 1994; Derenne, 2000). De plus, la caractérisation d'échantillons de sol d'horizons profonds (Zech et al., 1989; Rumpel et al., 2002, 2004; Mikutta et al., 2007) ou de fractions de sol isolées soit physiquement (Torn et al., 1997) soit chimiquement (Eusterhues et al., 2003) contenant la MO considérée comme plus ancienne ou plus stable chimiquement, et le suivi de dégradation de MO des sols ont révélé une plus grande abondance de certaines familles de molécules, laissant à penser à l'existence de familles de molécules plus récalcitrantes à la biodégradation, telles que les molécules aliphatiques (Riederer et al., 1993; Baldock et al., 1997; Derenne, 2000; Poirier et al., 2003; Winkler et al., 2005; Mikutta et al., 2006) et aromatiques (Kögel-Knabner et al., 1991; Guggenberger et al., 1995) (Figure 2).

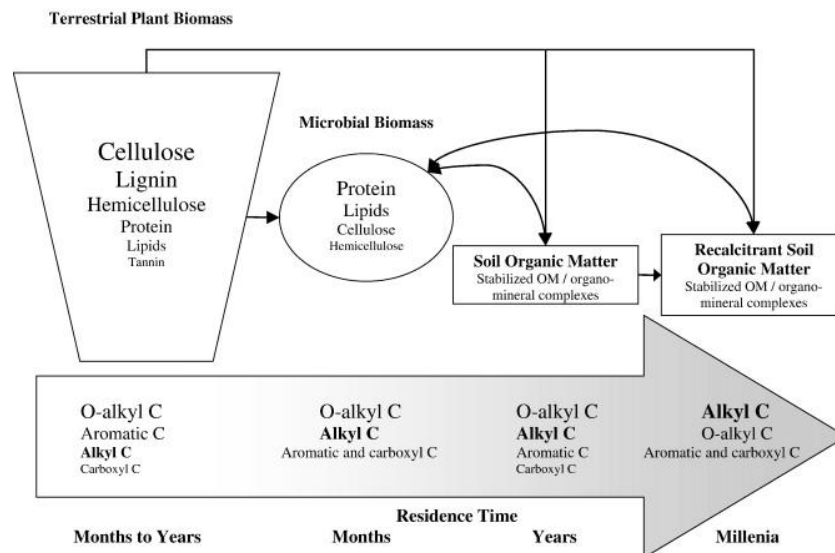


Figure 2 : schéma représentant les flux de carbone pendant la biodégradation de la biomasse terrestre, et temps de résidence approximatifs de C. Les proportions relatives de biomacromolécules / structures C sont indiquées par des tailles de police différentes (Selon Lorenz et al., 2007).

La caractérisation de la MO ou de certaines de ses fractions chimiques peut apporter un éclairage sur compréhension des mécanismes mis en jeu. L'analyse moléculaire de la MO, parfois associée au marquage isotopique, a permis des avancées considérables que ce soit dans l'identification des sources de la MO par l'identification de biomarqueurs, l'évaluation de la stabilité des molécules, ou encore le suivi ou l'évaluation du degré d'altération de la MO au cours de sa dégradation (Kögel-Knabner et Rumpel, 2018).

L'analyse moléculaire a, par exemple, permis de remettre en cause la labilité de certaines molécules comme les sucres (Derrien et al., 2003), ou au contraire la stabilité d'autres molécules comme la lignine (Dignac et al., 2005). Une autre application est la mise en évidence de contribution microbiennes vs plantes ou encore du type de plante grâce à l'identification de molécules en tant que biomarqueurs d'origine (Saiz-Jimenez and De Leeuw, 1986; Lichtfouse et al., 1995; Olsson, 1999; Poerschmann et al., 2005; Evershed et al., 2006; Feng and Simpson, 2007; Amelung et al., 2008; Grandy et Neff, 2008; Mercedes Mendez-Millan et al., 2010; Dungait et al., 2011). La caractérisation moléculaire permet également le suivi de l'évolution de la MO (Hempfling et al., 1987, 1991; Van Bergen et al., 1998; Nierop et al., 2001; Otto et Simpson, 2005; Haddix et al., 2016) ou de certaines molécules spécifiquement (Benner et al., 1990; Jolivet et al., 2001; Filley et al., 2002; Otto et Simpson, 2005).

Au cours de mes travaux de recherche, j'ai considéré tout d'abord la possible « récalcitrance » chimique de certaines fractions du sol réputées plus persistantes dans l'environnement, et donc moins biodégradables que je discuterai par la suite (partie 2.1) : les lipides, la MO chimiquement réfractaire et les carbonisats (figure 1, A).

L'évaluation de cette persistance a pu être réalisée grâce à l'étude d'échantillons de sols de deux sites adjacents : un site sur lequel s'était développée une forêt de conifères, et un site qui avait été converti à la culture de maïs depuis 22 ans. La mise en culture étant souvent mise en avant pour son rôle dans la perte de carbone dans les sols (Murty et al., 2002), la comparaison des deux sites pouvait permettre de mettre en évidence la MO plus résistante. Ce site présentait un autre avantage : la forêt pré-existante étant constituée de conifères dont le métabolisme est de type C₃, le maïs ayant lui un métabolisme de type C₄, un marquage isotopique naturel par le ¹³C permettant de distinguer la MO originelle, issue de la forêt, de celle issue du maïs a eu lieu. La texture sableuse du sol (90% de sable) présentait un avantage supplémentaire était. Celle-ci permettait de mettre l'accent sur une potentielle préservation liée à la composition chimique, plutôt que par la protection par les argiles (du fait de la faible proportion de fraction argileuse du sol (2%)), ainsi que Angst et al. (2017) l'ont souligné concernant les sols sableux. En effet, dans ce cas, cette protection organo-minérale doit vraisemblablement être dans ce cas un mécanisme minoritaire et le rôle de la composition chimique dominant.

2.1.1 Rôle des lipides

La fraction lipidique des sols correspond aux molécules extraites par des solvants organiques et représente généralement de 4 à 8% du carbone organique du sol (Dinel et Schnitzer, 1990). Elle regroupe de nombreuses familles de molécules, dont des alcanes, des alcools, des acides gras mais également des stérols, etc... Du fait de leur hydrophobicité, les lipides jouent un rôle important dans la stabilité des agrégats ou la rétention en eau. Par ailleurs, ils sont particulièrement étudiés pour leur rôle de biomarqueurs dans les sols (Otto and Simpson, 2005; Jansen et al., 2006; Mendez-Millan et al., 2010a; Simpson and Simpson, 2012; Zech et al., 2013) mais aussi dans les sédiments (Han et Calvin, 1969; Grimalt et Albaigés, 1987; Goosens et al., 1989; Rieley et al., 1991; Saliot et al., 1991; Meyers et Ishiwatari, 1993; Hernandez et al., 2001) et les eaux (Derrien et al., 2017) ou même les restes archéologiques (Evershed, 2008). Comme tout biomarqueur, leur composition permet de lier une famille de composés lipidiques et leur distribution à un type d'organisme dont sont issus les lipides extraits (plante ou microorganisme). La distribution des acides gras de

phospholipides permet par exemple d'obtenir des renseignements sur les communautés microbiennes des sols (Zelles, 1997; Baath et Anderson, 2003; Drenovsky et al., 2004; Evershed et al., 2006; Frostegard et al., 2010; Dungait et al., 2011).

L'évolution de la MO au cours de sa biodégradation a révélé une augmentation de l'aliphatité, notamment de la proportion des fonctions alkyles estimée par RMN ^{13}C à l'état solide par exemple (Kögel-Knabner et al., 1992; Golchin et al., 1995; Guggenberger et al., 1995; Baldock et al., 1997), qui semblait indiquer une plus grande stabilité de ces lipides. De la même façon, des composés aliphatiques dérivés de la subérine se sont avérés présenter un faible niveau de dégradation (Bull et al., 2000; Feng et Simpson, 2007), ou semblait s'accumuler dans les sols (Nierop et al., 2003; Nierop and Verstraten, 2003; Winkler et al., 2005). La cutine et la subérine sont des biopolymères. La cutine située sur les parties aériennes des plantes, associée aux cires cuticulaires, forme la cuticule. La subérine se trouve en majorité au niveau des racines mais également dans le suber. La cutine et la subérine ont une composition chimique différente (Kolattukudy et al., 1976; Kolattukudy, 1980; Bernards et Lewis, 1998; Graça et al., 2002) et cette différence de composition permet ainsi de distinguer les contributions aériennes vs racinaires dans les sols (Naafs et al., 2005; Mendez-Millan et al., 2010a, 2010b).

L'augmentation de l'aliphatité était également visible dans les fractions granulométriques de sols correspondant aux limons et aux argiles, qui sont reconnues comme étant des fractions dans lesquelles la MO est plus anciennes (Christensen, 1992; Guggenberger et al., 1995; Hassink et Whitmore, 1997). Cependant, aucune étude n'avait évalué la contribution et la composition lipidique dans ces fractions granulométriques, or plusieurs études avaient montré l'utilité de l'étude de fractions granulométriques, comme lors de changements d'usage des sols ou le renouvellement de la MO (Cerri et al., 1985; Balesdent et al., 1987; Skjemstad et al., 1990; Saiz-Jimenez et al., 1996; Roscoe et al., 2001; Jolivet et al., 2003; Poeplau et al., 2018).

Suite à ces observations, j'ai donc quantifié et déterminé la composition lipidique dans trois fractions granulométriques (sables, limons et argiles) d'un sol forestier sableux par CG-SM afin d'évaluer le devenir de cette fraction lipidique dans les sols. Ces résultats obtenus lors de mes travaux de thèse et publiés dans mes articles (Quenea et al., 2004; Quénéa et al., 2006d) sont rediscutés ci-dessous en tenant compte des éléments publiés dans la littérature ces dernières années. Dans un second temps, l'effet de la mise en culture sur ces lipides sera abordé.

Les lipides issus de différentes fractions granulométriques d'un sol (Quenea et al., 2004)

La quantification dans les différentes fractions granulométriques a mis en évidence une contribution plus importante de la MO dans la fraction argileuse du sol (67%), mais également une concentration en lipide plus élevée dans cette fraction (Tableau 1) qui représentait 23% de la MO. Cette forte concentration en MO dans la fraction argileuse est couramment observée (Gregorich et al., 1988, 1989; Feller et al., 1991; Buyanovsky et al., 1994; Schmidt et al., 1999) et résulte des interactions entre la MO et les minéraux (Six et al., 2004; von Lützow et al., 2007; Feller et Chenu, 2012) ou même de formation de structure organo-minérales de la taille des argiles (Chenu et Plante, 2006; Angst et al., 2017). La mise en place d'interactions organo-minérales dans la fraction argileuse peut avoir lieu par adsorption de métabolites ou résidus d'organismes sur les minéraux (Kleber et al., 2007, 2015; Kallenbach et al., 2016), par l'adhésion de bactéries sur les minéraux (Chenu et Stotzky, 2002). Toutefois aucune étude de lipides dans les fractions granulométriques n'ayant été réalisé auparavant, cette contribution plus importante des lipides à la MO dans la fraction argileuse n'avait jamais été observée.

	Abondance relative de chaque fraction de sol (% masse totale)	Abondance de la MO (% de masse de chaque fraction)	Proportion de lipides (% de chaque fraction)	Proportion de lipides dans la MO (%)
Sable	90.2	1.4	0.1	7.1
Limon	6.7	48.4	3.4	7
Argile	2.3	67.4	15.8	23.4

Tableau 1 : Abondance relative de la MO et des lipides dans chaque fraction de sol (Quenea et al., 2004)

Comme nous l'avons vu précédemment, la composition moléculaire de cette fraction lipidique peut apporter des informations tant sur la source de ces lipides que sur leur degré de dégradation, grâce à certaines familles pouvant servir de biomarqueurs. Par ailleurs, on peut distinguer deux types de lipides selon la nature des interactions avec la matrice du sol : certains sont appelés « lipides libres », car extraits directement par les solvants, alors que d'autres sont dits « lipides liés » par des liaisons esters du fait de la nécessité de recourir à une saponification préalablement à leur analyse. Ces lipides liés, auxquels contribuent de façon

importante la cutine et la subérine, sont réputés plus résistants à la biodégradation et ont tendance à s'accumuler avec le temps (Nierop et Verstraten, 2003), bien que cette vision soit actuellement remise en cause (Angst et al., 2016; Lin et Simpson, 2016).

La composition lipidique des différents groupes fonctionnels (acides carboxyliques, alcanes, cétones et alcools primaires) identifiés dans les lipides libres de chaque fraction granulométrique a révélé une contribution importante des lipides issus des plantes, mais également une contribution bactérienne (Figure 3). En effet, les distributions des acides carboxyliques, des alcools primaires et des alcanes sont caractéristiques de celles des plantes avec une prédominance des acides à longues chaînes carbonées (> 20 atomes de carbones) (Tulloch, 1976; Kolattukudy, 1980; Wannigama et al., 1981; Rieley et al., 1991). Cependant des composés à chaîne carbonée courte, ramifiée, indicateurs d'une contribution bactérienne sont également présents (Han et Calvin, 1969; Boon et al., 1975; Meyers et Ishiwatari, 1993). Cette contribution de plantes et de bactéries avait déjà été observée dans d'autres sols étudiés de façon globale, *i.e.* sans isolement de fractions (Amblès et al., 1989; Jambu et al., 1991; Jaffé et al., 1996; Bull et al., 1998, 2000). L'utilisation de ces lipides comme marqueurs d'origine dans les différentes fractions granulométriques permet de mettre en évidence **une contribution plus importante de plantes dans la fraction sableuse et une augmentation importante de la contribution bactérienne dans les fractions fines**, et notamment la fraction argileuse.

Le degré d'altération des lipides peut également être évalué grâce à la composition lipidique. En effet, initialement une prédominance de chaînes carbonées paires par rapport aux chaînes carbonées impaires des acides et des alcools est observée dans les plantes. Au cours de la biodégradation, ces acides subissent une oxydation et entraîne la décarboxylation des chaînes carbonées paires produisant des chaînes carbonées impaires. Un indice de préférence carbone (CPI) basé sur la proportion de composés pairs et impairs est d'ailleurs calculé et utilisé dans les sols et sédiments (Bray et Evans, 1961; Cranwell, 1981; Derrien et al., 2017). De plus, la diminution de la contribution des composés insaturés est également indicatrice d'une biodégradation plus importante (Nierop et al., 2003; Naafs et al., 2005). Lors de l'étude des lipides libres, nous avons observé une contribution plus importante d'acides gras insaturés dans la fraction argileuse. La combinaison des informations concernant les sources de MO et le degré de dégradation des composés lipidiques dans les différentes fractions granulométriques a permis de montrer une contribution plus importante de MO fraîche issue des plantes dans la fraction sableuse d'une part, et un **degré d'altération des**

composés plus faible dans la fraction argileuse d'autre part. Cette altération plus faible des composés lipidiques dans la fraction argileuse peut indiquer un phénomène de préservation par adsorption sur les argiles (Schulten and Schnitzer, 1990; Meyers and Ishiwatari, 1993; Jambu et al., 1995; Hassink and Whitmore, 1997; Katell Quenea et al., 2004; Wiseman and Püttmann, 2006; Barré et al., 2014; Singh et al., 2018).

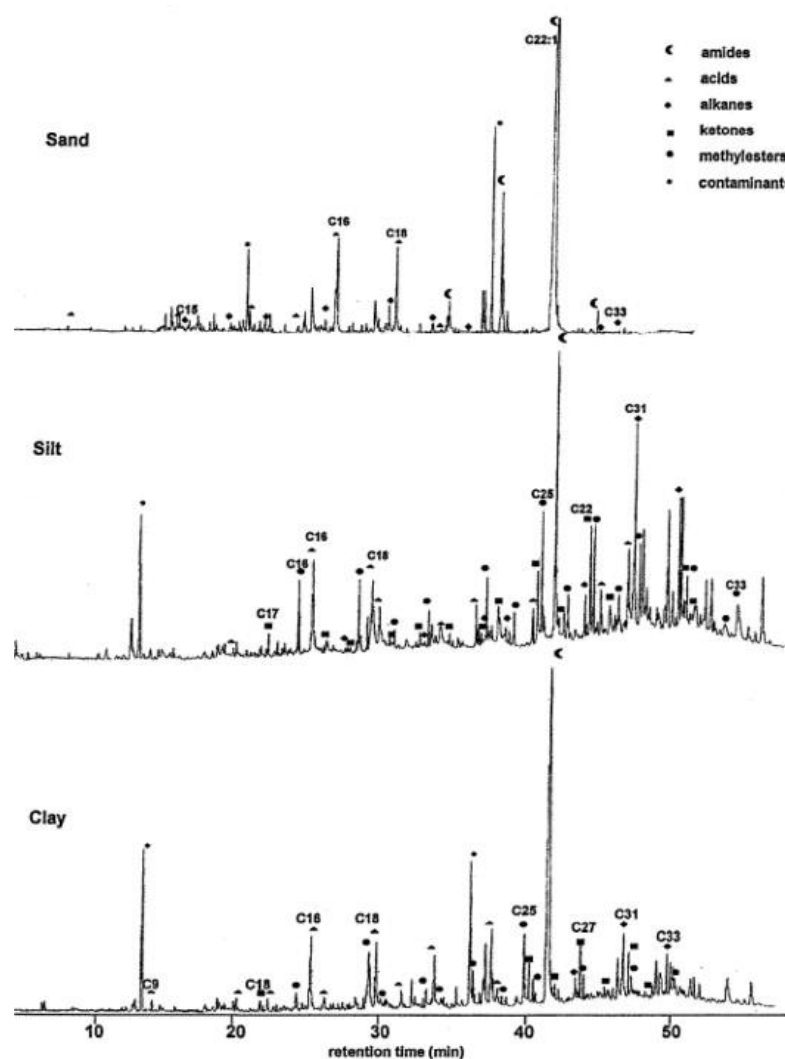


Figure 3 : Chromatogrammes des lipides totaux extraits des trois fractions granulométriques (Quenea et al., 2004)

En revanche, la caractérisation des lipides liés n'indique pas de différence de composition ni de préservation entre les fractions granulométriques. En plus des composés déjà identifiés dans la fraction de lipides libres, des hydroxy-acides et des dicarboxyliques acides ont été identifiés. Ces composés proviennent essentiellement de la rupture de liaison esters de molécules de haut poids moléculaire et en particulier de cutine et subérine. La

distribution de ces diacides, des ω -hydroxy acides ainsi que des acides carboxyliques sont en effet caractéristiques, avec une prédominance de composés ayant de longues chaînes carbonées avec une forte prédominance des composés à chaîne carbonée paires (Kolattukudy, 1980). Ces composés proviennent des plantes et sont souvent observés dans les sols (Matzke et Riederer, 1991; Riederer et al., 1993; Van Bergen et al., 1997; Naafs et al., 2005; Nierop et al., 2005; Otto et Simpson, 2006; Feng et Simpson, 2007). Des α -hydroxy acides présentant des chaînes carbonées de 12 à 29 carbones avec une prédominance des chaînes paires sont également identifiés. Ces composés sont des biopolymères structuraux de plusieurs microorganismes (Ratledge et Wilkinson, 1988; Simpson et Simpson, 2012) et sont d'autant plus abondants que la fraction granulométrique est fine, soulignant ainsi la plus **forte contribution bactérienne dans la fraction argileuse**.

Alors que la composition moléculaire des lipides libres variait selon les fractions granulométriques du fait de la diversité d'abondance des sources ou de dégradation, la **similitude de composition pour les lipides liés** semble indiquer une absence de l'influence de la fraction granulométrique considérée sur la composition moléculaire des lipides liés. Toutefois, la majorité des molécules identifiées était issue de la cutine et de la subérine. Le fait que ces molécules soient liées, elles sont moins sujettes à la biodégradation (Nierop et al., 2006). Ces composés sont en effet considérées comme moins biodégradables. Cette relative préservation du fait de leur composition moléculaire pourrait expliquer cette absence de différence dans notre étude quelle que soit la fraction granulométrique. Ainsi, dans le cas des lipides liés, la structure moléculaire elle-même semble contribuer majoritairement à leur stabilité, alors que dans le cas des lipides libres, la protection physique par interaction avec les argiles concourt à limiter leur altération.

Effet de la mise en culture sur les lipides (Quénéa et al., 2006d)

Afin d'évaluer la biodégradabilité de ces lipides, j'ai suivi la modification de la composition lipidique grâce à l'étude d'une chronoséquence : une parcelle adjacente ayant subi une conversion de ce sol forestier à la production agricole de maïs depuis 22 ans (Quénéa et al., 2006d) (Figure 1, D).

La mise en culture du sol forestier a entraîné une diminution de la teneur en carbone organique de 30 g.kg⁻¹ à 23 g.kg⁻¹ de sol, soit de plus de 20%. Cette diminution avec la mise en culture est classiquement observée, ainsi que l'on montré Guo et Gifford (2002), Don et al. (2011) et Poeplau et al. (2011) dans plusieurs méta-analyses. Cette perte de carbone est

généralement attribuée à plusieurs facteurs, dont la diminution des apports de résidus aériens, une stimulation de l'activité bactérienne par l'altération de la structure du sol, protectrice de la MO, par le labour (Balesdent et al., 2000), voir une modification des communautés microbiennes, et l'apport de fertilisants. La mise en culture a également une influence sur le carbone organique contenu dans toutes les différentes fractions granulométriques, ainsi que l'ont également observée Balesdent et al. (1998). Cependant, sur notre site, un **impact plus important sur le carbone contenu dans la fraction sableuse**, qui correspond à une diminution de 38% de carbone, a été noté. La plus grande sensibilité à la mise en culture du carbone organique de la fraction sableuse a été soulignée également par Guggenberger et al. (1995) et Jolivet et al. (2003). Elle peut être expliquée par la nature des résidus végétaux. En effet, cette fraction sableuse correspond à la fraction ayant la plus grosse granulométrie, et inclut les fragments végétaux les plus gros (MO particulaire) et les plus récents, comportant une part importante de composés labiles. De plus, la protection physique dans cette fraction est très faible. Toutefois, on observe également une diminution de carbone de 27.6% dans la fraction argileuse suite à la mise en culture.

L'influence de la mise en culture sur le carbone issu des lipides, par la comparaison des teneurs en carbone lipidique issu du sol forestier et cultivé, indique une **diminution importante de la concentration en carbone lipidique dans toutes les fractions** (-21.4, -38.75 et -67% pour les fractions sableuse, limoneuse et argileuse, respectivement) et impacte fortement la fraction argileuse (Tableau 2). La plus grande concentration de carbone lipidique est mesurée dans la fraction argileuse, que ce soit dans le sol forestier ou après 22 ans de culture de maïs. Cependant, la mise en culture a induit une perte de ce carbone issu des lipides dans les fractions fines, atteignant 75% dans la fraction argileuse. La **diminution du carbone des lipides étant équivalente ou supérieure à celle du carbone total tend à infirmer l'idée d'une biodégradabilité moindre des lipides**, qui est souvent avancée.

	Sol sous forêt			Sol cultivé		
	Sable	Limon	Argile	Sable	Limon	Argile
Concentration						
en carbone	7.1	242	337	4.4	226.5	244.7
(g.kg⁻¹)						
Carbone						
lipidique	0.76	19.4	96.6	0.61	11.1	23.1
(g.kg⁻¹)						
Contribution						
du C lipidique						
au carbone	11	8	28.5	14	4.9	9.4
total						

Tableau 2 : Teneur en carbone total et en carbone lipidique dans les fractions granulométriques du sol avant et après mise en culture (Quénéa et al., 2006d)

Cette diminution en carbone lipidique peut être due à une minéralisation plus importante suite à la mise en culture, ou à des apports plus faibles en lipide du fait de la composition chimique des résidus de maïs, appauvris en lipides par rapport aux résidus « forestiers ». Cette dernière hypothèse est peu probable du fait de la faible diminution de la concentration en carbone lipidique dans la fraction sableuse contenant la MO la plus grossière, et donc la plus proche des résidus apportés. Par ailleurs, ces résultats mettent à mal l'hypothèse d'une protection majoritaire des lipides par interaction avec les argiles, car ce sont les lipides de cette fraction qui sont les plus impactés. Ce mécanisme n'est alors vraisemblablement pas le mécanisme dominant de la préservation des lipides. Par conséquent, si les lipides ne sont pas protégés, le faible degré d'altération des lipides dans la fraction argileuse observée précédemment lors de la caractérisation moléculaire des lipides des différentes fractions pourrait confirmer une origine différente des lipides telle que supposée précédemment : les lipides extraits de la fraction argileuse pourraient être majoritairement d'origine bactérienne et donc extraits de la biomasse microbienne du sol.

Le sol forestier ayant un delta ¹³C de -27.8‰ alors que celui du sol après 22 ans de culture de maïs étant de -25.2‰, la conversion de la forêt en culture de maïs a permis un marquage isotopique naturel de la MO. Il est donc possible de calculer la proportion (*f*) de

carbone du sol provenant du maïs par rapport à celui provenant de la forêt selon l'équation 1 suivante (Balesdent et Mariotti, 1996):

$$f = (\delta_{\text{cultivé}} - \delta_{\text{forêt}}) / (\delta_{\text{maïs}} - \delta_{\text{forêt}}) \quad (\text{équation 1})$$

Dans cette équation, $\delta_{\text{cultivé}}$ représente la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ de la MO du sol cultivé, $\delta_{\text{forêt}}$ est la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ de la MO du sol sous forêt, et $\delta_{\text{maïs}}$ est la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ du maïs (-12.5‰).

Ce marquage isotopique nous apporte des éléments complémentaires car il nous permet de calculer le pourcentage de carbone issu de chaque type de végétation, et d'estimer le pourcentage de ces résidus qui a été dégradé. La contribution de carbone issu du maïs est de 17%, mais est plus importante dans la fraction sableuse (35%) (Tableau 3). Ce résultat est cohérent avec l'estimation d'une **contribution importante de MO peu dégradée, et donc récente, dans cette fraction sableuse**, déduite précédemment grâce aux biomarqueurs lipidiques. Il est également semblable aux observations de Cerri et al. (1985); Martin et al. (1990); Balesdent et al. (1998) et Jolivet et al. (2003) dans d'autres sites. Toutefois, cette contribution paraît faible après 22 ans de culture de maïs, bien qu'elle soit cohérente avec celle d'autres sols similaires (Balesdent et al., 1987; Jolivet et al., 2001), et reflète une faible incorporation des résidus de maïs apportés. Cependant, ce calcul de la contribution ne signifie pas que les 65% de carbone restants sont issus de la végétation de la forêt. Si les apports de maïs sont limités, les microbes pourraient dégrader majoritairement la MO « forestière » ancienne. La biomasse microbienne présenterait alors un $\delta^{13}\text{C}$ proche de celui de la végétation forestière et contribuerait également à ces 65% de carbone restants.

	% de C du sol issu du maïs	% de dégradation du C de la forêt	% de C lipidique du sol issu du maïs	% de dégradation du C lipidique de la forêt
Sol total	17	38	11	63
Sable	35	60	18.5	36
Limon	23	41	9	57
argile	15	31	9	76

Tableau 3 : Contribution du carbone du maïs au carbone total et au carbone lipidique, et évaluation du pourcentage de dégradation (Quénéa et al., 2006d)

Le pourcentage de dégradation ($\%_{\text{deg}}$) de la MO initiale, issue de la forêt, peut être calculé grâce à l'équation 2:

$$\%_{\text{deg}} = (1 - ((1-f) * C_{\text{cultivé}}) / C_{\text{forêt}}) * 100 \quad (\text{équation 2})$$

dans laquelle $C_{\text{cultivé}}$ est la teneur en carbone du sol cultivé depuis 22 ans, et $C_{\text{forêt}}$ est la concentration en carbone dans le sol sous forêt.

Ce calcul permet de mettre en évidence une **dégradation plus importante dans la fraction sableuse** (60%), bien supérieure à celle du carbone total (38%). Elle souligne une dégradation différentielle selon la fraction granulométrique, telle qu'elle avait été estimée grâce aux biomarqueurs lipidiques. Elle confirme la faible préservation de la MO de cette fraction sableuse, que cela soit lié au fait que cette MO est fraîche, et donc plus labile, ou qu'elle soit non protégée par les interactions organo-minérales. Cette sensibilité à la biodégradation de la MO dans les fractions grossières avait également été observé par Christensen (1987), Buyanovsky et al. (1994) et Golchin et al. (1995).

La comparaison de ces pourcentages concernant le carbone issu des lipides montre une tendance inverse de celle du carbone total, avec une **dégradation beaucoup plus importante du carbone lipidique que du carbone total du sol** (63% et 38% pour le carbone lipidique et le carbone total, respectivement), mais également du carbone lipidique dans les fractions fines (>50%). De la même façon, une plus faible proportion du carbone lipidique provient du carbone du maïs que pour le carbone total (11 et 17%, respectivement). Ceci peut être dû à une plus faible teneur en lipide du maïs (Jambu et al., 1985), ou à une dégradation du carbone lipidique plus importante que celle du carbone de la MO totale (Moucawi et al., 1981; Fustec et al., 1985). Néanmoins, la contribution de carbone issu des microorganismes (pouvant avoir un $\delta^{13}\text{C}$ proche de celui de la MO de la forêt) peut conduire à sous-estimer la contribution du carbone issu du maïs. De façon similaire, Wiesenberg et al. (2004) ont estimé un renouvellement des *n*-alcanes et des acides carboxyliques, faisant partis des lipides, plus rapide que celui du sol total. Kalbitz et al. (2003) ont suivi la biodégradation de MO dissoute par différents techniques analytiques et n'ont pas pu mettre en évidence la stabilité des lipides. Mais ils ont néanmoins observé une augmentation de l'aliphatité au cours de cette biodégradation qu'ils ont attribuée à une contribution microbienne plus importante. Le pourcentage de dégradation important dans les fractions fines conforte l'hypothèse d'une faible protection des lipides par les interactions minérales.

L'utilisation des biomarqueurs identifiés dans les fractions lipidiques extraites des différentes fractions granulométriques du sol forestier et agricole confirme plusieurs de ces observations. Quelque soit la fraction granulométrique ou le sol considéré, l'origine de la MO

est double : des composés caractéristiques de la cutine et de la subérine, indicateurs de végétaux, et des composés bactériens, tels que des *n*-alcanes et acides carboxyliques à chaînes carbonées courtes et/ou ramifiées. Cependant, l'abondance relative de ces marqueurs diffère selon les fractions granulométriques et les sols respectifs. Dans les deux sols, les marqueurs bactériens sont plus abondants dans les fractions limoneuses et argileuses, mais dans le sol sous maïs, cette contribution bactérienne est plus marquée que dans le sol sous forêt. Cette différence peut refléter une **dégradation relative plus importante des résidus végétaux par rapport aux apports microbiens dans le sol cultivé**. De plus, la distribution au sein des différentes familles de composés (diacides, hydroxy-acides et alcools estérifiés), et notamment la proportion de composés à chaînes paires par rapport aux chaînes impaires, permet de souligner un degré de dégradation des lipides plus important dans ces fractions fines, ce qui corrobore les observations obtenues par la mesure du $\delta^{13}\text{C}$ lipidique.

Dans ce site d'étude, pour lequel la protection par interaction organo-minérale était limitée, la dégradation des composés lipidiques du sol s'est révélée importante, et même supérieure à celle du carbone total. Ainsi **la stabilité des lipides au cours de la biodégradation observée généralement dans les sols semble davantage liée à des interactions spécifiques avec les minéraux**, ou l'hydrophobicité, que par leur structure chimique, ainsi que l'avait rapporté Bachmann et al. (2008). Dans notre étude, le changement d'usage du sol avait conduit à un sol appauvri en carbone et en lipides. Nous avons observé i) une contribution du carbone lipidique au carbone total dans le sol cultivé plus importante dans la fraction sableuse, et ii) la proportion du carbone lipidique issu du maïs y est également la plus importante. En conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une source de carbone lipidique majoritairement issu des résidus végétaux récents dans cette fraction. Dans les fractions fines, la contribution des microorganismes semblait plus importante dans le sol cultivé, vraisemblablement due à une dégradation relative accrue des végétaux issus de la forêt après perturbation du sol, *i.e.* lors de la mise en culture, qui a pu conduire à une croissance microbienne importante, puis à la formation d'interaction organo-minérales, même si ce mécanisme paraissait minoritaire. Ces résultats soulignent la contribution potentielle des microorganismes à la MO totale du sol telle qu'avancée par Bird et Torn (2006) ou Cotrufo et al. (2013).

2.1.2 La matière organique chimiquement réfractaire

Comme introduit précédemment, l'analogie entre la résistance à la biodégradation et la résistance à des traitements chimiques a été développée pour les sols (Paul et al., 1997; Augris et al., 1998; Lichtfouse et al., 1998; von Lützow et al., 2007). Des traitements chimiques, impliquant principalement des hydrolyses ou une oxydation avec divers réactifs, tels que des oxydations au $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Eusterhues et al., 2003), H_2O_2 (Eusterhues et al., 2005), NaClO (Mikutta et al., 2006), l'hydrolyse à l'acide chlorhydrique (Leavitt et al., 1996; Paul et al., 2001), ont effectivement mis en évidence une fraction de MO stable, *i.e.* dont l'estimation du temps de résidence était plus élevé. Ces traitements ont différents objectifs et ciblent, selon le réactif utilisé, différentes fractions de la MO, comme celle associée aux minéraux par la destruction des minéraux ou encore la cellulose. Castanha et al. (2008) ont testé l'isolement de fractions de MO ayant des temps de renouvellement différents selon différents protocoles et ont isolé des fractions ayant des signatures ^{14}C plus spécifiques en utilisant des hydrolyses que d'autres techniques de fractionnement. De plus, dans leurs synthèses von Lützow et al. (2007) et Poeplau et al. (2018) ont évalué la pertinence de l'isolement de la MO en pools fonctionnels selon des méthodes physiques et/ou chimiques. Ces études illustrent la difficulté d'isoler un pool stable de MO, aucune méthode n'étant réellement satisfaisante du fait de l'hétérogénéité de la MO extraite. Toutefois ces traitements peuvent tout de même apporter des éléments sur la stabilisation de la MO dans des systèmes plus simples ou plus contraints dans lesquels le nombre de mécanismes en jeu est plus réduit (von Lützow et al., 2007).

Le site d'étude que nous avons étudié pouvait convenir pour appréhender la stabilité de la MO. La combinaison de plusieurs critères était présente dans notre site d'étude : la possibilité d'estimer la persistance de la MO par le contexte d'un changement d'usage de sol conduisant au passage d'une végétation en C3 à une culture en C4, et de surcroît, un sol sableux limitant la protection physique de la MO. De plus, la mise en culture d'un sol induisant une perte de carbone importante, ce contexte permettait de vérifier si une MO réfractaire aux traitements chimiques s'avérait plus stable dans le temps. Aussi, dans une première étape, la fraction réfractaire de la MO (MOR) a été extraite des sols issus des deux parcelles adjacentes, présentées auparavant, par une succession d'extraction et d'hydrolyses (Quénéa et al., 2005a). Cette MOR a ensuite été caractérisée par des techniques spectroscopiques (infra rouge à transformée de Fourier (IRTF), résonnance magnétique nucléaire du ^{13}C à l'état solide (RMN ^{13}C)) et spectrométriques (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), pyrolyse couplée à chromatographie gazeuse

couplée et la spectrométrie de masse (Py-CG-SM))(Quenea et al., 2005a; Quénéa et al., 2006a), par des dégradations chimiques et des analyses optiques (microscopie électronique à transmission) (Quénéa et al., 2005b). *La mise en œuvre de ces différentes techniques d'analyse m'a permis de pouvoir caractériser la MO et d'identifier les composants de cette MOR pour, dans une deuxième étape, mieux appréhender le devenir de la MO dans les sols par évaluation de l'influence de la mise en culture sur cette MOR (Quénéa et al., 2006b).*

Caractérisation de la MOR (Quénéa et al., 2005a, 2006a)

La MOR a été isolée par une succession d'extractions et d'hydrolyses (figure 1, B et C). Dans une première étape les lipides ont été extraits aux solvants organiques, puis les substances humiques ont été extraites par un mélange de soude et de pyrophosphate. Le résidu de ces extractions a été hydrolysé par des solutions acides (trifluoroacétique et chlorhydrique), puis déminéralisé par un mélange d'acides (chlorhydrique et fluorhydrique) afin de détruire les minéraux pouvant interagir avec la MO et libérer la MO associée (Quenea et al., 2005a).

La mesure en carbone organique de cette MOR a indiqué qu'elle représentait 34% du carbone organique total du sol. L'intensité des pics du spectre obtenu suite à l'analyse RMN ^{13}C à l'état solide a révélé une aliphatité et une aromaticité importantes (d'autant plus que le signal dû aux structures aromatiques est sous-estimé par cette techniques d'analyse (Poirier et al., 2000), mais également la présence de lignine et de polysaccharides (Figure 4). La faible abondance de composés O-alkyl et carbonyl-C, généralement abondants dans la MO des sols, indique une modification de la composition de la MO initiale du sol après les traitements chimiques.

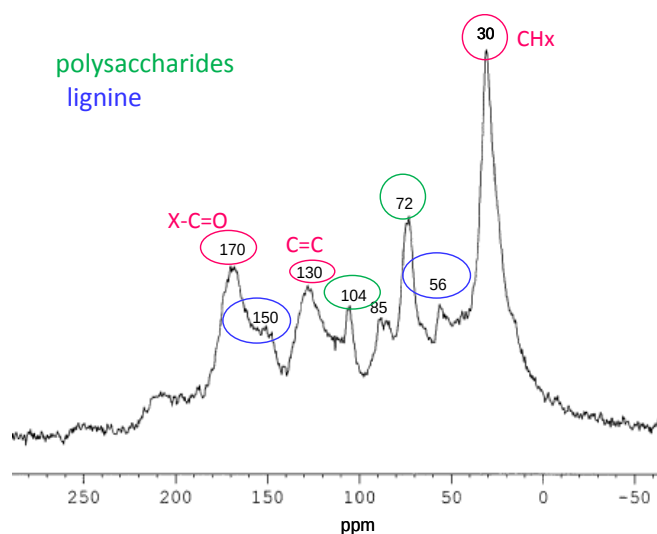


Figure 4 : Spectre RMN ^{13}C à l'état solide de la MOR du sol sous forêt

Cependant afin d'obtenir des informations sur la composition moléculaire de cette MOR, elle a été caractérisée par py-CG-SM en présence d'ammonium d'hydroxyde de tetramethyle (TMAH). La caractérisation moléculaire par py-CG-SM peut être utilisée pour des objectifs très divers comme synthétisés par Derenne et Quenea (2015). Elle a notamment servi à l'étude de l'évolution de la MO au cours de sa biodégradation ou l'observation de l'impact de diverses activités anthropiques sur le sol (changement d'usage du sol, feux). La présence de TMAH permet de cliver des structures macromoléculaires, en particulier celles présentant des liaisons contenant de l'oxygène, comme des esters ou des éthers, tout en limitant les réactions secondaires comme la décarboxylation et la déshydratation et en méthylant les composés polaires afin qu'ils soient analysables par CG-SM (Clifford et al., 1995; Challinor, 1996, 2001).

Les composés dominant le pyrochromatogramme correspondaient à des produits de pyrolyse de la lignine (methoxy benzenes, la plupart des alkyl phénols), de la cutine et de la subérine (ω -hydroxy acides, α - ω acides di-carboxyliques) (Figure 5).

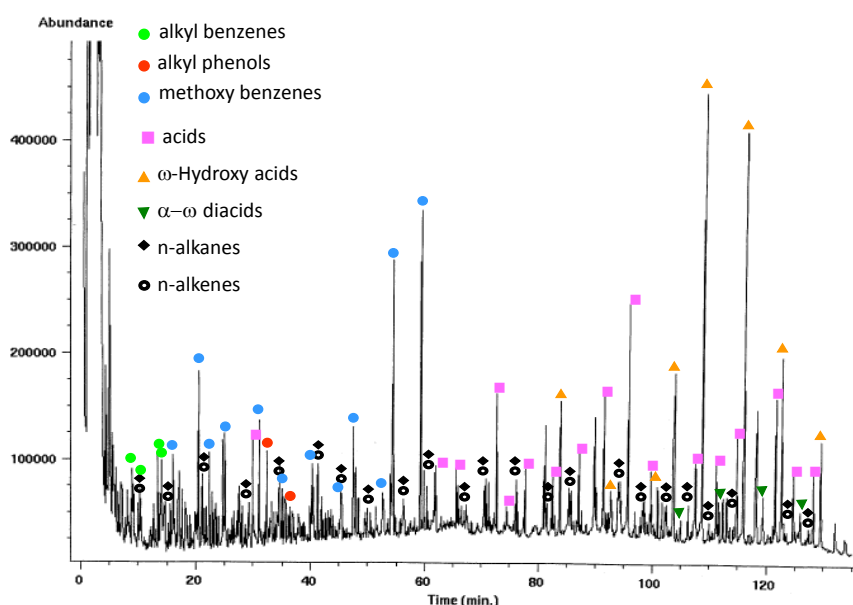


Figure 5 : Pyrochromatogramme de la MOR isolée du sol sous forêt (Quénéa et al., 2005a)

La persistance de ces composés indique qu'ils ont résisté au traitement d'isolement de la MOR. Cette résistance peut être liée à la composition chimique intrinsèque des molécules, ou à leur protection par divers mécanismes. L'augmentation de la contribution relative de subérine a été corrélée avec l'âge de la MO du sol (Rumpel et al., 2002) et soulignée lors de

l'acidification d'un sol (Nierop et Verstraten, 2003). Ces résultats semblaient indiquer la préservation de la subérine. Une hypothèse avancée par plusieurs auteurs (Grasset et al., 2002), suite au concept d'humification, était la protection de la MO par protection stérique dans la structure macromoléculaire de la MO. Cette protection pouvait expliquer la persistance de carbohydrates ou de lipides libres suite au traitement d'isolement de la MOR. Afin de distinguer les molécules faiblement liées à cette macrostructure de MO et de celles fortement liées, deux techniques ont été appliquées : une technique par oxydations chimiques successives (Quénéa et al., 2005a), adaptée d'études antérieures sur des substances humiques (Martin et al., 1981; Almendros et al., 1987, 1989), et une technique pyrolytique (Quénéa et al., 2006a).

Evaluation de la résistance de la MOR (Quenea et al., 2005b; Quénéa et al., 2006b)

Une fois cette MOR résistante à un traitement chimique drastique isolée, deux questions se sont posées : i) pourquoi ces composés formant la MOR ont-ils résisté à ce traitement chimique ? ii) quelle est réellement leur stabilité dans le sol ? (Figure 1D)

Dans ce but, la MOR fut donc soumise à des oxydations chimiques et à une technique pyrolytique. Les oxydations de force oxydative croissante successives (persulfate de sodium, perborate de sodium et dichromate de potassium) avaient été appliquées lors de l'étude de substances humiques (Martin et al., 1981; Martin et Gonzalez-vila, 1984; Almendros et al., 1987, 1989) et permis d'élucider leur structure. L'oxydation devait permettre de révéler des macromolécules réticulées pouvant piéger d'autres molécules dans leur structure et ainsi les protéger de la dégradation (appelée parfois protection stérique)(Almendros et al., 1991, 1996; Grasset et Amblès, 1998; Gonzalez et al., 2003). Nous avons appliqué ces oxydations à la MOR de nos sols. Les produits résultant des oxydations de la MOR identifiés avaient pour origine majoritairement des produits d'oxydation de la subérine, plus ou moins altérés selon l'oxydant utilisé (Quénéa et al., 2005b). Ils ne permirent **pas de mettre en évidence de protection stérique**. Ces résultats sont cohérents lors de la prise en compte de l'évolution du principe d'évolution de la MO par humification. En effet, ces dernières années, cette vision de l'évolution de la MO a été reconsidérée (Sutton et Sposito, 2005; Kleber et Johnson, 2010; Lehmann et Kleber, 2015). Des analyses ont montré que, contrairement à ce qui était avancé, les acides humiques ne seraient pas des macromolécules mais un assemblage de molécules de plus faible poids moléculaire (Piccolo, 2001; Sutton et Sposito, 2005). Aussi il est peu probable que des composés de la MO aient pu être protégés par une macrostructure constituée

de MOR. **La composition chimique influe donc davantage** sur la sensibilité à ces oxydations chimiques qu'une protection stérique réelle.

En revanche, la technique pyrolytique, comportant deux étapes de chauffage successives (à 350, puis 650°C) (« double shot pyrolysis »), a permis de distinguer deux types de composés selon la température à laquelle ils se sont volatilisés. En effet, la première étape est une désorption thermique alors que la seconde correspond à un craquage thermique de la MOR, or les composés identifiés lors des deux étapes sont différents. Cette étude pyrolytique a été réalisée lors d'un séjour à l'Institut des ressources naturelles et agrobiologie de Séville en collaboration avec Mr Gonzalez-Vila et Gonzalez Perez.

Les produits de désorption de la MOR sont composés de molécules issues des carbohydrates et de lignine, alors que les produits de craquage thermique ont permis l'identification de molécules provenant de tanins et de chaînes aliphatiques (Quénéa et al., 2006a). La possibilité d'un lien entre stabilité thermique et stabilité chimique est actuellement souvent mise en avant. Ainsi, de façon similaire à l'établissement d'une corrélation entre la stabilité de la MO et la récalcitrance chimique pendant des années, des techniques d'analyses thermique se développent actuellement pour évaluer la stabilité de la MO, que ce soit par thermogravimétrie, l'analyse thermique différentielle ou la pyrolyse ainsi que Plante et al. (2009) l'ont synthétisée. La pyrolyse « Rock eval » est ainsi appliquée aux sols (Disnar et al., 2003; Sebag et al., 2006; Barré et al., 2016; Soucémariadin et al., 2018) et fournit des résultats intéressants, bien que restants en développement pour les sols car les effets de matrice sont importants. La pyrolyse en deux étapes appliquée en 2006 sur la MOR a fourni des informations concernant la stabilité des liaisons des molécules de la MOR. D'après le raisonnement exposé ci-dessus, la **lignine présenterait une stabilité moindre par rapport aux molécules aliphatiques et donc de la subérine** (les produits majoritaires de la MOR en sont issus). Toutefois, les fractionnements chimiques qui visent à isoler une MO donnée peuvent induire des transformations dans la structure chimique de l'OM restante, rendant son interprétation sur leur stabilité plus difficile (Sleutel et al., 2009).

L'utilisation de la conversion du sol forestier en sol cultivé, nous a de nouveau permis d'estimer l'impact de cette mise en culture sur la MOR. L'hypothèse était que dans le cas d'une résistance chimique « mimant » une résistance à la biodégradation, la MOR ne devrait pas être impactée par cette mise en culture. Après 22 ans de mise en culture, la MOR constituait 20% du carbone organique total du sol, dont 15% provient du maïs (calculé grâce au marquage isotopique). En faisant abstraction de cet apport de carbone issu du maïs, la perte

de MOR initiale était de 63%. Cette baisse importante de MOR indique donc que **le caractère réfractaire à des hydrolyses chimiques ne correspond pas à une stabilité dans le sol** à l'échelle de dizaines d'années. D'un point de vu de l'évolution de la composition de cette MOR, l'analyse par RMN ^{13}C et la caractérisation moléculaire par py-CG-SM ont révélé une **diminution de la contribution en lignine et en carbohydrates** dans la MOR isolée du sol sous forêt. En conséquence, une **contribution relative plus importante en composés aliphatiques**, notamment issus de la subérine, a été observée par py-CG-SM, tout comme une plus grande abondance des marqueurs bactériens. La subérine est considérée comme un marqueur de MO racinaire, la présence de subérine était donc cohérente dans ces sols mais elle semble préservée par rapport à la lignine, qui a subi une forte dégradation. Lors de l'étude de la MO d'une succession végétale développée sur un sol sableux, Nierop (2001) a également observé un enrichissement relatif en subérine et une diminution de la lignine au cours du temps. Plusieurs études ont par ailleurs souligné une vitesse de biodégradation de la lignine plus importante que celle initialement évoquée (Dignac et al., 2005; Thevenot et al., 2010). Le spectre obtenu par RMN ^{13}C à l'état solide indiquait également un **enrichissement en composés aromatiques**. Ceux-ci ne pouvaient pas être dû à la lignine car celle-ci est moins abondante, ainsi que l'a révélée la py-CG-SM. Ces fonctions aromatiques peuvent provenir des tanins, certains composés identifiés par py-CG-SM pouvant être attribué à ces tanins. De plus, Nierop (2001) avait également noté l'augmentation des composés provenant de tanins. Une autre origine de ces composés aromatiques peut être la présence de carbonisats, des incendies importants ayant eu lieu dans la zone d'étude en 1937 et 1943, ou la formation de mélanoidines lors de l'isolement de la MOR (Poirier et al., 2000). Sans exclure une contribution des tanins et de potentielles mélanoidines, l'observation par microscopie électronique à transmission haute résolution (MET HR) de la MOR a effectivement mis en évidence des carbonisats que nous avons étudié par la suite (Quénéa et al., 2005a).

La mise en culture a conduit à une altération tant quantitative que qualitative de la MOR. Cette altération est révélatrice de **l'absence de lien entre la résistance chimique et la biodégradabilité de la MO**. Cependant, une **persistance différente selon les molécules** d'origine des composés a été observée. Par cette étude et celle de Nierop (2001), les sols étant sableux et n'offrant que peu de protection par des interactions organo-minérales, le rôle de la composition moléculaire de la MO dans son devenir est souligné.

2.1.3 Les carbonisats (Quénéa et al., 2006c)

Les carbonisats comprennent tous les résidus de la combustion incomplète de la biomasse végétale et des combustibles fossiles (Goldberg, 1985; Haumaier et Zech, 1995; Schmidt et Noack, 2000), du résidu partiellement carbonisé au graphite et aux particules de suie. La carbonisation, en induisant une altération de la structure moléculaire de la MO initiale (Knicker, 2007), et en particulier son aromatisation, permettrait la stabilisation de la MO dans le sol. Ces composés sont donc considérés comme persistants dans l'environnement. En effet, des temps de résidence des carbonisats dans des sols et des sédiments atteignant de 100 à plus de 10000 ans ont été mesurés par datation au ^{14}C (Goldberg, 1985; Masiello et al., 2002; Kuzyakov et al., 2009).

Lors de la remise en question du principe d'humification (Kleber et Johnson, 2010; Lehmann et Kleber, 2015), le suivi de la biodégradation de litière n'ayant pas permis de mettre en évidence d'aromatisation de la MO (Hempfiling et al., 1987; Rumpel et al., 2002; Kelleher et Simpson, 2006), l'augmentation du degré d'aromatisation lors de l'évolution de la MO de sols a été attribuée à la persistance des carbonisats.

Lors de notre étude de la MOR, la présence de carbonisats a pu être mise en évidence par MET HR, et par la présence d'acides benzènes polycarboxyliques obtenus suite à l'oxydation de la MOR au tetroxyde de ruthénium, un oxydant préférentiel des cycles aromatiques (Quénéa et al., 2005a). *Nous avons quantifié ces carbonisats par deux techniques : i) par dénombrement après isolement manuel et ii) par oxydation thermo-chimique (TCO), après avoir évalué ces techniques sur des charbons modèles (Quénéa et al., 2006c).* La quantification par TCO a été réalisée en partenariat avec O. Gustafsson lors d'un séjour au département de science environnementale appliquée de l'Université de Stockholm. Dans des échantillons provenant du site forestier et de la parcelle agricole, la quantification a indiqué qu'environ 60% des carbonisats avaient été dégradés. Bien que la structure des carbonisats et leur degré d'aromatisation soient des éléments déterminants de la stabilité de ces carbonisats (Spokas, 2010; Knicker, 2011; Singh et al., 2012; Wang et al., 2016), **les carbonisats de nos échantillons se sont avérés sensibles à la mise en culture.** La biodégradation des carbonisats est bien connue et de nombreux facteurs autres que leur structure chimique, tels que la température ou l'humidité du milieu, qui furent détaillés par Wang et al. (2016) suite à une méta-analyse, influent sur la biodégradation des carbonisats et leur stabilité dans le sol.

2.1.4 Stabilité et composition chimique

Nos travaux sur l'influence de la mise en culture sur différentes familles de molécules ou fractions de la MO ont mis en évidence un effet tant sur les lipides, que sur la fraction de la MO résistante aux extractions chimiques, ou sur les carbonisats, conduisant à une diminution de ces composés dans les sols. Or, ces fractions avaient été identifiées comme potentiellement les plus résistantes à la biodégradation. Ces résultats vont dans le sens de plusieurs auteurs qui se sont interrogés depuis sur le rôle de cette composition chimique sur la stabilité de la MO (Lützow et al., 2006; Mikutta et al., 2006; Marschner et al., 2008; Schmidt et al., 2011; Dungait et al., 2012; Simpson et Simpson, 2012). Finalement, un consensus tend à être adopté : la composition chimique et la structure de la MO ont été proposées pour jouer un rôle majoritairement à court et moyen terme (von Lützow et al., 2006; Kögel-Knabner et Amelung, 2014) sur la stabilisation de la MO des sols.

Cette réévaluation de l'influence de la composition chimique induit des conséquences importantes sur la compréhension et l'estimation du devenir de la MO. Toutefois, bien qu'ayant un rôle à court terme, ce facteur ne doit pas être négligé, car il joue bel et bien un rôle, comme l'ont montré les dégradations différentielles selon les familles de molécules observées dans notre chronoséquence, ou l'analyse de MO provenant de sols de jachères nues, c'est-à-dire n'ayant eu aucun apport de MO depuis plusieurs dizaines d'années (Barré et al., 2016, 2019). De plus, l'importance relative de ce mécanisme par rapport aux autres mécanismes de préservation, par interactions organo-minérales, reste difficile à évaluer. En effet, l'évaluation de son influence peut être modifiée selon les conditions environnementales (von Lützow et al., 2008) comme dans le cas de notre étude, où le sol était très sableux, et les interactions organo-minérales étaient donc minoritaires.

La caractérisation de la MO ne doit donc pas être négligée, notamment au niveau moléculaire. Son rôle déterminant a pu être illustré par quelques résultats marquants. Ainsi, des analyses moléculaires, associées à un marquage isotopique, ont permis de corriger des visions erronées, comme celle de la persistance de la lignine à longue échelle de temps (Dignac et al., 2005; Rasse et al., 2006), ou inversement du caractère peu persistant des carbohydrates (Derrien et al., 2003). La caractérisation par RMN ^{13}C à l'état solide a également permis de reconsidérer la contribution des substances humiques à la MO du sol (Kelleher et Simpson, 2006) et de démontrer la contribution forte des microorganismes à la MO (Simpson et al., 2007; Grandy and Neff, 2008; Kallenbach et al., 2016). Aussi, la caractérisation chimique de la MO reste donc cruciale afin de mieux comprendre l'intégralité des processus en jeu dans la stabilisation de la MO.

2.2 Influence des interactions organo-minérales sur le devenir de la MO

Dans le sol, du fait de processus biologiques, chimiques et physiques, les constituants organiques et les minéraux sont intimement associés par des interactions organo-minérales. Les interactions organo-minérales peuvent être envisagées selon différentes échelles : la mise en place de liaison entre MO et minéraux à leur surface, ou l'organisation des constituants organiques et minéraux sous la forme de structure organo-minérales, comme les agrégats (Chenu and Stotzky, 2002; Six et al., 2004; Kleber et al., 2015).

Les interactions organo-minérales ont un rôle prépondérant sur la protection de la MO comme l'ont souligné de nombreuses études. Dès les années 90, certains auteurs mettaient déjà en avant le rôle des minéraux dans la protection de la MO (Hassink et al., 1993; Golchin et al., 1994; Davidson et al., 1995; Oades, 1995; Sollins et al., 1996; Hassink et Whitmore, 1997; Torn et al., 1997). Mais depuis les années 2000, l'intérêt et la prise en compte des interactions organo-minérales sur le devenir de la MO n'a cessé de croître (*e.g.* Baldock et Skjemstad, 2000; Balesdent et al., 2000; Kaiser et Guggenberger, 2000, 2003; Eusterhues et al., 2003; Guggenberger et Kaiser, 2003; Six et al., 2004; Basile-Doelsch et al., 2005; Kalbitz et al., 2005; Chenu et Plante, 2006; Lützow et al., 2006; Mikutta et al., 2006; Wiseman et Püttmann, 2006; Kögel-Knabner et al., 2008; Moni et al., 2010; Schmidt et al., 2011; Dungait et al., 2012; Cotrufo et al., 2013; Barré et al., 2014; Keil et Mayer, 2014; Kleber et al., 2015; Pronk et al., 2017).

Cet effet des interactions organo-minérales a été mis en évidence notamment par un taux de renouvellement de la MO plus faible dans les agrégats (Puget et al., 1995; Monreal et al., 1997), comme dans la fraction fine du sol (Feller et al., 1991; Buyanovsky et al., 1994; Balesdent et al., 1998; Christensen, 2001; Roscoe et al., 2001; Kaiser et al., 2002; Marschner et al., 2008; Feller and Chenu, 2012), ou les fractions les plus denses (Roscoe et al., 2001; Kaiser et al., 2002; Basile-Doelsch et al., 2009; Sollins et al., 2009). Les estimations du temps de renouvellement du carbone inclus dans ces interactions, après isolement de fractions de sol (densimétrique ou granulométrique) réalisés par mesure du ^{14}C peuvent indiquer des temps supérieurs au siècle (Torn et al., 1997; Kögel-Knabner et al., 2008; Sollins et al., 2009; Trumbore, 2009).

Les mécanismes en jeu dans les interactions organo-minérales, leur formation et leur influence sur la stabilisation de carbone ont été synthétisés par Kleber et al.(2015) de façon détaillée. Quant à la protection par « adsorption », une des hypothèses de cette persistance serait une affinité de la MO pour le minéral supérieure à l'affinité du site enzymatique actif, ainsi la MO ne pourrait être biodégradée par les microorganismes (Dungait et al., 2012). Les

minéraux, tels que les phyllosilicates, les oxydes et hydroxydes métalliques, sont susceptibles d'interagir avec la MO du fait de leur surface spécifique élevée et de leur réactivité de surface, mais la nature de la MO joue également un rôle comme l'ont montré plusieurs expérimentations (Kaiser et al., 2000; Kalbitz et al., 2005; Mikutta et al., 2007; Scheel et al., 2008) et ainsi que l'illustre le modèle de Kleber et al. (2007). La sorption sur les minéraux est donc influencée à la fois par les propriétés des minéraux du sol, leur évolution (Basile-Doelsch et al., 2015) et par la nature même des espèces organiques.

La mise en place de structures organo-minérales, telles que les agrégats, peut également être impliquée dans la protection de la MO. Les mécanismes avancés sont principalement l'inaccessibilité des microorganismes (et / ou des enzymes) à la MO (Baldock et Skjemstad, 2000; Chenu et Stotzky, 2002; Dungait et al., 2012; Ruamps et al., 2013), et / ou une activité limitée des microorganismes. Celle-ci serait due à leur exclusion du fait de la taille des pores et la création d'un microenvironnement inadapté au développement de microorganismes dans les agrégats (Sexstone et al., 1985; Horn et Smucker, 2005; Rabbi et al., 2016; Nunan, 2017), telle que la diffusion limitée de l'oxygène dans les agrégats. En effet, l'architecture du sol impliquant une distribution hétérogène de la MO et des microorganismes semble être un paramètre déterminant dans la minéralisation du carbone (Chenu et Stotzky, 2002; Nunan et al., 2003; Ruamps et al., 2013; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015; Rabbi et al., 2016; Nunan, 2017). Par conséquent, les mécanismes impliqués dans la stabilité à plus long terme de la MO sont d'une part les interactions avec les minéraux et d'autre part l'inaccessibilité de la MO aux microorganismes (von Lützow et al., 2008) (figure 6).

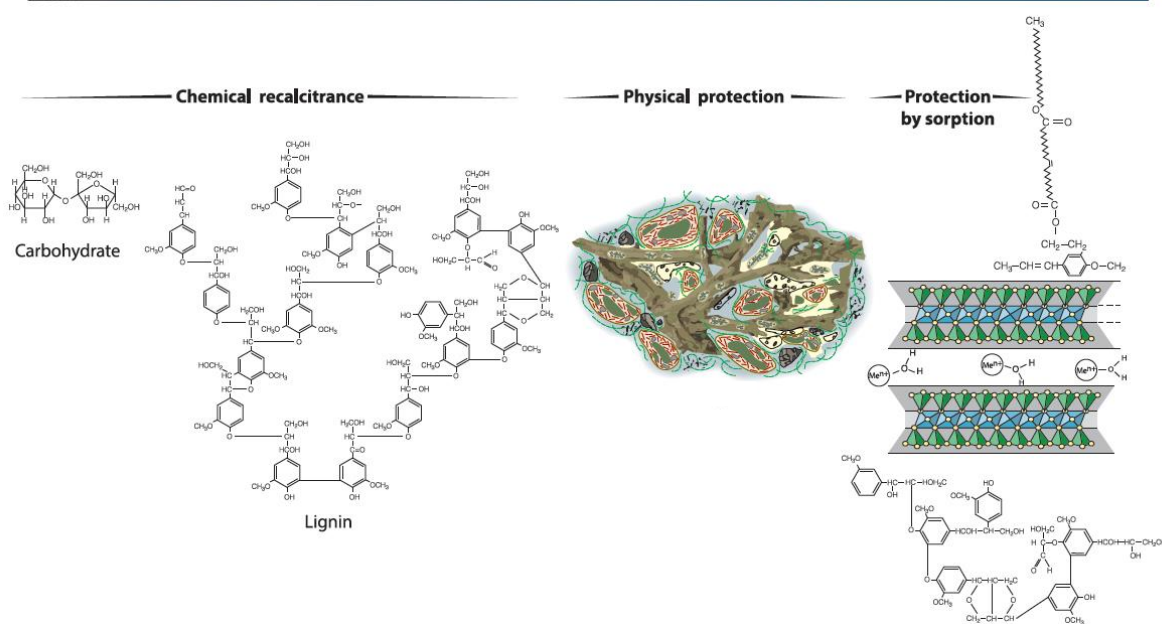


Figure 6 : Exemples de lien entre les différents processus de stabilisation de la MO et sa stabilité. Me^{n+} : ions métalliques

2.2.1 Rôle des vers de terre dans la structuration du sol

Dans ce contexte, je me suis intéressée au devenir de la MO localisée dans les agrégats du sol et en particulier dans des agrégats biogéniques (Figure 1' E) dans le cadre d'un projet EC2CO dont j'étais porteuse et de la thèse d'Alix Vidal que j'ai co-encadrée. En effet, si la structuration de sol est le fait de mécanismes physico-chimiques, mais aussi biologiques, dont les mécanismes ont fait l'objet de nombreuses publications et modèles d'agrégation (Tisdall et Oades, 1982; Oades, 1993; Golchin et al., 1994; Jastrow et al., 1998; Six et al., 2000), les macroorganismes du sol, dont les vers de terre, en tant qu'ingénieurs de l'écosystème, contribuent également fortement à la structuration du sol (Lavelle, 1988; Lee et Foster, 1991; Brown et al., 2000; Fonte et al., 2012; Blouin et al., 2013; Bottinelli et al., 2015). Bossuyt et al. (2005) ont montré que la proportion de macroagrégats ($> 2000 \mu m$) était 3,6 fois plus élevée en présence de vers de terre dans un sol cultivé incubé en laboratoire, et Zangerlé et al. (2011) ont montré que la proportion de macroagrégats passait de 17,8% à 42,1% en présence de vers de terre après deux mois d'expérience.

Les vers ingèrent une grande quantité de sol (17 mg de matière sèche/g de ver/jour (Curry et Schmidt, 2007) ou encore estimée à 400 t/ha/an) mais également de MO. Ils excrètent ainsi jusqu'à 50 tonnes de turricules par hectares et par an (Lee, 1985). D'après Edwards et Bohlen (1996), la totalité des 15 premiers centimètres d'un sol passerait par le

tractus digestif des vers en 15 à 20 ans, et plus de 50% des agrégats du sol seraient produits par les vers de terre (Lee et Foster, 1991). Lors de l'ingestion de MO et sol, la structure du sol initiale est détruite, la MO ingérée est intimement mixée avec du mucus produit par le ver. Les turricules produits lors de l'égestion constituent de nouveaux agrégats biogéniques riches en MO (Vidal et al., 2016b). Les vers ont donc une grande importance dans la formation aussi bien de macroagrégats (Bossuyt et al., 2005) que de microagrégats (Six et al., 2004), mais aussi sur le devenir de la MO associée et intégrée dans ces structures (Bossuyt et al., 2005; Coq et al., 2007; Fonte et al., 2007, 2012; Lemtiri et al., 2014; Angst et al., 2017). Par conséquent, les turricules de vers de terre, de par leur abondance dans les sols et le carbone qu'ils contiennent, peuvent influencer le devenir de la MO dans la biosphère continentale, et constituent également un modèle d'agrégat organo-minéral accessible et facilement isolable.

2.2.2 Effet des vers de terre sur le carbone organique du sol (Vidal et al., 2017)

L'effet de la présence de vers de terre sur le carbone organique des sols a été étudié grâce à un protocole expérimental de suivi de MO en présence de vers de terre, en milieu contrôlé (projet EC2CO et thèse d'Alix Vidal). Nous nous sommes en particulier intéressés à l'influence des vers sur la MO fraîche apportée au sol. Pour cela, Nous avons réalisé 6 mésocosmes d'environ 75L. Dans 4 mésocosmes nous avons apporté du ray gras (*Lolium multiflorum* Lam.), marqué artificiellement au ^{13}C , en distinguant les parties aériennes et racinaires, en présence ou en absence de vers de terre, afin que la MO apportée soit plus homogène. En effet, les parties aériennes et racinaires des plantes apportées ont des compositions chimiques différentes, avec des teneurs en carbone similaires (40%), mais des racines moins riches en azote (3% pour les parties aériennes vs 1.5% pour les racines). De plus, l'abondance en lignine et subérine généralement plus importante dans les racines est parfois mise en avant pour expliquer leur temps de résidence plus important que celui des feuilles dans le sols (Gleixner et al., 2001; Rasse et al., 2005). De la même façon, le marquage isotopique artificiel des parties aériennes et racinaires était différents (1324‰ (+/-43) et 1632‰ (+/-16) pour les racines et les parties aériennes, respectivement). Aussi, les racines et les feuilles ont été séparées dans le dispositif expérimental et mis à incuber séparément. Les deux autres mésocosmes constituaient les témoins avec et sans vers.

Afin de pouvoir suivre spécifiquement le devenir de MO apportée dans les mésocosmes, la MO apportée avait été préalablement marquée au ^{13}C . Ce marquage a permis de calculer la proportion de MO intégrée dans le sol et dans les turricules, et de la distinguer

de la MO originellement présente dans le sol. Cette MO a été suivie pendant 54 semaines avec des prélèvements à 1, 2, 4, 8, 24 et 54 semaines (Figure 1 F et G).

La proportion de ^{13}C dans les sols a été calculée à chaque pas de temps. Ainsi une augmentation du pourcentage de ^{13}C issu de la MO a été observée dans la couche 0-20cm, pour atteindre 11.4%, au bout d'un an dans les mésocosmes contenant des racines en absence de vers (Figure 7).

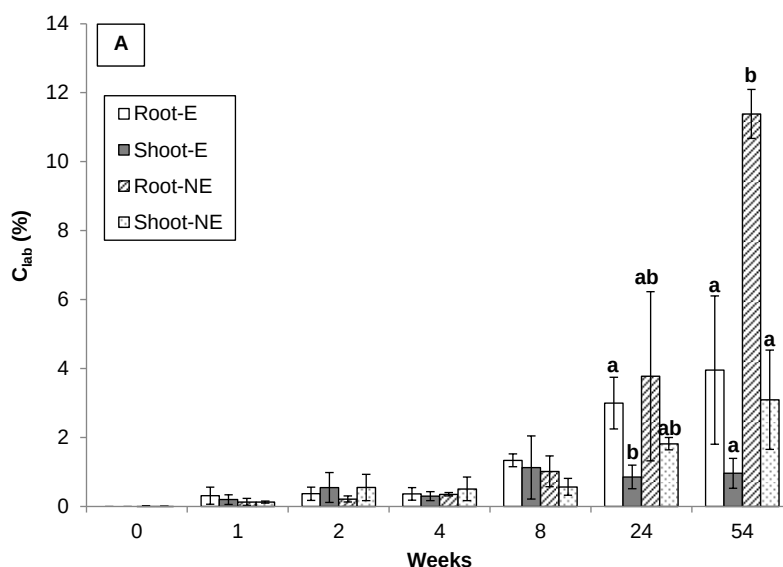


Figure 7 : Proportion de C marqué (C_{lab}) dans le sol après apport de racines ou de parties aériennes de Raygrass, en absence (NE) ou en présence € de vers de terre d'après Vidal et al. (2017). E : earthworm, NE : No earthworm

Si la présence de vers de terre n'a pas eu d'influence sur l'incorporation de la MO au début de l'expérimentation, au bout de 54 semaines, la contribution de la MO marquée était significativement plus importante dans le mésocosme sans ver ayant reçu des racines. Cette contribution à la MO totale a pu avoir eu lieu sous différente forme : soit la biomasse végétale est demeurée intacte à la surface, ou a été transférée sous forme de composés solubles ou de fragments dans le sol. Cependant une partie du carbone marqué peut également provenir de la biomasse microbienne ayant consommé la MO marquée. A la fin de l'expérimentation, une partie de la MO apportée était en effet encore visible dans le mésocosme sans ver, et avec les résidus de racines et feuilles. Bien que l'effet de la nature de la MO dans cette expérimentation ne sera abordé que dans la section 2.3, **l'absence de différence significative dans la proportion de C marqué selon l'origine de la MO en présence de ver de terre**, doit être mentionnée. La MO a été assimilée par les vers quelle que soit la MO apportée. **La**

comparaison de la proportion de carbone marqué avec ou sans vers pour les feuilles, n'a pas mis en évidence un effet significatif des vers sur la quantité de ^{13}C issu des parties aériennes dans le sol.

Au cours de l'expérimentation, la teneur en carbone du sol a évolué par rapport à la teneur initiale. Après 54 semaines, en présence de vers, il y a eu une diminution de la teneur en carbone et donc une minéralisation du carbone initial du sol, alors que sans vers de terre, l'apport de MO a conduit à un enrichissement en carbone du sol (figure 8). **Les vers ont donc accru la minéralisation du carbone du sol dans cette expérimentation.**

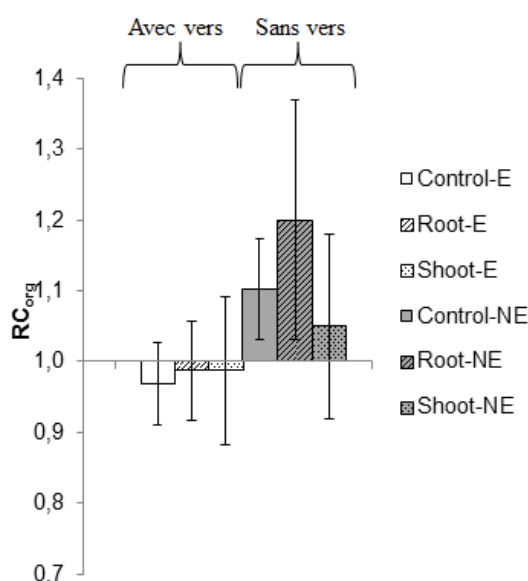


Figure 8 : Proportion de carbone organique du sol par rapport à la teneur initiale dans les mésocosmes 54 semaines après le début de l'expérimentation (vidal et al, 2017).

Cette minéralisation accrue a également été observée par Fahey et al., (2013) et Lubbers et al. (2013, 2017). Cet effet a pu être direct, du fait de l'ingestion de la MO, mais également indirect par stimulation des microorganismes qui ont une activité plus importante en présence de vers, dû à leur mucus riche en polysaccharides (Brown, 1995; Binet et al., 1998; Brown et al., 2000; Fahey et al., 2013; Lubbers et al., 2013; Hoang et al., 2016). Un effet « priming effect » a été mis en évidence lors de l'activité des vers de terre (Brown et al., 2000; Coq et al., 2007; Bityutskii et al., 2012; Hoang et al., 2017). Ce « priming effect » pourrait également conduire à la minéralisation de MO ancienne présente dans le sols (Lubbers et al., 2017). Cependant d'autres auteurs avaient observé au contraire une stabilisation du carbone en présence de vers (Six et al., 2004; Bossuyt et al., 2005; Pulleman et al., 2005; Fonte et al., 2007; Zangerlé et al., 2011) fortement liée à la localisation dans les agrégats donc à une protection physique. Une des hypothèses avancée pour cette étude pour

expliciter ces observations contradictoires, et partagée par d'autres auteurs (Coq et al., 2007; Zhang et al., 2013; Frouz et al., 2014; Zangerlé et al., 2014; Lubbers et al., 2017; Angst et al., 2017), est **l'occurrence de deux phases successives conduisant dans un premier temps à un accroissement de la minéralisation de la MO, suivie d'une stabilisation du carbone résiduel à plus long terme** (Vidal et al., 2017).

2.2.3 Incorporation et devenir de la MO dans les agrégats biogéniques (Vidal et al., 2016b, 2017)

Les résultats précédents concernaient le carbone contenu dans le sol dans sa globalité. *Nous avons également suivi plus spécifiquement la MO incorporée dans les turricules. L'étude des turricules en tant que modèle d'agrégat organo-minéral peut apporter des informations complémentaires sur le rôle de ces interactions sur le devenir de la MO.*

Dans les turricules prélevés dans les mésocosmes, la **teneur en carbone était supérieure à celle du sol** et contenait de 1.3 à 3.6 fois plus de carbone et a atteint 5.5% de carbone à 8 semaines (figure 8A). La **proportion de carbone marquée a atteint plus de 50%** (58.1 et 51.8% pour les parties aériennes et les racines, respectivement) à 8 semaines d'incubation (figure 8B), et était similaire aux résultats obtenus lors d'une autre expérimentation (Jégou et al., 1998). A la fin de l'expérimentation (54 semaines), la proportion de carbone marquée dans les turricules n'était plus que de 12% (Fig. 9), indiquant ainsi une **minéralisation importante de la MO incorporée dans les turricules**. Celle-ci est à mettre en lien avec une activité des microorganismes importante comme mentionné précédemment. De plus, cette minéralisation importante a pu être la conséquence de la conception du dispositif expérimental. En effet, la quantité de MO apportée au début de l'expérimentation étant limitée, au bout de 24 semaines toute la MO apportée a été ingérée par les vers. Or ceux-ci re-ingèrent leur turricules, conduisant à une minéralisation supplémentaire de la MO (Cortez et Bouché, 1998) à 54 semaines. La minéralisation du carbone a donc probablement pu être surestimée dans cette étude par rapport aux conditions en milieu naturel.

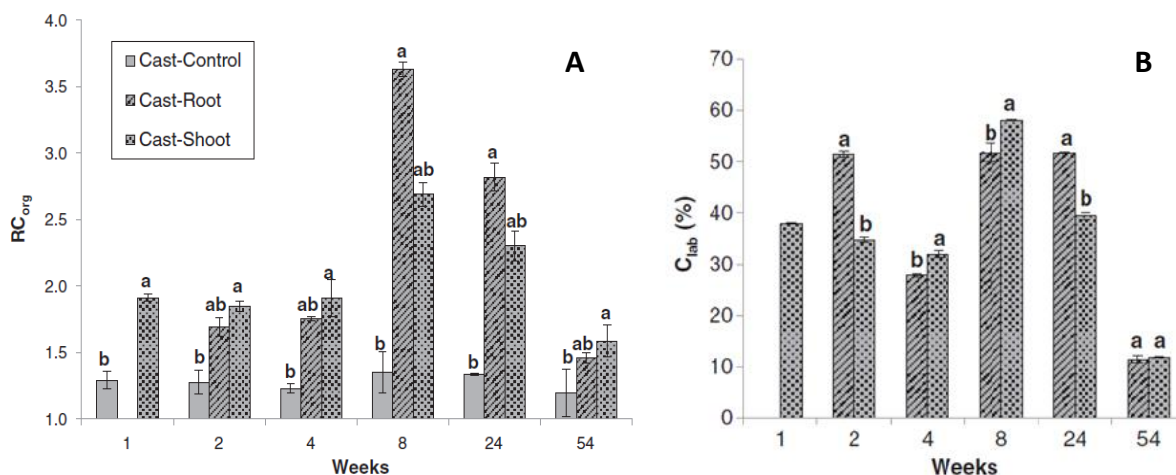


Figure 9 : A- Proportion de carbone organique des turricules par rapport à la teneur initiale en carbone du sol et B- Pourcentage de carbone marqué contenu dans les turricules (n=3) (Vidal et al., 2017)

Cette **activité bactérienne importante a pu être observée directement dans les turricules isolés de l'expérimentation** (figure 1 F). En effet, afin de mieux comprendre les interactions organo-minérales mises en place dans les turricules, nous avons développé une nouvelle approche pour observer les turricules par deux techniques complémentaires : la microscopie électronique à transmission (MET) et la spectrométrie de masse à ions nanométriques secondaires (nanoSIMS) (Vidal et al., 2016b). Ainsi l'utilisation de MET a permis d'identifier les microstructures, les fragments végétaux et des microorganismes abondamment présents dans les turricules (Watteau et al., 2006; Vidal et al., 2016b), alors que la nanoSIMS nous a permis de suivre le carbone marqué dans ces même turricules (lames jumelles). L'application de la nanoSIMS aux sciences du sol (Herrman et al., 2007; Heister et al., 2012), et en particulier à la caractérisation des interactions organo-minérales s'est développée dernièrement (Mueller et al., 2012; Remusat et al., 2012; Vogel et al., 2014; Rumpel et al., 2015). La combinaison inédite de ces deux techniques nous a permis de caractériser les différents constituants organiques et minéraux des turricules, et d'identifier la MO récemment incorporée dans ces turricules, ou encore des microorganismes ayant dégradé cette MO grâce au marquage isotopique (figure 10 B). Les observations des turricules par MET ont mis en évidence des résidus de végétaux et des minéraux, soit isolés, soit sous forme d'agrégats, dans les turricules. De nombreuses bactéries, isolées ou regroupées au sein d'agrégats, ainsi que des champignons ont pu également être identifiés (figure 10A). Les analyses par nanoSIMS ont montré un **marquage isotopique important de certaines**

bactéries et champignons indiquant leur implication dans la minéralisation de la MO apportée au sein des turricules.

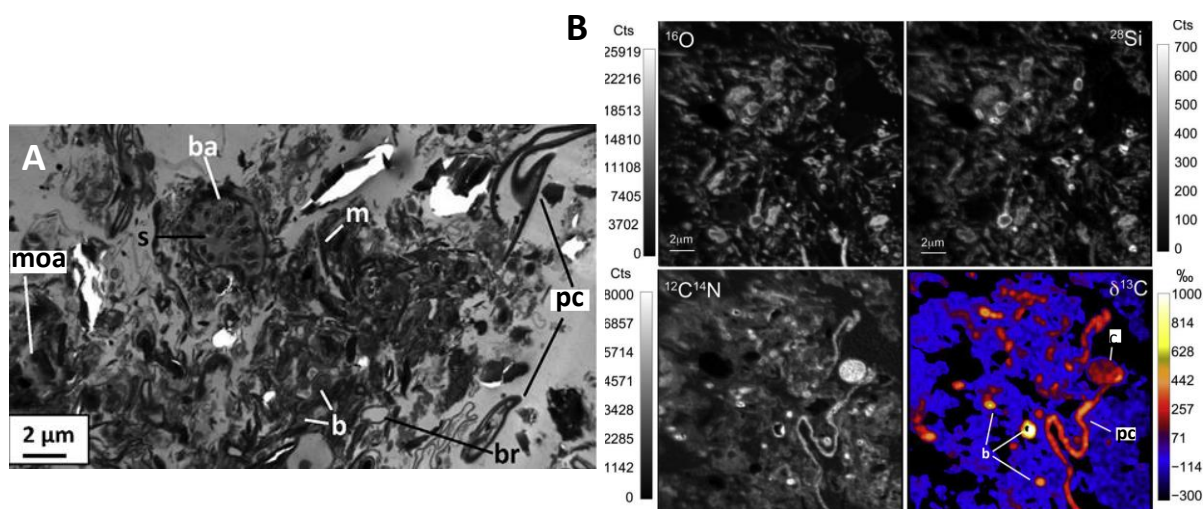


Figure 10 : A-Agrégats organo-minéraux et bactériens de turricules observés par MET ; B- images NanoSIMS des ^{16}O , ^{28}S , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ illustrant la diversité de la matière organique dans les turricules (pour l'image isotopique, un masque a été appliqué pour supprimer la contribution de la résine époxy, en utilisant un seuil défini pour l'élément $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$).

moa : matière organique amorphe; b : bactérie; ba : agrégat de bactéries; br : résidus bactériens; pc : paroi cellulaire; m : minéraux ; c : champignon (d'après Vidal et al.(2016b))

Les résultats sur la MO incorporée dans les turricules soulignent le **rôle essentiel des vers dans l'incorporation de MO fraîche dans des structures biogéniques**. Cependant, la mise en perspective à une plus grande échelle temporelle du devenir de la MO incorporée dans les turricules n'est pas aussi aisée à mettre en évidence : d'une part, une minéralisation importante de la MO incorporée dans les turricules a lieu, mais d'autre part, malgré cette minéralisation importante, la teneur en carbone dans les turricules était toujours supérieure à celle du sol. De plus, la minéralisation était sur estimée du fait de la re-ingestion des turricules par les vers. Aussi **une partie importante de la MO apportée est localisée dans les turricules après 54 semaines**, malgré l'épuisement de MO fraîche. Or diverses études ont fourni des résultats parfois contradictoires sur le bilan de carbone en présence de vers et ne permettent pas d'estimer le devenir du carbone dans ces turricules spécifiquement. Aucune étude n'a étudié la dynamique de la MO contenue dans les turricules directement, or cette minéralisation est le fait à la fois de l'activité des microorganismes, mais également des vers de terre comme l'ont souligné Lubbers et al. (2017). Or il n'a pas été possible de discriminer le rôle des vers de celui des microorganismes. Afin de statuer clairement sur l'influence de l'intégration de la MO dans les turricules sur la minéralisation ou la stabilisation de la MO incluse dans ces agrégats, des études complémentaires sont nécessaires (voir section 2.4).

2.3 Combinaison du rôle de la composition chimique et de la structure du sol sur le devenir de la MO

2.3.1 Influence de la nature de la MO sur son devenir (Vidal et al., 2016a)

Au cours de notre expérimentation, nous avons également pu évaluer l'effet de la nature ou composition chimique de la MO apportée (aérienne vs racinaire) sur le devenir de la MO. Celle-ci n'a finalement pas eu d'influence significative sur l'incorporation du carbone dans les turricules, ou dans le sol, ou sur son devenir (Figures 6 et 7), même si un décalage dans le temps a été observé avec des racines incorporées moins rapidement par les vers. A l'issue de l'expérimentation, en absence de vers de terre, le pourcentage de C marqué d'origine racinaire incorporé dans les sols est significativement supérieur (Figure 6) pouvant indiquer une **minéralisation plus faible de la MO racinaire**. Quand la MO apportée était des racines, les fragments végétaux encore présents à la surface étaient plus abondants. Dans les deux cas les fragments végétaux étaient déposés en surface, la protection minérale n'était donc pas possible. La **différence de vitesse de dégradation entre les parties aériennes et racinaires est donc probablement due à leur composition chimique**. En effet, les racines sont reconnues pour être moins biodégradables du fait de la plus grande abondance en subérine et lignine (Gale and Cambardella, 2000; Gleixner et al., 2001; Nierop et al., 2003; Steffens et al., 2015). Cette **différence de minéralisation entre parties aériennes et racinaires** généralement observée dans les sols (Gale et Cambardella, 2000; Puget et Drinkwater, 2001; Rasse et al., 2005; Bird et Torn, 2006; Mendez-Millan et al., 2010b; Steffens et al., 2015) **n'était pas observable dans les turricules** (Vidal et al., 2017). Ce résultat, observé pour la première fois, peut être lié aux interactions entre les vers et les microorganismes contenus dans leur intestins qui améliorent la décomposition des macromolécules (Trigo et al., 1999; Adnan et Joshi, 2017) ou un effet de « priming effect » stimulant l'activité bactérienne au sein des turricules (Brown, 1995; Amador et Görres, 2007; Bernard et al., 2012; Bityutskii et al., 2012; Vidal et al., 2016b). L'absence de différence entre la vitesse de minéralisation de MO racinaire et aérienne signifierait que l'activité des vers « annule » l'effet de la composition chimique sur la vitesse de dégradation. Rasse et al. (2005) avait également souligné le fait que la protection de la MO racinaire soit davantage liée à ses interactions avec les minéraux, relativisant ainsi l'effet de la composition chimique. En conséquence, non seulement **la protection de la MO du fait de sa composition chimique** n'aurait une influence qu'à des échelles de temps réduites (année), mais cette protection serait également très **dépendante des conditions environnementales**, une modification du milieu (présence de faune, induction d'un priming effect par exemple) pouvant gommer son effet.

Par ailleurs, l'analyse par nanoSIMS a montré une grande hétérogénéité de marquage isotopique de la MO incorporée dans les turricules. Cette hétérogénéité peut être le résultat du marquage lui-même (Nguyen Tu et al., 2013), mais peut également être due à une dégradation sélective des composés des végétaux. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus par Haddix et al. (2016) lors d'un marquage différentiel des composés structuraux et métaboliques. À l'issue de ce marquage, ils ont montré la contribution du carbone issu des composés métaboliques à la fraction de carbone associé aux minéraux, alors que les composés structuraux étaient localisés dans une fraction légère du sol. Les observations en MET des turricules prélevés à différents temps ont montré la **persistance de certaines structures** cellulaires, telles que les parois cellulaires des végétaux. Ces constituants structuraux plus riches en lignine semblaient moins vite dégradés que les composés non structuraux. Or, la lignine est appauvrie en $\delta^{13}\text{C}$ (Benner et al., 1987; Gleixner et al., 1993; Baldock et al., 1997) entraînant ainsi un marquage isotopique différent selon les résidus observés. Ces observations pourraient indiquer une accumulation de MO dans les turricules dont la composition chimique différerait de la MO fraîche. Dans ce cas **un taux de renouvellement de la MO différent pourrait résulter à la fois de la protection physique mais également d'une MO de composition chimique** différente qui serait biodégradable plus lentement.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons donc procédé à la caractérisation moléculaire de la MO des turricules prélevés à différents pas de temps dans nos mésocosmes (ayant reçu ou non de la MO), mais également de la MO apportée (Vidal et al., 2016a) afin d'identifier une évolution des différents composés constituant la MO au cours de la biodégradation (figure 1H). Les différents composés ont été identifiés par py-CG-SM en présence de TMAH. Les composés dont l'origine était connue ont été choisis comme variables pour la réalisation d'une ACP, cet outil statistique ayant déjà été utilisé avec succès dans des études de MO des sols (Buurman et al., 2007; Carr et al., 2013; Schellekens et al., 2013; Haddix et al., 2016). **Les résultats obtenus ont indiqué que l'origine de la MO incorporée, aérienne ou racinaire, était toujours identifiable dans les turricules** (figure 11B). Le facteur 1 de l'ACP, expliquant 40% de la variance, permettait de séparer la MO des turricules ayant reçu de la MO racinaire de ceux ayant reçu des feuilles ou du turricule sans rye gras. Le facteur 2 permettait de séparer la MO aérienne de la MO du turricule sans rye gras. La composition chimique permettait bien de distinguer des « signatures » de la MO des turricules (figure 11A). Cependant, **cette « signature » de l'origine de la MO avait tendance à s'atténuer au cours de l'expérimentation.** Ainsi la MO des turricules prélevés à

54 semaines avait une composition moléculaire plus proche de celle contenue dans les turricules sans rye gras (mésocosme témoin).

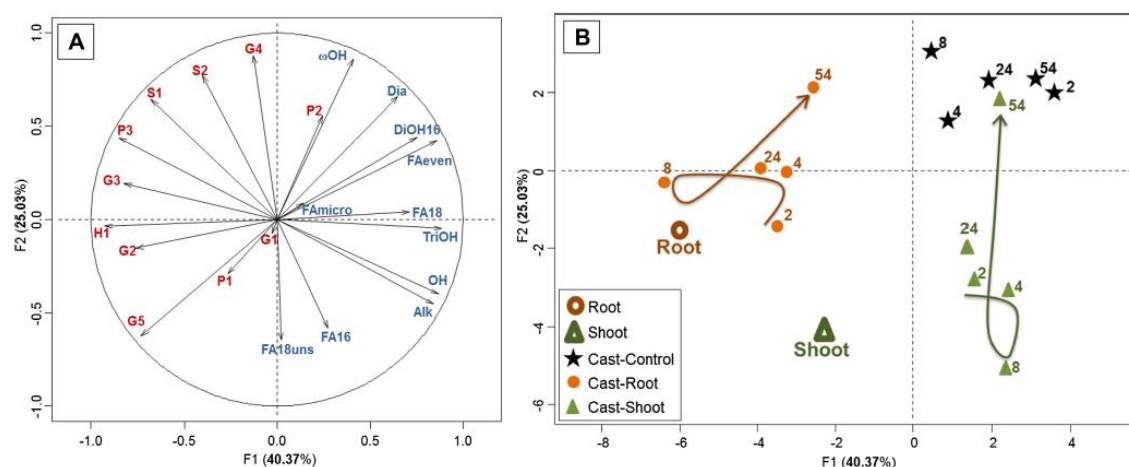


Figure 11: ACP réalisée à partir des analyses moléculaires de la MO des turricules. Les MO aérienne et racinaire ont été représentées. A- distribution des variables sur le cercle de corrélation ; B- distribution des échantillons de turricules (les nombres indiquant la date de prélèvement, les terres S, G et H, des composés issus de la lignine) (Vidal et al., 2016a).

Code	Compound	Main origin	Example of references
Aromatic compounds			
<u>Guaiacyl derived</u>			
G1	3-methoxy benzoic acid, methyl ester	Lignin derived	(Nierop, 2001)
G2	4-ethenyl-1,2-dimethoxy benzene	Typical of grass type lignin	(Clifford et al., 1995)
G4	3,4-dimethoxy benzaldehyde	Lignin derived	(Nierop, 2001)
G5	3,4-dimethoxy benzoic acid, methyl ester	Lignin derived	(Nierop, 2001)
G6	Trans, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) 2-propenoic acid, methyl ester	Lignin derived, identified in suberin	(González-Vila et al., 1996; Nierop, 2001)
G7	Trans, 3-(3,4-dimethoxyphenyl) 2-propenoic acid, methyl ester		
<u>Syringyl derived</u>			
S1	3,4,5-trimethoxy benzaldehyde	Lignin derived	(Nierop, 2001)
S2	3,4,5-trimethoxy benzoic acid, methyl ester	Lignin derived	(Chefetz et al., 2000; Nierop, 2001)
<u>P-coumaryl derived</u>			
H1	3-(4-methoxyphenyl) 2-propenoic acid, methyl ester	Typical of grass type lignin	(Clifford et al., 1995)
<u>Phenolic compounds</u>			
P1	1,4-Dimethoxy benzene	Non lignin derived	(Chefetz et al., 2000)
P2	4-methoxy benzoic acid, methyl ester	Lignin derived	(Chefetz et al., 2000; Nierop, 2001)
<u>Others</u>			
A1	1,2,4-Trimethoxy benzene	Cellulose and starch	(Fabbri and Helleur, 1999)
Aliphatic compounds			
Micro	Alkanoic acids C ₁₄ , C _{14i} , C _{15i,a} , C _{16:1} and C _{17i,a}	Microbial origin	(Quénéa et al., 2012)
FAeven	Alkanoic acid even carbon chain C ₂₀₋₃₄	Fresh residues	(Chefetz et al., 2000; Packter, 1985)
FA16	Alkanoic acid C ₁₆	Present in most living organisms	(Nierop, 2001)
FA18	Alkanoic acid C ₁₈	Cutin and suberin derived	(Wiesenberg et al., 2010)
FA18ins	Alkanoic acid C _{18:1}	Fresh residues	(Wiesenberg et al., 2010)
Alkeven	Alkanes odd carbon chain C ₂₅₋₃₃	Alkodd/even decrease with degradation of organic matter	(Wiesenberg et al., 2010)
Alkodd	Alkanes even carbon chain C ₂₆ and C ₂₈		
Alceven	Alkanols even carbon chain C ₂₆₋₃₄	Waxes originating from leaves of superior plants	(Quénéa et al., 2006; van Bergen et al., 1998)
ωOH	ω-hydroxyalkanoic acids even carbon chain C ₂₀₋₂₆	Suberin derived	(Kolattukudy, 1980; Nierop, 2001)
Dia	Alkanedioc acids C ₂₂ and C ₂₄	Suberin derived	(Kolattukudy, 1980; Nierop, 2001)
DiOH	8,16 - 9,16 and 10, 16 dihydroxyhexadecanoic acids	Common in plants, important cutin constituent	(del Río and Hatcher, 1998; Riederer et al., 1993)
TriOH	9,10,18 trihydroxyoctadecanoic acid	Cutin and suberin derived	(Otto and Simpson, 2006)
Carbohydrates			
Carb	Sum of 5 non-identified carbohydrates	Decrease with degradation of organic matter Poor sensitivity of TMAH technic to carbohydrates	(Chefetz et al., 2000) (Clifford et al., 1995)

Tableau 4 : Produits de pyrolyse utilisés pour l'ACP. Les origines probables et la signification de chaque produit ou groupe de produits sont mentionnés (Vidal et al., 2016a)

Une **modification au cours du temps** de la composition chimique de la MO incorporée dans les turricules a donc été observée quelle que soit la MO apportée, avec un **décalage pour les parties racinaires qui semblent évoluer plus lentement**. Elle est représentée par un enrichissement relatif en ω -hydroxy acides (ω OH), diacides carboxyliques (Dia) et dihydroxy acides (DiOH16) qui sont des composés issus de la cutine et/ou subérine. Un enrichissement en composés aliphatiques avait également été observé par Frouz et al. (2015) et attribué à **l'accumulation des cires cuticulaires** dans l'intestin des vers liée à leur faible biodégradabilité. Par ailleurs, ces composés ont été souvent mis en avant pour leur persistance dans les sols (Nierop et al., 2001; Feng et Simpson, 2007; Lorenz et al., 2007; Pisani et al., 2014). En revanche, une **dégradation plus rapide des composés issus de la lignine** a été observée. La composition chimique de la MO des turricules avait tendance à devenir plus similaire, quelle que soit la nature de la MO source. Elle convergeait vers la composition de la MO des turricules provenant du mésocosme n'ayant pas reçu de MO, qui a peu évolué au cours de l'expérimentation. Alors que les teneurs en carbones organiques et les valeurs isotopiques de la MO des turricules ayant reçus de la MO aérienne ou racinaire différaient peu au cours du temps, la caractérisation moléculaire a montré un décalage temporel avec une dégradation plus lente de la MO racinaire. Cette dégradation plus lente était également révélée par une contribution de composés issus de la lignine présentant une degré d'oxydation, indicateur de biodégradation, plus faible dans les mésocosmes ayant reçu de la MO racinaire (Hatcher et al., 1995; Nierop et al., 2001).

La composition chimique initiale de la MO joue un rôle à la fois sur son incorporation dans les turricules, mais également sur sa vitesse de minéralisation. Toutefois cet effet n'est que temporaire comme l'indique la convergence de signature chimique observée après un an. La comparaison de la MO (racinaire ou aérienne) des turricules à 8 et 54 semaines d'expérimentation par MET, nanoSIMS mais également en caractérisant la MO particulaire et celle associée aux minéraux par RMN ^{13}C à l'état solide a permis de montrer qu'en début d'expérimentation la composition chimique de la MO a un effet déterminant sur son devenir alors qu'à 54 semaines les interactions organo-minérales sont dominantes (Vidal et al., soumis). Dans les turricules, une évolution similaire tant de la teneur en carbone que de la composition moléculaire est observée quelle que soit la source de MO, aérienne ou racinaire. Certains composés de la MO sont apparus plus abondants à la fin de l'expérimentation. Or ce sont les composés classiquement identifiés comme plus stables, tels que les composés issus de la cutine, de la subérine et dans une moindre mesure de la lignine. **Aussi, la composition**

chimique joue également un rôle dans la dégradation de la MO au sein même de structures du sol telles que les turricules. Toutefois lors de cette étude, il n'était possible de distinguer la protection par inclusion dans la structure, de la protection par sorption sur les minéraux.

2.3.2 Influence conjointe de la nature de la MO et des interactions organo-minérales

En plus de favoriser les interactions organo-minérales dans le tractus digestif des vers (Shipitalo et Protz, 1989), il ne peut être exclu que la modification de composition chimique de la MO au cours du temps a une influence sur la nature des interactions organo-minérales. En effet, les fonctions aromatiques et carboxyliques, qui augmentent au cours de la biodégradation, ont été identifiées comme adsorbées préférentiellement sur les minéraux (Filley et al., 2002; Kaiser et Guggenberger, 2003; Kalbitz et al., 2005; Mikutta et al., 2007; Scheel et al., 2008). De la même façon, les composés aliphatiques pourraient également mettre en place des interactions spécifiques avec les minéraux (Rumpel et al., 2004; Kleber et al., 2007; Clemente et al., 2011). Aussi, au cours de la dégradation, le degré d'oxydation de la MO augmentant, les interactions organo-minérales deviendraient plus importantes et augmenterait la protection physique de la MO, notamment dans les turricules, ainsi que l'ont proposé Zangerlé et al. (2014) et Angst et al. (2017).

Lors du suivi de MO dans des microcosmes en présence ou en absence de ver mais également avec des sols très sableux ou argileux, Angst et al. (2017) ont analysé la MO par RMN ^{13}C à l'état solide et par py-GC-MS. L'influence des vers sur la composition chimique de la MO n'a pu être mise en évidence de façon significative, bien que la lignine paraisse plus abondante en présence de vers. Cependant, ils ont démontré le rôle des interactions avec les argiles dans la préservation de la MO, et la prédominance du mécanisme de préservation physique sur celle de la composition chimique en présence de vers et d'argile. L'importance des argiles dans la mise en place d'interactions organo-minérales et la protection de la MO est reconnue (Kiem et Kögel-Knabner, 2002; Eusterhues et al., 2003; Barré et al., 2014), or les turricules sont enrichis en argile et le passage dans l'intestin conduit à un « enrobage » d'argile sur la MO (Frouz et al., 2015). Ainsi dans des turricules, l'influence de l'argile sur la limitation de la dégradation de catéchol a pu être mise en évidence (Butenschoen et al., 2009).

Au sein même des agrégats, la préservation de la MO pourrait donc être le résultat d'interactions organo-minérales dans lesquelles la composition chimique de cette MO jouerait un rôle également, et évoluerait dans le temps.

2.4 Perspectives

Comme vu lors de notre précédente expérimentation, le rôle des vers de terre dans la stabilisation de la MO n'est pas encore clairement établi. Cependant une meilleure évaluation des mécanismes de stabilisation de la MO au sein même des turricules semble essentielle. De plus, la minéralisation de la MO est contrôlée par les microorganismes, or nous avons vu que les microorganismes étaient abondants dans les turricules aussi, je souhaite développer un projet ayant pour but de suivre la dégradation de la MO spécifiquement dans des turricules, en lien avec des analyses microbiologiques.

2.4.1 Rôle des turricules dans la protection de la MO

Etat de l'art et contexte du projet de recherche

Les différents modèles développés pour évaluer le devenir de la MO dans les sols prennent tous en compte des compartiments cinétiques ayant des temps de résidence différents allant de la journée au millier d'années. Ces différences de temps de résidence sont attribuées à 3 mécanismes distincts de protection de la MO comme vu précédemment : 1) une différence de dégradabilité selon la composition chimique de la MO, 2) une interaction avec les minéraux limitant la minéralisation par les microorganismes et 3) une accessibilité réduite de la MO aux microorganismes par occlusion dans des agrégats organo-minéraux (von Lützow et al., 2006). Ces trois mécanismes sont reconnus dans la protection de la MO mais leur effet n'est pas mesurable à la même échelle de temps. La composition chimique ne joue un rôle que de l'ordre de quelques années, les agrégats quelques dizaines d'années et les interactions plusieurs centaines d'années.

Depuis quelques années, il est proposé d'atténuer l'augmentation de CO₂ atmosphérique dû à la combustion de combustible fossile par une augmentation du stockage de carbone dans les sols, comme le propose notamment l'initiative 4‰ (<http://4p1000.org/>). Or pour confirmer cette possibilité, il est nécessaire de quantifier l'importance relative des différents mécanismes liés à la protection de la MO des sols. Actuellement, l'évaluation de l'implication de ces mécanismes ne permet pas le pilotage de démarches de génie écologique et d'agro-écologie et limite ainsi nos capacités à optimiser la gestion des sols et leur préservation (Dignac et al., 2017).

- Les agrégats du sol

Les agrégats sont les éléments clefs de la structure du sol issus d'interactions entre des particules minérales et des substances organiques et inorganiques. Les différents mécanismes

à l'origine de l'agrégation dans les sols et les facteurs l'influençant ont été synthétisés par Bronick et Lal (2005). Parmi ces facteurs, les rôles des organismes (plantes, microorganismes, faune) dans l'agrégation sont particulièrement importants, que ce soit par la production de substances organiques servant de liants entre les particules ou par l'enchevêtrement physique des particules. Ainsi la stabilité des agrégats est corrélée à la teneur en MO (Chenu et al., 2000) et la nature de la MO elle-même influe sur la stabilité des agrégats (Abiven et al., 2009). Bien que la MO soit centrale dans la formation des agrégats, son abondance et sa composition chimique évoluent au cours du temps, et donc sa contribution à la stabilité physique des agrégats, ce qui induit une réelle dynamique des agrégats (Tisdall et Oades, 1982; Six et al., 2004; de Gryze et al., 2006). La stabilité physique des agrégats, c'est-à-dire leur capacité à maintenir leur forme et leur taille face à des stress externes (réhumectation, tassement), et en conséquent leur rôle dans la protection de la MO, varie ainsi au cours du temps (Denef et al., 2001a; Cosentino et al., 2006). Cependant, dans les agrégats, la MO peut se retrouver dans différentes fractions isolées par tamisage : soit sous forme de résidus de végétaux, dans des micro-agrégats ou encore associée aux minéraux fins. Or la localisation de la MO influence son devenir, la MO incluse dans les micro-agrégats et adsorbée sur les minéraux fins ayant été reconnue comme plus stable (Six et al., 2000).

- Rôle des vers de terre dans la protection de la MO

Comme vu dans la section 2.2, les vers de terre ont un rôle majeur sur la dynamique du carbone et de l'azote (Brown et al., 2000; van Groenigen et al., 2014), notamment de par leur abondance dans les milieux naturels (1 à 3 millions/ha), la quantité importante de sol et résidus végétaux ingérés (Curry and Schmidt, 2007) puis la production de turricules pouvant atteindre 50T/ha/an (Lee, 1985; Lee and Foster, 1991). Dans des conditions classiques d'écosystème cultivé tempéré, cela représente 3 à 10 t/ha de carbone organique contenu dans les turricules (Bouché, 2014). En conséquent, une part significative de MO pourrait être protégée dans ces agrégats biogéniques (Vidal et al., 2016b; Angst et al., 2017). Cependant, les effets des vers de terre sur la dynamique de la MO sont complexes et dépendent de l'échelle temporelle considérée. A court terme, ils accroissent la minéralisation de la MO (*e.g.* méta-analyse de Lubbers et al. (2013)) du fait de la métabolisation de la MO, mais également de la stimulation des microorganismes par « priming effect ». Cependant d'autres auteurs affirment que les vers de terre augmenteraient la persistance de la MO dans le sol, mais à plus long terme.

Ces agrégats sont plus stables physiquement que les agrégats « physico-chimiques » du fait de l'abondance des polysaccharides contenus dans le mucus des vers, d'une compaction plus importante dans le tractus digestif et d'une texture plus fine (Ketterings et al., 1997; Six et al., 2004, Zangerlé et al., 2011). Cependant cette stabilité structurale ne serait pas immédiate et ne serait acquise qu'après une « maturation » de ces agrégats (Zangerlé et al., 2014). Par ailleurs, d'autres études considèrent que, lors de leur « vieillissement », les turricules finiraient par atteindre un nouvel équilibre et la MO incluse seraient protégée (Brown et al., 2000; Bossuyt et al., 2005). Ce vieillissement est défini comme la modification au cours du temps des propriétés physiques, chimiques et biologiques des turricules. De plus, l'apport de mucus favoriserait également le développement de champignons qui peuvent accroître la stabilité structurale des agrégats. Ainsi, l'effet global des vers sur la MO semble dépendre des échelles de temps considérées : un effet déstabilisateur et de minéralisation de la MO dans un premier temps, puis effet stabilisateur venant compenser la déstabilisation initiale dans un second temps. Cependant, dans une étude de plusieurs mois, Zhang et al. (2013) ont mis en évidence des effets des vers sur la MO différents selon la teneur en carbone initiale du sol. Cette influence de la teneur initiale en carbone induisant soit la minéralisation, soit la stabilisation du carbone du sol peut avoir des conséquences importantes dans l'évaluation de l'effet des vers et doit être confirmé par d'autres études. En conséquent, l'influence des vers de terre sur la dynamique de la MO est encore discutée (Brown et al., 2000; Zhang et al., 2013; Lubbers et al., 2017) et reste à déterminer.

- Origine de la protection de la MO dans les turricules

Les mécanismes à l'origine de la protection de la MO au sein des turricules restent encore imprécis. Il pourrait s'agir de la mise en place d'interactions plus importantes entre l'argile, des cations polyvalents et la MO dans les turricules, comme l'ont suggéré Shipitalo et Protz (1989), d'autant plus que, les turricules sont enrichis en argile par rapport au sol environnant. Or celles-ci sont reconnues pour leur rôle dans la protection de la MO dans les sols (Kiem et al., 2002; Eusterhues et al., 2003; Barré et al., 2014). La protection de la MO dans les turricules pourraient également être liée à la création de microenvironnements (Drake et Horn, 2007) dans lesquels les communautés microbiennes seraient différentes (Furlong et al., 2002) et les activités microbiennes seraient réduites par rapport au sol (Mummey et al., 2006). La détermination de l'abondance des microorganismes et la composition de la communauté microbienne, ainsi que l'estimation de leur activité dans les turricules pourraient permettre de mieux identifier les mécanismes influençant le devenir de la

MO dans ces structures biogéniques. Cependant, lors de la décomposition de MO, des successions microbiennes sont observées (Bastian et al., 2009; Marschner et al., 2011), ainsi que lors de la formation des agrégats (Blaud et al., 2012), aussi les communautés présentes dans les turricules pourraient évoluer au cours du temps. Par ailleurs, Zheng et al. (2018) ont montré une influence des vers sur l'activité des communautés microbiennes présentes dans les sols liées à la composition des résidus végétaux apportés au sol. Les évolutions conjointes de la nature de la MO, des communautés et de la stabilité des agrégats au cours du temps illustre la complexité de ce système (figure 12). La compréhension de ces évolutions pourrait permettre d'estimer le rôle des turricules dans la stabilisation de la MO.

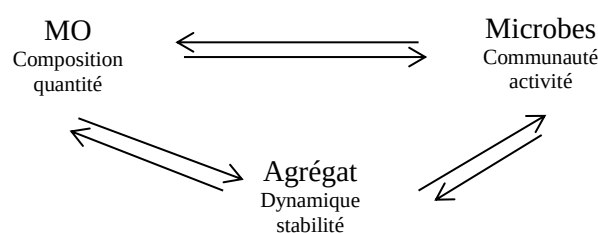


Figure 12: Interactions pouvant influencer la vitesse de dégradation de la MO dans les turricules

Objectif général et questions de recherche traitées

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel de stabilisation de la MO dans les turricules de vers de terre en identifiant les interactions entre les processus biologiques et la MO au cours du vieillissement des turricules. Dans ce but, nous avons décidé de nous concentrer sur le rôle des turricules dans la stabilisation de MO fraîche (MOF), de composition variable, marquée au ^{13}C sous forme de résidus végétaux. L'utilisation du marquage isotopique nous permettra de distinguer le devenir de la MOF de celui de la MO présente initialement dans le sol et incorporée simultanément dans les turricules.

Afin de comprendre les mécanismes en jeu, il est nécessaire de suivre conjointement le devenir de la MO (minéralisation ou modification de sa composition chimique) et les communautés microbiennes impliquées. Pour cela, ce projet vise à quantifier la proportion de MOF minéralisée dans les turricules, tout en caractérisant les communautés microbiennes. Pour cela, nous étudierons l'effet du vieillissement des turricules à la fois sur le devenir de la MO, sur les communautés microbiennes mais également sur la stabilité des turricules et donc leur capacité à maintenir cette protection dans le temps.

- *Effet de l'incorporation de la MO dans les turricules:*

Quels sont les taux de minéralisation de la MO dans les turricules et comment évoluent-ils au cours du temps ? La MO fraîche est-elle dégradée plus vite que la MO initialement présente dans le sol ? Comment évolue la composition chimique de la MO des turricules ?

Observe-t-on des modifications de l'abondance bactérienne ou fongique, de structures des communautés microbiennes au cours du temps ?

- *Effet de la composition de la MOF :*

La composition chimique de la MOF est-elle déterminante pour l'évolution de la minéralisation ? La composition chimique initiale de la MO incorporée aux turricules joue-t-elle sur les communautés microbiennes ? Cette composition chimique évolue-t-elle au cours du temps de façon identique selon la MOF apportée ? La composition de la MOF influence-t-elle la stabilité des agrégats mais également l'évolution de cette stabilité au cours du temps ?

- *Effet de la teneur en carbone du sol*

La teneur en carbone du sol avant formation des turricules joue-t-elle un rôle sur le taux de minéralisation et sur les communautés microbiennes ?

- *Effet de la localisation de la MOF*

La distribution spatiale de la MOF (résidus organiques libres/microagrégats/ associées aux fractions minérales fines) au sein des turricules évolue-t-elle au cours du temps ? Peut-elle expliquer la modification du taux de minéralisation ?

Caractère innovant et prise de risque

Les deux aspects novateurs de ce projet sont : 1) le suivi de turricules au cours du temps, 2) par une approche intégrée associant à la fois des analyses biogéochimiques et microbiologiques. Cette collaboration permettra de mettre directement en lien l'évolution de la MO (quantitative et qualitative) et les communautés microbiennes (diversité, abondance, activité) pour estimer le potentiel de stabilisation de la MO au travers de la structuration du sol due à la faune.

- **L'évaluation simultanée de l'effet de la formation de turricules sur la protection de la MO et sur les communautés microbiennes:**

La succession de communautés microbiennes dans un sol après apport de MO a déjà été mise en évidence, tout comme la modification des communautés après ingestion par les vers de terre. Cependant aucune étude n'a suivi l'évolution des communautés microbiennes au sein de

turricules au cours du temps. Ces informations seront essentielles pour comprendre l'évolution de la minéralisation de la MO des agrégats et le potentiel de préservation de la MO.

- **Suivi de l'évolution chimique de la MO et de sa minéralisation en relation avec la stabilité des agrégats et la communauté de microorganismes :**

L'effet de l'apport de différents types de MO sur la stabilité des agrégats a été étudié mais, au cours de sa biodégradation, la composition chimique de la MO évolue, et les communautés bactériennes et fongiques inféodées à la dégradation de la MO dans un sol se succèdent donc. Quel est l'impact sur la stabilité des turricules ? L'évolution de la stabilité structurale des turricules en lien avec la succession des communautés et la composition chimique de la MO reste à évaluer.

Actions proposées et méthodologies

Il est important de pouvoir suivre la MO des sols afin de comprendre son devenir. Le traçage isotopique du ^{13}C de la MO constitue pour cela un outil de choix, que ce soit par marquage naturel lors d'un changement de culture (alternance de plante C3/C4) (Balesdent et al., 1987) ou par suivi de MO enrichie artificiellement en ^{13}C (Amelung et al., 2008). L'utilisation de plantes marquées artificiellement au ^{13}C s'est révélée très pertinente lors du suivi de l'incorporation de racines et feuilles dans des turricules réalisé récemment au laboratoire (Vidal et al., 2017). L'utilisation de MO marquée au ^{13}C permettra de 1) distinguer la MO présente initialement dans le sol et intégrée aux turricules de la MOF apportée, 2) de localiser la MOF après fractionnement, 3) réaliser un suivi de la dégradation de ces deux types de MO au cours du temps par mesure du $^{13}\text{CO}_2$ émis, 4) de l'incorporation dans la biomasse microbienne au niveau de marqueurs membranaires connus.

1) *Dispositif expérimental*

Le dispositif expérimental suivant sera mis en place selon 3 modalités (en triplicat) pour deux sols dont la teneur en carbone diffère : turricules sans apport de MOF, turricules réalisés par les vers en présence d'une MOF marquée au ^{13}C de C/N élevé, turricules réalisés par les vers en présence d'une MOF marquée au ^{13}C de C/N faible. Un suivi temporel (2, 7, 14, 21, 30 jours, 2 mois, 3 mois, 6 mois, 1 an, 1.5 an, 2 ans et 2,5 ans) sera réalisé. Le sol utilisé sera prélevé dans un site appartenant à une infrastructure de recherche ce qui permettra d'avoir un sol parfaitement caractérisé et pour lequel des données existent déjà : je propose des sols de

l'expérimentation de longue durée de La Cage (INRA Versailles) qui a fait l'objet d'études de son compartiment organique, biologique ainsi que de ses propriétés physiques (Henneron et al., 2015; Pelosi et al., 2015; Autret et al., 2016) et dont la teneur en carbone varie 9 à 13.6 g.kg⁻¹ selon la parcelle (Henneron et al., 2015), permettant ainsi de disposer de sols similaires mais de teneur en carbone différente.

Deux types de MO (maïs et ray grass, de C/N d'environ 40 et 14, respectivement), avec un marquage au ¹³C de 1000 ‰, seront placés sur deux sols de teneur en carbone différent en présence de vers de terre (*Lumbricus terrestris*). Les turricules produits seront récoltés et placés dans une série de microcosmes d'1 L, clos hermétiquement afin de pouvoir mesurer les émissions de CO₂. La valeur isotopique du sol étant d'environ -23‰, ce marquage à 1000‰ garantit une bonne détection dans le milieu malgré la dilution du signal lors de l'incorporation dans les turricules et de la dégradation de la MO.

Des microcosmes seront arrêtés au cours de l'incubation (12 pas de temps). A chaque prélèvement, 6 types de turricules seront prélevés (issus des sols 1 et 2 sans MOF, du sol 1 avec deux types de MOF, du sol 2 avec deux types de MOF). Les turricules seront subdivisés en 3 échantillons pour A) évaluer la stabilité des turricules au cours du temps et la distribution de la MOF dans les fractions, B) Quantifier la MO minéralisée et restante et caractériser cette MO puis C) caractériser les communautés microbiennes (Figure 13).

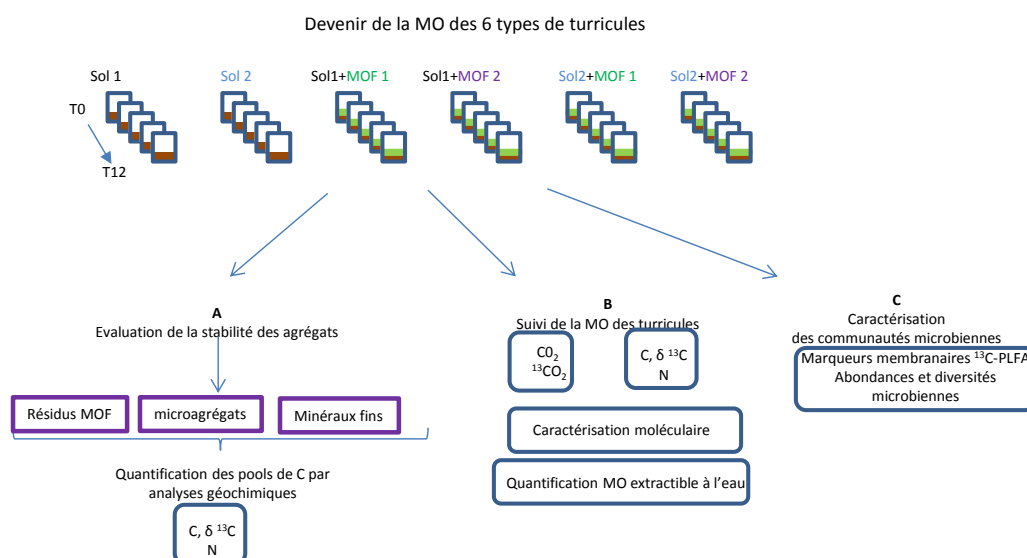


Figure 13: Schéma de l'expérimentation et des analyses envisagées

1) Evaluation du devenir de la MO

Dans une première étape, nous réaliserons un **bilan du devenir de la MO des turricules** : par quantification du **carbone minéralisé** (quantification des émissions de CO₂ et mesure du $\delta^{13}\text{CO}_2$ émis par μGC et un spectromètre de masse isotopique) et estimation du CO₂ résultant de la minéralisation de la MO initiale et des MOF, quantification du **carbone incorporé** dans les turricules (teneur en C et mesure du $\delta^{13}\text{C}$). Nous pourrions ainsi déterminer **le taux de minéralisation** de la MO selon la nature de la MOF apportée et de la teneur en carbone initiale du sol.

2) Suivi de la nature de la MO au cours du temps

Une caractérisation plus fine de la MO sera réalisée 1) en quantifiant le carbone organique extractible à l'eau qui est généralement rapidement métabolisé et joue un rôle dans la stabilité des agrégats, puis 2) en caractérisant également la composition de la MO au **niveau moléculaire** (Py-GC/MS) à certains pas de temps.

3) Estimation de l'activité et de la dynamique microbienne

Parallèlement à ces analyses géochimiques, nous quantifierons l'activité et les **dynamiques des communautés** microbiennes impliquées dans la minéralisation de la MO dans les turricules.

Au cours de l'incubation, l'activité biologique sera suivie en mesurant l'émission de CO₂ et des prélèvements réguliers de CO₂ permettront d'avoir la composition isotopique du CO₂ émis et ainsi de la MO minéralisée (*cf* 1^o évaluation du devenir de la MO). Nous pourrions par la même mesurer un éventuel effet priming effect.

Lors des prélèvements des microcosmes, les abondances bactériennes et fongiques seront déterminées par quantification des séquences cibles des ADNr16S et 18S (par PCR en temps réel). Ces résultats permettront de quantifier la part des différents microorganismes (bactériens vs fongiques) au cours du temps. Les modifications de communautés bactériennes au cours de la dégradation, de l'incorporation de la MO seront déterminées par l'utilisation MicroRespTM. Les analyses des MicroRespTM (Lerch et al., 2013) nous permettront de déterminer les profils cataboliques des communautés microbiennes, et d'observer la façon dont la structure métabolique des communautés évolue au cours de la dégradation de la MO (suivi temporel). La distribution des PLFA permettra d'identifier les groupes majeurs présents (Zelles, 1999) et la mesure de la valeur isotopique de ces acides gras par GC-C-IRMS (¹³C-PLFA) identifiera les groupes impliqués dans la minéralisation de la MO marquée.

4) *Caractérisation de la structure du sol et stabilité des agrégats en lien avec la MO et les microorganismes*

En parallèle, la stabilité structurale des turricules isolés sera évaluée par tamisage humide. Ce tamisage entraînera la destruction des turricules en 3 fractions : les résidus de végétaux préalablement intégrés dans les turricules, récupérés par flottation, (fraction $>63\mu\text{m}$ et les minéraux fins auxquels de la Mo peut être associée. Les 3 fractions résultantes seront quantifiées ainsi que le carbone qu'elles contiennent. L'évolution de la stabilité structurale sera mise **en relation avec le type de MOF, sa dégradation au cours du temps et les communautés microbiennes**.

Résultats attendus

Le principal résultat attendu est tout d'abord de pouvoir affirmer ou infirmer le rôle des turricules dans la protection de la MO grâce à leur suivi spécifique pendant une période longue (à l'échelle des incubations généralement réalisées). Les résultats permettront de répondre à la question du devenir de la MO dans les turricules à long terme qui reste encore très peu développée dans la littérature.

L'hypothèse de la protection de la MO repose sur une accessibilité de la MO aux microorganismes réduite au sein des turricules. Aussi, en suivant simultanément le devenir de la MO et les communautés microbiennes en jeu, nous pensons pouvoir fournir des informations sur les interactions entre l'évolution chimique de la MO et l'évolution des communautés microbiennes, qui permettront d'explicitier la dynamique de la MO dans les turricules. Nous mettrons également en lien cette dynamique et la stabilité des turricules. En effet, de cette stabilité dépend la durée de l'effet protecteur des turricules.

Nous souhaitons également affiner ces éléments en apportant des informations sur le rôle de la composition chimique incorporée aux turricules dans ces mécanismes.

2.4.2 Effet de paramètres environnementaux sur le devenir de la MO incluse dans la structure du sol

Afin de refléter davantage le milieu naturel et d'extrapoler les résultats obtenus, j'envisage à plus long terme de soumettre un projet à l'ANR.

En effet, suite à ce projet, je souhaite également envisager **l'effet de cycles de dissection-réhumectation** sur les turricules afin de reproduire des conditions plus proches de celles rencontrées en milieu naturel. Ces cycles sont reconnus pour une structuration physico-chimique des agrégats, ils ont une influence forte sur la stabilité des agrégats, sur les

communautés microbiennes et sur les interactions organo-minérales par adsorption de la MO (Denef et al., 2001a; Cosentino et al., 2006; Kaiser et al., 2015) mais qu'en est-il pour les turricules ? Je souhaiterais suivre la minéralisation de la MO contenue dans les turricules après des cycles de dissection-réhumectation successifs. L'effet de ces cycles sur les cycles du carbone et de l'azote sont encore discutés (Borken and Matzner, 2009) Dans quelle mesure la modification de la structure de ces turricules influence-t-elle la MO qui y est contenue ? Deux hypothèses peuvent être envisagées : i) L'alternance de cycles modifie la structure et rend à nouveau accessible de la MO protégée auparavant permettant une minéralisation plus importante (Denef et al., 2001a, 2001b) ou ii) la stabilité des agrégats est renforcée comme observé parfois (Park et al., 2007) et la stabilisation de la MO est renforcée. L'effet de ces cycles sur la structure, mais surtout sur la porosité intra agrégat, pourra être suivi en parallèle grâce au développement de la microtomographie dans l'étude des sols (Ma et al., 2015).

Je voudrais également confronter les résultats que j'obtiendrai avec des observations mais cette fois en considérant **des sols tropicaux**. En effet, leur minéralogie est généralement différente avec une abondance plus importante d'oxyde d'aluminium par exemple, or cette minéralogie est importante pour la protection de la MO (Kaiser et Guggenberger, 2000; Basile-Doelsch et al., 2005; von Lützow et al., 2006; Moni et al., 2010; Barré et al., 2014).

Partie 3 :

Interactions matière organique-
contaminants

3. Interactions matière organique- contaminants

Dans le milieu naturel, la forte affinité de nombreux contaminants minéraux ou organiques pour la MO est établie depuis longtemps (Reuter and Perdue, 1977; Jackson et al., 1978; Khan, 1978; Karickhoff et al., 1979; Sauvé et al., 2000; Kabata-Pendias, 2004; Moeckel et al., 2014). La source de MO, et donc sa composition chimique, a une forte influence sur le devenir des contaminants, leur mobilité ou leur biodisponibilité (Kabata-Pendias, 2004; Ahmed et al., 2015). En effet, la MO est fortement fonctionnalisée et présente une grande variété de fonctions chimiques (carboxylique, hydroxyles, methoxyles, etc..) qui sont très réactives. La MO présente également des structures aliphatiques ou aromatiques qui lui confèrent une certaine hydrophobicité. Comme souligné par Minor et al. (2014), la réactivité de la MO vis-à-vis des contaminants organiques est conditionnée par sa polarité et son aromaticité, et donc par la nature de la MO. Ainsi, Moeckel et al. (2014) ont montré que les concentrations en HAP ayant des degrés d'aliphaticité plus élevés sont fortement corrélées à la concentration en carbone organique dissous (DOC). Du fait de ces caractéristiques chimiques, la MO interagit fortement avec certains contaminants organiques hydrophobes (e.g. Pan et al., 2007; Abdulla et al., 2009; Chefetz et Xing, 2009; Hur et al., 2009; Mei et al., 2009; Moeckel et al., 2014) ou les éléments trace métalliques (e.g. Korndorff et Schnitzer, 1980; Ducaroir et Lamy, 1995; Harter et Naidu, 1995; Kalbitz et Wennrich, 1998; Kargar et al., 2013).

Cependant, dans le milieu, la MO est progressivement biodégradée et sa composition chimique évolue au cours du temps. Lors de sa biodégradation le rapport atomique O/C, l'aliphaticité et l'aromaticité augmentent progressivement. Ces modifications peuvent également conduire à une modification de la conformation spatiale de la MO. Cette évolution modifie la réactivité de la MO et l'affinité des contaminants organiques et inorganiques pour la MO. Cette réactivité influe ainsi le devenir de la MO elle-même, mais également celui des molécules qui peuvent y être associées (Balabane et al., 1999; Pan et al., 2007; Hur et al., 2011, 2014; Cornu et al., 2016; Zhou et al., 2018). La prise en compte de cette évolution de la MO avec le temps dans l'évaluation du devenir des contaminants est relativement récente et encore peu fréquente. Pourtant, lors de la mesure de la sorption du phénanthrène avec de la MO dissoute avant et après incubation, Hur et al. (2011) ont mesuré une plus grande affinité de la MO ayant subi une dégradation partielle. Il apparaît donc comme essentiel de comprendre les interactions entre les contaminants et la MO afin d'estimer les transferts de contaminants dans le milieu naturel, mais également l'impact de ces contaminants sur la

dégradation de la MO. En effet, Boucher et al. (2005) ont observé une influence des éléments trace métallique (ETM) sur la MO et mis en évidence une stabilisation de la MO associée à ces éléments traces.

3.1 MO et ETM

A travers une collaboration avec C. Dumat, je me suis intéressée à l'influence de contamination de sols en éléments trace métallique sur le devenir de la MO. Nous avons donc étudié des sols contaminés en Pb, Cu, Zn, Cd et Cu selon deux voies de contamination : des sols contaminés par des dépôts aériens et des sols contaminés suite à l'épandage d'eaux usées. Les sols étudiés étaient des sols cultivés et présentaient la particularité de résulter d'une succession de cultures C₃/C₄. Cette succession a permis de calculer le taux de renouvellement de la MO dans ces sites.

Dans le cas des sites contaminés par voie aérienne, trois sols distants de 1, 3 et 10 Km d'une fonderie, et cultivés en monoculture de maïs depuis plus de 10 ans ont été choisis (Dumat et al., 2006). Ces trois sols présentaient les mêmes caractéristiques pédologiques mais des concentrations en ETM décroissantes avec l'éloignement par rapport à la fonderie (M1 à 1Km, M2 à 3Km et M3 à 10 Km) (Tableau 5). Le site M3 présentait des concentrations similaires au fond géochimique et n'avait donc pas été impacté par les émissions en ETM de la fonderie. En revanche, les concentrations en ETM dans les sols des sites M1 et M2 étaient importantes et atteignaient des valeurs 10 fois supérieures au fond pédogéochimique pour le Pb et Zn dans la couche superficielle.

Depth (cm)	[Pb] (mg kg ⁻¹)	[Zn] (mg kg ⁻¹)	[Cu] (mg kg ⁻¹)	[Cd] (mg kg ⁻¹)	C (g kg ⁻¹)
Soil M ₁					
0–30	503	852	34	16.8	15
30–35	216	280	18	9.8	9
35–40	118	175	13	6	5
55–65	71	41	4,6	2,1	2.4
170–180	33	39	4.15	1.8	1.15
Soil M ₂					
0–30	187	172.5	17.9	12.05	27
30–40	145	133	13.1	9.3	19
40–50	62.3	39	9.8	5.1	11
50–65	38.3	29	7.9	3.3	8.5
Soil M ₃					
0–30	54.5	64.2	13.2	3.5	25

Tableau 5 : Concentrations en éléments trace métallique (mg.Kg⁻¹) et en carbone organique total des sols (Dumat et al., 2006).

Concernant la MO, la proportion de C issu du maïs par rapport au C total (C_4/C) a été calculée pour le sol total et 4 fractions granulométriques pour chaque sol selon l'équation :

$$C_4/C = (\delta - \delta_{\text{ref}_{C_3}}) / (\delta_{\text{veg}_{C_4}} - \delta_{\text{ref}_{C_3}}) \quad \text{avec } \delta_{\text{ref}_{C_3}} = -27\text{‰} \text{ et } \delta_{\text{veg}_{C_4}} = -14\text{‰}.$$

Celle-ci a montré des situations très différentes selon le sol considéré (figure 14). La contribution de la MO issue du maïs est bien plus importante, en particulier dans les fractions grossières, dans le sol non contaminé. Les fractions grossières contiennent davantage de fragments végétaux, ou MO particulaire, alors que la MO dans les fractions fines est une MO transformée suite à la biodégradation et souvent associée aux minéraux. Des microorganismes sont également présents dans ces différentes fractions.

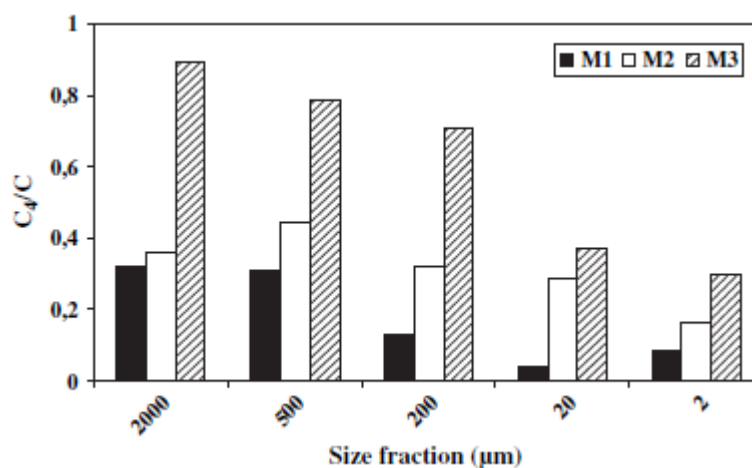


Figure 14 : Proportion C_4/C dans les échantillons de surfaces des trois sols (M1, M2 et M3) en fonction de la fraction granulométrique (Dumat et al., 2006).

Les résultats des mesures isotopiques ont indiqué une contribution faible de MO issue des plantes en C_4 dans ces fractions fines. Les $\delta^{13}C$ des fractions fines ($<2\mu m$) étaient de -25.5, -25 et -23‰ pour M1, M2 et M3, respectivement (figure 15).

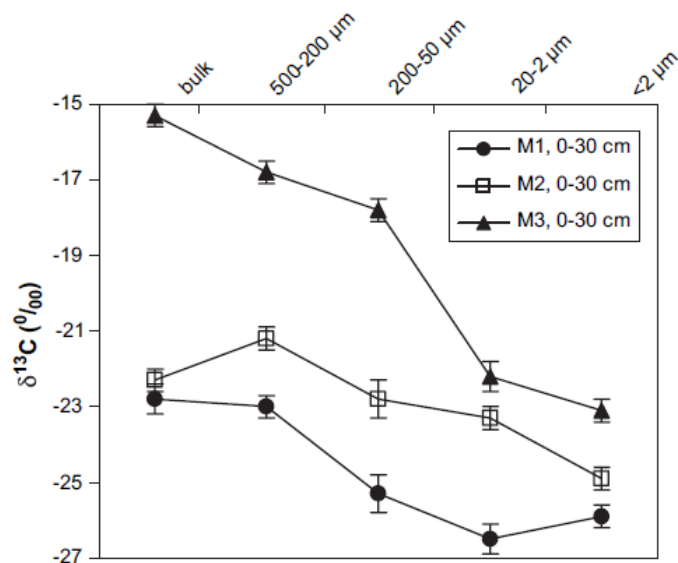


Figure 15 : $\delta^{13}\text{C}$ des sols de surface en fonction de la fraction granulométrique pour les trois sols (Dumat et al., 2006).

Par ailleurs, les mesures effectuées sur les différentes fractions granulométriques ont révélé des concentrations en MO et ETM plus élevées dans les fractions fines, ainsi que cela a été observé fréquemment (Besnard et al., 1996; Parat et al., 2002; Hardy et Cornu, 2006; Ajmone-Marsan et Biasioli, 2010; Gomes et al., 2016) (Tableau 6).

	1000-500μm			500-200μm			200-50μm			50-20μm			20-2μm			<2μm		
mg Kg ⁻¹	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Pb	514.5+/-15.4	273+/-13.7	57+/-3.8	450+/-13.5	224.5+/-18	66+/-3.3	139.3+/-4.1	207.5+/-10.4	49+/-1.5	115.5+/-6.8	155+/-5.4	41+/-0.8	298.5+/-11.8	163+/-7.5	39+/-1.5	1327.3+/-39.1	318+/-15.9	84+/-2.4
Zn	394+/-11.8	235.5+/-11.9	91+/-6.2	321+/-9.5	200+/-16	86+/-4.2	203+/-6.1	184+/-9	48+/-1.4	112.5+/-6.7	161+/-5.8	40+/-0.75	274+/-10.8	162.5+/-7.6	35+/-1.35	3286+/-98.7	258+/-12.8	121+/-3.5
Cu	17.5+/-0.55	23.8+/-1.2	16+/-1.1	14.05+/-0.4	17.15+/-1.35	14+/-0.7	4.3+/-0.42	17.4+/-0.9	11+/-0.35	10+/-0.55	14.95+/-0.55	7.5+/-0.15	28.2+/-1.2	14.25+/-0.65	8.2+/-0.3	93.7+/-3	55+/-2.65	21+/-0.65
Cd	11.7+/-0.35	16.25+/-0.8	3.6+/-0.25	10+/-0.3	12.95+/-1	2.4+/-0.12	5.8+/-0.17	10.05+/-0.5	2.5+/-0.065	4.5+/-0.15	11.9+/-0.4	2.7+/-0.4	14.4+/-0.55	9.7+/-0.4	2.1+/-0.08	53.5+/-1.6	30.4+/-1.5	5.3+/-0.2

Tableau 6 : Concentrations en éléments trace (mg.kg⁻¹) dans les différentes fractions granulométriques des 3 sols de surface (0-30 cm)

Contrairement au sol non contaminé, dans les sols contaminés la contribution en MO issue du maïs était plus importante dans les fractions les plus grossières que pour le sol total. Le maïs ayant poussé sur un sol contaminé, un transfert sol-plante d'ETM a pu avoir lieu et les résidus apportés aux sols pouvaient donc être plus riches en ETM. La **MO particulaire plus riche en ETM pourrait être moins vite dégradée** et donc s'accumuler conduisant à ce $\delta^{13}\text{C}$ plus élevé dans les fractions grossières du fait de l'impact des ETM sur les microorganismes. Certaines études montrent en effet une toxicité des ETM sur les bactéries, bien que celle-ci diffère selon le métal ou le sol considéré (Bååth, 1989; Giller et al., 1998).

Du fait des caractéristiques du sol et de la gestion culturale similaire de ces sites, une différence de renouvellement de la MO a été attribuée à une **influence de la contamination sur le renouvellement de la MO**. Cette influence de la contamination en ETM et le ralentissement de la décomposition de MO a également été observé dans d'autres sites (Cotrufo et al., 1995; Balabane et al., 1999; Boucher et al., 2005; Wyszowska et al., 2013).

Suite à cette étude, nous avons voulu savoir si ces résultats de l'impact des ETM sur la biodégradation de la MO pouvaient être observés sur d'autres sites. Nous avons donc examiné un autre site ayant reçu des ETM suite à des épandages d'eau usées (Quénéa et al., 2009). Le type d'apport d'ETM, et donc probablement la forme des ETM, différait de la première étude, mais il s'agissait également d'un site cultivé avec une succession de culture de plantes historiquement (depuis une centaine d'année) en C₃, pour du maïs (C₄) depuis 15 ans. Ce contexte permettait d'avoir une approche prenant en compte le renouvellement de la MO. Nous avons donc quantifié les ETM (Zn, Pb, Cd et Cu) dans différentes fractions granulométriques. Etant donné qu'une interaction MO-ETM a souvent été mise en avant (Lamy et al., 1993; Ducaroir et Lamy, 1995; Sauvé et al., 2000; Besnard et al., 2001) du fait de la concentration élevée simultanée en MO et ETM dans sols, mais surtout dans les fractions les plus fines du sol, nous avons décidé de quantifier les ETM extractibles dans ces sols et différentes fractions granulométriques par deux type d'extractants. Nous avons extraits et quantifiés les ETM par un chélatant fort, l'EDTA, et par le Na₄P₂O₇ qui extrait les ETM associés à la MO (Evans, 1959). Les quantités d'ETM extraites par les deux extractants étaient très proches confirmant ainsi les interactions MO-ETM dominantes (figure 16). Cette interaction ETM-MO semblait particulièrement pertinente pour le Zn et le Cu. Ces éléments présentent une forte affinité pour la MO (Kabata-Pendias, 1993, 2011). En revanche, pour le Pb et le Cd, une part significative de ces ETM était associée à d'autres composants du sol, comme les argiles, les minéraux riches en fer ou les carbonates.

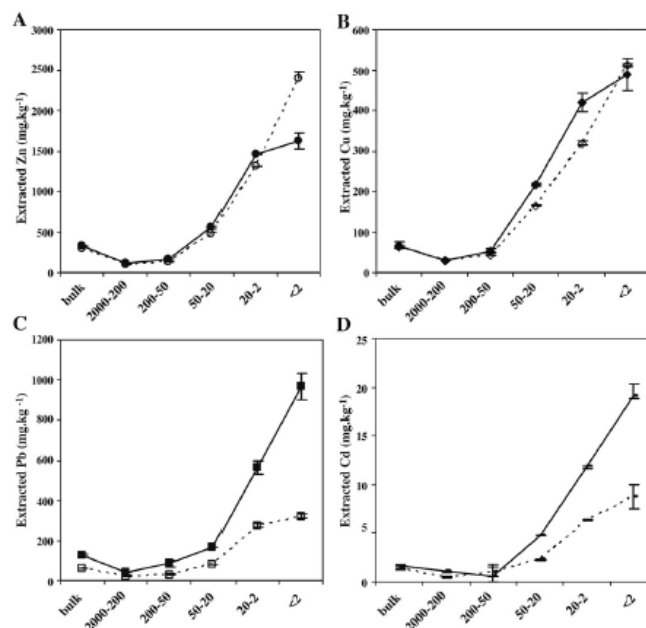


Figure 16 : Concentration en éléments trace extraite (mg.Kg^{-1}) du sol et des différentes fractions granulométrique par l'EDTA (—) et le $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (---)(Quénée et al., 2009)

D'autre part, les valeurs des rapports isotopiques du sol et des fractions ont permis d'estimer la proportion de C issue du maïs (figure 17). Cette proportion était bien plus faible que celles observés par d'autres auteurs sur des sites non contaminés. Balesdent et al. (1987) ont ainsi calculé que 80% de la MO de la fraction grossière provenait du maïs après 13 ans de culture. Dans nos échantillons, la proportion de C issu du maïs atteignait au maximum seulement 40% dans la fraction sableuse après 15 ans.

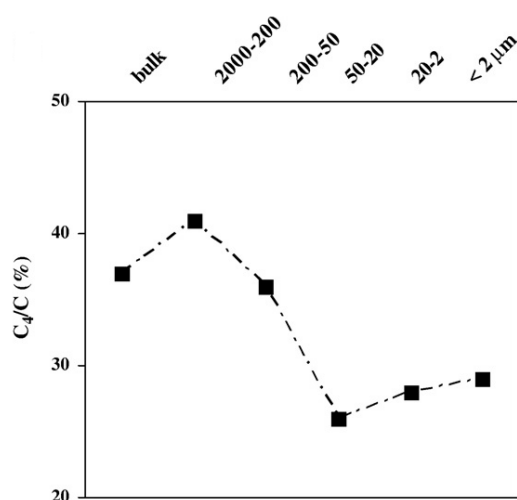


Figure 17 : Pourcentage de carbone issu de la MO en C_4 dans le sol et les différentes fractions granulométriques (quenea et al., 2009)

La présence des **ETM** semblaient donc avoir diminué la vitesse de minéralisation de la MO issue des plantes en C_3 sur ce site également. Cette persistance de résidus de

plantes dont la teneur en ETM avait augmenté au cours de leur biodégradation avait été remarquée au cours de suivis en mésocosme (Boucher et al., 2005). Lors d'une analyse combinant nanoSIMS et C-NEXAFS de sol au cours d'une incubation avec du Cu, Li et al. (2018) ont mis en évidence une augmentation des interactions MO-Cu (en particulier dans les agrégats $<63\mu\text{m}$) au cours du vieillissement de la MO. Ils ont attribué cette augmentation à une abondance plus grande de fonctions carboxyliques lors du vieillissement de la MO. Dans notre étude les ETM ont été apportés simultanément avec de la MO, il y a de nombreuses années par les eaux usées. Si les interactions MO-ETM augmentent avec l'âge de la MO, ces ETM pourraient être moins biodisponibles et donc le maïs moins contaminé. Par conséquent, les microorganismes, sensibles à ces ETM, pourraient **dégrader préférentiellement la MO nouvellement apportée et moins contaminée**, plus biodégradable et moins complexée aux ETM, au détriment de la MO plus ancienne et présentant des teneurs en ETM plus importantes. La MO issue du maïs, plus récente, apparaissait donc être minéralisée plus rapidement. De plus, le sol étudié avait une texture sableuse, la protection physique y était donc limitée, ce qui a pu exacerber ce phénomène.

Dans ces deux cas d'étude, si un effet des contaminants sur la dégradation de la MO a été mis en évidence, il n'était pas possible de préciser les mécanismes en jeu : modification de l'activité bactérienne réduite du fait d'une modification de communauté, ou du fait de l'interaction MO-ET qui diminuerait l'efficacité de biodégradation des microorganismes.

La majorité des études concernant les interactions ETM-MO considèrent davantage la MO comme une « phase porteuse » des ETM, la caractérisation de la MO est rarement envisagée et son évolution au cours du temps, encore très peu prise en compte. Toutefois, ces aspects sont indispensables à la compréhension de la mobilité des ETM dans les sols comme l'on montré certaines études plus récentes (Gangloff et al., 2014; Li et al., 2018). De plus l'adsorption de la MO sur les minéraux peut également influencer le devenir des contaminants (Avneri-Katz et al., 2017). Par ailleurs, l'effet de l'interaction contaminants-MO sur le devenir de la MO est très rarement abordé. La caractérisation de la MO dissoute en milieu aquatique et son interaction avec les contaminants est parfois prise en compte, bien que souvent cantonnée à des caractérisations plus globale, fonctionnelle de la MO, telles que les techniques spectroscopiques (SUVA). Ces études ont pourtant mis en évidence le rôle prépondérant de certaines fonctions de la MO (Masson et al., 2011; Kikuchi et al., 2017) et de la nécessité de mieux connaître cette MO (Nebbioso et Piccolo, 2013; Ren et al., 2015). En

revanche dans les sols, la caractérisation de la MO et l'influence de sa composition et de son évolution sur les contaminants est toujours peu abordée.

3.2 Perspectives concernant la MO et contaminants

Au sein du laboratoire Métis, une équipe a pour objet d'étude les contaminants organiques (HAP, phthalate, pesticides, PCB) (Blanchard et al., 2007; Blanchoud et al., 2007; Gateuille et al., 2014; Gaspéri et al., 2016). Cette équipe est fortement impliquée dans le Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'eau et l'ENvironnement du bassin de la Seine (PIREN Seine). Le rôle de la MO dans le devenir des contaminants organiques étant souvent mis en avant, deux projets ont donc été initiés au sein de l'UMR.

Interaction MO-contaminants organiques au sein d'une rivière

La première étude, financée par le PIREN Seine, et portée par Elodie Guigon et moi, concerne la MO et les contaminants organiques dans l'étude dans un sous-bassin versant de la Seine, celui de l'Orge.

Du fait de la diversité de sources de la MO dans les systèmes aquatiques naturels, et donc de la diversité de composition chimique, les interactions contaminants organiques-MON seront plus ou moins importantes, liées à la variation de réactivité potentielle qui en résulte, dans un bassin versant. Cette réactivité influe ainsi le devenir de la MON elle-même, mais également celui des molécules qui peuvent y être associées (Pan et al., 2007; Hur et al., 2011, 2014). Cependant, au sein même de la rivière, la MO est progressivement biodégradée au cours du temps pour aboutir finalement à la production de CO₂. Tout comme dans les sols, au cours de la biodégradation, sa composition chimique va évoluer, son degré d'oxydation va augmenter progressivement et sa réactivité va être modifiée. Ainsi, lors de sa biodégradation le rapport atomique O/C, l'aliphatité et l'aromaticité augmentent progressivement. Lors de la mesure de la sorption du phénanthrène avec de la MO dissoute avant et après incubation, Hur et al. (2011) ont mesuré une plus grande affinité de la MO ayant subi une dégradation partielle. Cependant si la caractérisation de la MO peut être réalisée par des techniques très diverses, ainsi que l'ont synthétisé Minor et al. (2014), elle est rarement caractérisée au niveau moléculaire. Or la composition moléculaire peut apporter des informations précises sur la source ou le degré de dégradation de la MO (Derrien et al., 2017). En effet, certaines familles de molécules peuvent constituer des biomarqueurs pertinents de source ou de degré d'altération pour l'étude de la MO (Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1986; Rieley et al., 1991; Meyers et Ishiwatari, 1993; Cotrim da Cunha et al., 2002; Otto et Simpson, 2005; Harwood, 2014; Derrien et al., 2017).

L'affinité des contaminants organiques pour la MO pourrait évoluer selon la source dominante de MO dans la rivière et selon son degré de dégradation en milieu naturel. Afin de tenter d'apporter un élément de réponse, nous étudierons conjointement les teneurs en HAP, phtalates, pesticides et la MO extraits des plusieurs matrices (eau, sols, sédiments et banquettes) prélevés dans le bassin versant de l'Orge, en amont et en aval, deux fois par an, en hiver (hautes eaux) et en automne (basses eaux). Ce bassin versant est très contrasté avec une partie amont très agricole et une partie aval fortement anthropisée. Les contaminants organiques choisis pour cette étude présentent également des sources différentes. Les HAP dans le bassin versant de la Seine sont majoritairement d'origine anthropique (chauffage, production d'énergie...) et apportés par retombées atmosphériques ou lessivage des sols (Blanchard et al., 2007; Motelay-Massei et al., 2007, Gateuille et al., 2014; Gasperi et al., 2016). Les phtalates sont également des composés anthropiques, ce sont des produits de synthèse principalement utilisés pour leur propriété plastifiante. Les phtalates proviennent de sources diffuses, lors de l'utilisation ainsi que de la dégradation de matériaux (Teil et al., 2013; Teil et al., 2010), notamment contenant du PVC. Les teneurs en HAP et phtalates sont donc fortement liées à l'importance des activités anthropiques et à la densité de population. Les pesticides en revanche ont pour origine un usage agricole, mais aussi urbain en fonction des molécules utilisées. En revanche la nature de la MO dans ce bassin versant et son évolution n'ont pas fait l'objet d'étude.

Les objectifs de cette étude seront i) de caractériser le niveau de contamination des points amont et aval en HAP, phtalates et pesticides, ii) de caractériser la MO de ces même points afin d'estimer la part de MO autochtones vs allochtone et l'évolution de sa composition d'amont en aval. Les résultats préliminaires obtenus et mis en commun permettront de voir si des corrélations peuvent être établies entre les évolutions des teneurs en contaminants et celle de la nature et composition chimique de la MO.

Développement d'une technique de géophysique à l'étude des sites pollués

Le deuxième projet auquel je participe est financé par la ville de Paris et est porté par Damien Jougnot. Il a pour objectif de suivre des sites contaminés par des hydrocarbures (dont HAP) par des techniques géophysiques. Afin de mettre au point ces techniques, le projet associe une microbiologiste, deux géochimistes et trois géophysiciens.

Dans ce projet « Geoprocess », dans une première étape nous allons suivre la dégradation d'hydrocarbures et de HAP au sein de microcosmes, constitués de sable et de compost,

comme source de MO, au cours du temps par des analyses chimiques. Cette dégradation sera parallèlement suivie par plusieurs techniques géophysiques (magnétisme, conductivité électrique, ...). L'objectif est de réussir à utiliser des mesures physiques pour suivre des processus biogéochimiques du fait des modifications des propriétés physicochimiques du milieu, ainsi que l'ont synthétisé Atekwana et Atekwana (2010) (figure 18). La confrontation des résultats de géochimie (quantification des contaminants, évolution chimique du compost), de microbiologie (quantification de la biomasse microbienne) à ceux obtenus par les techniques géophysiques servira à paramétrer ces nouvelles techniques.

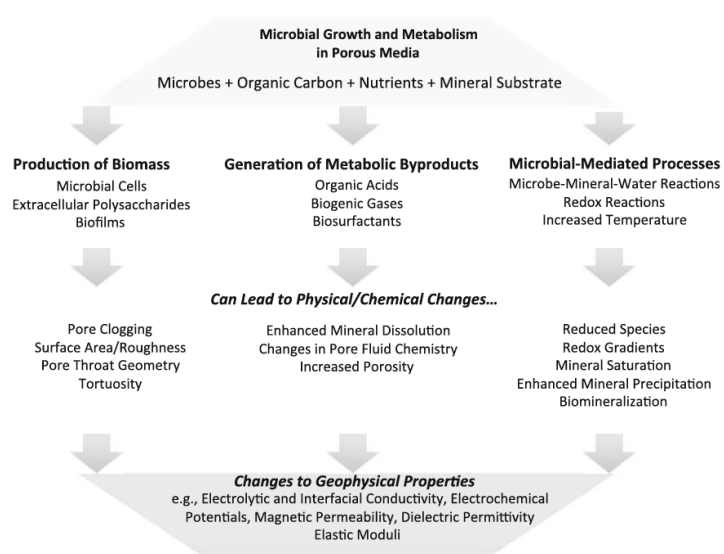


Figure 18 : Schéma conceptuel généralisé montrant que la croissance et l'activité microbiennes dans les milieux poreux peuvent modifier les propriétés physicochimiques et, par conséquent, les signatures géophysiques (Atekwana et Atekwana, 2010)

Dans ce projet, je vais caractériser l'évolution de la MO naturelle, tant d'un point de vu quantitatif que qualitatif, au cours du temps et quantifier les hydrocarbures linéaires dans les échantillons. Les données microbiologiques concernant la croissance bactérienne en particulier seront mises en lien avec le taux de minéralisation de la MO naturelle et des hydrocarbures, voire la contribution de la MO bactérienne à cette MO par le suivi de biomarqueurs, tel que le rapport hexose/pentose. En effet, la proportion d'hexose et de pentose peut fournir des informations sur la contribution de MO issue des plantes ou des bactéries. Les hexoses comme le galactose (gal) et le mannose (man) sont principalement produits par des micro-organismes, alors que les pentoses comme l'arabinose (ara) et le

xylose (xyl) sont majoritairement produits par les plantes. Le rapport (gal+man)/(ara+xyl) peut être utilisé comme un indicateur microbien (s'il est > 2), ou d'origine végétale (<0,5) (Oades, 1984).

La caractérisation de la MO au niveau fonctionnel (par ^{13}C RMN à l'état solide) ou moléculaire (par py-CG-SM en présence de TMAH) permettra de suivre son évolution et d'évaluer le degré d'oxydation de la MO à chaque pas de temps.

Des extractions seront également réalisées afin de déterminer la fraction de MO (naturelle ou non) extractible à l'eau. Nous pourrions ainsi estimer l'évolution de la proportion de MO extractible à l'eau au cours de la biodégradation de la MO naturelle, et l'impact des contaminants sur cette biodégradation. De plus, nous pourrions également évaluer la proportion de contaminants associés à la MO extractible à l'eau afin de suivre l'évolution de la mobilité de ces contaminants au cours du temps.

De plus, la combinaison des résultats issus de ces deux projets concernant le lien entre évolution de la composition chimique de la MO au cours de sa biodégradation et son interaction avec les contaminants permettront de consolider les résultats qui seront obtenus.

Influence d'une contamination en éléments trace sur le devenir de la MO du sol et influence sur leur mobilité

Comme je l'ai souligné précédemment, la MO est rarement l'objet central des études en rapport avec les contaminations. Cette étude nécessiterait de nouveau de nombreuses collaborations au sein du laboratoire Métis, mais également avec d'autres laboratoires (IMPMC et IEES Paris à Sorbonne Université et l'UCCS à Lille) : collaboration avec J. Leloup (IEES Paris), M. Rouelle (UMR Métis) et C. Davy (UCCS) au cours duquel je pourrais suivre le devenir de la MO contaminée par des ET (financement envisagé : PEPS INEE).

La contamination en ET influence la structure des communautés bactériennes (Giller et al., 1998), et la biodégradation de MO semblent être affectée par la présence d'éléments trace (Boucher et al., 2005; Quénéa et al., 2009). L'objectif de ce projet serait i) de mesurer en parallèle la vitesse de minéralisation de MO contaminée et la biodisponibilité d'un contaminant, le plomb, au cours du temps, ii) de visualiser le Pb et la MO dans la structure du sol et iii) de comparer à la vitesse de dégradation d'une MO non contaminée (Figure 19). Dans les résidus végétaux la MO et le Pb seront associés et donc en interaction forte. Le choix du Pb dans cette première étude est l'avantage que présente cet élément pour la visualisation

par tomographie : A quelle vitesse sera dégradée la MO et qu'en sera-t-il de la biodisponibilité du Pb ?

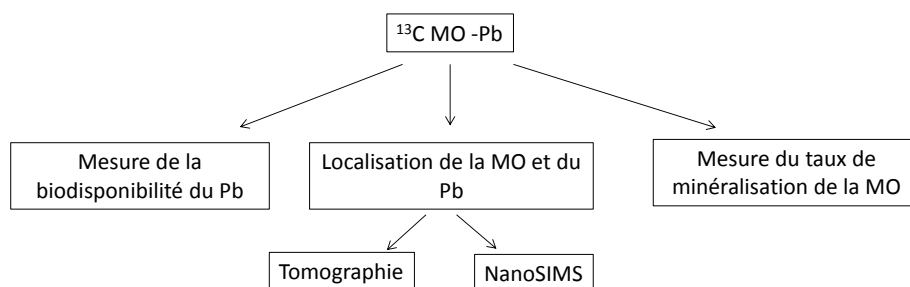


Figure 19 : Actions envisagées lors du suivi de la MO marquée et issue de plantes contaminées

L'hypothèse envisagée est un ralentissement de la vitesse de dégradation de la MO contaminée; mais quels seront les facteurs influençant la vitesse de biodégradation : une évolution des communautés microbiennes ? La structure du sol résultant de l'activité des organismes, celle-ci sera-t-elle impactée par une modification de communauté ou d'activité ? Par conséquent, la protection de la MO par la structure du sol sera-t-elle différente ? Finalement, comment évoluera la biodisponibilité du Pb au cours de cette biodégradation ? Afin de répondre à ces questions, je pourrais associer différentes approches : mesures isotopiques pour suivre la MO, mesure du Pb dans le sol et dans des fractions (extractibles au CaCl_2), caractérisation des communautés bactériennes. Je souhaiterais une prise en compte de la structure du sol, de la distribution de la MO et du Pb associé par microtomographie, complétée par des analyses nanoSIMS. La contrainte spatiale reste un paramètre essentiel comme nous l'avons vu auparavant. En effet, les microorganismes se développent dans le réseau poral dans lequel l'accessibilité à la ressource est conditionné à la fois par leur possibilité de déplacement et/ou à la diffusion de MO dissoute dans le réseau. Les contraintes induites par la porosité du sol influencent fortement l'activité de minéralisation des microorganismes (Ekschmitt et al., 2008; Ruamps et al., 2013; Negassa et al., 2015; Rabbi et al., 2016; Banfield et al., 2017; Nunan, 2017; Nunan et al., 2017; Banfield et al., 2018). Par conséquent, une approche complémentaire à l'étude de l'influence de la structure du sol sur le devenir de la MO, est l'étude de la porosité du sol.

Partie 4 :

Conclusions et perspectives

4. Conclusions et perspectives

Le système sol est un milieu extrêmement complexe et la compréhension des mécanismes influençant le devenir de la MO est essentielle pour préserver les services écosystémiques rendus. La communauté de chercheurs en sciences du sol est dynamique et des approches et techniques novatrices émergent régulièrement. Ces nouvelles approches permettent des évolutions continues de la connaissance de cette MO et remettent régulièrement en cause des paradigmes, comme le processus d'humification conduisant à la formation de substances humiques, la récalcitrance chimique ou la considération des résidus végétaux comme source essentielle de la MO des sols. De nombreuses interrogations subsistent encore et ces défis entretiennent mon intérêt pour l'étude de cette MO depuis des années.

Dans les différentes études que j'ai menées, la compréhension des facteurs influençant la biodégradation de la MO dans le sol était centrale. J'ai ainsi tout d'abord envisagé l'effet de la composition chimique de la MO sur sa biodégradation par sa caractérisation et l'évaluation de sa dégradation en considérant différentes fractions isolées de la MO du sol. Les résultats de ces travaux ont révélé que les fractions de la MO, considérées comme récalcitrantes à la biodégradation n'étaient en réalité pas aussi stables que cela avait été envisagé. Cependant, certaines molécules, telles que celles issues de la cutine ou subérine, montrent tout de même des vitesses de dégradation plus lentes. Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs s'accordant sur un effet à cours terme de la composition chimique de la MO sur sa stabilisation dans les sols. Toutefois, si le rôle des interactions organo-minérales sur la préservation de la MO, que ce soit par protection dans la structure du sol, ou par adsorption, est désormais incontestable, la composition de la MO, et sa potentielle évolution dans le temps, ne doivent pas être négligée. Celle-ci est cruciale dans la compréhension des processus de mise en place de ces interactions et du devenir de la MO, comme l'ont rappelé Zechmeister-Boltenstern et al. (2015). Des études récentes indiquent que le rôle de la composition chimique pourraient également être dominant au sein même d'agrégats dans une première phase de dégradation (Angst et al., 2017; Vidal et al., soumis). Par ailleurs, selon les horizons ou même les sols considérés, l'influence des différents facteurs influençant le devenir de la MO est plus ou moins importante. Ainsi différentes études concernant les sols profonds plus spécifiquement (Fontaine et al., 2007; Rumpel and Kögel-Knabner, 2011; Schmidt et al., 2011; Banfield et al., 2017; Heinze et al., 2018) ou, au contraire, une meta-analyse de suivis en sac de litière, donc avec des interactions organo-minérales très réduites (Zhang et al. 2008), indiquaient soit un rôle prédominant des

interactions avec les minéraux, ou de la composition chimique de la litière, comme principal facteur influençant sa vitesse de décomposition.

De plus, la prise en compte grandissante de la contribution des microorganismes (ainsi que de leurs résidus) comme partie intégrante de la MO du sol (Gleixner et al., 1999; Grandy et Neff, 2008; Liang et Balser, 2010; Miltner et al., 2012; Cotrufo et al., 2013; Lehmann and Kleber, 2015; Kallenbach et al., 2016; Malik et al., 2016; Paul, 2016) et à l'origine de sa stabilité, par exemple, soulève de nouvelles questions portant sur les facteurs pouvant influencer cette source de MO : quelle est l'influence de la nature de la MO issue des plantes, ou de la nature des minéraux, ou encore des conditions environnementales (température, humidité), sur le développement des communautés microbiennes ? Ainsi, le fait que les microorganismes puissent être une source importante de MO des sols, voire majoritaire, pour les horizons profonds, conduit également à devoir de nouveau considérer la composition chimique de la MO. En effet, celle-ci influence les communautés microbiennes, que ce soit quantitativement ou qualitativement (par la composition de ces communautés). Or, la persistance du carbone du sol est parfois présentée comme la résultante d'un équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme, qui peut être traduite comme étant l'efficacité à utiliser le carbone ou CUE (carbon-use efficiency), et celle-ci dépend des paramètres environnementaux, mais également de la qualité de la MO comme l'ont synthétisé Manzoni et al. (2012), mais également souligné par Castellano et al. (2015) et Córdova et al. (2018). Geyer et al. (2016) ont ainsi défini une CUE au niveau écosystémique (figure 20) prenant en compte les différents facteurs influençant cet équilibre. Cette efficacité pourrait être un facteur déterminant dans la production de MO d'origine microbienne.

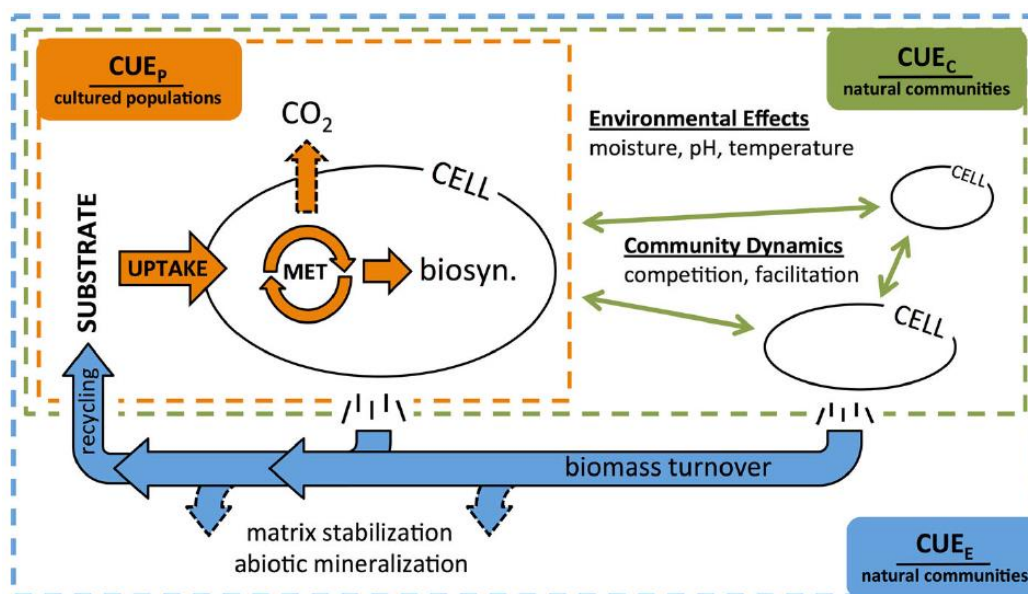


Figure 20 : Efficacité d'utilisation du carbone intégrant des dimensions temporelles et spatiales. CUE_p reflète le fonctionnement spécifique des taxons et la thermodynamique du métabolisme du carbone (MET). CUE_C intègre les facteurs environnementaux et microbiens affectant le métabolisme microbien. CUE_E décrit les émissions de carbone à long terme dues au CUE_p et au CUE_C (Geyer et al., 2016)

Ainsi, des sources de MO différentes pourraient induire l'occurrence de communautés différentes (et plus ou moins abondantes), et à terme produire une MO bactérienne différente. En ce sens, Kallenbach et al. (2016) ont montré l'influence de la nature de la MO sur les communautés bactériennes dans un premier temps, puis sur la composition moléculaire de la MO du sol dans un second temps dans un sol artificiel, auquel divers substrats organiques avaient été apporté. Cette étude confirme ainsi les observations de Ng et al. (2014) sur l'influence de la composition de la MO apportée au sol sur le fonctionnement et la structure des communautés microbiennes. De plus, les communautés microbiennes évoluent également au cours du temps (Bastian et al., 2009; Baumann et al., 2009; Fierer et al., 2010; Marschner et al., 2011) modifiant ainsi la vitesse de renouvellement de la MO du sol (Schimel and Schaeffer, 2012; Zechmeister-Boltenstern et al., 2015; Don et al., 2017). Toutefois, la contribution microbienne à la MO des sols dépend également du type de sol ou horizon considéré. Ainsi que l'on illustré Zechmeister-Boltenstern et al. (2015), si dans les sols minéraux ou dans les horizons profonds, le rapport C/N des sols en particulier est souvent assez similaire, cette « convergence » de composition de MO est attribuée à la diminution progressive de la MO d'origine végétale, très variable, au profit de MO d'origine bactérienne dont la composition stoechiométrique serait plus homogène.

En conséquent, les influences réciproques de la MO végétales et des communautés microbiennes sur la formation puis la biodégradation de la MO des sols sont très complexes et les aspects à explorer sont multiples : influence des racines dans ce systèmes (Poirier et al., 2018) comme source de MO (Stockmann et al., 2013; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015), le lien avec les cycles biogéochimiques de l'azote ou du phosphore (Recous et al., 2017; Zechmeister-Boltenstern et al., 2015), ou encore le rôle des facteurs abiotiques tels que la température, de l'humidité, susceptibles de varier avec le changement climatique, ou encore les minéraux en forte interaction avec la MO.

Les interactions organo-minérales contraignent également fortement le système. Aussi, je me suis également intéressée au rôle de la structure du sol dans la protection de la MO du sol, en étudiant plus spécifiquement l'effet de vers de terre sur la MO, du fait de leur rôle fondamental dans la structuration des sols en zone tempérée. Nous avons ainsi observé une incorporation importante de la MO fraîche apportée dans les structures biogéniques que constituent les turricules. Au cours de l'expérimentation, une partie de cette MO fraîche a été minéralisée. De plus, nous avons montré que dans les mésocosmes étudiés la présence de vers avait conduit à une minéralisation plus importante de la MO globale du sol. Par conséquent, ces résultats pourraient conduire à fortement relativiser la protection par inclusion de MO dans des structures biogéniques. Cependant, en considérant un pas de temps plus long, la minéralisation serait, dans un second temps, beaucoup plus lente, tendant à indiquer une stabilisation de la MO dans ces structures. Par conséquent, mon prochain projet de recherche sera d'essayer de statuer spécifiquement sur le rôle de ces structures biogéniques sur le devenir de la MO en suivant à la fois la minéralisation de la MO et les communautés microbiennes au cours du temps.

Mais de nombreuses voies restent encore à explorer : Lorsque les interactions organo-minérales sont considérées dans la stabilisation de la MO, quelle est la part de la sorption sur les minéraux et celle de la protection du fait de la limitation de structure du sol ? Et cette protection par occlusion était-elle liée à l'accès à la MO par les microorganismes ou à la limitation de l'activité des microorganismes du fait des conditions physiques induites par la structure ? Les nouvelles approches prenant davantage en compte la spatialisation et la porosité du sol (Strong et al., 2004; Falconer et al., 2015; Nunan, 2017) ou l'étude du sol par de nouvelles techniques minimisant l'altération de la structure du sol lors des études (Kinyangi et al., 2006; Herrman et al., 2007; Lehmann et al., 2008; Mueller et al., 2012; Peth et al., 2014; Vogel et al., 2014; Chenu et al., 2015; Angst et al., 2016b; Vidal et al., 2016b; Yu

et al., 2016) apportent désormais de nouveaux éléments et devraient continuer à se développer. Cependant, la distinction des processus de protection de la MO en lien avec les minéraux reste encore un défi dans la plupart des expérimentations.

Un autre aspect de mes travaux concerne la prise en compte de la MO dans les interactions MO-contaminants. L'objectif est de mieux caractériser la MO afin de mieux comprendre à terme le devenir des contaminants dans le milieu. En effet, lors de l'étude des contaminants, la MO est généralement davantage considérée comme une « phase porteuse » qui n'évoluerait pas. Or bien que nos études concernant des sites pollués par des ET ont montré une influence de la contamination sur la vitesse de dégradation de la MO du sol, l'effet de la modification de la MO sur le devenir des contaminants n'avait pas été envisagé. Un de mes projet à plus long terme serait d'associer les théories sur les mécanismes de stabilisation de la MO, en particulier par les interactions organo-minérales, à l'évaluation de la biodisponibilité d'éléments trace lors d'un suivi dans le temps, mais également dans l'espace, à plus petite échelle, dans la structure du sol.

Références

5. Références

- Abdulla, H.A.N., Dias, R.F., Minor, E.C., 2009. Understanding the enhanced aqueous solubility of styrene by terrestrial dissolved organic matter using stable isotope mass balance and FTIR. *Organic Geochemistry* 40, 547–552.
- Abiven, S., Menasseri, S., Chenu, C., 2009. The effects of organic inputs over time on soil aggregate stability-A literature analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1–12.
- Adhikari, K., Hartemink, A.E., 2016. Linking soils to ecosystem services — A global review. *Geoderma* 262, 101–111.
- Adnan, M., Joshi, N., 2017. The uniqueness of microbial diversity from the gut of earthworm and its importance. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 3, 111–115.
- Ahmed, A.A., Thiele-Bruhn, S., Aziz, S.G., Hilal, R.H., Elroby, S.A., Al-Youbi, A.O., Leinweber, P., Kühn, O., 2015. Interaction of polar and nonpolar organic pollutants with soil organic matter: Sorption experiments and molecular dynamics simulation. *Science of The Total Environment* 508, 276–287.
- Ajmone-Marsan, F., Biasioli, M., 2010. Trace elements in soils of urban areas. *Water, Air, & Soil Pollution* 213, 121–143.
- Almendros, G., Gonzalez-vila, F.J., Martin, F., 1989. Room temperature alkaline permanganate oxidation of representative humic acids. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 481–486.
- Almendros, G., guadalix, M.E., gonzalez-vila, F.J., Martin, F., 1996. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *organic geochemistry* 24, 651–659.
- Almendros, G., Martin, F., Gonzalez-vila, F.J., 1987. Depolymerization and degradation of humic acids with sodium perborate. *Geoderma* 235–247.
- Almendros, G., Sanz, J., Gonzalez-vila, F.J., Martin, F., 1991. Evidence for a polyalkyl nature of soil humin. *naturwissenschaften* 78, 359–362.
- Amador, J., Görres, J., 2007. Microbiological characterization of the structures built by earthworms and ants in an agricultural field. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2070–2077.
- Ambès, A., Jambu, P., Ntsikoussalabongui, B., 1989. Evolution des lipides naturels d'un podzol forestier induite par l'apport d'engrais minéraux: hydrocarbures, cétones, alcools. *Science du sol* 27, 201–214.
- Amelung, W., Brodowski, S., Sandhage-Hofmann, A., Bol, R., 2008. Combining biomarker with stable isotope analyses for assessing the transformation and turnover of soil organic matter. *Advances in Agronomy* 100, 155–249.
- Angers, D.A., Recous, S., Aita, C., 1997. Fate of carbon and nitrogen in water-stable aggregates during decomposition of ¹³C¹⁵N-labelled wheat straw in situ. *European Journal of Soil Science* 48, 295–300.
- Angst, G., Heinrich, L., Kögel-Knabner, I., Mueller, C.W., 2016a. The fate of cutin and suberin of decaying leaves, needles and roots – Inferences from the initial decomposition of bound fatty acids. *Organic Geochemistry* 95, 81–92.

- Angst, G., John, S., Mueller, C.W., Kögel-Knabner, I., Rethemeyer, J., 2016b. Tracing the sources and spatial distribution of organic carbon in subsoils using a multi-biomarker approach. *Scientific Reports* 6, 29478.
- Angst, G., Mueller, K.E., Kögel-Knabner, I., Freeman, K.H., Mueller, C.W., 2017. Aggregation controls the stability of lignin and lipids in clay-sized particulate and mineral associated organic matter. *Biogeochemistry* 132, 307–324.
- Angst, Š., Mueller, C.W., Cajthaml, T., Angst, G., Lhotáková, Z., Bartuška, M., Špaldoňová, A., Frouz, J., 2017. Stabilization of soil organic matter by earthworms is connected with physical protection rather than with chemical changes of organic matter. *Geoderma* 289, 29–35.
- Atekwana, E.A., Atekwana, E.A., 2010. Geophysical Signatures of Microbial Activity at Hydrocarbon Contaminated Sites: A Review. *Surveys in Geophysics* 31, 247–283.
- Augris, N., Balesdent, J., Mariotti, A., Derenne, S., Largeau, C., 1998. Structure and origin of insoluble and non-hydrolyzable, aliphatic organic matter in a forest soil. *Organic Geochemistry* 28, 119–124.
- Autret, B., Mary, B., Chenu, C., Balabane, M., Girardin, C., Bertrand, M., Grandeau, G., Beaudoin, N., 2016. Alternative arable cropping systems: A key to increase soil organic carbon storage? Results from a 16 year field experiment. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 232, 150–164.
- Avneri-Katz, S., Young, R.B., McKenna, A.M., Chen, H., Corilo, Y.E., Polubesova, T., Borch, T., Chefetz, B., 2017. Adsorptive fractionation of dissolved organic matter (DOM) by mineral soil: Macroscale approach and molecular insight. *Organic Geochemistry* 103, 113–124.
- Ayoma, M., Angers, D.A., N'Dayegamiye, A., Bissonnette, N., 2000. Metabolism of ¹³C-labeled glucose in aggregates from soils with manure application. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 295–300.
- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 335–379.
- Baath, E., Anderson, T.-H., 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 955–963.
- Bachmann, J., Guggenberger, G., Baumgartl, T., Ellerbrock, R.H., Urbanek, E., Goebel, M.-O., Kaiser, K., Horn, R., Fischer, W.R., 2008. Physical carbon-sequestration mechanisms under special consideration of soil wettability. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 14–26.
- Balabane, M., Faivre, D., Van Oort, F., Dahmani-Muller, H., 1999. Mutual effects of soil organic matter dynamics and heavy metals fate in a metallophyte grassland. *Environmental Pollution* 105, 45–54.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Nelson, P.N., Skene, T.M., Golchin, A., Clarke, P., 1997. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Australian Journal of Soil Research* 35, 1061–1083.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassallo, A.M., Wilson, M.A., 1992. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16, 1–42.

- Baldock, J.A., Skjemstad, J., 2000. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry* 31, 697–710.
- Balesdent, J., Balabane, M., 1992. Maize root-derived soil organic carbon estimated by natural ^{13}C abundance. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 97–101.
- Balesdent, J., Besnard, E., Arrouays, D., Chenu, C., 1998. The dynamics of carbon in particle-size fractions of soil in a forest-cultivation sequence. *Plant and soil* 201, 49–57.
- Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M., 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and tillage research* 53, 215–230.
- Balesdent, J., Mariotti, A., 1996. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance, in: S., B.T. and Y. (Ed.), *Mass Spectrometry of Soils*. Marcel Dekker, New york, pp. 83–111.
- Balesdent, J., Mariotti, A., Guillet, B., 1987. Natural ^{13}C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 25–30.
- Banfield, C.C., Dippold, M.A., Pausch, J., Hoang, D.T.T., Kuzyakov, Y., 2017. Biopore history determines the microbial community composition in subsoil hotspots. *Biology and Fertility of Soils* 53, 573–588.
- Banfield, C.C., Pausch, J., Kuzyakov, Y., Dippold, M.A., 2018. Microbial processing of plant residues in the subsoil – The role of biopores. *Soil Biology and Biochemistry* 125, 309–318.
- Barré, P., Fernandez-Ugalde, O., Virto, I., Velde, B., Chenu, C., 2014. Impact of phyllosilicate mineralogy on organic carbon stabilization in soils: incomplete knowledge and exciting prospects. *Geoderma* 235–236, 382–395.
- Barré, P., Plante, A.F., Cecillon, L., Lutfalla, S., Baudin, F., Bernard, S., Christensen, B.T., Eglin, T., Fernandez, J.M., Houot, S., Kätterer, T., Le Guillou, C., Macdonald, A., Van Oort, F., Chenu, C., 2016. The energetic and chemical signatures of persistent soil organic matter. *Biogeochemistry* 130, 1–12.
- Barré, P., Quénéa, K., Vidal, A., Cécillon, L., Christensen, B.T., Kätterer, T., Macdonald, A., Petit, L., Plante, A.F., Van Oort, F., Chenu, C., 2019. Microbial and plant-derived compounds both contribute to persistent soil organic carbon in temperate soils. *Biogeochemistry*.
- Basile-Doelsch, I., Amundson, R., Stone, W.E.E., Masiello, C.A., Bottero, J.Y., Colin, F., Masin, F., Borschneck, D., Meunier, J.D., 2005. Mineralogical control of organic carbon dynamics in a volcanic ash soil on La Réunion. *European Journal of Soil Science* 56, 689–703.
- Basile-Doelsch, I., Balesdent, J., Rose, J., 2015. Are Interactions between Organic Compounds and Nanoscale Weathering Minerals the Key Drivers of Carbon Storage in Soils? *Environmental Science & Technology* 49, 3997–3998.
- Basile-Doelsch, I., Brun, T., Borschneck, D., Masin, A., Marol, C., Balesdent, J., 2009. Effect of landuse on organic matter stabilized in organomineral complexes: A study combining density fractionation, mineralogy and $\delta^{13}\text{C}$. *Geoderma* 151, 77–86.

- Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B., Ranjard, L., 2009. Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 262–275.
- Baumann, K., Marschner, P., Smernik, R.J., Baldock, J.A., 2009. Residue chemistry and microbial community structure during decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1966–1975.
- Bender, M., 1971. Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry* 10, 1239–1244.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., Hodson, R.E., 1987. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710.
- Benner, R., Welily, K., Hedges, J.I., 1990. Early diagenesis of mangrove leaves in a tropical estuary: Molecular-level analyses of neutral sugars and lignin-derived phenols. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 1991–2001.
- Bernard, L., Chapuis-Lardy, L., Razafimbelo, T., Razafindrakoto, M., Pablo, A.-L., Legname, E., Poulain, J., Bröls, T., O'Donohue, M., Brauman, A., Chotte, J.-L., Blanchart, E., 2012. Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *The ISME Journal* 6, 213–222.
- Bernards, M.A., Lewis, N.G., 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry* 47, 915–933.
- Besnard, E., Chenu, C., Balesdent, J., Puget, P., Arrouays, D., 1996. Fate of particulate organic matter in soil aggregates during cultivation. *European Journal of Soil Science* 47, 495–503.
- Besnard, E., Chenu, C., Robert, M., 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution* 112, 329–337.
- Binet, F., Fayolle, L., Pussard, M., Crawford, J.J., Traina, S.J., Tuovinen, O.H., 1998. Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 27, 79–84.
- Bird, jeffrey A., Kleber, M., Torn, M., 2008. ^{13}C and ^{15}N stabilization dynamics in soil organic matter fractions during needle and fine root decomposition. *Organic Geochemistry* 39, 465–477.
- Bird, J.A., Torn, M.S., 2006. Fine Roots vs. Needles: A Comparison of ^{13}C and ^{15}N Dynamics in a Ponderosa Pine Forest Soil. *Biogeochemistry* 79, 361–382.
- Bityutskii, N.P., Maiorov, E.I., Orlova, N.E., 2012. The priming effects induced by earthworm mucus on mineralization and humification of plant residues. *European Journal of Soil Biology* 50, 1–6.
- Blanchard, M., Teil, M.-J., Guigon, E., Larcher-Tiphagne, K., Ollivon, D., Garban, B., Chevreuil, M., 2007. Persistent toxic substance inputs to the river Seine basin (France) via atmospheric deposition and urban sludge application. *Science of The Total Environment, Human activity and material fluxes in a regional river basin: the Seine River watershed* 375, 232–243.

- Blanchoud, H., Moreau-Guigon, E., Farrugia, F., Chevreuil, M., Mouchel, J.M., 2007. Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *Science of The Total Environment*, Human activity and material fluxes in a regional river basin: the Seine River watershed 375, 168–179.
- Blaud, A., Lerch, T.Z., Chevallier, T., Nunan, N., Chenu, C., Brauman, A., 2012. Dynamics of bacterial communities in relation to soil aggregate formation during the decomposition of ¹³C-labelled rice straw. *Applied Soil Ecology* 53, 1–9.
- Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J.E., Cluzeau, D., Brun, J.-J., 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* 64, 161–182.
- Boon, J.J., De leeuw, J.W., Schenk, P.A., 1975. Organic geochemistry of Walvis Bay diatomaceous ooze—I. Occurrence and significance of the fatty acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 39, 1559–1565.
- Borken, W., Matzner, E., 2009. Reappraisal of drying and wetting effects on C and N mineralization and fluxes in soils. *Global Change Biology* 15, 808–824.
- Bossuyt, H., Six, J., Hendrix, P.F., 2004. Rapid incorporation of carbon from fresh residues into newly formed stable microaggregates within earthworm casts. *European Journal of Soil Science* 55, 393–399.
- Bossuyt, H., Six, J., Hendrix, P.F., 2005. Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 251–258.
- Bottinelli, N., Jouquet, P., Capowiez, Y., Podwojewski, P., Grimaldi, M., Peng, X., 2015. Why is the influence of soil macrofauna on soil structure only considered by soil ecologists? *Soil and Tillage Research, Soil Structure and its Functions in Ecosystems: Phase matter & Scale matter* 146, 118–124.
- Bouché, M.B., 2014. Des vers de terre et des hommes. *Actes Sud*, Arles.
- Boucher, U., Lamy, I., Cambier, P., Balabane, M., 2005. Decomposition of leaves of the metallophyte *Arabidopsis halleri* in soil microcosms: fate of Zn and Cd from plant residues. *Environmental Pollution* 135, 323–332.
- Boucher, U., Lamy, I., Cambier, P., Balabane, M., 2005. Decomposition of leaves of metallophyte *Arabidopsis halleri* in soil microcosms: fate of Zn and Cd from plant residues. *Environmental Pollution* 135, 323–332.
- Boulaine, J., 1983. V. V. Dokouchaev et les débuts de la pédologie. *Revue d'histoire des sciences* 36, 285–306.
- Boutton, T.W., 1996. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change, in: Boutton, T.W., Yamasaki, S. (Ed.), *Mass Spectrometry of Soils*. pp. 46–82.
- Bray, E.E., Evans, E.D., 1961. Distribution of n-paraffins as a clue to recognition of source beds. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 22, 2–15.

- Bronick, C.J., Lal, R., 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124, 3–22.
- Brown, G.G., 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil* 170, 209–231.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, patrick, 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36, 177–198.
- Bull, I.D., Van Bergen, P.F., Nott, C.J., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 2000. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments-V. The fate of lipids in different long-term experiments. *Organic Geochemistry* 31, 389–408.
- Bull, I.D., Van Bergen, P.F., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments-II, Soils from the hoosfield spring barley experiment treated with different quantities of manure. *Organic Geochemistry* 28, 11–26.
- Butenschoen, O., Ji, R., Schäffer, A., Scheu, S., 2009. The fate of catechol in soil as affected by earthworms and clay. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 330–339.
- Buurman, P., Peterse, F., Martin, G.A., 2007. Soil organic matter chemistry in allophanic soils: a pyrolysis-GC/MS study of a Costa Rican Andosol catena. *European Journal of Soil Science* 58, 1330–1347.
- Buyanovsky, A.G., Aslam, M., Wagner, G.H., 1994. Carbon turnover in soil physical fractions. *Soil Science Society American Journal* 58, 1167–1173.
- Carr, A.S., Boom, A., Chase, B.M., Meadows, M.E., Roberts, Z.E., Britton, M.N., Cumming, A.M.J., 2013. Biome-scale characterisation and differentiation of semi-arid and arid zone soil organic matter compositions using pyrolysis–GC/MS analysis. *Geoderma* 200–201, 189–201.
- Castanha, C., Trumbore, S., Amundson, R., 2008. Methods of Separating Soil Carbon Pools Affect the Chemistry and Turnover Time of Isolated Fractions. *Radiocarbon* 50, 83–97.
- Castellano, M.J., Mueller, K.E., Olk, D.C., Sawyer, J.E., Six, J., 2015. Integrating plant litter quality, soil organic matter stabilization, and the carbon saturation concept. *Global Change Biology* 21, 3200–3209.
- Cerri, C., Feller, C., Balesdent, J., Victoria, R., Plenecassagne, A., 1985. Application du tracage isotopique naturel en ^{13}C , à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris* 300, 423–428.
- Challinor, J.M., 1996. Characterisation of wood extractives by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of quaternary ammonium hydroxide extracts. *Journal of analytical and applied pyrolysis* 37, 1–13.
- Challinor, J.M., 2001. Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of analytical and applied pyrolysis* 61, 3–34.

- Chefetz, B., Xing, B., 2009. Relative Role of Aliphatic and Aromatic Moieties as Sorption Domains for Organic Compounds: A Review. *Environmental Science & Technology* 43, 1680–1688.
- Chenu, C., Le Bissonnais, Y., Arrouays, D., 2000. Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1479–1486.
- Chenu, C., Plante, A.F., 2006. Clay-sized organo-mineral complexes in a cultivation chronosequence: revisiting the concept of the “primary organo-mineral complex.” *European Journal of Soil Science* 57, 569–607.
- Chenu, C., Rumpel, C., Lehmann, J., 2015. Methods for studying soil organic matter: nature, dynamics, spatial accessibility and interactions with minerals, in: *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. p. 582.
- Chenu, C., Stotzky, G., 2002. Interactions between microorganisms and soil particles: an overview, in: Huang, P., Bollag, J.-M., Senesi, N. (Eds.), *Interactions between Soil Particles and Microorganisms*. John Wiley and sons, pp. 3–40.
- Christensen, B.T., 1987. Use of particle size fractions in soils organic matter studies. *INTECOL Bulletin* 15, 113–123.
- Christensen, B.T., 1992. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *advances in soil science* 20, 1–90.
- Christensen, B.T., 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science* 52, 345–353.
- Clemente, J.S., Simpson, A.J., Simpson, M.J., 2011. Association of specific organic matter compounds in size fractions of soils under different environmental controls. *Organic Geochemistry* 42, 1169–1180.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D. e., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetraethylammonium hydroxide (TMAH). *organic geochemistry* 23, 169–175.
- Collister, J.W., Rieley, G., Stern, B., Eglinton, G., Fry, B., 1994. Compound-specific d13C analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Organic Geochemistry* 21, 619–627.
- Coq, S., Barthès, B.G., Oliver, R., Rabary, B., Blanchart, E., 2007. Earthworm activity affects soil aggregation and organic matter dynamics according to the quality and localization of crop residues- An experimental study (Madagascar). *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2119–2128.
- Córdova, S.C., Olk, D.C., Dietzel, R.N., Mueller, K.E., Archontoulis, S.V., Castellano, M.J., 2018. Plant litter quality affects the accumulation rate, composition, and stability of mineral-associated soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 125, 115–124.
- Cornu, J.-Y., Denaix, L., Lacoste, J., Sappin-Didier, V., Nguyen, C., Schneider, A., 2016. Impact of temperature on the dynamics of organic matter and on the soil-to-plant transfer of Cd, Zn and Pb in a contaminated agricultural soil. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 2997–3007.

- Cortez, J., Bouché, M.B., 1998. Field decomposition of leaf litters: earthworm–microorganism interactions —the ploughing-in effect. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 795–804.
- Cosentino, D., Chenu, C., Le Bissonnais, Y., 2006. Aggregate stability and microbial community dynamics under drying-wetting cycles in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2053–2062.
- Cotrim da Cunha, L., Serve, L., Blazi, J.-L., 2002. Neutral sugars as biomarkers in the particulate organic matter of a French Mediterranean river. *Organic Geochemistry* 33, 953–964.
- Cotrufo, M.F., De Santo, A.V., Alfani, A., Bartoli, G., De Cristofaro, A., 1995. Effects of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in *Quercus ilex* L. Woods. *Environmental Pollution* 89, 81–87.
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Denef, K., Paul, E.A., 2013. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19, 988–995.
- Cranwell, P.A., 1981. Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* 3, 79–89.
- Curry, J.P., Schmidt, O., 2007. The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia* 50, 463–477.
- Davidson, E., Agren, G., Dahme, A., Daniel, O., Emeis, K.-C., Largeau, C., Lee, C., Mopper, K., Oades, J.M., Reeburgh, W.S., Schimel, D., Zepp, R.G., 1995. What are the physical, chemical and biological processes that control the formation and degradation of nonliving organic matter?, in: Zepp, R.G., Sonntag, C. (Eds.), *The Role of Nonliving Organic Matter in the Earth's Carbon Cycle*. Wiley, pp. 304–324.
- Denef, K., Six, J., Bossuyt, H., Frey, S.D., Elliott, E.T., Merckx, R., Paustian, K., 2001a. Influence of dry–wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1599–1611.
- Denef, K., Six, J., Paustian, K., Merckx, R., 2001b. Importance of macroaggregate dynamics in controlling soil carbon stabilization: short-term effects of physical disturbance induced by dry-wet cycles. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 2145–2153.
- Derenne, S., 2000. Chemical structure and preservation processes of organic matter in soils and sediments. *Organic Geochemistry* 31, 607–608.
- Derenne, S., Nguyen Tu, T.T., 2014. Characterizing the molecular structure of organic matter from natural environment: An analytical challenge. *Comptes Rendus Geoscience* 346, 53–63.
- derenne, S., Quenea, K., 2015. Analytical pyrolysis as a tool to probe soil organic matter. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 111.
- Derrien, D., Balesdent, J., Marol, C., Santaella, C., 2003. Measurement of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of soil-plant individual sugar by gas chromatography/combustion/ isotope-ratio mass spectrometry of silylated derivatives. *Rapid communications in mass spectrometry* 17, 2626–2631.

- Derrien, M., Yang, L., Hur, J., 2017. Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: A review. *Water Research* 112, 58–71.
- Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Rasse, D., Bardoux, G., Balesdent, J., Girardin, C., Chenu, C., Mariotti, A., 2005. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma* 128, 3–17.
- Dignac, M.-F., Derrien, D., Barré, P., Barot, S., Cécillon, L., Chenu, C., Chevallier, T., Freschet, G.T., Garnier, P., Guenet, B., Hedde, M., Klumpp, K., Lashermes, G., Maron, P.-A., Nunan, N., Roumet, C., Basile-Doelsch, I., 2017. Increasing soil carbon storage: mechanisms, effects of agricultural practices and proxies. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 37, 14.
- Dinel, H., Schnitzer, M., 1990. Soil lipids: Origin, nature, content, decomposition, and effect on soil physical properties., in: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol.6. Dekker, M., New york, pp. 397–429.
- Disnar, J.-R., Guillet, B., Keravis, D., Di-Giovanni, C., Sebag, D., 2003. Soil organic matter (SOM) characterization by Rock-Eval pyrolysis: scope and limitations. *Organic Geochemistry* 34, 327–343.
- Don, A., Böhme, I.H., Dohrmann, A.B., Poeplau, C., Tebbe, C.C., 2017. Microbial community composition affects soil organic carbon turnover in mineral soils. *Biology and Fertility of Soils* 53, 445–456.
- Don, A., Schumacher, J., Freibauer, A., 2011. Impact of tropical land-use change on soil organic carbon stocks – a meta-analysis. *Global Change Biology* 17, 1658–1670.
- Drake, H.L., Horn, M.A., 2007. As the Worm Turns: The Earthworm Gut as a Transient Habitat for Soil Microbial Biomes. *Annual Review of Microbiology* 61, 169–189.
- Drenovsky, R., Elliott, G., Graham, K., Scow, K., 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1793–1800.
- Ducaroir, J., Lamy, I., 1995. Evidence of trace metals association with organic matter using size fractionation after physical dispersion treatment. *The Analyst* 120, 741–745.
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M., 2006. Study of trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soil. *Environmental Pollution* 142, 521–529.
- Dungait, J.A.J., Hopkins, D.W., Gregory, A.S., Whitmore, A.P., 2012. Soil organic matter is governed by accessibility not recalcitrance. *Global Change Biology* 18, 1781–1796.
- Dungait, J.A.J., Kemmit, S.J., Michallon, L., Guo, S., Wen, Q., Brookes, P.C., Evershed, R.P., 2011. Variable response of the soil microbial biomass to trace concentrations of ¹³C-labelled glucose, using ¹³C-PLFA analysis. *European Journal of Soil Science* 62, 117–126.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and ecology of earthworms*. Springer Science & Business Media.

- Ekschmitt, K., Kandeler, E., Poll, C., Brune, andreas, Buscot, F., Friedrich, M., Gleixner, G., Hartmann, A., Kästner, M., Marhan, S., Miltner, A., Scheu, S., Wolters, V., 2008. Soil-carbon preservation through habitat constraints and biological limitations on decomposer activity. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 27–35.
- Eusterhues, K., Rumpel, C., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., 2003. Stabilisation of soil organic matter by interactions with minerals as revealed by mineral dissolution and oxidative degradation. *organic geochemistry* 34, 1591–1600.
- Eusterhues, K., Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 2005. Organo-mineral associations in sandy acid forest soils: importance of specific surface area, iron oxides and micropores. *European Journal of Soil Science* 56, 753–763.
- Evans, L.T., 1959. The Use of Chelating Reagents and Alkaline Solutions in Soil Organic-Matter Extraction. *Journal of Soil Science* 10, 110–118.
- Evershed, R.P., 2008. Organic residue analysis in archaeology: The archaeological biomarker revolution. *Archeometry* 50, 895–924.
- Evershed, R.P., Crossman, Z.M., Bull, I.D., Mottram, H., Dungait, J.A., Maxfield, P.J., Brennand, E.L., 2006. ¹³C-labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 72–82.
- Fahey, T.J., Yavitt, J.B., Sherman, R.E., Maerz, J.C., Groffman, P.M., Fisk, M.C., Bohlen, P.J., 2013. Earthworms, litter and soil carbon in a northern hardwood forest. *Biogeochemistry* 114, 269–280.
- Falconer, R.E., Battaia, G., Schmidt, S., Baveye, P., Chenu, C., Otten, W., 2015. Microscale Heterogeneity Explains Experimental Variability and Non-Linearity in Soil Organic Matter Mineralisation. *PLOS ONE* 10, e0123774.
- Feller, C., Chenu, C., 2012. Les inter-actions bio-organo-argileuses et la stabilisation du carbone dans les sols. *Etude et Gestion des Sols* 19, 235–248.
- Feller, C., Fritsch, E., Poss, R., Valentin, C., 1991. Effet de la texture sur le stockage et la dynamique des matières organiques dans quelques sols ferrugineux et ferrallitiques (Afrique de l’Ouest, en particulier). *Cahier de l’ORSTOM, série pédologie* 26, 25–36.
- Feng, X., Simpson, M., 2007. The distribution and degradation of biomarkers in Alberta grassland soil profile. *Organic Geochemistry* 38, 1558–1570.
- Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., Craine, J.M., 2010. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 161, 635–642.
- Filley, T.R., Cody, G.D., Goodell, B., Jellison, J., Noser, C., Ostrofsky, A., 2002. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *organic geochemistry* 33, 111–124.
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–281.

- Fonte, S.J., Kong, A., van Kessel, C., Hendrix, P.F., Six, J., 2007. Influence of earthworm activity on aggregate-associated carbon and nitrogen dynamics differs with agroecosystem management. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1014–1022.
- Fonte, S.J., Qintero, C.D., Velasquez, E., Lavelle, P., 2012. Interactive effects of plants and earthworms on the physical stabilization of soil organic matter in aggregates. *Plant Soil* 359, 205–214.
- Frostegard, A., Tunlid, A., Baath, E., 2010. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Frouz, J., Špaldoňová, A., Fričová, K., Bartuška, M., 2014. The effect of earthworms (*Lumbricus rubellus*) and simulated tillage on soil organic carbon in a long-term microcosm experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 58–64.
- Frouz, J., Špaldoňová, A., Lhotáková, Z., Cajthaml, T., 2015. Major mechanisms contributing to the macrofauna-mediated slow down of litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 91, 23–31.
- Furlong, M.A., Singleton, D.R., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2002. Molecular and Culture-Based Analyses of Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1265–1279.
- Fustec, E., Moucawi, J., Jambu, P., Amblès, A., Jacquesy, J.C., 1985. Principaux facteurs influençant l'évolution des lipides végétaux du sol. *Agrochimica* 24, 174–185.
- Gale, W.J., Cambardella, C.A., 2000. Carbon Dynamics of Surface Residue- and Root-derived Organic Matter under Simulated No-till. *Soil Science Society of America Journal* 64, 190–195.
- Gangloff, S., Stille, P., Pierret, M.-C., Weber, T., Chabaux, F., 2014. Characterization and evolution of dissolved organic matter in acidic forest soil and its impact on the mobility of major and trace elements (case of the Strengbach watershed). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 130, 21–41.
- Gaspéri, J., Ayrault, S., Moreau-Guigon, E., Alliot, F., Labadie, P., Budzinski, H., Blanchard, M., Muresan, B., Caupos, E., Cladière, M., Gateuille, D., Tassin, B., Bordier, L., Teil, M.-J., Bourges, C., Desportes, A., Chevreuil, M., Moilleron, R., 2016. Contamination of soils by metals and organic micropollutants: case study of the Parisian conurbation. *Environmental Science and Pollution Research* 1–15.
- Gateuille, D., Evrard, O., Lefevre, I., Moreau-Guigon, E., Alliot, F., Chevreuil, M., Mouchel, J.-M., 2014. Mass balance and decontamination times of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in rural nested catchments of an early industrialized region (Seine River basin, France). *Science of The Total Environment* 470–471, 608–617.
- Gelin, F., Volkman, J.K., Largeau, C., Derenne, S., Sinninghe Damsté, J.S., De Leeuw, J.W., 1999. Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Organic Geochemistry* 30, 147–159.
- Geyer, K.M., Kyker-Snowman, E., Grandy, A.S., Frey, S.D., 2016. Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem-scale controls over the fate of metabolized organic matter. *Biogeochemistry* 127, 173–188.

Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389–1414.

Girardin, C., Rasse, daniel, Biron, P., Ghashghaie, J., Chenu, C., 2009. A method for ¹³C-labeling of metabolic carbohydrates within French bea leaves (*Phaeseolus vulgaris* L.) for decomposition studies in soils. *Rapid communications in mass spectrometry* 23, 1792–1800.

Glaser, B., 2005. Compound-specific stable-isotope (δ¹³C) analysis in soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 633–648.

Gleixner, G., Bol, R., Balesdent, J., 1999. Molecular insight into soil carbon turnover. *Rapid communications in mass spectrometry* 13, 1278–1283.

Gleixner, G., Czimczik, C., Kramer, C., Lühker, B., Schmidt, M., 2001. Plant compounds and their turnover and stabilization as soil organic matter, in: Schulze, E., Heimann, M., Harrison, S., Holland, E., Lloyd, J., Prentice, I.C., Schimel, D. (Eds.), *Global Biogeochemical Cycles in the Climate System*. academic press, pp. 201–215.

Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R.A., Schmidt, H.L., 1993. Correlations between the ¹³C Content of Primary and Secondary Plant Products in Different Cell Compartments and That in Decomposing Basidiomycetes. *Plant Physiology* 102, 1287–1290.

Golchin, A., Oades, J.M., Skjemstad, J., Clarke, P., 1994. Soil structure and carbon cycling. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1043–1068.

Golchin, A., Oades, J.M., Skjemstad, J., Clarke, P., 1995. Structural and dynamic properties of soil organic matter as reflected by ¹³C natural abundance, pyrolysis mass spectrometry and solid-state ¹³C NMR spectroscopy in density fractions of an oxisol under forest and pasture. *Australian Journal of Soil Research* 33, 59–76.

Goldberg, E.D., 1985. *Black carbon in the environment*. Wiley & sons, New York.

Gomes, P., Valente, T., Braga, M.A.S., Grande, J.A., de la Torre, M.L., 2016. Enrichment of trace elements in the clay size fraction of mining soils. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 6039–6045.

Gonzalez, J.A., Gonzalez-vila, F.J., Almendros, G., Zancada, M.C., Polvillo, O., Martin, F., 2003. Preferential accumulation of selectively preserved biomacromolecules in the humus fractions from a peat deposit as seen by analytical pyrolysis and spectroscopic techniques. *Journal of analytical and applied pyrolysis* 68–69, 287–298.

Goosens, H., Düren, R.R., De Leeuw, J.W., Schenk, P.A., 1989. Lipids and their mode of occurrence in bacteria et sediments-II. Lipids in the sediment of a stratified, freshwater lake. *Organic Geochemistry* 14, 27–41.

Graça, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., Pereira, H., 2002. Glycerol and glyceryl esters of w-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* 61, 205–215.

- Grandy, S., Neff, J.C., 2008. Molecular C dynamics downstream: the biochemical decomposition sequence and its impact on soil organic matter structure and function. *Science of the total environment* 404, 297–307.
- Grasset, L., Amblès, A., 1998. Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. *organic geochemistry* 29, 881–891.
- Grasset, L., Guignard, C., Amblès, A., 2002. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetraethylammonium acetate. *organic geochemistry* 33, 181–188.
- Gregorich, E.G., Ellert, B.H., Monreal, C.M., 1995. Turnover of soil organic matter and storage of corn residue carbon estimated from natural ¹³C abundance. *Canadian journal of soil science* 161–167.
- Gregorich, E.G., Kachanoski, R.G., Voroney, R.P., 1988. Ultrasonic dispersion of aggregates: Distribution of organic matter in size fractions. *Canadian journal of soil science* 68, 395–403.
- Gregorich, E.G., Kachanoski, R.G., Voroney, R.P., 1989. Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregate disruption. *Journal of Soil Science* 40, 649–659.
- Grimalt, J., Albaigés, J., 1987. Sources and occurrence of C₁₂–C₂₂ n-alkane distributions with even carbon-number preference in sedimentary environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51, 1379–1384.
- Gryze, S.D., Six, J., Merckx, R., 2006. Quantifying water-stable soil aggregate turnover and its implication for soil organic matter dynamics in a model study. *European Journal of Soil Science* 57, 693–707.
- Guggenberger, G., Kaiser, K., 2003. Dissolved organic matter: challenging the paradigm of sorptive preservation. *Geoderma* 13, 293–310.
- Guggenberger, G., Zech, W., Haumaier, L., Christensen, B.T., 1995. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soils: II. CPMAS and solution ¹³C NMR analysis. *European Journal of Soil Science* 46, 147–158.
- Guo, L.B., Gifford, R.M., 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology* 8, 345–360.
- Haddix, M.L., Paul, E.A., Cotrufo, M.F., 2016. Dual, differential isotope labeling shows the preferential movement of labile plant constituents into mineral-bonded soil organic matter. *Global Change Biology* 22, 2301–2312.
- Han, J., Calvin, M., 1969. Hydrocarbon distribution of algae and bacteria, and microbiological activity in sediments. *Proceeding of national academy of science* 64, 436–443.
- Hardy, M., Cornu, S., 2006. Location of natural trace elements in silty soils using particle-size fractionation. *Geoderma* 133, 295–308.
- Harter, R.D., Naidu, R., 1995. Role of Metal-Organic complexation in metal sorption by Soils, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 219–263.

Harwood, J.J., 2014. Molecular markers for identifying municipal, domestic and agricultural sources of organic matter in natural waters. *Chemosphere* 95, 3–8.

Hassink, J., Bouwman, L.A., Zwart, K.B., Bloem, J., Brussaard, L., 1993. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and C and N mineralization in grassland soils. *Geoderma* 57, 105–128.

Hassink, J., Whitmore, P., 1997. A model of the physical protection of organic matter in soils. *Soil Science Society American Journal* 61, 131–139.

Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dible, S.D., Carson, D.M., 1995. Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23, 881–888.

Hatcher, P.G., Spiker, E.C., Szeverenyi, N.M., Maciel, G.E., 1983. Selective preservation and origin of petroleum-forming aquatic kerogen. *Nature* 305, 498–501.

Haumaier, L., ZECH, W., 1995. Black carbon-possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Organic Geochemistry* 23, 191–196.

Hedges, J.I., Oades, J.M., 1997. Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry* 27, 319–362.

Heinze, S., Ludwig, B., Piepho, H.-P., Mikutta, R., Don, A., Wordell-Dietrich, P., Helfrich, M., Hertel, D., Leuschner, C., Kirfel, K., Kandeler, E., Preusser, S., Guggenberger, G., Leinemann, T., Marschner, B., 2018. Factors controlling the variability of organic matter in the top- and subsoil of a sandy Dystric Cambisol under beech forest. *Geoderma* 311, 37–44.

Heister, K., Höschen, C., Pronk, G.J., Mueller, C.W., Kögel-Knabner, I., 2012. NanoSIMS as a tool for characterizing soil model compounds and organomineral associations in artificial soils. *Journal of Soils and Sediments* 12, 35–47.

Hempfling, R., Simmlet, N., Schulten, H.-R., 1991. Characterization and chemodynamics of plant constituents during maturation, senescence and humus genesis in spruce ecosystem. *Biogeochemistry* 13, 27–60.

Hempfling, R., Ziegler, F., Zech, W., Schulten, H.-R., 1987. Litter decomposition and humification in acidic forest soils studied by chemical degradation, IR and NMR spectroscopy and pyrolysis field ionization mass spectrometry. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 150, 179–186.

Henneron, L., Bernard, L., Hedde, M., Pelosi, C., Villenave, C., Chenu, C., Bertrand, M., Girardin, C., Blanchart, E., 2015. Fourteen years of evidence for positive effects of conservation agriculture and organic farming on soil life. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 169–181.

Hernandez, M.E., Mead, R., Peralba, M.C., Jaffé, R., 2001. Origin and transport of n-alkane-2-ones in a subtropical estuary: potential biomarkers for seagrass-derived organic matter. *Organic Geochemistry* 32, 21–32.

- Herrman, A., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P., Pett-Ridge, J., Kilburn, M., Murphy, D., O'Donnell, A., Stockdale, E., 2007. Nano-scale secondary ion mass spectroscopy-A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil biology and biochemistry* 39, 1835–1850.
- Hoang, D.T.T., Bauke, S.L., Kuzyakov, Y., Pausch, J., 2017. Rolling in the deep: Priming effects in earthworm biopores in topsoil and subsoil. *Soil Biology and Biochemistry* 114, 59–71.
- Hoang, D.T.T., Pausch, J., Razavi, B.S., Kuzyakova, I., Banfield, C.C., Kuzyakov, Y., 2016. Hotspots of microbial activity induced by earthworm burrows, old root channels, and their combination in subsoil. *Biology and Fertility of Soils* 52, 1105–1119.
- Horn, R., Smucker, A., 2005. Structure formation and its consequences for gas and water transport in unsaturated arable and forest soils. *Soil and Tillage Research* 82, 5–14.
- Hur, J., Lee, B.-M., Shin, H.-S., 2011. Microbial degradation of dissolved organic matter (DOM) and its influence on phenanthrene–DOM interactions. *Chemosphere* 85, 1360–1367.
- Hur, J., Lee, B.-M., Shin, K.-H., 2014. Spectroscopic characterization of dissolved organic matter isolates from sediments and the association with phenanthrene binding affinity. *Chemosphere* 111, 450–457.
- Hur, J., Lee, D.-H., Shin, H.-S., 2009. Comparison of the structural, spectroscopic and phenanthrene binding characteristics of humic acids from soils and lake sediments. *Organic Geochemistry* 40, 1091–1099.
- Jackson, K.S., Jonasson, I.R., Skippen, G.B., 1978. The nature of metals—sediment—water interactions in freshwater bodies, with emphasis on the role of organic matter. *Earth-Science Reviews* 14, 97–146.
- Jaffé, R., Elismé, T., Cabrera, A.C., 1996. Organic Geochemistry of seasonally flooded rain forest soils: molecular composition and early diagenesis of lipid components. *Organic Geochemistry* 25, 9–17.
- Jambu, P., Amblès, A., Dinel, H., Secouet, B., 1991. Incorporation of natural hydrocarbons from plant residues into an hydromorphic humic podzol following afforestation and fertilization. *Journal of Soil Science* 42, 629–636.
- Jambu, P., Amblès, A., Magnoux, P., Parlanti, E., 1995. Effects of addition of clay minerals on the fatty acid fraction of a podzol soil. *European Journal of Soil Science* 46, 187–192.
- Jambu, P., Moucawi, J., Fustec, E., Amblès, A., Jacquesy, J.C., 1985. Inter-relation entre le pH et la nature des composés lipidiques du sol: étude comparée d'une rendzine et d'un sol lessivé glossique. *Agrochimica* 29, 186–198.
- Jansen, B., Nierop, K.G.J., Hageman, J.A., Cleef, A.M., Verstraten, J.M., 2006. The straight-chain lipid biomarker composition of plant species responsible for the dominant biomass production along two altitudinal transects in the Ecuadorian Andes. *Organic Geochemistry* 37, 1514–1536.
- Jastrow, J.D., Miller, R.M., Lussenhop, J., 1998. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie1The submitted manuscript has been created by the

University of Chicago as operator of Argonne National Laboratory under Contract No. W-31-109-ENG-38 with the U.S. Department of Energy.1. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 905–916.

Jégou, D., Cluzeau, D., Balesdent, J., Tréhen, P., 1998. Effects of four ecological categories of earthworms on carbon transfer in soil. *Applied Soil Ecology* 9, 249–255.

Jobbágy, E.G., Jackson, R.B., 2000. The Vertical Distribution of Soil Organic Carbon and Its Relation to Climate and Vegetation. *Ecological Applications* 10, 423–436.

Jolivet, C., Angers, D.A., Chantigny, M.H., Andreux, F., Arrouays, D., 2006. Carbohydrate dynamics in particle-size fractions of sandy spodosols following forest conversion to maize cropping. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2834–2842.

Jolivet, C., Arrouays, D., Lévêque, J., Andreux, F., Chenu, C., 2003. Organic carbon dynamics in soil particle-size separates of sandy spodosols when forest is cleared for maize cropping. *European Journal of Soil Science* 54, 257–268.

Jolivet, C., Guillet, B., Karroum, M., Andreux, F., Bernoux, M., Arrouays, D., 2001. Les phénols de la lignine et le ^{13}C , traceurs de l'origine des matières organiques du sol. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris* 333, 651–657.

Jónsson, J.Ö.G., Davíðsdóttir, B., 2016. Classification and valuation of soil ecosystem services. *Agricultural Systems* 145, 24–38.

Kabata-Pendias, A., 1993. Behavioural properties of trace metals in soils. *Applied Geochemistry, Environmental Geochemistry* 8, 3–9.

Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements- an environmental issue. *Geoderma* 122, 143–149.

Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants. CRC press.

Kaiser, K., Eusterhues, K., Rumpel, C., Guggenberger, G., Kögel-Knabner, I., 2002. Stabilization of organic matter by soil minerals-investigations of density and particle-size fractions from two acid forest soils. *Journal of plant nutrition and soil science* 165, 451–459.

Kaiser, K., Guggenberger, G., 2000. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. *organic geochemistry* 31, 711–725.

Kaiser, K., Guggenberger, G., 2003. Mineral surfaces and soil organic matter. *European Journal of Soil Science* 54, 219–236.

Kaiser, K., Haumaier, L., Zech, W., 2000. The sorption of organic matter in soils as affected by the nature of soil carbon. *Soil Science* 165, 305–313.

Kaiser, M., Kleber, M., Berhe, A.A., 2015. How air-drying and rewetting modify soil organic matter characteristics: An assessment to improve data interpretation and inference. *Soil Biology and Biochemistry* 80, 324–340.

- Kalbitz, K., Schwesig, D., Rethemeyer, J., Matzner, E., 2005. Stabilization of dissolved organic matter by sorption to the mineral soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1319–1331.
- Kalbitz, K., Schwesig, D., Schmerwitz, J., Kaiser, K., Haumaier, L., Glaser, B., Ellerbrock, R., Leinweber, P., 2003. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1129–1142.
- Kalbitz, K., Wennrich, R., 1998. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Science of The Total Environment* 209, 27–39.
- Kallenbach, C.M., Frey, S.D., Grandy, A.S., 2016. Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls. *Nature Communications* 7, 13630.
- Kargar, M., Jutras, P., Clark, G.O., Hendersot, W.H., Prasher, S.O., 2013. Trace metal contamination influenced by land use, soil age, and organic matter in Montreal tree pit soil. *Journal of Environmental Quality* 10, 1527–1533.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research* 13, 241–248.
- Keil, R.G., Mayer, L.M., 2014. Mineral matrices and organic matter, in: Elsevier (Ed.), *Treatise on Geochemistry*. pp. 337–359.
- Kelleher, B.P., Simpson, A.J., 2006. Humic substances in soils: Are they chemically distinct? *Environmental Science and Technology* 40, 4605–4611.
- Khan, S.U., 1978. Chapter 4 The Interaction of Organic Matter with Pesticides, in: Schnitzer, M., Khan, S.U. (Eds.), *Developments in Soil Science, Soil Organic Matter*. Elsevier, pp. 137–171.
- Kiem, R., Knicker, H., Kögel-Knabner, I., 2002. Refractory organic carbon in particle-size fractions of arable soil I: distribution of refractory carbon between the size fractions. *organic geochemistry* 33, 1683–1697.
- Kiem, R., Kögel-Knabner, I., 2002. Refractory organic carbon in particle-size fractions of arable soils II: organic carbon in relation to mineral surface area and iron oxides in fractions <6µm. *organic geochemistry* 33, 1699–1713.
- Kikuchi, T., Fujii, M., Terao, K., Jiwei, R., Lee, Y.P., Yoshimura, C., 2017. Correlations between aromaticity of dissolved organic matter and trace metal concentrations in natural and effluent waters: A case study in the Sagami River Basin, Japan. *Science of The Total Environment* 576, 36–45.
- Kinyangi, J., Solomon, D., Liang, B., Lerotic, M., Wirick, S., Lehmann, J., 2006. Nanoscale biogeocomplexity of the organomineral assemblage in soil: Application of STXM microscopy and C 1s-NEXAFS spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal* 70, 1708–1718.
- Kleber, M., Eusterhues, K., Keiluweit, M., Mikutta, C., Nico, P.S., 2015. Chapter one: mineral–organic associations: formation, properties, and relevance in soil environments. *Advances in Agronomy* 130, 1–140.

Kleber, M., Johnson, M.G., 2010. Chapter 3 - Advances in Understanding the Molecular Structure of Soil Organic Matter: Implications for Interactions in the Environment, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*, *Advances in Agronomy V106*. Academic Press, pp. 77–142.

Kleber, M., Nico, P.S., Plante, A.F., Filley, T., Kramer, M.G., Swanston, C., Sollins, P., 2011. Old and stable soil organic matter is not necessarily chemically recalcitrant: implications for modeling concepts and temperature sensitivity. *Global Change Biology* 17, 1097–1107.

Kleber, M., Sollins, P., Sutton, R., 2007. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* 85, 9–24.

Knicker, H., 2007. How does fire affect the nature and stability of soil organic nitrogen and carbon? A review. *Biogeochemistry* 85, 91–118.

Knicker, H., 2011. Pyrogenic organic matter in soil: Its origin and occurrence, its chemistry and survival in soil environments. *Quaternary International, Black Soils and Black Sediments -- Archives of Landscape Evolution* 243, 251–263.

Kögel-Knabner, I., 2000. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry* 31, 609–625.

Kögel-Knabner, I., 2016. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter: fourteen years on. *Soil Biology and Biochemistry*.

Kögel-Knabner, I., Amelung, W., 2014. Dynamics, chemistry, and preservation of organic matter in soils, *Treatise in geochemistry*. Elsevier.

Kögel-Knabner, I., De Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., 1992. Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles: implications for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules. *The science of total environment* 117/118, 175–185.

Kögel-Knabner, I., De Leeuw, J.W., Tegelaar, E.W., Hatcher, P.G., Kerp, H., 1994. A lignin-like polymer in the cuticle of spruce needles: implications for the humification of spruce litter. *Organic Geochemistry* 21, 1219–1228.

Kögel-Knabner, I., Guggenberger, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheu, S., Eusterhues, K., Leinweber, P., 2008. Organo-mineral association in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 61–82.

Kögel-Knabner, I., Rumpel, C., 2018. Chapter One - Advances in Molecular Approaches for Understanding Soil Organic Matter Composition, Origin, and Turnover: A Historical Overview, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1–48.

Kögel-Knabner, I., Zech, W., Hatcher, P.G., 1991. Chemical Structural Studies of Forest Soil Humic Acids: Aromatic Carbon Fraction. *Soil Science Society of America Journal* 55, 241–247.

Kolattukudy, P., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990–1000.

- Kolattukudy, P., Croteau, R., Buckner, J.S., 1976. Chemistry and biochemistry of natural waxes. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Korndorff, H., Schnitzer, M., 1980. Sorption of metals on humic acids. *Geochimica and cosmochimica acta* 44, 1701–1708.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184–199.
- Kuzyakov, Y., Domanski, G., 2000. Carbon input by plant into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 421–431.
- Kuzyakov, Y., Subbotina, I., Chen, H., Bogomolova, I., Xu, X., 2009. Black carbon decomposition and incorporation into soil microbial biomass estimated by ¹⁴C labeling. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 210–219.
- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304, 1623–1626.
- Lamy, I., Bourgeois, S., Bermond, A., 1993. Soil Cadmium Mobility as a Consequence of Sewage Sludge Disposal. *Journal of Environmental Quality* 22, 731–737.
- Lavelle, P., 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils* 6, 237–251.
- Le Quéré, C., Raupach, M.R., Canadell, J.G., Marland, G., Bopp, L., Ciais, P., Conway, T.J., Doney, S.C., Feely, R.A., Foster, P., Friedlingstein, P., Gurney, K., Houghton, R.A., House, J.I., Huntingford, C., Levy, P.E., Lomas, M.R., Majkut, J., Metz, N., Ometto, J.P., Peters, G.P., Prentice, I.C., Randerson, J.T., Running, S.W., Sarmiento, J.L., Schuster, U., Sitch, S., Takahashi, T., Viovy, N., van der Werf, G.R., Woodward, F.I., 2009. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geoscience* 2, 831–836.
- Leavitt, S.W., Follett, R.F., Paul, E.A., 1996. Estimation of slow- and fast-cycling soil organic carbon pools from 6N HCl hydrolysis. *Radiocarbon* 38, 231–239.
- Lee, K.E., 1985. Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*.
- Lee, K.E., Foster, R.C., 1991. Soil fauna and soil structure. *Australian Journal of Soil research* 29, 745–773.
- Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528, 60–68.
- Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Dathe, L., Wirick, S., Jacobsen, C., 2008. Spatial complexity of soil organic matter forms at nanometre scales. *Nature geosciences* 1, 238–242.
- Lemtiri, A., Colinet, G., Alabi, T., Cluzeau, D., Zirbes, L., Haubruge, E., Francis, F., 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 18, 1–13.

- Lerch, T.Z., Coucheney, E., Herrmann, A.M., 2013. Sensitivity of soil microbial catabolic profiles to a gradient of carbon inputs: Does the soil organic matter matter? *Soil Biology and Biochemistry* 57, 911–915.
- Li, Q., Du, H., Chen, W., Hao, J., Huang, Q., Cai, P., Feng, X., 2018. Aging shapes the distribution of copper in soil aggregate size fractions. *Environmental Pollution* 233, 569–576.
- Liang, C., Balser, T.C., 2010. Microbial production of recalcitrant organic matter in global soils: implications for productivity and climate policy. *Nature Reviews Microbiology* 9, 75.
- Lichtfouse, E., Berthier, G., Houot, S., Barriuso, E., Bergheaud, V., Vallaey, T., 1995. Stable carbon isotope evidence for the microbial origin of C₁₄-C₁₈ n-alkanoic acids in soils. *Organic Geochemistry* 23, 849–852.
- Lichtfouse, E., Chenu, C., Baudin, F., Leblond, C., Da Silva, M., Behar, F., Derenne, S., Largeau, C., Wehrung, P., Albrecht, P., 1998. A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers: chemical and isotope evidence. *Organic Geochemistry* 28, 411–415.
- Lin, L.H., Simpson, M.J., 2016. Enhanced extractability of cutin- and suberin-derived organic matter with demineralization implies physical protection over chemical recalcitrance in soil. *Organic Geochemistry* 97, 111–121.
- Lorenz, K., Lal, R., Preston, C.M., Nierop, K.G.J., 2007. Strengthening the soil organic carbon pool by increasing contributions from recalcitrant aliphatic bio(macro)molecules. *Geoderma* 142, 1–10.
- Lubbers, I.M., Groenigen, K.J. van, Fonte, S.J., Six, J., Brussaard, L., Groenigen, J.W. van, 2013. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. *Nature Climate Change* 3, 187–194.
- Lubbers, I.M., Pulleman, M.M., Van Groenigen, J.W., 2017. Can earthworms simultaneously enhance decomposition and stabilization of plant residue carbon? *Soil Biology and Biochemistry* 105, 12–24.
- Lützom, M.V., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., Marschner, B., 2007. SOM fractionation methods: relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil biology and biochemistry* 39, 2183–2207.
- Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions-A review. *European Journal of Soil Science* 57, 426–445.
- Ma, R., Cai, C., Li, Z., Wang, J., Xiao, T., Peng, G., Yang, W., 2015. Evaluation of soil aggregate microstructure and stability under wetting and drying cycles in two Ultisols using synchrotron-based X-ray micro-computed tomography. *Soil and Tillage Research* 149, 1–11.
- Malik, A.A., Roth, V.-N., Hébert, M., Tremblay, L., Dittmar, T., Gleixner, G., 2016. Linking molecular size, composition and carbon turnover of extractable soil microbial compounds. *Soil Biology and Biochemistry* 100, 66–73.

- Mambelli, S., Bird, J.A., Gleixner, G., Dawson, T.E., Torn, M.S., 2011. Relative contribution of foliar and fine root pine litter to the molecular composition of soil organic matter after in situ degradation. *Organic Geochemistry* 42, 1099–1108.
- Manzoni, S., Taylor, P., Richter, A., Porporato, A., Ågren, G.I., 2012. Environmental and stoichiometric controls on microbial carbon-use efficiency in soils. *New Phytologist* 79–91.
- Marschner, B., Brodowski, S., Dreves, A., Gleixner, G., Gude, A., Grootes, P., Hamer, U., Heim, A., Jandl, G., Ji, R., Kaiser, K., Kalbitz, K., Kramer, C., Leinweber, P., Rethemeyer, J., Schäffer, A., Schmidt, M., Schwark, L., Wiesenberger, G., 2008. How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 91–110.
- Marschner, P., Umar, S., Baumann, K., 2011. The microbial community composition changes rapidly in the early stages of decomposition of wheat residue. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 445–451.
- Martin, A., Mariotti, A., Balesdent, J., Lavelle, P., Vuattoux, R., 1990. Estimate of organic matter turnover rate in a savanna soil by ¹³C natural abundance measurements. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 517–523.
- Martin, F., Del Rio, J.C., Gonzalez-vila, F.J., Verdejo, T., 1995. Pyrolysis derivatization of humic substances 2. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of analytical and applied pyrolysis* 31, 75–83.
- Martin, F., Gonzalez-vila, F.J., 1984. Persulfate oxidation of humic acids extracted from three different soils. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 207–210.
- Martin, F., Saiz-Jimenez, C., Gonzalez-vila, F.J., 1981. The persulfate oxidation of a soil humic acid. *Soil Science* 132, 200–203.
- Masiello, C.A., Druffel, E.R.M., Currie, L.A., 2002. Radiocarbon measurement of black carbon in aerosols and ocean sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 1025–1036.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., Parlanti, E., Le Coustumer, P., 2011. Copper addition by organic matter degradation in the freshwater reaches of a turbid estuary. *Science of The Total Environment* 409, 1539–1549.
- Matzke, K., Riederer, M., 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185, 233–245.
- Mei, Y., Wu, F., Wang, L., Bai, Y., Li, W., Liao, H., 2009. Binding characteristics of perylene, phenanthrene and anthracene to different DOM fractions from lake water. *Journal of Environmental Sciences* 21, 414–423.
- Mendez-Millan, M., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Derenne, S., 2010a. Can cutin and suberin biomarkers be used to trace shoot and root-derived organic matter? A molecular and isotopic approach. *Biogeochemistry* 23–38.
- Mendez-Millan, M., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Rasse, D.P., Derenne, S., 2010b. Molecular dynamics of shoot vs. root biomarkers in an agricultural soil estimated by natural abundance ¹³C labelling. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 169–177.

- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine Organic Geochemistry- an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20, 867–900.
- Mikutta, R., Kleber, M., Torn, M.S., Jahn, R., 2006. Stabilization of soil organic matter: association with minerals or chemical recalcitrance? *Biogeochemistry* 77, 25–56.
- Mikutta, R., Mikutta, C., Kalbitz, K., Scheel, T., Kaiser, K., Jahn, R., 2007. Biodegradation of forest floor organic matter bound to minerals via different binding mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 2569–2590.
- Miltner, A., Bombach, P., Schmidt-Brücken, B., Kästner, M., 2012. SOM genesis: microbial biomass as a significant source. *Biogeochemistry* 111, 41–45.
- Minor, E.C., Swenson, M.M., Mattson, B.M., Oyler, A.R., 2014. Structural characterization of dissolved organic matter: a review of current techniques for isolation and analysis. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16, 2064–2079.
- Moeckel, C., Monteith, D.T., Llewellyn, N.R., Henrys, P.A., Pereira, M.G., 2014. Relationship between the Concentrations of Dissolved Organic Matter and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Typical U.K. Upland Stream. *Environmental Science & Technology* 48, 130–138.
- Moni, C., Rumpel, C., Virto, I., Chabbi, A., Chenu, C., 2010. Relative importance of sorption versus aggregation for organic matter storage in subsoil horizons of two contrasting soils. *European Journal of Soil Science* 61, 958–969.
- Monreal, C.M., Schulten, H.-R., Kodama, H., 1997. Age, turnover and molecular diversity of soil organic matter in aggregates of a gleysol. *Canadian journal of soil science* 77, 379–388.
- Moucaww, J., Fustec, E., Jambu, P., Jacquesy, J.C., 1981. Decomposition of lipids in soils: free and esterified fatty acids, alcohols and ketones. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 461–468.
- Mueller, C.W., Kölbl, A., Hoeschen, C., Hillion, F., Heister, K., Herrmann, A.M., Kögel-Knabner, I., 2012. Submicron scale imaging of soil organic matter dynamics using Nano-SIMS-From single particles to intact aggregates. *Organic Geochemistry* 42, 1476–1488.
- Mummey, D.L., Rillig, M., C., Six, J., 2006. Endogeic earthworms differentially influence bacterial communities associated with different soil aggregate size fractions. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1608–1614.
- Murty, D., Kirschbaum, M.F., Mc Murtrie, R.E., Mc Gilvray, H., 2002. Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? A review of the literature. *Global change biology* 8, 105–123.
- Naafs, D.F.W., Nierop, K.G.J., van Bergen, P.F., de Leeuw, J.W., 2005. Changes in the molecular composition of ester-bound aliphatics with depth in an acid andic forest soil. *Geoderma* 127, 130–136.
- Nebbioso, A., Piccolo, A., 2013. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 109–124.

- Negassa, W.C., Guber, A.K., Kravchenko, A.N., Marsh, T.L., Hildebrandt, B., Rivers, M.L., 2015. Properties of Soil Pore Space Regulate Pathways of Plant Residue Decomposition and Community Structure of Associated Bacteria. *PLOS ONE* 10, e0123999.
- Ng, E.-L., Patti, A.F., Rose, M.T., Scheffe, C.R., Wilkinson, K., Smernik, R.J., Cavagnaro, T.R., 2014. Does the chemical nature of soil carbon drive the structure and functioning of soil microbial communities? *Soil Biology and Biochemistry* 70, 54–61.
- Nguyen Tu, T.T., Biron, P., Maseyk, K., Richard, P., Zeller, B., Quénéa, K., Alexis, M., Bardoux, G., Vaury, V., Girardin, C., Pouteau, V., Billiou, D., Bariac, T., 2013. Variability of ¹³C-labeling in plant leaves. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27, 1961–1968.
- Nierop, K., Jansen, B., Hageman, J., Verstraten, J., 2006. The complementarity of extractable and ester-bound lipids in a soil profile under pine. *Plant and soil* 286, 269–285.
- Nierop, K.G., Naafs, D., Verstraten, J.M., 2003. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Organic Geochemistry* 34, 719–729.
- Nierop, K.G., van Bergen, P.F., Buurman, P., van Iagen, B., 2005. NaOH and Na₄P₂O₇ extractable organic matter in two allophanic ash soils of the azores Islands-a pyrolysis GC/MS study. *Geoderma* 127, 36–51.
- Nierop, K.G.J., 2001. Temporal and vertical organic matter differentiation along a vegetation succession as revealed by pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of analytical and applied pyrolysis* 61, 111–132.
- Nierop, K.G.J., Van Iagen, B., Buurman, P., 2001. Composition of plant tissues and soil organic matter in the first stages of a vegetation succession. *Geoderma* 100, 1–24.
- Nierop, K.G.J., Verstraten, J.M., 2003. Organic matter formation in sandy subsurface horizons of dutch coastal dunes in relation to soil acidification. *organic geochemistry* 34, 499–513.
- Nunan, N., 2017. The microbial habitat in soil: Scale, heterogeneity and functional consequences. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 180, 425–429.
- Nunan, N., Leloup, J., Ruamps, L.S., Pouteau, V., Chenu, C., 2017. Effects of habitat constraints on soil microbial community function. *Scientific Reports* 7, 4280.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I., Crawford, J., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with micro-architecture of soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 203–215.
- Oades, J.M., 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implication for management. *Plant and soil* 76, 319–337.
- Oades, J.M., 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* 56, 377–400.
- Oades, J.M., 1995. An overview of processes affecting the cycling of organic carbon in soils., in: Zepp, R.G., Sonntag, C. (Eds.), *The Role of Nonliving Organic Matter in the Earth's Carbon Cycle*. Wiley, pp. 293–303.

- O'Leary, M., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20, 553–567.
- Olsson, P.A., 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 303–310.
- O'Malley, V.P., Burke, R.A., Schlotzhauer, W.S., 1997. Using GC-MS/ Combustion /IRMS to determine the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of individual hydrocarbons produced from the combustion of biomass materials-application to biomass burning. *Organic Geochemistry* 27, 567–581.
- Otto, A., Simpson, M., 2005. Degradation and preservation of vascular plant-derived biomarkers in grassland and forest soils from Western Canada. *Biogeochemistry* 74, 377–409.
- Otto, A., Simpson, M.J., 2006. Sources and composition of hydrolysable aliphatic lipids and phenols in soils from western Canada. *Organic Geochemistry* 37, 385–407.
- Pan, B., Ghosh, S., Xing, B., 2007. Nonideal Binding between Dissolved Humic Acids and Polyaromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* 41, 6472–6478.
- Parat, C., Chaussod, R., Lévêque, J., Dousset, S., Andreux, F., 2002. The relationship between copper accumulated in vineyard calcareous soils and soil organic matter and iron. *European Journal of Soil Science* 53, 663–670.
- Park, E.-J., Sul, W.J., Smucker, A.J.M., 2007. Glucose additions to aggregates subjected to drying/wetting cycles promote carbon sequestration and aggregate stability. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2758–2768.
- Paul, E.A., 2016. The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biology and Biochemistry* 98, 109–126.
- Paul, E.A., Collins, H.P., Leavitt, S.W., 2001. Dynamics of resistant soil carbon of midwestern agricultural soils measured by naturally occurring ^{14}C abundance. *Geoderma* 104, 239–256.
- Paul, E.A., Follett, R.F., Leavitt, S.W., Halvorson, A., Peterson, G.A., Lyon, D.J., 1997. Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. *Soil Science Society American Journal* 61, 1058–1067.
- Pelosi, C., Bertrand, M., Thénard, J., Mougin, C., 2015. Earthworms in a 15 years agricultural trial. *Applied Soil Ecology* 88, 1–8.
- Peth, S., Chenu, C., Leblond, N., Mordhorst, A., Garnier, P., Nunan, N., Pot, V., Ogurreck, M., Beckmann, F., 2014. Localization of soil organic matter in soil aggregates using synchrotron-based X-ray microtomography. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 189–194.
- Piccolo, A., 2001. THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE OF HUMIC SUBSTANCES. *Soil Science* 166, 810.
- Pisani, O., Hills, K.M., Courtier-Murias, D., Haddix, M.L., Paul, E.A., Conant, R.T., Simpson, A.J., Arhonditsis, G.B., Simpson, M.J., 2014. Accumulation of aliphatic compounds in soil with increasing mean annual temperature. *Organic Geochemistry* 76, 118–127.

Plante, A.F., Fernandez, J.M., Leifeld, J., 2009. Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma* 153, 1–10.

Poeplau, C., Don, A., Six, J., Kaiser, M., Benbi, D., Chenu, C., Cotrufo, M.F., Derrien, D., Gioacchini, P., Grand, S., Gregorich, E., Griepentrog, M., Gunina, A., Haddix, M., Kuzyakov, Y., Kühnel, A., Macdonald, L.M., Soong, J., Trigalet, S., Vermeire, M.-L., Rovira, P., van Wesemael, B., Wiesmeier, M., Yeasmin, S., Yevdokimov, I., Nieder, R., 2018. Isolating organic carbon fractions with varying turnover rates in temperate agricultural soils – A comprehensive method comparison. *Soil Biology and Biochemistry* 125, 10–26.

Poeplau, C., Don, A., Vesterdal, L., Leifeld, J., Wesemael, B.V., Schumacher, J., Gensior, A., 2011. Temporal dynamics of soil organic carbon after land-use change in the temperate zone – carbon response functions as a model approach. *Global Change Biology* 17, 2415–2427.

Poerschmann, J., Parsi, Z., Gorecki, T., Augustin, J., 2005. Characterization of non-discriminating tetramethylammonium hydroxide-induced thermochemolysis-capillary gas chromatography-mass spectrometry as a method for profiling fatty acids in bacterial biomasses. *Journal of Chromatography A* 1071, 99–109.

Poirier, N., Derenne, S., Balesdent, J., Mariotti, A., Massiot, D., Largeau, C., 2003. Isolation and analysis of the non-hydrolysable fraction of a forest soil and an arable soil (Lacadée, southwest France). *European Journal of Soil Science* 54, 243–255.

Poirier, N., Derenne, S., Rouzaud, J., Largeau, C., Mariotti, A., Balesdent, J., Maquet, J., 2000. Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France). *Organic Geochemistry* 31, 813–827.

Poirier, V., Roumet, C., Munson, A.D., 2018. The root of the matter: Linking root traits and soil organic matter stabilization processes. *Soil Biology and Biochemistry* 120, 246–259.

Pronk, G.J., Heister, K., Vogel, C., Babin, D., Bachmann, J., Ding, G.-C., Ditterich, F., Gerzabek, M.H., Giebler, J., Hemkemeyer, M., Kandeler, E., Kunhi Mouvenchery, Y., Miltner, A., Poll, C., Schaumann, G.E., Smalla, K., Steinbach, A., Tanuwidjaja, I., Tebbe, C.C., Wick, L.Y., Woche, S.K., Totsche, K.U., Schloter, M., Kögel-Knabner, I., 2017. Interaction of minerals, organic matter, and microorganisms during biogeochemical interface formation as shown by a series of artificial soil experiments. *Biology and Fertility of Soils* 53, 9–22.

Puget, P., Chenu, C., Balesdent, J., 1995. Total and young organic matter distributions in aggregates of silty cultivated soils. *European Journal of Soil Science* 46, 449–459.

Puget, P., Drinkwater, L.E., 2001. Short-Term Dynamics of Root- and Shoot-Derived Carbon from a Leguminous Green Manure. *Soil Science Society of America Journal* 65, 771–779.

Pulleman, M.M., Six, J., Uyl, A., Marinissen, J.C.Y., Jongmans, A.G., 2005. Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Applied Soil Ecology* 29, 1–15.

Quenea, K., Derenne, S., Benedetti, M., sous presse. Insight into continental organic matter: a chemist view, in: *Advanced Green Chemistry*. M. Macria and Istvan Horvath.

- Quénééa, K., Derenne, S., Gonzalez-Vila, J., Mariotti, A., Rouzaud, J.-N., Largeau, C., 2005. Study of the composition of the macromolecular refractory fraction from an acidic sandy forest soil (Landes de Gascogne, France) using chemical degradation and electron microscopy. *Organic Geochemistry* 36, 1151–1162.
- Quénééa, K., Derenne, S., Gonzalez-Vila, J.A., Mariotti, A., Largeau, C., 2006a. Double-shot pyrolysis of the non-hydrolysable organic fraction isolated from a sandy forest soil (Landes de Gascogne, south-west France). Comparison with classical Curie point pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 76, 271–279.
- Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2004. Variation in lipid relative abundance and composition among different particle size fractions of a forest soil. *Organic Geochemistry, Advances in Organic Geochemistry 2003. Proceedings of the 21st International Meeting on Organic Geochemistry* 35, 1355–1370.
- Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2004. Variation in lipid abundance and composition among different particle-size fractions of a forest soil. *Advances in organic geochemistry* 11/12, 1355–1370.
- Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2005. Spectroscopic and pyrolytic features and abundance of the macromolecular refractory fraction in a sandy acid forest soil (Landes de Gascogne, France). *organic geochemistry* 36, 349–363.
- Quénééa, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2006b. Influence of change in land use on the refractory organic macromolecular fraction of a sandy spodosol (Landes de Gascogne, France). *Geoderma* 136, 136–151.
- Quénééa, K., Derenne, S., Rumpel, C., Rouzaud, J.-N., Gustafsson, O., Carcaillet, C., Mariotti, A., Largeau, C., 2006c. Black carbon quantification in forest and cultivated sandy soils (Landes de Gascogne, France). Influence of change in land-use. *Organic Geochemistry* 37, 1185–1189.
- Quénééa, K., Lamy, I., Winterton, P., Bermond, A., Dumat, C., 2009. Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water. *Geoderma* 149, 217–223.
- Quénééa, K., Largeau, C., Derenne, S., Spaccini, R., Bardoux, G., Mariotti, A., 2006d. Molecular and isotopic study of lipids in particle size fractions of a sandy cultivated soil (Cestas cultivation sequence, southwest France): Sources, degradation, and comparison with Cestas forest soil. *Organic Geochemistry* 37, 20–44.
- Rabbi, S.M.F., Daniel, H., Lockwood, P.V., Macdonald, C., Pereg, L., Tighe, M., Wilson, B.R., Young, I.M., 2016. Physical soil architectural traits are functionally linked to carbon decomposition and bacterial diversity. *Scientific Reports* 6, 33012.
- Rasse, D.P., Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Mariotti, A., Chenu, C., 2006. Lignin turnover in an agricultural field: from plant residues to soil-protected fractions. *European Journal of Soil Science* 57, 530–538.

Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant and Soil* 269, 341–356.

Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. *Microbial lipids*. academic press.

Recous Sylvie, Lashermes, Gwenaëlle, Bertrand, Isabelle, n.d. Couplages et contrôles des cycles du carbone et de l'azote par les communautés microbiennes dans les sols cultivés, in: *Les Sols et La Vie Souterraine*, Synthèses. Quae, p. 328.

Remusat, L., Hatton, P.-J., Nico, P.S., Zeller, B., Kleber, M., Derrien, D., 2012. NanoSIMS study of organic matter associated with soil aggregates: Advantages, Limitations, and Combination with STXM. *Environmental Science and Technology* 46, 3943–3949.

Ren, Z.-L., Tella, M., Bravin, M.N., Comans, R.N.J., Dai, J., Garnier, J.-M., Sivry, Y., Doelsch, E., Straathof, A., Benedetti, M.F., 2015. Effect of dissolved organic matter composition on metal speciation in soil solutions. *Chemical Geology* 398, 61–69.

Reuter, J.H., Perdue, E.M., 1977. Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 325–334.

Riederer, M., Matze, K., Ziegler, F., Kögel-Knabner, I., 1993. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soil. *Organic Geochemistry* 20, 1063–1076.

Rieley, G., Collier, R.J., Jones, D.M., Eglinton, G., 1991. The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K.-I. source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Organic Geochemistry* 17, 901–912.

Roscoe, R., Buurman, P., Velthorst, E.J., Vasconcellos, C.A., 2001. Soil organic matter dynamics in density and particle size fractions as revealed by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio in a Cerrado's oxisol. *Geoderma* 104, 185–202.

Ruamps, L.S., Nunan, N., Pouteau, V., Leloup, J., Raynaud, X., Roy, V., Chenu, C., 2013. Regulation of soil organic C mineralisation at the pore scale. *FEMS Microbiology Ecology* 86, 26–35.

Rumpel, C., Baumann, K., Remusat, L., Dignac, M.-F., Barré, P., Deldicque, D., Glasser, G., Lieberwirth, I., Chabbi, A., 2015. Nanoscale evidence of contrasted processes for root-derived organic matter stabilization by mineral interactions depending on soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 85, 82–88.

Rumpel, C., Eusterhues, K., Kögel-Knabner, I., 2004. Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil biology and biochemistry* 36, 177–190.

Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 2011. Deep soil organic matter—a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. *Plant and Soil* 338, 143–158.

Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F., 2002. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *organic geochemistry* 32, 1131–1142.

- Saiz-Jimenez, C., De Leeuw, J.W., 1986. Lignin pyrolysis products: Their structures and their significance as biomarkers. *Advances in organic geochemistry* 10, 869–876.
- Saiz-Jimenez, C., Hermosin, B., Guggenberger, G., Zech, W., 1996. Land use effects on the composition of organic matter in soil particle size separates. III. Analytical pyrolysis. *European Journal of Soil Science* 47, 61–69.
- Saliot, A., Laureillard, Scribe, P., Sicre, M.-A., 1991. Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry* 36, 233–248.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E., 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 34, 1125–1131.
- Scheel, T., Haumaier, L., Ellerbrock, R.H., Rühlmann, J., Kalbitz, K., 2008. Properties of organic matter precipitated from acidic forest soil solutions. *Organic Geochemistry* 39, 1439–1453.
- Schellekens, J., Barberá, G.G., Buurman, P., Pérez-Jordà, G., Martínez-Cortizas, A., 2013. Soil organic matter dynamics in Mediterranean A-horizons—The use of analytical pyrolysis to ascertain land-use history. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 104, 287–298.
- Schimel, J.P., Schaeffer, S.M., 2012. Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in microbiology* 3, 1–11.
- Schmidt, M., Noack, A., 2000. Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochemical Cycles* 14, 777–793.
- Schmidt, M., Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 1999. Evaluation of an ultrasonic dispersion procedure to isolate primary organomineral complexes from soils. *European Journal of Soil Science* 50, 87–94.
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, daniel, Weiner, S., Trumbore, S.E., 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49–56.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M., 1990. Aliphatics in soil organic matter in fine-clay fractions. *Soil Science Society American Journal* 54, 98–105.
- Sebag, D., disnar, J.-R., Guillet, B., Di Giovanni, C., Verrechia, E.P., Durand, A., 2006. Monitoring organic matter dynamics in soil profiles by “rock-Eval pyrolysis”: bulk characterization and quantification of degradation. *European Journal of Soil Science* 57, 344–355.
- Sextstone, A.J., Revsbech, N.P., Parkin, T.B., Tiedje, J.M., 1985. Direct Measurement of Oxygen Profiles and Denitrification Rates in Soil Aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 49, 645–651.
- Shipitalo, M.J., Protz, R., 1989. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma* 45, 357–374.
- Simpson, A.J., Simpson, M.J., Smith, E., Kelleher, B.P., 2007. Microbially derived inputs to soil organic matter: Are current estimates too low? *Environmental Science and Technology* 41, 8070–8076.

- Simpson, M.J., Simpson, A.J., 2012. The chemical ecology of soil organic matter molecular constituents. *Journal of Chemical Ecology* 38, 768–784.
- Singh, M., Sarkar, B., Sarkar, S., Churchman, J., Bolan, N., Mandal, S., Menon, M., Purakayastha, T.J., Beerling, D.J., 2018. Chapter Two - Stabilization of Soil Organic Carbon as Influenced by Clay Mineralogy, in: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 33–84.
- Singh, N., Abiven, S., Torn, M.S., Schmidt, M.W.I., 2012. Fire-derived organic carbon in soil turns over on a centennial scale. *Biogeosciences* 9, 2847–2857.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and tillage research* 79, 7–31.
- Six, J., Elliott, E.T., Paustian, K., 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation : a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 2099–2103.
- Skjemstad, J., Le Feuvre, R.P., Prebble, R.E., 1990. Turnover of soil organic matter under pasture as determined by ^{13}C natural abundance. *Australian Journal of Soil Research* 28, 267–276.
- Sleutel, S., Leinweber, P., Ara Begum, S., Kader, M.A., De Neve, S., 2009. Shifts in soil organic matter composition following treatment with sodium hypochlorite and hydrofluoric acid. *Geoderma* 149, 257–266.
- Smith, B.N., Epstein, S., 1971. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant physiology* 47, 380–384.
- Sollins, P., Homann, P., Caldwell, B.A., 1996. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma* 74, 65–105.
- Sollins, P., Kramer, M.G., Swanston, C., Latjha, K., Filley, T., Aufdenkampe, A.K., Wagai, R., Bowden, R.D., 2009. Sequential density fractionation across soils of contrasting mineralogy: evidence for both microbial- and mineral-controlled soil organic matter stabilization. *Biogeochemistry* 96, 209–231.
- Soucémariadin, L., Cécillon, L., Chenu, C., Baudin, F., Nicolas, M., Girardin, C., Barré, P., 2018. Is Rock-Eval 6 thermal analysis a good indicator of soil organic carbon lability? – A method-comparison study in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 117, 108–116.
- Spokas, K.A., 2010. Review of the stability of biochar in soils: predictability of O:C molar ratios. *Carbon Management* 1, 289–303.
- Stankiewicz, B.A., Briggs, D.E.G., Michels, R., Collinson, M.E., Flannery, M.B., Evershed, R.P., 2000. Alternative origin of aliphatic polymer in kerogen. *Geology* 28, 559–562.
- Steffens, C., Helfrich, M., Joergensen, R.G., Eissfeller, V., Flessa, H., 2015. Translocation of ^{13}C -labeled leaf or root litter carbon of beech (*Fagus sylvatica* L.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.) during decomposition – A laboratory incubation experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 125–137.
- Stockmann, U., Adams, M.A., Crawford, J.W., Field, D.J., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., McBratney, A.B., Courcelles, V. de R. de, Singh, K., Wheeler, I., Abbott, L., Angers, D.A., Baldock, J.,

- Bird, M., Brookes, P.C., Chenu, C., Jastrow, J.D., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, A.G., Parton, W.J., Whitehead, D., Zimmermann, M., 2013. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 164, 80–99.
- Strong, D.T., De Wever, H., Merckx, R., Recous, S., 2004. Spatial location of carbon decomposition in the soil pore system. *European Journal of Soil Science* 55, 739–750.
- Sutton, R., Sposito, G., 2005. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science and Technology* 39, 9009–9015.
- Tegelaar, E.W., De leeuw, J.W., Derenne, S., Largeau, C., 1989. A reappraisal of kerogen formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53, 3103–3106.
- Thevenot, M., Dignac, M.-F., Rumpel, C., 2010. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1200–1211.
- Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science* 33, 141–163.
- Torn, M.S., Trumbore, S.E., Chadwick, O.A., Vitousek, P.M., Hendricks, D.M., 1997. Mineral control of soil organic carbon storage and turnover. *Nature* 389, 170–173.
- Trigo, D., Barois, I., Garvin, M.H., Huerta, E., Irisson, S., Lavelle, P., 1999. Mutualism between earthworms and soil microflora. *Pedobiologia* 43, 866–873.
- Trumbore, S.E., 2009. Radiocarbon and soil carbon dynamics. *Annual review Earth Planet* 37, 47–66.
- Trumbore, S.E., Druffel, E.R.M., 1995. Carbon isotopes for characterizing sources and turnover of nonliving organic matter, in: Zepp, R.G., Sonntag, C. (Eds.), *The Role of Nonliving Organic Matter in the Earth's Carbon Cycle*. Wiley, pp. 7–22.
- Tulloch, A., 1976. Chemistry of waxes of higher plants, in: Kolattukudy, P. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier.
- Van Bergen, P.F., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1997. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments-I Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Organic Geochemistry* 26, 117–135.
- Van Bergen, P.F., Nott, C.J., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments-IV. Preliminary results from a study of the effect of soil pH on organic matter decay. *organic geochemistry* 29, 1779–1795.
- van Groenigen, J.W., Lubbers, I.M., Vos, H.M.J., Brown, G.G., De Deyn, G.B., van Groenigen, K.J., 2014. Earthworms increase plant production: a meta-analysis. *Scientific Reports* 4, 6365.
- Vidal, A., Quenea, K., Alexis, M., derenne, S., 2016a. Molecular fate of root and shoot litter on incorporation and decomposition in earthworm casts. *Organic Geochemistry* 101.

- Vidal, A., Quenea, K., Alexis, M., Nguyen Tu, T.T., Mathieu, J., Vauray, V., derenne, S., 2017. Fate of ¹³C labelled root and shoot residues in soil and anecic earthworm casts: A mesocosm experiment. *Geoderma* 285, 9–18.
- Vidal, A., Remusat, L., Watteau, F., derenne, S., Quenea, K., 2016b. Incorporation of ¹³C labelled shoot residues in *Lumbricus terrestris* casts: A combination of transmission electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Soil Biology and Biochemistry* 93, 8–16.
- Vogel, C., Mueller, C.W., Höschen, C., Buegger, F., Heister, K., Schulz, S., Schlöter, M., Kögel-Knabner, I., 2014. Submicron structures provide preferential spots for carbon and nitrogen sequestration in soils. *Nature communications* 5, 2947–2954.
- Von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., 2010. Response to the Concept paper: “What is recalcitrant soil organic matter?” by Markus Kleber. *Environmental Chemistry* 7, 333–335.
- von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Flessa, H., Guggenberger, G., Matzner, E., Marschner, B., 2007. SOM fractionation methods: relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil biology and biochemistry* 39, 2183–2207.
- von Lützow, M., Kögel-Knabner, I., Ludwig, B., Matzner, E., Flessa, H., Ekschmitt, K., Guggenberger, G., Marschner, B., Kalbitz, K., 2008. Stabilization mechanisms of organic matter in four temperate soils: Development and application of a conceptual model. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 111–124.
- Wang, J., Xiong, Z., Kuzyakov, Y., 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. *GCB Bioenergy* 8, 512–523.
- Wannigama, G.P., Volkman, J.K., Gillan, F.T., Nichols, P.D., Johns, R.B., 1981. A comparison of lipid components of the fresh and dead leaves and pneumatophores of the mangrove *Avicennia Marina*. *Phytochemistry* 20, 659–666.
- Watteau, F., Villemin, G., Burtin, G., Jocteur-Monrozier, L., 2006. Root impact on the stability and types of micro-aggregates in silty soil under maize. *European Journal of Soil Science* 57, 247–257.
- Wiesenberg, G.L.B., Schwarzbauer, J., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., 2004. Source and turnover of organic matter in agricultural soils derived from n-alkane/n-carboxylic acid compositions and C-isotope signatures. *Organic Geochemistry, Advances in Organic Geochemistry 2003. Proceedings of the 21st International Meeting on Organic Geochemistry* 35, 1371–1393.
- Winkler, A., Haumaier, L., Zech, W., 2005. Insoluble alkyl carbon components in soils derive mainly from cutin and suberin. *Organic Geochemistry* 36, 519–529.
- Wiseman, C., Püttmann, W., 2006. Interactions between mineral phases in the preservation of soil organic matter. *Geoderma* 134, 109–118.
- Wyszkowska, J., Borowik, A., Kucharski, M., Kucharski, J., 2013. Effect of cadmium, copper and zinc on plants, soil microorganisms and soil enzymes. *Journal of Elementology* 18.

- Yu, X., Fu, Y., Lu, S., 2016. Characterization of the pore structure and cementing substances of soil aggregates by a combination of synchrotron radiation X-ray micro-computed tomography and scanning electron microscopy. *European Journal of Soil Science* 68, 66–79.
- Zangerlé, A., Hissler, C., Blouin, M., Lavelle, P., 2014. Near infrared spectroscopy (NIRS) to estimate earthworm cast age. *Soil Biology and Biochemistry* 70, 47–53.
- Zangerlé, A., Pando, A., Lavelle, P., 2011. Do earthworms and roots cooperate to build soil macroaggregates? A microcosm experiment. *Geoderma* 167–168, 303–309.
- Zech, M., Krause, T., Meszner, S., Faust, D., 2013. Incorrect when uncorrected: Reconstructing vegetation history using n-alkane biomarkers in loess-paleosol sequences – A case study from the Saxonian loess region, Germany. *Quaternary International, Closing the gap - North Carpathian loess traverse in the Eurasian loess belt 6th Loess Seminar, Wrocław, Poland Dedicated to Prof. Henryk Maruszczak* 296, 108–116.
- Zech, W., Haumaier, L., Kögel-Knabner, I., 1989. Changes in aromaticity and carbon distribution of soil organic matter due to pedogenesis. *Science of The Total Environment, Advances in Humic Substances Research* 81–82, 179–186.
- Zechmeister-Boltenstern, S., Keiblinger, K.M., Mooshammer, M., Peñuelas, J., Richter, A., Sardans, J., Wanek, W., 2015. The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecological Monographs* 85, 133–155.
- Zelles, L., 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *chemosphere* 35, 275–294.
- Zelles, L., 1999. Fatty acids patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and fertility of soils* 29, 11–129.
- Zhang, D., Hui, D., Luo, Y., Zhou, G., 2008. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology* 1, 85–93.
- Zhang, W., Hendrix, P.F., Dame, L.E., Burke, R.A., Wu, J., Neher, D.A., Li, J., Shao, Y., Fu, S., 2013. Earthworms facilitate carbon sequestration through unequal amplification of carbon stabilization compared with mineralization. *Nature Communications* 4, ncomms3576.
- Zheng, Y., Wang, S., Bonkowski, M., Chen, X., Griffiths, B., Hu, F., Liu, M., 2018. Litter chemistry influences earthworm effects on soil carbon loss and microbial carbon acquisition. *Soil Biology and Biochemistry* 123, 105–114.
- Zhou, T., Wu, L., Luo, Y., Christie, P., 2018. Effects of organic matter fraction and compositional changes on distribution of cadmium and zinc in long-term polluted paddy soils. *Environmental Pollution* 232, 514–522.

Curriculum vitae détaillé

6. Curriculum vitae détaillé

Katell QUENEA

Laboratoire METIS-Milieux Environnementaux : Transferts et Interactions dans les hydrosystèmes et les Sols- UFR 918

2 enfants (nés en 2006 et 2010)

6.1 Parcours professionnel

Depuis 2006 : Maître de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie

Recherche : Influence de la composition de la matière organique sur son devenir

Enseignement : Responsable pédagogique du M1 professionnel « sol, eau, environnement » depuis 2014

Responsable des plusieurs UE de M1 de l'UFR TEB (tds :236h/an en moyenne)

2005-2006 : post-doctorat à l'IFREMER au Laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Organiques, Département Biogéochimie et Ecotoxicologie de l'IFREMER (Brest)

Etude sur le transfert de contaminants (PBDE, PCB, alkyl phénols, phtalates, pesticides) dans le réseau trophique

2005 : Ingénieur à la SOBAC (Rodez)

Evaluation de la qualité de sols : analyse d'échantillons de sols (pH, CEC, minéraux, nitrate)

2000 (6 mois) : assistante ingénieur au Centre de recherche, d'études et de contrôle des eaux de Paris :

Collecte d'informations, traitement des données et rédaction d'un rapport sur la qualité des eaux de la Seine et de la Marne (DBO, COT, Pb, Hg et azote total)

6.2 Formation

Formation continue :

2018 : la formation « encadrement de la thèse »

2017 : formation en écologie des sols (sup'agro Montpellier)

2015 : Formation « statistique des petits échantillons » (CNRS)

2009 : Formation SIG QGIS (UPMC)

2008 : Formation pédologie (INRA Orléans)

Formation académique

2004 : Doctorat en sciences de l'environnement. (UPMC).

Titre de la thèse : « Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs. »

2001: DEA d'environnement « fonctionnement physique, chimique et biologique de la biosphère continentale » (UPMC).

2000: Obtention des modules d'océanographie générale (Chimie marine, océanographie descriptive) et d'environnement (Pollution, écotoxicologie, gestion des systèmes naturels et aquatiques) (Maîtrise). (UPMC).

1999 : Maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes (UPMC).

6.3 Activités de recherche

Pilotage ou participation à des programmes de recherche

J'ai participé à une dizaine de projets et j'ai piloté, ou co-piloté, 5 projets de recherche depuis mon recrutement.

Année	Projet	Porteur	Montant (euros)
2018-2020	Sources et puits de carbone organique et émissions de CO ₂ dans le continuum sols-eaux (Sol'eau [solo]) COSOLO	J. Garnier	29000
2017-2021	Geoprocess : suivi GEOphysique des PROCESsus hydrogéologiques et bio-géochimiques dans les Sols <i>Projet Emergence de la ville de Paris</i>	D. Jougnot	210000
2016-2019	Interactions MO-contaminants organiques <i>PIREN Seine</i>	K. Quénéa E. Guigon	53700
2013-2015	Suivi de l'incorporation de la matière organique dans les agrégats biogéniques : implication dans la protection du carbone des sols <i>EC2CO</i>	K. Quénéa	30000
2015-2017	CARACAS : Caractérisation multi-techniques et multi-échelles du C stable des sols <i>EC2CO</i>	P. Barré	
2013-2015	DESTOC : impact des pratiques agricoles sur le destockage du carbone organique <i>EC2CO</i>	V. Chaplot	
2015	Microbiologie des turricules <i>UMR Métis</i>	K. Quénéa	3000
2013-2016	Migémos <i>INRAP</i>	C. Cammas	
2012	Ver/agrégat <i>UMR Bioémco</i>	K. Quénéa	6000
2011-2014	EUROCHAR <i>Projet européen</i>	F. Miglietta	
2009	Caractérisation de boues de STEP <i>Anjou Recherche</i>	K. Quénéa	10000

Participation à des comités de pilotage de thèse

- Iry Andrianjara (soutenance prévue en 2020) ED « Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution et écologie »
- Justine Barthod (soutenance 2017) ED sciences de l'environnement
- Alain Pierrart (soutenance 2017) Université de Toulouse
- Irene Criscoli (soutenance 2016) ED Agroparistech
- Suzanne Lutfalla (soutenance 2015) ED agriculture alimentation santé environnement (Paris)
- Christophe Naisse (soutenance 2014) ED sciences de l'environnement

Participation à des jurys de thèse

- Rapporteur de la thèse Khatab Abdalla (University of Kwazulu-Natal, South Africa) (Mai 2016) *“Let use et let management impact on CO₂ emissions from soils in selected smallholder farming systems”*
- Examinatrice de la thèse d'A. Creme (Juillet 2016) « *Impacts de la gestion des prairies sur le stockage du carbone et la nature biogéochimique des matières organiques du sol* »

Participation à des comités de lecture

- Biogeochemistry (2011)
- Catena (2017)
- Chemosphere (2015)
- Chemosphere (2015)
- Geoderma (2008, 2010, 2017)
- Journal of analytical et applied Pyrolysis (2016, 2017, 2018)
- Journal of soils et sediments (2016)
- Organic Geochemistry (2007, 2011, 2012, 2013, 2014, 2017)
- Science of the total environment (2015)
- Science of total environment (2015)
- Soil Biology et Biochemistry (2016)

6.4 Responsabilités administratives

Mai 2016 Membre **comité de sélection MCF** à Aix en Provence (CEREGE)

2010-2014 Membre élue du **Conseil de laboratoire** BioEMCo

2014-2019 Membre nommée du **conseil scientifique** de l'UMR métis

Depuis 2014 : Membre de l'**EFU**

Membre de la **commission d'enseignement** du master SDUEE

Organisation de journées scientifiques

6-9/06/2017 Participation au **comité scientifique** du congrès international « Sustainable Urban Agricultures: Vector for the Ecological Transition »

Co-organisatrice de la journée « Carbone des sols » organisée dans le cadre de la FIRE le 19/5/16.(80 participants)

Co-organisatrice de la journée « Cycle du carbone » dans le cadre de l'institut Pierre Simon Laplace du 23/4/15

Co-organisation des journées scientifique du laboratoire BioEMCo en 2013

6.5 Activités en enseignement

Depuis mon recrutement j'ai enseigné en licence de sciences de la Terre et dans le master SDUEE essentiellement (env 230h/an). Ces dernières années, la majorité de ces enseignements sont des enseignements de **géochimie** et portent plus spécifiquement sur les **sols et les contaminants**. Une partie importante de mes cours est réalisée dans des formations professionnelles. De ce fait, les UE dont je suis responsable présente la particularité de comporter une partie non négligeable d'études de cas, afin que les étudiants acquièrent des méthodes d'étude dont ils ont besoin rapidement en entreprise. Je participe également à plusieurs enseignements de terrain dont la durée varie d'une journée à une semaine selon les UE.

Responsabilités en enseignement

Depuis 2014 : Responsable Master 1 professionnel « Sol, eau, Environnement » (SEE)

Responsable des UE de M1 : « physico chimie des sols et pollution »

« stage en entreprise-tutorat académique »

« Sols et polluants »

« Projet tuteuré »

Co-responsable des UE de M1 : « Connaissances du milieu et cycles biogéochimiques » du master "Gestion et Traitement des Sols, des Eaux et des Déchets » d'AgroParistech

« Ecotoxicologie et toxicologie » du parcours « Ecophysiologie et Ecotoxicologie » (EPET) du master 1biologie écologie et évolution de Sorbonne université

Co-responsable des UE de M2 : Biogéochimie des matières organiques naturelles du parcours « géochimie environnementale » du master 2 hydrologie-hydrogéologie géochimie environnementale de Sorbonne université

Encadrements d'étudiants

Encadrement de stages et thèse

Année	BTS	L3	M1 ECH	M2	Thèse
2007	C.			Co-	

	Dubois		encadrement (S. Bégé) et encadrement (C. Pop)	
2008		Co- encadrement R. Mouloudi		
2009	L. Foubert		A. Pony	
2010		1 en co- encadrement		
2011	L. Prada	Co- encadrement C. Le Carpentier		
2012	Co-encadrement K. Grira		co-encadrement S. Lutfalla	
2013	S. Benakroun	X. François	I. Andrianjara	
2014		E. Gan		A. Vidal
2015	N. Martin	J. Le Noé		A. Vidal
2016		A. Allain		A. Vidal
2017			S Guo	
2018		A. Lambert		
Bilan	1	5	8	6
				1

Valorisation des travaux ayant impliqués des stagiaires :

Les travaux de recherche auxquels ont participé de K. Grira, X. François, I. Andrianjara, E. Gan lors de leur stage ont été valorisés sous la forme d'article ou de communications scientifiques (orale ou posters).

Article:

Katell Quenea, [Iry Andrianjara*](#), Aleksetar Rankovic, [Erika Gan*](#), Emmanuel Aubry, Jean-Christophe Lata, Sebastien Barot, Maryse Castrec-Rouelle, *Evaluation of trace element contamination of street trees and their soils in Paris (France) - Influence of the residence time in the city-* soumis à Environmental Science et Pollution Research

Posters:

- 14^{ème} congrès français de sédimentologie, Paris, 5-7 novembre 2013 : différenciation micromorphologique et géochimique des modes d'occupation du sol : premiers résultats sur des anthroposols archéologiques (Roissy-en-france, xiième-xvième s.) Cécilia Cammas, Katell Quénéa, Amy Bell, [Xavier François*](#)
- Journée écologie urbaine, Paris, juin 2014 : Estimation des concentrations en éléments traces métalliques dans les sols et feuilles d'une chronoséquence de plantations d'alignement parisiennes : conséquences pour le recyclage des sols et l'utilisation du compost de feuilles en agriculture urbaine. Aleksandar Rankovic, [Iry Andrianjara*](#), Jean-Christophe Lata, Maryse Castrec Rouelle, Katell Quenea

International meeting on organic geochemistry 2013, Tenerife (Espagne):

- *geochemical characterization of medieval soil use : application to roissy en france archaeological site (france)* Katell Quenea, Cécilia Cammas, Marie Alexis et [Xavier François*](#)

- *Variability of ^{13}C -labeling in plant tissues, implication for biogeochemical studies*. Thanh thuy nguyen tu, philippe biron, katell quenea, marie alexis, patricia richard, bernd zeller, céline lett, kadmiel maseyk, véronique vauray, gérard bardoux, valérie pouteau, cyril girardin, nicolas pechot, daniel billiou, [katia Grira*](#) & thierry bariac
- Ateliers d'été de l'Agriculture urbaine et de la Biodiversité Natureparif, Paris, 30 juin au 2 juillet : *Estimation des concentrations en éléments trace métalliques dans les sols et feuilles d'une chronoséquence de plantations d'alignement parisiennes : conséquences pour le recyclage des sols et l'utilisation du compost de feuilles en agriculture urbaine*, [Iry Andrianjara*](#), Aleksetar Rankovic, Jean-Christophe Lata, Maryse Rouelle, Katell Quenea

Communication orale :

Deuxième Journée d'Écologie Urbaine, juillet 2014, Paris: *Estimation des concentrations en éléments traces métalliques dans les sols et feuilles d'une chronoséquence de plantations d'alignement parisiennes : conséquences pour le recyclage des sols et l'utilisation du compost de feuilles en agriculture urbaine*, Rankovic, A., [Andrianjara, I*](#), Lata, J.-C., Castrec Rouelle, M., Quenea, K.

Valorisation des travaux de doctorat

La thèse d'[A. Vidal](#) financée par l'école doctorale GRNE s'inscrit dans un projet EC2CO dont j'étais porteuse. Les résultats obtenus ont été valorisés par la rédaction **de 3 articles** et la préparation d'un **4^{ème}** (soumis dans Soil Biology et Biochemistry), 1 poster en congrès national, **4 posters** en congrès internationaux, 1 oral en congrès national et **3 oraux** en congrès internationaux :

Articles (4)

[A. Vidal*](#), L. Remusat, F. Watteau, S. Derenne, K. Quenea (2016) *Incorporation of ^{13}C labelled shoot residues in Lumbricus terrestris casts: A combination of Transmission Electron Microscopy et Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry*. Soil Biology et Biochemistry, 93; 8-16

[A Vidal*](#), K. Quenea, M. Alexis, S. Derenne (2016) *Molecular fate of root et shoot litter on incorporation et decomposition in earthworm casts*, Organic Geochemistry, 101, 1-10

[A. Vidal*](#), K. Quenea, M Alexis, TT Nguyen Tu, J. Mathieu, V. Vauray, S. Derenne (2017) *Fate of ^{13}C labelled root et shoot residues in soil et anecic earthworm casts: A mesocosm experiment*, , Geoderma, 9-18

A. Vidal*, F. Watteau, L. Remusat, C.W. Mueller, T. T. Nguyen Tu, S. Derenne, K. Quenea
From fresh roots et shoots to particulate organic matter et organo-mineral associations in earthworm casts soumis à Soil Biology et Biochemistry

Posters (5):

Colloque du reseau matière organique, Tregastel (22), février 2018:

"Incorporation de racines et de parties aériennes marquée au C dans le sol en présence de Lumbricus terrestris: une approche isotopique et moléculaire, Vidal, Alix;* Quenea Katell; Alexis, Marie; Nguyen, Tu Thanh Thuy; Anquetil, Christelle; Derenne, Sylvie

IMOG, Prague, 2015: *Incorporation of ^{13}C labelled litter in the soil in the presence of earthworms. An isotopic et molecular approach.* Alix Vidal*, Katell Quenea, Marie Alexis, Thanh Thuy Nguyen Tu, Véronique Vaury, Christelle Anquetil, Sylvie Derenne

European Geosciences Union, Vienne (Autriche), avril 2016: *Incorporation of ^{13}C labelled root-shoot residues in soil in the presence of Lumbricus terrestris: An isotopic et molecular approach.* Alix Vidal*, Katell Quenea, Marie Alexis, Thanh Thuy Nguyen Tu, Sylvie Derenne.

Goldschmidt, Paris (France), aout 2017 : *are lipids better preserved in earthworm casts compared to soils? A mesocosm experiment with ^{13}C -labeled litter* T.T. Nguyen Tu, A. Vidal*, K. Quenea, M. Mendez, E. Canolle, A.S Permal, S. Derenne

6th symposium on soil organic matter, Rothamsted (Grande-Bretagne):

Carbon transfer from root et shoot litter to microorganisms in earthworm casts –TEM et NanoSIMS analyses. Vidal A*., Watteau F., Remusat L., Nguyen Tu T.T., Derenne S., Quenea K.

Oraux (4) :

5th symposium on soil organic matter, Göttingen:

Incorporation of ^{13}C labelled shoot residues in Lumbricus terrestris casts: A combination of Transmission Electron Microscopy et Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry Alix Vidal*, Laurent remusat, francoise Watteau, Sylvie Derenne, Katell Quenea

*Incorporation of ^{13}C labelled root-shoot residues in soil in the presence of *Lumbricus terrestris*: An isotopic et molecular approach* [Alix Vidal*](#), Katell Quenea, Marie Alexis, Thanh Thuy Nguyen Tu, Véronique Vaury, Christelle Anquetil, Sylvie Derenne

EGU, Vienne 2016: Spatial et temporal distribution of ^{13}C labelled plant residues in soil aggregates et *lumbricus terrestris* surface casts: a combination of transmission electron microscopy et nanoscale secondary ion mass spectrometry. [Alix Vidal*](#), Laurent Remusat, Françoise Watteau, Sylvie Derenne, Katell Quenea

Journée d'Etude des Sols, Bourget du Lac (73) – Juillet 2014.

*“Influence de vers de terre (*Lombricus terrestris*) sur l'incorporation de biomasses végétales marquées (^{13}C) dans un sol en conditions contrôlées”* [Vidal Alix*](#), Quenea Katell, Alexis Marie, Nguyen Tu Thanh Thuy, Mathieu Jérôme, Vaury Véronique et Derenne Sylvie

Encadrement d'étudiants-apprentis sous forme de tutorat académique

Année	Licence professionnelle	Master Professionnel (M1)	Master Professionnel (M2)
2008-2009	G.Jan		
2009-2010	L Seddah, et R. Saccault		
2010-2011	S. Blivi Akue et H. Admi		
2011-2012	L. Reuilly	R. Fauches	
2012-2013	M. Dupré	L. Villard S.Panurge	
2013-2014	M. Vignard	M. Gehin J.Derilly	L. Villard S.Panurge
2014-2015	R. Ben Jrad	A. Nolin N. Cahen	M. Gehin J.Derilly
2015-2016	E. Pageot	M. bouquillon S. Leclere M. Macé A. Quinio	A. Nolin N. Cahen
2016-2017		S. Rea L. Rodrigues	M. bouquillon S. Leclere M. Macé A. Quinio
2017-2018		Z. Lane G. Derre E. Dolly	S. Rea L. Rodrigues G. Fléchais
2018-2019		C. Mancel B. Orta C. Rouxel	Z. Lane G. Derre E. Dolly
Bilan	10	19	16

Liste des communications scientifiques

7. Liste des communications scientifiques

Publications (24):

- 1- **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, C. Rumpel et A. Mariotti, (2004) *Variation in lipid abundance et composition among different particle-size fractions of a forest soil*, Organic geochemistry, vol. 35, issue 11/12, 1355-1370..
- 2- » **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, C. Rumpel et A. Mariotti « *Spectroscopic et pyrolytic features et abundance of the macromolecular refractory fraction in a sety acid forest soil (Letes de Gascogne, France)* », (2005), Organic Geochemistry, vol.36, issue 3, 349-362.
- 3- **K. Quénéa**, S. Derenne, F.J. Gonzalez-Vila, A. Mariotti, J.-N. Rouzaud et C. Largeau. Geochemistry (2005) *Study of the composition of the macromolecular refractory fraction from an acidic sety forest soil (Letes de Gascogne, France) using chemical degradation et electron microscopy*» Organic vol 36, issue 8, 1151-1162.
- 4- **K. Quénéa**, C. Largeau, S. Derenne, R. Spaccini, G. Bardoux et A. Mariotti. (2006) *Molecular et isotopic study of lipids in particle size fractions of a sety cultivated soil (Cestas cultivation sequence, southwest France): Sources, degradation, et comparison with Cestas forest soil-* Organic Geochemistry, vol. 37, Issue 1, 20-44
- 5- , **K. Quenea**, A. Bermond, S. Toinen et M.F. Benedetti. (2006) « *Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soil*». C. DumatEnvironmental Pollution, vol 142, Issue 3, 521-529
- 6- **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, C. Rumpel, A. Mariotti. (2006) *Influence of change in let use on the refractory organic macromolecular fraction of a sety spodosol (Letes de Gascogne, France)* Geoderma, vol 136, 136-151
- 7- **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Rumpel, J.-N. Rouzaud, O. Gustafsson, C. Carcaillet, A. Mariotti, C. Largeau (2006) *Black carbon quantification in forest et cultivated sety soils (Letes de Gascogne, France). Influence of change in let-use »*, Organic Geochemistry, vol 37, Issue 9, 1185-1189
- 8- **K. Quénéa**, S. Derenne, F.J. Gonzalez-Vila, J.A. Gonzalez-Pérez, A. Mariotti, C. Largeau (2006)« *Double-shot pyrolysis of the non-hydrolysable organic fraction isolated from a sety forest soil (Letes de Gascogne, south-west France). Comparison with classical Curie point pyrolysis* ». Journal of Analytical et Applied Pyrolysis, vol 76, Issue 1-2, 271-279
- 9- C. Rumpel, N. Rabia, S. Derenne, **K. Quenea**, K. Eusterhues, I. Kögel-Knabner et A. Mariotti, (2006)« *Alteration of soil organic matter following treatment with hydrofluoric acid (HF)* Organic Geochemistry, vol.37, 1437-1451
- 10- **K. Quenea**, I. Lamy, P. Winterton, A. Bermond, C. Dumat (2009) *Interactions between metals et soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water »* Geoderma, Vol. 149, 217-223
- 11- **K. Quénéa**, J. Mathieu, S. Derenne (2012) « *Soil lipids from accelerated solvent extraction: Influence of temperature et solvent on extract composition* », Organic geochemistry, vol 44, 45-52.
- 12- Abbadie L., Baldy V., Barré P., Chevaldonné P., De Wit R., Fernetz C., Guarini , J.M., Jouanneau I., Lacroix G., Le Bris N., **Quenea K.**, Pérez T., Rochelle Newall Emma. (2012) Conférence paper : Ecogéochimie In : Hossaert M. (ed.), Barthes . Ateliers de Prospectives sur l'Ecologie Chimique : Atelier 7.. p. 31-35. (Les Cahiers Prospectives - CNRS).

- 13- Thanh Thuy Nguyen Tu, Philippe Biron, Patricia Richard, Bernd Zeller, **Katell Quénéa**, Marie Alexis, Gérard Bardoux, Véronique Vaury, Cyril Girardin, Valérie Pouteau, Nicolas Péchot, Daniel Billiou, Kadmiel Maseyk, Céline Lett, Brian Fry & Thierry Bariac, (2013) “*Variability of ¹³C-labeling in plant leaves*” Rapid communication in mass spectrometry, vol 27, 1961-1968 DOI: 10.1002/rcm.6650
- 14-M. Shahid, T. Xiong, N. Masood, T. Leveque, **K. Quenea**, A. Austruy, Y. Foucault, C. Dumat. (2014) Influence of plant species et phosphorus amendements on metal speciation et bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food chain contamination. Journal of Soils et Sediments 14, 655-665. DOI: 10.1007/s11368-013-0745-8
- 15- S. Derenne et **K. Quénéa**, (2015) Analytical pyrolysis as a tool to probe soil organic matter. Journal of Analytical et Applied Pyrolysis vol 111, 108-120 DOI : 10.1016/j.jaap.2014.12.001
- 16-V. Chaplot, K Abdalla; H Bourennane; F Darboux; P Dlamini; C Everson; C MChunu.; D Muller-Nedebock D; M Mutema; **K Quenea**; H Thenga, Msc; P Chivenge. (2015) Surface organic carbon enrichment to explain greater CO₂ emissions from short-term no-tilled soils. Journal of Agriculture, Ecosystems et Environment, 203, 110-118
- 17- A.Vidal, L. Remusat , F. Watteau, S. Derenne, **K. Quenea**.(2016) Incorporation of ¹³C labelled shoot residues in Lumbricus terrestris casts: A combination of Transmission Electron Microscopy et Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry. Soil Biology et Biochemistry, 93; 8-16
- 18- Mathieu Lejay, Marie Alexis , **Katell Quénéa**, Farid Sellami, François Bon (2016) *Organic signatures of fireplaces: experimental for archaeological interpretations*, Organic geochemistry
- 19- A Vidal, **K. Quenea**, M. Alexis, S. Derenne (2016) *Molecular fate of root et shoot litter on incorporation et decomposition in earthworm casts* Organic Geochemistry, 101, 1-10
- 20- A. Vidal, **K. Quenea**, M Alexis, TT Nguyen Tu,-J. Mathieu, V. Vaury, S. Derenne (2017) *Fate of ¹³C labelled root et shoot residues in soil et anecic earthworm casts: A mesocosm experiment*, Geoderma, 9-18
- 21- Pierre Barre, **Katell Quénéa**, Alix Vidal, Lauric Cécillon, Bent T Christensen, Thomas Kätterer, Ety Macdonald, Léo Petit, Alain F Plante, Folkert van Oort, Claire Chenu (2018) *Microbial et plant-derived compounds both contribute to persistent soil organic carbon in temperate soils*, Biogeochemistry, 140(1), 81-92.
- 22- **K. Quénéa** I. Andrianjara, A. Rankovic E. Gan E. Aubry J-C. Lata, S. Barot, M. Castrec-Rouelle (2019) *Influence of the residence time of street trees and their soils on trace element contamination in Paris (France)*, Environmental Science and Pollution Research, accepté
- 23- Chaplot, V., Darboux, F., Alexis, M., Cottenot, L., Gaillard, H., **Quenea, K.**, & Mutema, M. (2019). Soil tillage impact on the relative contribution of dissolved, particulate and gaseous (CO₂) carbon losses during rainstorms. *Soil and Tillage Research*, 187, 31-40.
- 24- A. Vidal, F. Watteau, L. Remusat, C.W. Mueller, T. T. Nguyen Tu, F. Buegger, S. Derenne, **K. Quenea** (sous presse) *Earthworm cast formation and development: a shift from plant litter to mineral associated organic matter*. Frontiers

Communications orales :

Congrès internationaux (7):

1- 225th meeting de l'American Chemical Society, Symposium "Molecular studies of soil organic matter", New Orleans, 23-27 mars 2003: « *Variation in lipid abundance et composition among different particle-size fractions of a forest soil* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau , C. Rumpel et A. Mariotti.

2- Meeting on mechanisms et regulation of organic matter stabilisation in soil, Munich, 5-8 Octobre 2003 : « *Sources et relative preservation of lipids in different particle-size fractions of a cropped et a forest soil: influence of cropping on lipids* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau , C. Rumpel et A. Mariotti.

3- Eurosoil 2004, Freiburg, 4-12th September 2004: « *Origin et structure of soil refractory organic matter from a forest soil before et after conversion to arable soil* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau , C. Rumpel, A. Mariotti, F.J. Gonzalez-Vila, P. Schaeffer et P. Albrecht.

4-EGU 2014, Vienne

Characterisation of Organic Matter Preserved in Earths Using Micromorphological et Chemical Analysis. Initial Results from Two Prehistoric French Sites: Les Bossats et Régismont-le-Haut. Mathieu Lejay, Marie Alexis, **Katell Quenea**, Farid Sellami , Pierre Bodu, Henri-Georges Naton , Ligia Vassiliu, Gaëlle Dumarça, François Bon, et Romain Mensan

5th symposium on soil organic matter, Göttingen:

5-*Incorporation of ¹³C labelled shoot residues in Lumbricus terrestris casts: A combination of Transmission Electron Microscopy et Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry* Alix Vidal, Laurent remusat, francoise Watteau, Sylvie Derenne, **Katell Quenea**

6-*Incorporation of ¹³C labelled root-shoot residues in soil in the presence of Lumbricus terrestris: An isotopic et molecular approach* Alix Vidal, **Katell Quenea**, Marie Alexis, Thanh Thuy Nguyen Tu, Véronique Vaury, Christelle Anquetil, Sylvie Derenne

7. EGU, vienne 2016: Spatial et temporal distribution of ¹³C labelled plant residues in soil aggregates et *lumbricus terrestris* surface casts: a combination of transmission electron microscopy et nanoscale secondary ion mass spectrometry. Alix Vidal, Laurent Remusat, Françoise Watteau, Sylvie Derenne, **Katell Quenea**

Congrès nationaux (8) :

1- 5^{ème} colloque français sur la matière organique naturelle organisé sous l'égide du groupe français de l'IHSS, session dynamique et renouvellement de la matière organique naturelle), Clermont-Ferret, 26-28 Mars 2003 : « *Influence de la granulométrie sur les lipides de sols des Letes* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau , C. Rumpel et A.Mariotti

2- 6^{ème} colloque français sur la matière organique naturelle organisé sous l'égide du groupe français de l'IHSS, session structure et caractérisation des matières organiques naturelles, Reims, 13-15 Octobre 2004 : « *Isolement et quantification de la matière organique réfractaire et des carbonisats d'un sol forestier* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau , C. Rumpel, C. Carcaillet, O. Gustafsson et A.Mariotti

3- 8^{ème} journée nationale d'étude des sols, Gradignan, 26-28 Octobre 2004 : « *Caractérisation de lipides extraits de différentes fractions granulométriques d'un sol forestier et d'un sol cultivé* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau et A.Mariotti

4- 14^{ème} congrès français de sédimentologie, Paris, 4-8 Novembre 2013 :

Différenciation micromorphologique et géochimique des modes d'occupation du sol : premiers résultats sur des anthroposols archéologiques (roissy-en-france, xiième-xvième s.) Cécilia Cammas, **Katell Quénéa**, Amy Bell, Xavier François

5- Ateliers d'été de l'Agriculture urbaine et de la Biodiversité Natureparif, Paris, 30 juin au 2 juillet : *Estimation des concentrations en éléments traces métalliques dans les sols et feuilles d'une chronoséquence de plantations d'alignement parisiennes : conséquences pour le recyclage des sols et*

l'utilisation du compost de feuilles en agriculture urbaine, Iry Etrianjara, Aleksetar Rankovic, Jean-Christophe Lata, Maryse Rouelle, **Katell Quenea**

6- Communication à la deuxième Journée d'Écologie Urbaine, juillet 2014, Paris:

Estimation des concentrations en éléments traces métalliques dans les sols et feuilles d'une chronoséquence de plantations d'alignement parisiennes : conséquences pour le recyclage des sols et l'utilisation du compost de feuilles en agriculture urbaine, Rankovic, A., Etrianjara, I., Lata, J.-C., Castrec Rouelle, M., **Quenea, K.**

7- Journée d'Etude des Sols, Bourget du Lac (73) – Juillet 2014.

*"Influence de vers de terre (*Lombricus terrestris*) sur l'incorporation de biomasses végétales marquées (^{13}C) dans un sol en conditions contrôlées"* Vidal Alix, **Quenea Katell**, Alexis Marie, Nguyen Tu Thanh Thuy, Mathieu Jérôme, Vauray Véronique et Derenne Sylvie.

8- Colloque du réseau matière organique, Tregastel (22), février 2018:

"Signature organique des foyers archéologiques - Application au site Aurignacien de Régismont-le-Haut" Mathieu Lejay, Quenea Katell; Alexis, Marie;

Posters :

Congrès nationaux (8)

1- Exposition Pollutec, Paris, Novembre 2001 : « *Influence de l'épétage d'eaux usées sur la qualité des sols agricoles de la région d'Achères* ». **K. Quénéa**, A. Bermond, C. Dumat.

2- Journée Pb de l'APESA (Assoc. pour l'Environ. Sud Aquitain), Pau, 25 Septembre 2003: « *Influence de l'épétage d'eaux usées sur la qualité des sols agricoles de la région d'Achères; Etude des éléments traces métalliques (Pb, Zn et Cu)* ». C. Dumat, **K. Quénéa**, S. Bourgeois et A. Bermond.

3- Deuxième colloque de restitution scientifique, session 'quoi de neuf sur les matières organiques', Toulouse 3-5 décembre 2007 : *Processus de stabilisation des matières organiques dans les horizons profonds des sols sous prairie ou culture. Ecosphère continentale.* Rumpel, C., Amblès, A., Caner, L., Chabbi, A., Chenu, C., Croué, J.-P., Hubert, F., Kögel-Knabner, I., Lavaud, A., Lemée, L., Moni, C., Nunan, N., **Quénéa, K.**, Rogeon, H., Salomé, C

4- 14^{ème} congrès français de sédimentologie, Paris, 5-7 novembre 2013 : différenciation micromorphologique et géochimique des modes d'occupation du sol : premiers résultats sur des anthroposols archéologiques (roissy-en-france, xiième-xvième s.) Cécilia Cammas, **Katell Quénéa**, Amy Bell, Xavier François

5- La matière organique comme marqueurs de l'usage des sols dans les milieux pléistocènes anthropisés. Farid Sellami, Mathieu Lejay, Marie Alexis, **Katell Quenea**, Cécilia Cammas

6- Approches croisées pour la détermination de la matière organique conservée dans les foyers préhistoriques : micromorphologie et chimie organique. Mathieu Lejay Marie Alexis, **Katell Quenea**, Farid Sellami, François Bon, Romain Mensan, Pierre Bodu, Gaëlle Dumarçay

7- Journée écologie urbaine, Paris, juin 2014 : *Estimation des concentrations en éléments traces métalliques dans les sols et feuilles d'une chronoséquence de plantations d'alignement parisiennes : conséquences pour le recyclage des sols et l'utilisation du compost de feuilles en agriculture urbaine.* Aleksetar Rankovic, Iry Etrianjara, Jean-Christophe Lata, Maryse Castrec Rouelle, **Katell Quenea**

8- Colloque du réseau matière organique, Tregastel (22), février 2018:

*"Incorporation de racines et de parties aériennes marquée au C dans le sol en présence de *Lumbricus terrestris*: une approche isotopique et moléculaire,* Vidal, Alix; Quenea Katell; Alexis, Marie; Nguyen, Tu Thanh Thuy; Anquetil, Christelle; Derenne, Sylvie

Congrès internationaux (26):

1- 3rd European meeting on environmental chemistry, Genève (Suisse), Décembre 2002: « *Abundance et chemical features of organic matter in particle size fractions of a forest soil* ». **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, O. Gustafsson, C. Rumpel et A. Mariotti.

21st International meeting on organic geochemistry, Cracovie (Pologne), 8-12 Septembre 2003:

- 2- - « *Variation in lipid abundance et composition among different particle-size fractions of a cropped et a forest soil* » **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, C. Rumpel et A. Mariotti.
- 3- -« *Chemical structure of refractory organic matter from a forest et a maize cropped soil investigated by thermal et chemical degradations* » **K. Quénéa**, F.J.Gonzalez-Vila, S. Derenne, O. Polvillo, C. Largeau, C. Rumpel et A. Mariotti.
- 4- Meeting on mechanisms et regulation of organic matter stabilisation in soil, Munich (Allemagne), 5-8 Octobre 2003 : « *Changes of the chemical composition of organic matter after treatment with 10%HF* » N. Rabia, C. Rumpel, S. Derenne, K. Eusterhues, I. Kögel-Knaber, C. Girardin, **K. Quénéa**, A. Mariotti
- 16th International symposium on analytical et applied pyrolysis, Alicante (Espagne), 23-27 Mai 2004:
- 5- -« *Comparison between direct Curie point pyrolysis et “double-shot” pyrolysis on a forest soil refractory organic residue*». **K. Quénéa**, J.A. Gonzalez, F.Gonzalez-Vila, S. Derenne, C. Largeau, C. Rumpel et A. Mariotti
- 6- - « *Comparison between TMAH pyrolysis et ruthenium tetroxide oxidation of soil refractory organic matter* » **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, P.Schaeffer, P. Albrecht et A. Mariotti
- 7- 5rd European meeting on environmental chemistry, Bari (Italie), Décembre 2004 : « *Quantification et caractérisation of refractory organic matter et black carbon from a forest soil* » **K. Quénéa**, S. Derenne, C. Largeau, C. Rumpel, C. Carcaillet, O. Gustafsson et A. Mariotti
- 8- European geosciences union, Vienne (Autriche), Avril 2005: “*Characterisation et quantification of black carbon (BC) in forest et cultivated sety soils. Parallel study on reference chars of the BC ring trial*” **Quénéa, K.**; Derenne, S.; Largeau, C.; Rumpel, C.; Rouzard, J.N.; Gustafsson, O.; Carcaillet, C
- 9- 22st International meeting on organic geochemistry, Séville (Espagne), 11-16 Septembre 2005: “*Black carbon characterisation et quantification in the refractory organic macromolecular fraction of forest et cultivated soils*”. **Quénéa, K.**; Derenne, S.; Largeau, C.; Rumpel, C.; Rouzard, J.N.; Gustafsson, O.; Carcaillet, C.
- 10- International symposium on organic matter dynamics in agro-ecosystems, Poitiers (France), 16-19 Juillet 2007: “*Turnover of free et bound lipids in an agricultural soil profile*”. Mendez-Millan, M., **Quénéa, K.**, Dignac, M-F., Rumpel, C., Derenne, S.
- 11- European geosciences union, Vienne (Autriche), Avril 2008 : “*accelerated solvent extraction: influence of solvents et extraction condition on lipids extracted from three different soils* ». **Quénéa, K.**; Derenne, S.
- 12- European geosciences union, Vienne (Autriche), Avril 2011 : “*Hint of our ancestor’s fire uses: Step 1. Characterization of experimental fire residues*”. Marie Alexis, **katell Quénéa**, Farid Sellami.
- 6th ISMOM, Montpellier, juin 2011:
- 13-“*Dynamic of soil structuration by earthworms - Influence of earthworms on soil organic matter composition et bacterial communities* ». **Katell Quenea**, Gael Caro, Marie Alexis, Jérôme Mathieu
- 14-“*What is the chemical nature of stable carbon ? Using soils from a long term bare fallow to answer this question.*” Suzanne Lutfalla, **Katell Quénéa**, Folkert Van Oort, Claire Chenu
- Eurosoil, Bari (Italie), juillet 2012 :
- 15-« *Variability of ¹³C-labeling in plant tissues*” **Katell Quénéa**, Thanh Thuy Nguyen Tu, Marie Alexis, Thierry Bariac, Philippe Biron, Patricia Richard
- 16-« *Nature of precursors, a key factor of biochar quality*” Naisse C., Alexis M.A., **Quénéa K.**, Anquetil C., Rumpel C
- 17- JESIUM (joint european stable isotope users group meeting) 2012, Leipzig (Allemagne) septembre 2012: “*variability of ¹³c-labeling in plant leaves, implication for biogeochemical studies.*” Nguyen Tu T.T., Biron P., **Quénéa K.**, Richard P., Alexis M., Lett C., Maseyk K., Bardoux G., Billiou D., Girardin C., Vauray V., Bariac T., et Derenne S.
- International meeting on organic geochemistry 2013, Tenerife (Espagne):
- 18-“*geochemical characterization of medieval soil let use : application to roissy en france archaeological site (france)*” **Katell Quenea**, Cécilia Cammas, Marie Alexis et Xavier Francois

19 Consideration of dissolved organic matter in assessment of soil organic matter dynamics through labeling experiment. Alexis M.A., **Quénéa, K.**, Nguyen Tu T.T.¹, Vaury V., Biron P., Richard P. Et Bariac T.

20- Variability of ¹³C-labeling in plant tissues, implication for biogeochemical studies. Thanh Thuy Nguyen Tu, Philippe Biron, **Katell Quenea**, Marie Alexis, Patricia Richard, Bernd Zeller, Céline Lett, Kadmiel Maseyk, Véronique Vaury, Gérard Bardoux, Valérie Pouteau, Cyril Girardin, Nicolas Pechot, Daniel Billiou, Katia Grira & Thierry Bariac

21- European geosciences union, Vienne (autriche), avril 2015 : Massive processing of pyrochromatogram mass spectra (py-gcms) of soil samples using the parafac2 algorithm. Lauric Cécillon, P. Barré, **K.Quénéa**, C Anquetil

22-imog, prague, 2015: incorporation of ¹³c labelled litter in the soil in the presence of earthworms. An isotopic et molecular approach. Alix vidal, **katell quenea**, marie alexis, thanh thuy nguyen tu, véronique vaury, christelle anquetil, sylvie derenne

23- European geosciences union, Vienne (autriche), avril 2016: Incorporation of ¹³C labelled root-shoot residues in soil in the presence of Lumbricus terrestris: An isotopic et molecular approach. Alix Vidal, **Katell Quenea**, Marie Alexis, Thanh Thuy Nguyen Tu, Sylvie Derenne.

24- Goldschmidt, Paris (France), aout 2017 : are lipids better preserved in earthworm casts compared to soils? A mesocosm experiment with ¹³c-labeled litter T.T. Nguyen Tu, A. Vidal, **K. Quenea**, M. Mendez, E. Canolle, A.S Permal, S. Derenne

6th symposium on soil organic matter, Rothamsted (Grande-Bretagne):

25- Carbon transfer from root et shoot litter to microorganisms in earthworm casts –TEM et NanoSIMS analyses. Vidal A., Watteau F., Remusat L., Nguyen Tu T.T., Derenne S., **Quenea K.**

26- The energetic et chemical fingerprints of persistent soil organic carbon, Barré P, Baudin F., Bernard S., Cécillon L., Christensen B.T., Fernet J.M., Houot S., Kätterer T., Lutfalla S., Macdonald A., van Oort F., Plante A.F., **Quénéa K.**, Vidal A., Chenu C.

Annexe : Sélection de publications

Variation in lipid relative abundance and composition among different particle size fractions of a forest soil

Katell Quenea^{a,b}, Sylvie Derenne^{a,*}, Claude Largeau^a, Cornélia Rumpel^b,
André Mariotti^b

^a *Laboratoire de Chimie Bioorganique et Organique Physique, UMR 7573, CNRS/ENSCP, 11 rue P.M. Curie, 75231 Paris cedex 05, France*

^b *Laboratoire de Biogéochimie Isotopique, CNRS/INRA/UPMC, Paris, France*

Received 20 October 2003; accepted 9 March 2004

(returned to author for revision 19 January 2004)

Available online 11 September 2004

Abstract

Most studies of soil organic matter are on humic substances although a substantial contribution of lipids is generally noted for soils. Moreover, soil lipids were shown to have a relatively high resistance to biodegradation. Thus, they could provide information on organic matter sources and diagenetic processes. Soil organic matter is highly heterogeneous and different dynamic pools are evidenced. However the links between these pools and molecular structure have not yet been established. Soil lipids were investigated in three particle-size fractions of a forest soil. Lipids were shown to be preferentially located in the finest fraction. GC-MS analysis of free lipids has revealed different main sources depending on the particle-size fraction and differential degradation. Furthermore, the results obtained for the free lipids on the one hand, and the saponified lipids on the other hand, have indicated that different preservation mechanisms for lipids occur in this soil.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Soil organic matter (SOM) is known to be an important pool of carbon on Earth, estimated at about 1500×10^{12} kg of carbon (Eswaran et al., 1993; Alperin et al., 1995; Amundson, 2001) and it plays a central role in the biochemical cycling of carbon. This organic matter (OM) is usually considered as consisting of three pools with different residence times: the first with a fast turnover (few years), the second with a low turnover (several decades) and the third considered as stable (up to millennia). The latter two pools are of prime importance because any

increase in their turnover rate would result in a partial transfer of the large amount of carbon presently stored in the soil to the atmosphere. However, so far no link between these kinetic pools and molecular structure has been established. This may be mainly due to the complexity of the SOM and the high diversity of its constituents, and hence differences in chemical stability.

SOM is a complex mixture originating from a large variety of plant-, animal- and microorganism-derived compounds with a high structural diversity. These compounds are more or less decomposed and transformed into highly polymerised degradation and de novo synthesis products. The precise origin and pathways of transformation of soil organic substances at the molecular level are still far from being understood. Most of the studies so far performed on SOM have been concerned with the humic and fulvic acids and, to a lesser extent, humin. Whereas lipids have been extensively studied in

* Corresponding author. Tel.: +33-1-4329-5102; fax: +33-1-4325-7975.

E-mail address: sylvie.derenne@enscp.jussieu.fr (S. Derenne).

sediments to derive information on OM sources and early diagenesis (e.g., Meyers and Ishiwatari, 1993), only a more limited number of studies has been performed on lipids extracted from soil (Amblès et al., 1989a,b, 1991; Jambu et al., 1991, 1993; Jaffé et al., 1996; Van Bergen et al., 1997; Bull et al., 2000). However, soil lipids were shown to exhibit a relatively high resistance to degradation, hydrophobic properties and reactivity with polyvalent cations which make them likely to play an important role in soil characteristics such as stability or water retention (Dinel and Schnitzer, 1990). Lipids are also useful biomarkers and their study can provide extensive information about the different sources of the SOM and their degradation or preservation mechanisms. Moreover, soil lipids usually account for 4–8 wt% of the soil organic carbon but higher quantities reaching 30 wt% according to Jambu et al. (1978) or 42 wt% according to Preston et al. (1987) have been reported. Lipids accumulate in soil with increasing acidity, anaerobiosis and soil dryness (Dinel and Schnitzer, 1990).

SOM is highly heterogeneous and more homogeneous fractions are commonly separated by particle size fractionation. OM and amorphous minerals are cemented together and form organo-mineral compounds (see e.g., Christensen, 1996), whereby they can be physically isolated according to their size. Particle-size fractionation is a non-destructive method which separates compartments where similar mineralization rates and residence times are observed. The carbon content was shown to increase as the particle size decreases whereas the C/N atomic ratio and the turnover rate decrease, the oldest OM thus belonging to the clay fraction (Anderson et al., 1981; Christensen, 1987; Feller et al., 1991a; Schulten et al., 1993; Andreux and Munier-Lamy, 1994; Buyanovsky et al., 1994; Cayet and Lichtfouse, 2001). However, as far as we are aware, no study or comparison of the lipids from soil particle-size fractions has been reported. In the present work, we examined the abundance and chemical composition of the lipids of three particle-size fractions of a forest soil: sand (2000–50 μm), silt (50–2 μm) and clay (<2 μm).

2. Experimental

2.1. Soil and sampling

The soil was sampled in March 1997 in a pine (*Pinus pinaster*) forest located near to Cestas (South-west France) as described by Jolivet et al. (2003) in order to obtain a representative sample. In short, it corresponds to a composite sample obtained through mixing 114 samples collected on a grid.

This sandy soil classified as a spodosol has been regularly fertilized by inorganic fertilizer for about 40

years for wood production (Jolivet, 2000). Coarse fresh plant debris was removed by a initial sieving at 2 mm.

The soil is characterized by a total organic carbon content (TOC) of 2.6%, nitrogen content of 0.09% resulting in a C/N atomic ratio close to 30 and a pH of 4.3.

2.2. Particle size fractionation

Prior to particle size fractionation, the soil aggregates were disrupted by ultrasonic dispersion in water. This procedure does not affect the chemical structure of OM as demonstrated by Schmidt et al. (1997) and allows the examination of the nature of OM within aggregates (Gregorich et al., 1988). The ultrasonic energy applied was 500 J ml⁻¹ in order to obtain the total dispersion of the aggregates while avoiding artefact formation (Schmidt et al., 1999). The sand fraction was separated by wet sieving from 1 kg of bulk soil and dried. The washings were retained, combined and thereafter the silt and the clay were separated by sedimentation. For separating the clay, the sand-free soil was thoroughly stirred in 1000 ml of water and allowed to settle for 16 h (settling time calculated by applying Stoke's law and a particle density of 2.65 g cm⁻³). Then the supernatant was siphoned off and the clay recovered by centrifugation (10,000 rpm, 1 h). Water was again added to the sedimented (silt-enriched) material and this whole process repeated 20 times. Drying of the combined centrifuged materials and of the settled material from the last repetition afforded the clay and silt fraction, respectively. The three dried fractions were weighed and their TOC content measured with a CHN autoanalyser (CHN NA 1500, Carlo Erba). As commonly assumed for forest soil, the amount of organic matter was considered as twice the organic carbon content (Duchaufour, 2001).

2.3. Free lipid isolation and derivatization

The bulk soil and the three particle-size fractions were extracted with a mixture of dichloromethane/methanol (2/1, v/v) using 6 ml of solvent per gram of soil and stirring for 18 h, at room temperature, prior to centrifugation for 15 min at 3000 rpm; this extraction was repeated three times and the supernatants were combined. The lipids were finally concentrated with a rotary evaporator. The total lipids extracted from each particle size fraction were directly analyzed using combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Aliquots were separately submitted to silylation, methylation, saponification and separation by thin layer chromatography before further GC-MS analysis. Silylation was performed in pyridine with chloromethylsilane and hexamethyldisilane (Sweetley et al., 1963). Methylation was performed in methanol with a few drops of acetyl chloride by refluxing for 1 h. Saponification was carried out under nitrogen by refluxing for 6 h with KOH 6% in methanol/distilled water (9/1,

v/v) then stirring overnight at room temperature. The saponified lipids were extracted with chloroform after acidification with HCl. They were methylated and silylated as described above. For thin layer chromatography separation, an aliquot of the total lipid was eluted with ether/heptane (12/100, v/v) and the less polar fraction was recovered.

2.4. Combined gas chromatography-mass spectrometry

GC-MS analysis was performed using a HP 5890 gas chromatograph fitted with a 25 m, 0.32 mm i.d., CPSil 5 CB capillary column; the temperature of the GC injector was 250 °C and that of the oven was programmed from 100 to 300 °C at a rate of 4 °C min⁻¹. The GC was coupled to a HP mass spectrometer operated at 70 eV (mass range m/z 40–600 with a cycle time of 0.7 s).

3. Results and discussion

3.1. Mass balance

In agreement with the sandy nature of the Cestas soil, particle-size fractionation showed that the sand fraction accounts ca. 90 wt% of the whole soil (Table 1). However, this fraction is very poor in organic matter (1.4 wt%) whereas the silt and clay ones are largely composed of organic matter (ca. 48 and ca. 67 wt%, respectively). Such an OM enrichment in the fine fraction of soil is classically observed (Gregorich et al., 1988, 1989; Feller et al., 1991b; Hassink et al., 1993; Andreux and Munier-Lamy, 1994; Buyanovsky et al., 1994; Christensen, 1987, 1996; Schmidt et al., 1999).

Lipid abundance in each size fraction, as wt% of the total mass of this fraction, exhibits large differences and ranges from a very low value of 0.1% for the sand fraction up to ca. 16% for the clay fraction. These lipids account for 7 to ca. 23 wt% of bulk organic matter depending on the fraction. When the absolute amounts of lipids are considered, a substantially lower value is noticed for the sand fraction compared to the silt and clay ones. Lipid enrichment thus occurs in the finest fractions, especially in the clay one.

3.2. Molecular composition

So as to determine whether differences in lipid content between the three particle size fractions are associated with differences in molecular composition, each lipid extract was analysed by GC-MS. The total ion current (TIC) traces are complex but similarities are observed between those of the two fine fractions, in contrast with that of the sand fraction (Fig. 1). Amides, carboxylic acids, methyl esters of fatty acids, and alkanes are the main series observed in the three fractions although with different relative abundances and distributions. Their distribution is described and their origin discussed below along with that of the ketones which are only present in the two fine fractions.

So as to get further insight into the hydrocarbon composition, the less polar fraction was separated from the total lipid extract by TLC. Methylation and silylation were also performed to improve the detection of the polar lipids. Finally, high molecular weight lipids which are not GC-amenable and thus cannot be directly analysed were investigated through saponification of the total lipids and further GC-MS analysis.

3.2.1. Free amides

The TIC traces of the lipids from the three fractions are dominated by a C_{22:1} amide which, in the case of the sand fraction, occurs as the major constituent of a series of even carbon numbered unsaturated amides ranging from C_{18:1} to C_{24:1}. The origin of these amides is not clear but, as discussed below, they are likely to be contaminants. Indeed, as far as we are aware, long chain amides have not been reported as higher plant lipids. A C_{22:1} acid, named erucic acid, occurs in the lipids of some higher plant seeds such as Cruciferae (Padley et al., 1992) but such plants are not growing in the sampling site. Moreover, there is no relationship between the distributions of the acids and amides, which precludes a common origin. In addition, erucylamide was found as a water contaminant originating from poly(ethylene) (Impact analytical, www.impact-analytical.com). In consequence, the amides observed in the lipids of the Cestas soil should originate from contamination by such products. However, when the

Table 1
Quantitative features from particle-size fractionation and lipid extraction

	Relative abundance of the size fractions (wt% of total soil) ^a	OM abundance in each size fraction (wt% of the total fraction)	Lipid abundance in each size fraction (wt% of the total fraction)	Lipid abundance in each size fraction (wt% of the total OM in the fraction)	Absolute amount of lipids (mg) from 1 kg of soil
Sand	90.2	1.4	0.1	7.1	900
Silt	6.7	48.4	3.4	7	2280
Clay	2.3	67.4	15.8	23.4	3635

^a Together these three size fractions account for 99.2 wt% of the whole soil, indicating negligible loss upon multi-step fractionation.

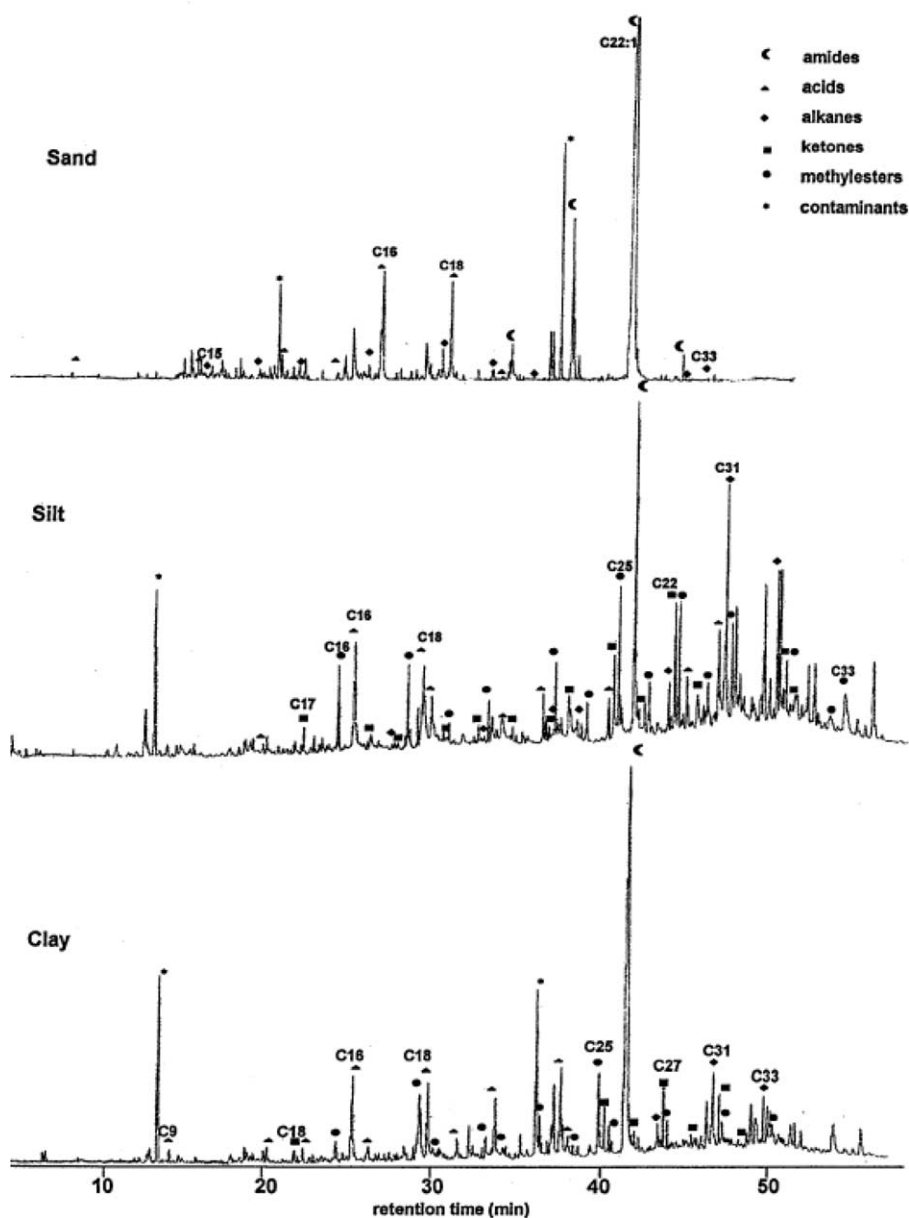


Fig. 1. Total ion current (TIC) trace of the total lipid extracts from the three particle-size fractions.

relative abundance of erucylamide with respect to the total lipids is considered, it shows a maximum in the sand fraction where it accounts for 15% of the GC-amenable products (according to GC integration). However, as reported below, in the study of the saponification products, non GC-amenable compounds represent a rather large proportion of the lipids. As a result, erucylamide should not affect significantly the lipid content reported in Table 1.

3.2.2. Free carboxylic acids

Carboxylic acids were detected in the lipids of the three fractions. In the two fine fractions, these acids occur along with a series of fatty acid methyl esters. It is well documented that methyl esters of fatty acids can be formed during rock extraction with methanol-containing solvents, since methylation is catalysed by various minerals, especially the clayey ones. Accordingly, the methyl esters observed in the present case

probably originate from such a process and they reflect the methylation of a part of the fatty acids during extraction with the dichloromethane–methanol mixture. These esters are therefore be taken into account for determining the distribution of the fatty acids in the extracts. Moreover, long chain fatty acids with more than C_{22} carbon atoms are hardly detected under our usual GC conditions. To overcome these two difficulties, complete methylation of the acids was

therefore performed prior to further GC-MS analysis. The distributions thus obtained for the fatty acids are shown in Fig. 2.

In the three particle-size fractions, the main free fatty acid is the saturated C_{16} one along with the C_{18} one. In addition, large amounts of the C_{20} saturated acid are observed for the silt and clay fractions. Moreover, the distributions of the saturated fatty acids in the lipid extracts show a relative increase in the C_{20+} compounds

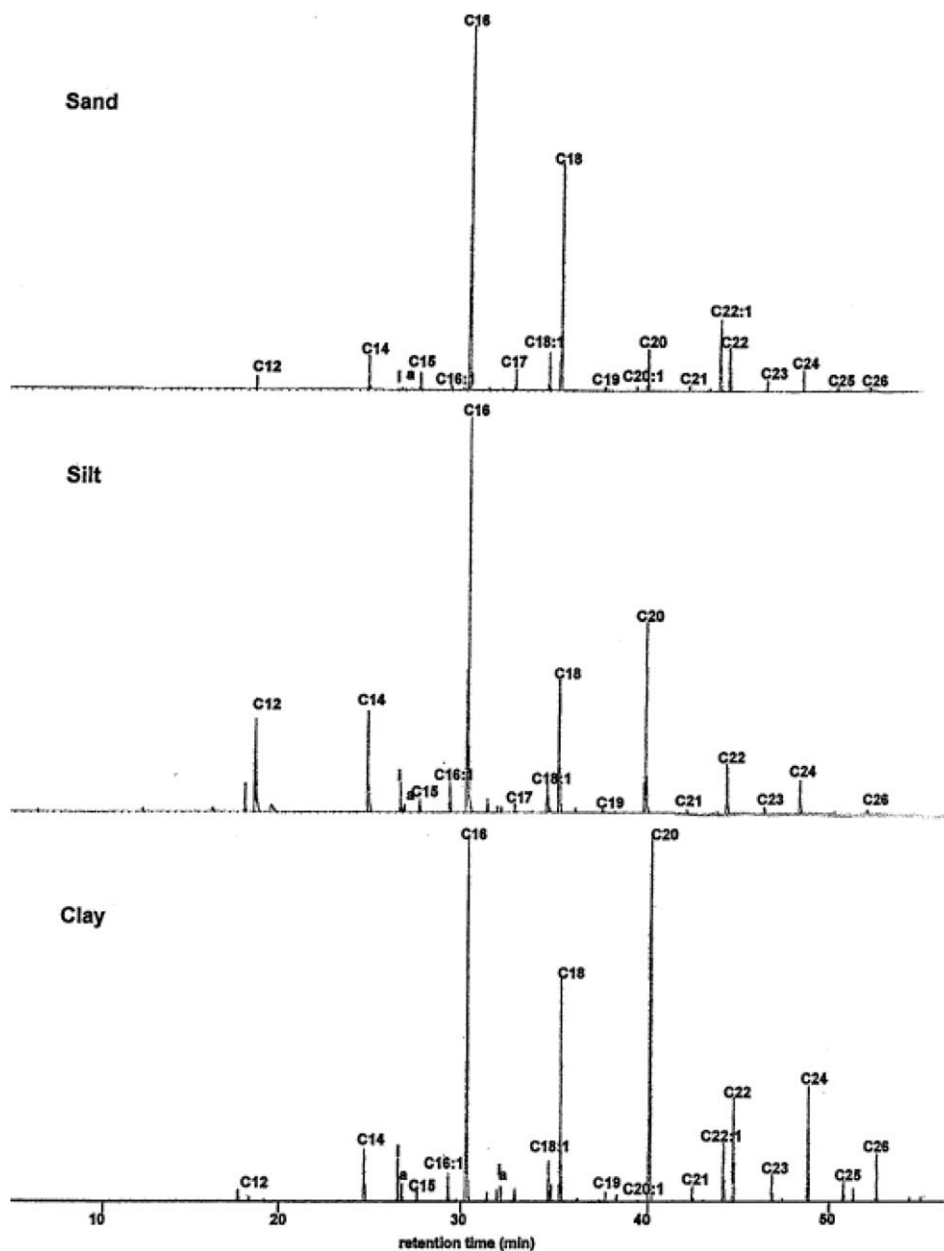


Fig. 2. Ion chromatogram (m/z 74) showing the distribution of the free carboxylic acids as their methyl esters in the total lipid extracts of the three particle-size fractions (a: anteiso-, i: iso-).

with respect to the C_{16} one from the sand fraction to the silt and clay ones. These long chain even-carbon-numbered fatty acids are typical biomarkers of higher plants (Kolattukudy, 1980; Wannigama et al., 1981). The increase in the C_{20+}/C_{20-} ratio from the coarse fraction to the fine ones thus reflects differential contributions of higher plant acids within the free lipids of the particle size fractions, with a maximum relative contribution for the clay fraction.

These saturated fatty acids are characterized by a strong even-over-odd carbon number predominance ($CPI_{12-24} < 0.1$ in sand, silt and clay). This indicates a moderate level of alteration since fatty acids with odd carbon number are considered to be mostly derived from even-carbon-numbered compounds.

Short chain (C_{15} , C_{17}) fatty acids are detected in the three fractions in low amount along with their *iso*- and *anteiso*-isomers. These acids are generally considered as bacterial markers (Boon et al., 1975; Meyers and Ishiwatari, 1993) and their low abundance points to a low contribution of bacterial acids in these free lipids of the size fraction of the Cestas soil.

Some unsaturated fatty acids are also observed (Fig. 2). Although the $C_{16:1}$ and $C_{18:1}$ acids are present in the three extracts, differences are observed between the different particle size fractions. Indeed, no additional unsaturated acid is detected in the silt whereas $C_{20:1}$ and $C_{22:1}$ acids occur in the sand and clay fractions along with a $C_{18:2}$ acid in the latter fraction. The occurrence of unsaturated fatty acids in the three extracts is therefore consistent with the low to moderate level of lipid degradation inferred from the distribution of the saturated acids as shown in marine sediments by Haddad et al. (1992). The presence of a diunsaturated compound in the case of the clay reflects a low level of degradation for this fine-grained fraction. This is in agreement with the lower turnover rate generally observed for the OM in the finest particle size fractions. The occurrence of several unsaturated fatty acids observed for this sand fraction, in spite of its coarse size should reflect the contribution of relatively fresh material. Indeed, poorly humified components are known to be preferentially associated with coarse fractions (Oades et al., 1987; Feller et al., 1991b; Balesdent et al., 1998; Buyanovsky et al., 1994).

C_8 and C_9 diacids are detected in low amounts in the silt and clay lipids. These α , ω diacids are commonly observed in soils where they are considered to be the result of the oxidative degradation of unsaturated lipids such as the ubiquitous oleic acid (Grasset and Amblès, 1998).

Some minor aromatic acids were identified in the lipids from the silt and the clay fractions: hydroxy- and dihydroxybenzoic acids in both cases, methoxybenzoic acid, hydroxymethoxybenzoic acid and cinnamic acid from the silt, benzoic acid from the clay. Benzoic acid is a rather ubiquitous compound in higher plant remains and the other aforementioned aromatic acids are con-

sidered as depolymerisation products of lignin (Young and Frazer, 1987). Lignin is a major polymeric constituent of conifer shoots and needles whose chemical structure is based on phenyl propanoid units (Sarkanen and Ludwig, 1971; Kögel-Knabner et al., 1994) and the aforementioned aromatic acids were shown to occur in the lipid extract of shoots of a fossil conifer infected by fungi (Nguyen Tu et al., 2000). The presence of such acids in the lipid extracts clearly reflects the contribution of lignin degradation products to the silt and clay fractions.

3.2.3. Free hydrocarbons

In order to analyse the hydrocarbons of the lipid extracts, the less polar compounds were separated by thin layer chromatography. The chromatograms of these compounds (Fig. 3) reveal a much wider diversity of alkanes than that directly visible in the chromatograms of the total extracts.

In the sand fraction, the alkanes constitute a highly complex mixture whose distribution pattern shows alkane clusters from C_{14} to C_{33} . These clusters exhibit an odd-over-even carbon number predominance from C_{17} , especially for the long chain C_{25} – C_{33} alkanes. The odd-carbon-numbered long chain *n*-alkanes are typical constituents of higher plant waxes (Tulloch, 1976; Rieley et al., 1991) whereas the shorter compounds are usually considered to reflect a bacterial origin (Han and Calvin, 1969). Such a bacterial contribution is confirmed by the occurrence of many branched alkanes among which are *iso*- and *anteiso*-isomers.

When compared with the sand fraction, the distribution of the alkanes from the silt fraction is characterized by a much simpler pattern. The hydrocarbons mainly correspond to C_{15} – C_{33} *n*-alkanes dominated by odd-carbon-numbered compounds ($CPI_{23-31} = 3.9$), with a maximum at C_{31} . This type of distribution has already been observed in several soils (Morrison, 1969; Amblès et al., 1989a; Jambu et al., 1991; Jaffé et al., 1996; Baas et al., 2000; Bull et al., 2000, 1998) and sediments (e.g., Cranwell, 1981) and reflects a higher plant input.

In the clay fraction, a bimodal distribution is observed, with long chain C_{20+} compounds dominated by odd-carbon-numbered *n*-alkanes maximizing at C_{31} and clusters of shorter (C_{20-}) alkanes corresponding to complex mixtures of branched compounds along with the *n*-isomers. These clusters are similar to those observed in the chromatogram of the hydrocarbons from the sand fraction. The high relative abundance of branched alkanes in addition to the occurrence of short chain linear alkanes points to a bacterial origin for these C_{20-} clusters, whereas the long chain *n*-alkanes are derived from higher plants. When the silt and clay fractions are compared, the main difference is the absence of the aforementioned clusters from the silt hydrocarbons. Short chain compounds are known to be more sensitive

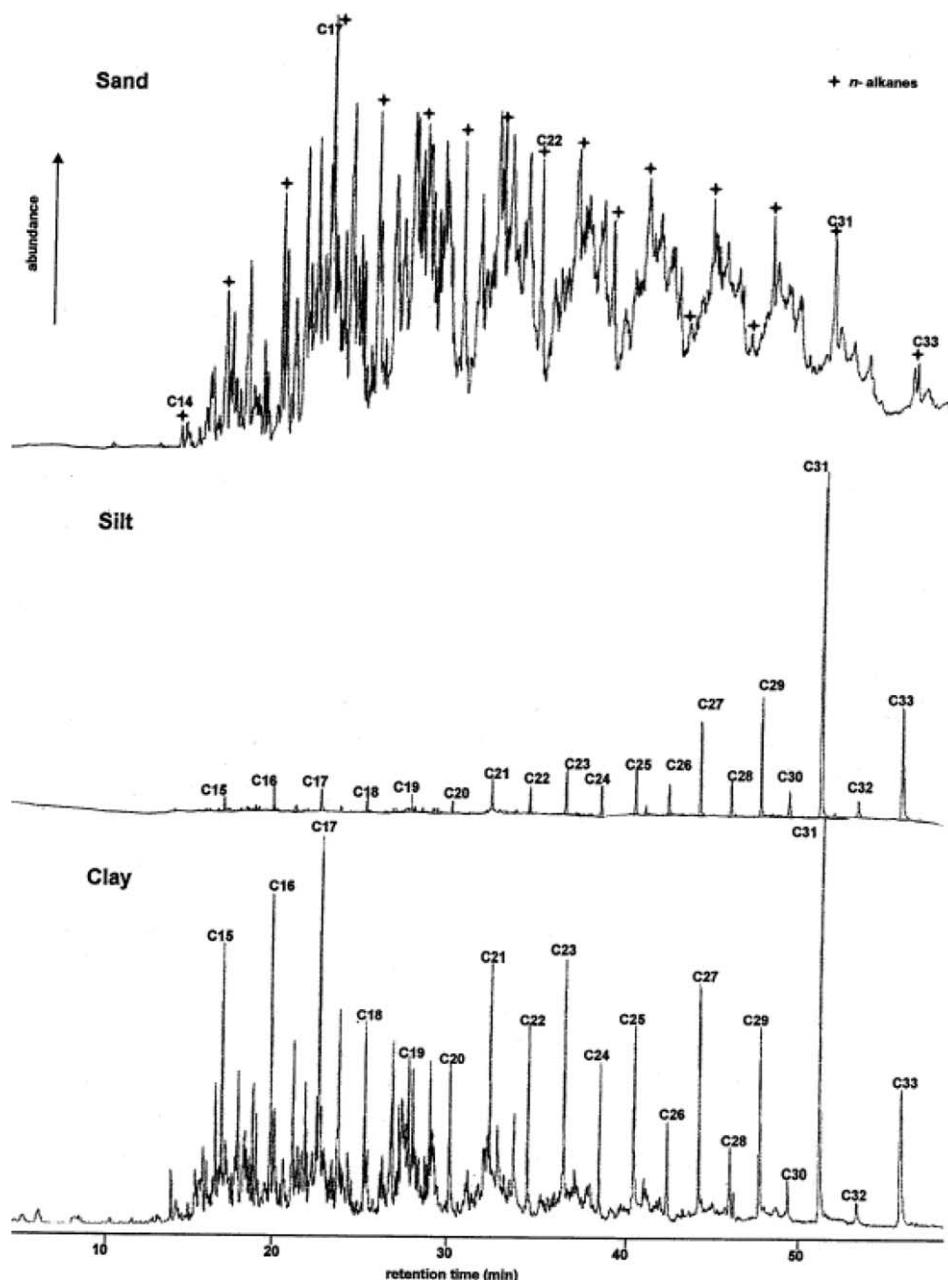


Fig. 3. Ion chromatogram (m/z 57) showing the distribution of the alkanes isolated by TLC from the total lipid extracts of the three particle-size fractions. Alkanes from the sand fraction exhibit complex clusters of isomers.

to biodegradation than long chain homologues (Moucawi et al., 1981). As a result, the distribution of alkanes in the clay likely indicates a better preservation of these hydrocarbons of bacterial origin in clay with respect to silt.

3.2.4. Free ketones

Straight chain alkan-2-ones ranging from C_{17} to C_{31} in the silt (and C_{33} in the clay), with a strong odd-over-

even carbon number predominance ($CPI_{22-30} = 3.5$ in silt and clay) and a maximum at C_{27} were detected in the two fine fractions (Fig. 4). As reported by Rieley et al. (1991), such n -alkan-2-ones have not been detected in lipids from higher plants. However, a similar series of ketones was previously observed by Morrison (1969) and by Jaffé et al. (1996) in soil lipids. In the latter case, the ketones exhibited the same distribution as the n -alkanes and were thus considered as having been formed

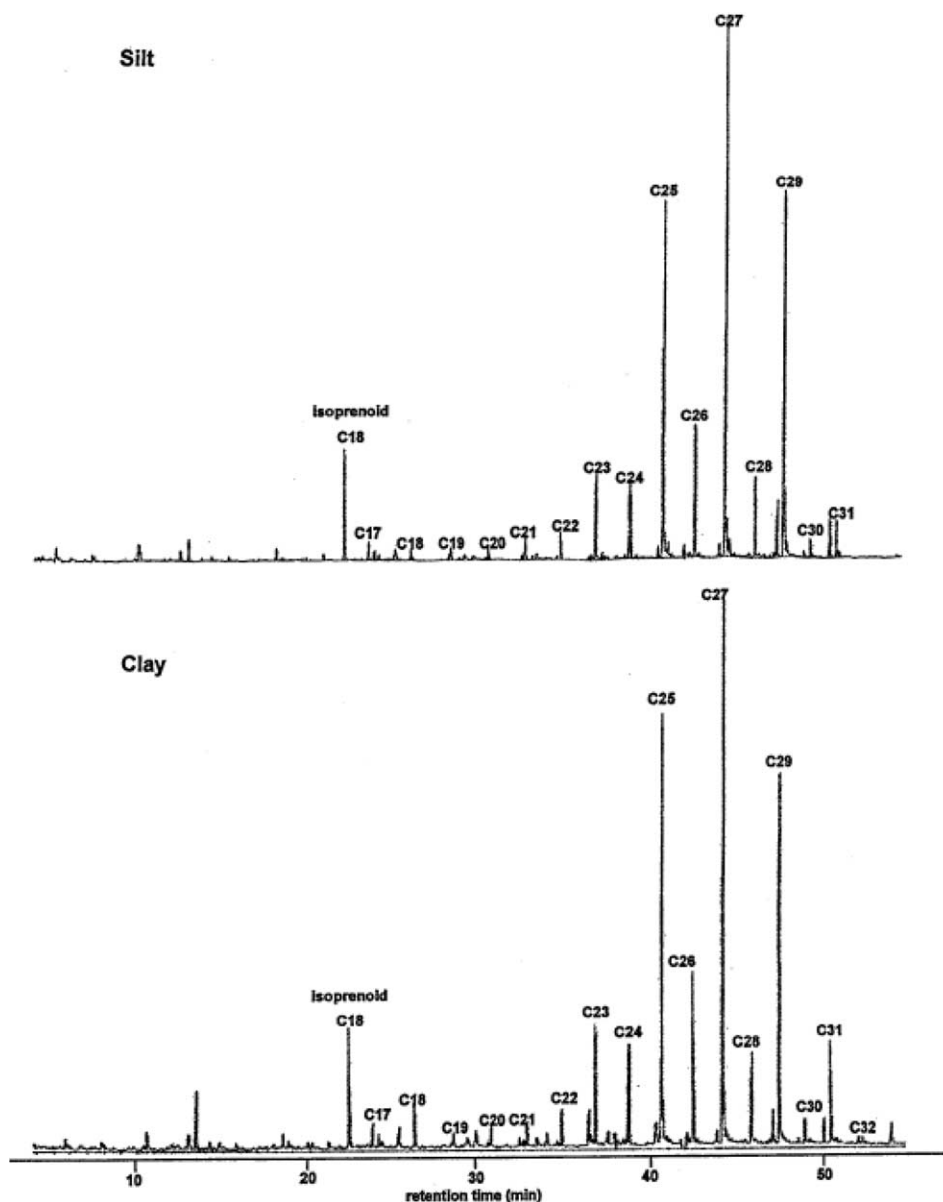


Fig. 4. Ion chromatogram (m/z 58) showing the distribution of the n -alkane-2-ones in the total lipid extracts of the silt and clay fractions.

by bacterial sub-terminal oxidation of the n -alkanes, as commonly assumed for sediments (Jaffé et al., 1996) and soils (Amblès et al., 1989a). Another possible mechanism which was put forward to account for n -alkan-2-one formation is β -oxidation of fatty acids followed by decarboxylation (Amblès et al., 1989a). In the latter case, the distribution of the ketones should correspond to that of the fatty acids, minus one carbon.

In the present study, the distribution of the n -alkan-2-ones, i.e. mainly long chain compounds with a strong

odd-over-even carbon number predominance points to a higher plant origin. However, the ketone series maximize at C₂₇ (Fig. 4) whereas the n -alkanes are characterized by a maximum at C₃₁ in the extracts of the silt and clay fractions (Fig. 3) so that a direct formation by sub-terminal oxidation of the n -alkanes cannot be considered. Similarly, no relationship can be observed between the distribution of the fatty acids (minus one carbon; Fig. 2) and that of the ketones, thus ruling out a formation by fatty acid β -oxidation and decarboxyl-

ation. These ketones can be considered as humification products but a mechanism responsible for their formation has not yet been elucidated. A similar observation has been reported by Volkman et al. (1981) in the study of a coastal marine sediment. Whatever the mechanism for ketone formation is, it seems to be catalysed by the minerals in the soil since the *n*-alkan-2-ones were only detected in the silt and clay fractions and are lacking in the sand fraction in spite of a careful search by selective ion detection. Such a catalytic oxidation has been recently put forward by Faure et al. (2003).

In addition to the *n*-alkan-2-ones, the C₁₈ regular isoprenoid ketone (6,10,14 trimethylpentadecan-2-one) is identified in substantial amounts in the lipids from the silt and clay fractions. This ketone is commonly observed in sediment extracts where it is considered as resulting from the oxidation of the phytol chain of chlorophyll (Ikan et al., 1975; Brooks et al., 1978). It must be noted that no phytol could be identified in these extracts whereas it was reported to occur in large abundance in some rain forest soils (Jaffé et al., 1996).

3.2.5. Free alkanols

Silylation of the total lipids reveals a series of primary *n*-alkanols in the three fractions. Again, sharp differences are observed between the sand fraction, on one hand, and the silt and clay ones on the other hand. Indeed, in the sand, only short chain *n*-alkan-1-ols (C₁₈ and C₂₀) are observed, whereas in the two fine fractions, a series of even carbon numbered *n*-alkan-1-ols (C₁₈–C₃₀ in the silt, C₂₀–C₂₈ in the clay) with a maximum at C₂₂ is present (Fig. 5). Long chain *n*-alkan-1-ols (C₂₀₊) with even carbon numbers have been reported in higher plant leaf waxes (Kolattukudy, 1980; Rieley et al., 1991). Such compounds are commonly observed in soil extracts (Amblès et al., 1989a; Rieley et al., 1991; Jaffé et al., 1996; Van Bergen et al., 1997) sometimes along with shorter homologues. The latter are usually considered to

be of microbial origin. It must be noted that large amounts of C₁₈ and C₂₀ alkanols have been identified in spore waxes (Albro, 1976). The distribution of the *n*-alkan-1-ols thus points to a predominant microbial contribution in the sand fraction, in agreement with the hydrocarbon distribution. In contrast, *n*-alkan-1-ols in the fine fractions of the Cestas soil are mainly of higher plant origin.

3.2.6. Lipid saponification

High molecular weight compounds and/or highly polar lipids are not GC-amenable and thus cannot be directly analysed. Information on the structure of some of the units building up such constituents can however be obtained through lipid saponification, e.g., Amblès et al. (1991).

The saponified extracts obtained from the three particle-size fractions were methylated and silylated prior to GC/MS analysis. Complex chromatograms dominated by series of acids, diacids and hydroxy acids (as methyl esters and trimethylsilyl ether derivatives) were thus observed, as shown for the clay fraction (Fig. 6). The same series were obtained for the three particle-size fractions. The large amount of GC-amenable lipids released upon saponification compared to the free lipids is reflected in the relative abundance of the erucylamide (occurring as the free compound) before and after saponification [Figs. 1 and 6(b)].

3.2.6.1. Carboxylic acids. After saponification, carboxylic acids ranging from C₁₂ to C₃₀ with an even-over-odd carbon number predominance (CPI_{16–28} from 0.2 to 0.4) are obtained, as shown by the ion chromatogram at *m/z* 74 of the methylated acids (Fig. 7). These acids, observed after saponification, can originate either from the cleavage of ester linkages in high molecular weight and/or highly polar lipids or they can correspond to free acids. The contribution of linked esters can be evidenced

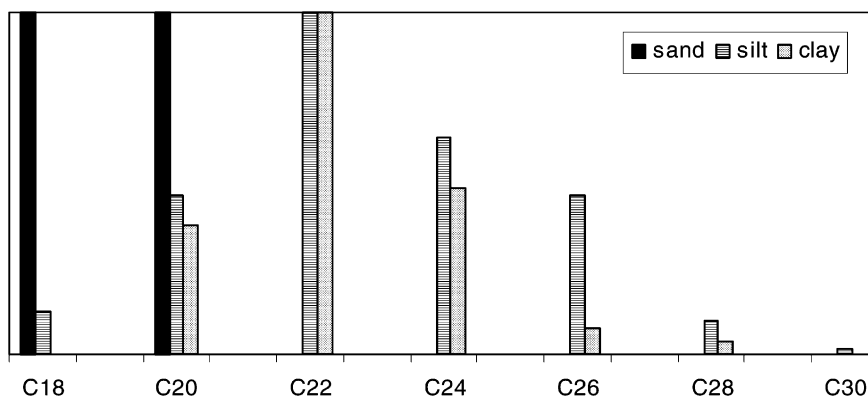


Fig. 5. Free alkanol distribution in the lipid extracts of the three particle-size fraction (for each fraction the distribution is normalized to the maximum).

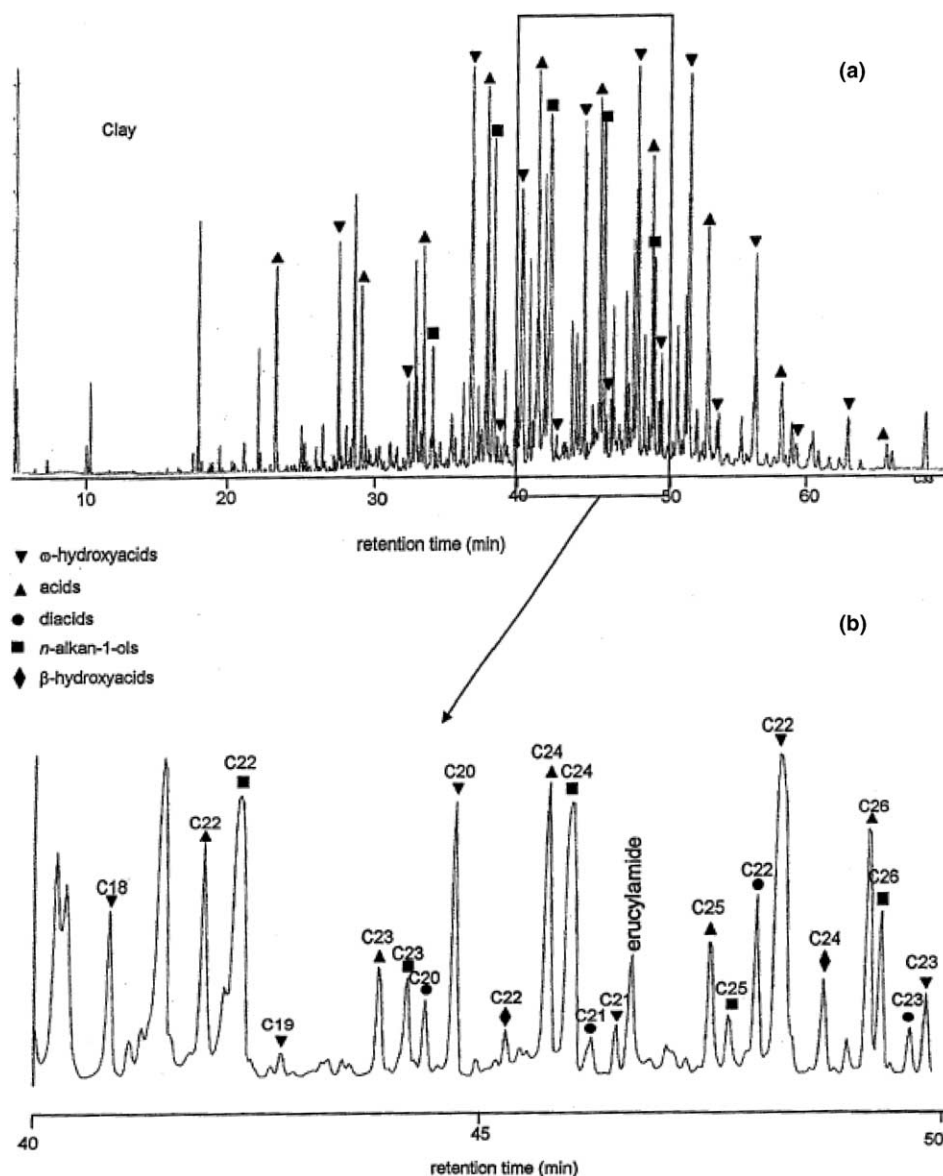


Fig. 6. (a) TIC trace of the saponified lipids from the extract of the clay fraction; (b) expanded area showing the various series.

by the comparison of the distribution of the acids in the free and saponified lipids (Figs. 2 and 7). Moreover, two types of high molecular weight lipids can be considered, either lipids directly inherited from the biomass (such as wax esters or cutin-derived products) or lipids formed upon humification by condensation of more or less altered smaller molecules.

When compared to the free acids, the acids observed after saponification comprise a higher relative contribution of long chain homologues (C_{20+}), with a predominance of the *n*-isomers. These long chain fatty acids thus largely originate from the cleavage of ester bonds in

high molecular weight and/or polar lipids. Wax esters and suberin are known to comprise ester-linked long chain fatty acid moieties with an even carbon number and thus can account for the increase in these long chain compounds after saponification, especially in the sand fraction. Evidence for such a suberin contribution in a temperate forest soil was previously reported by Riederer et al. (1993) based on chemical depolymerization. Cutin is a biopolyester dominated by C_{16} and C_{18} monomers; since these acids are ubiquitous, it is difficult to infer a suberin (cutin)-derived products contribution from the distributions of the fatty acids before and after

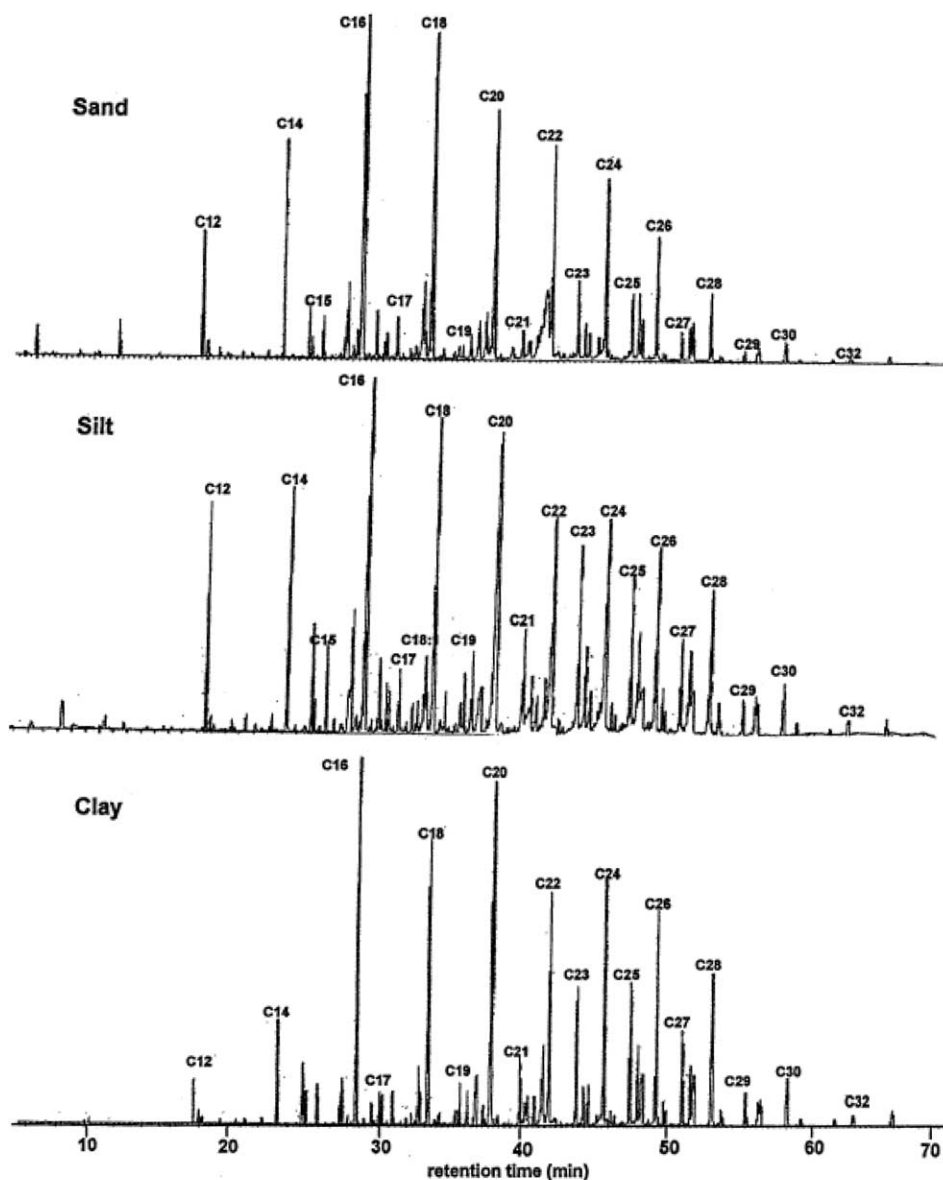


Fig. 7. Ion chromatogram (m/z 74) showing the distribution of the carboxylic acids as their methyl esters in the saponified lipids from the three fractions after saponification.

saponification. However, as discussed later on, cutin input is evidenced by the occurrence of a typical hydroxy acids in the saponified lipids. As a result, a part of the C_{16} and C_{18} acids observed after saponification should originate from cutin. When comparing the long chain fatty acids from the free and saponified lipids, a higher contribution of odd-carbon-numbered acids is observed in the latter. As previously mentioned, these acids reflect alteration of the initial distribution. The occurrence of a substantial amount of these odd-carbon-numbered acid moieties in the non GC-amenable lipids thus suggests

that a part of the latter has been formed upon humification and that the incorporated acid moieties had undergone some alteration prior to incorporation.

3.2.6.2. Hydroxy acids. Hydroxy acids dominate the TIC trace of the saponified lipids (Fig. 6) whereas none of these compounds were detected in the free lipids. These hydroxy acids thus exclusively correspond to ester-linked moieties in high molecular weight and/or polar lipids released by basic treatment; ω - and β -Hydroxy acids are identified in the three particle-size fractions, the

former being predominant. The ω -hydroxy acids range from C₁₂ to C₂₈, show a substantial even-over-odd carbon number predominance for the silt and clay fractions (CPI₂₀₋₂₆ of 0.54 and 0.32, respectively, and only even-carbon-numbered compounds are present for the sand fraction). These acids are characterized by a high contribution of C₁₂, C₁₆, C₂₀, C₂₂ and C₂₄ homologues (Fig. 8). Similar distributions were previously reported for ω -hydroxy acids released by saponification of the lipid extract of an acidic andosol (Naafs and Van, 2002), transesterification or pyrolysis of macromolecular lipids from soils (Riederer et al., 1993; Gobé et al., 2000;) or by thermochemolysis of a forest soil (Nierop, 1998). It must be noted that saponification of sediments also afforded such compounds (Goosens et al., 1989; Wakeham, 1999).

Several origins can be considered for these ω -hydroxy acids. Cutins and suberins are polyesters whose major monomers comprise even-carbon-numbered ω -hydroxy acids with chain length of C₁₆ and C₁₈ for cutins and from C₁₆ to C₂₆ for suberins (Eglinton and Hunneman, 1968; Eglinton et al., 1968; Kolattukudy, 1980; Holloway, 1983; Matzke and Riederer, 1991; Santos-Bento et al., 2001). C₁₆ and C₁₈ dihydroxy acids along with a C₁₈ unsaturated hydroxy acid are also typical constituents of cutins. In addition, polyesters of C₁₂–C₁₈ even ω -hydroxy acids are common constituents of gymnosperm waxes (Tulloch, 1976) and homologues with up to 30 carbons have also been reported as constituents of conifer waxes (Murray and Schoenfeld, 1955). The occurrence of a series of ω -hydroxy acids in the saponified lipids thus probably reflects a contribution of the aforementioned polyesters and especially of suberins. Indeed, a similar distribution was reported for the ω -hydroxy acids from suberin in periderm depolymerizates (Matzke and Riederer, 1991). This strongly suggests a marked input of root- and bark-derived products in the

saponified lipids from the three particle-size fractions. Such a root contribution in SOM was also recently demonstrated via pyrolysis of a forest soil (Nierop, 1998). In addition, cutin contribution is supported by the presence of a C_{18:1} ω -hydroxyacid in the saponified lipids from the three particle-size fractions and of C₁₆ and C₁₈ ω -dihydroxy acids in the silt and clay fractions. Along with these direct biological sources, it cannot be excluded however that a part of these ω -hydroxy acids originates from microbial hydroxylation of fatty acids. Indeed, ω -hydroxy acids are considered as intermediates in the formation of α , ω -diacids. However, no direct relationship can be established between the distribution of the fatty acids (Fig. 7) and that of the ω -hydroxy acids, thus showing that at most a minor fraction of the ω -hydroxy acids should originate from this pathway.

C₂₄ and C₂₆ β -hydroxy acids were identified, as their methyl esters trimethylsilyl ether derivatives in the saponified lipids from the sand fraction. These compounds show a wider distribution for the silt and clay fractions (C₁₂–C₂₉) with a pronounced even-over-odd predominance. Short chain (C₁₂–C₂₀) β -hydroxy acids occur as constituents of structural biopolymers of many microorganisms including bacteria, yeasts, fungi and protozoa (Ratledge and Wilkinson, 1988). Based on their distribution, the shortest β -hydroxy acids of the silt and clay fractions may originate from such biopolymers. However, hydroxy acids are also known to be intermediates in oxidative degradation of fatty acids, the β -oxidation pathway being more important than the α -one, hence a generally higher abundance of β -hydroxy acids over the α -isomers. The occurrence of long chain fatty acids in the silt and clay fractions supports such an origin for the β -hydroxy acids. It must be noted that no α -hydroxy acids could be detected in these saponified lipids from any fraction. In the fine fractions, a double origin (microbial structural biopolymers and fatty acid oxidation)

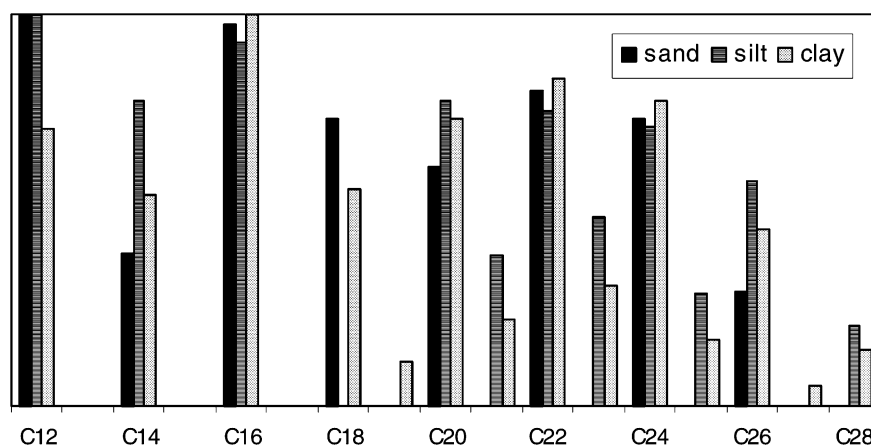


Fig. 8. ω -Hydroxy acid distribution of the saponified lipids from the three particle-size fractions.

can be considered for the shortest β -hydroxy acids, whereas the longest compounds likely result from the latter process. The restricted range of the β -hydroxy acids (only C_{24} and C_{26}) in the saponified lipids of the sand fraction makes their origin less clear.

3.2.6.3. Diacids. Whereas only a few diacids (C_8 and C_9) were present in the free lipids, a series of α, ω -diacids was observed in the saponified lipids of each particle-size fraction. This series ranges from C_{16} for the sand fraction (C_{11} for the silt and C_{14} for the clay) to C_{29} with even-over-odd carbon number predominance ($CPI_{22-26} = 0.22$ in the sand, $CPI_{20-28} = 0.45$ in the silt and $CPI_{20-28} = 0.31$ in the clay) and a maximum at C_{22} (Fig. 6). Diacids with a similar distribution were also identified in the saponified lipids from an anmoor soil (Amblès et al., 1991), pyrolysates of macromolecular lipids from an acidic anmoor soil (Gobé et al., 2000) and in trace amounts after saponification of an acidic andosol (Naafs and Van, 2002). Two main origins are generally considered for these compounds:

- C_{16} to C_{22} α, ω -diacids are major components of suberins (Eglinton and Hunneman, 1968; Eglinton et al., 1968; Kolattukudy, 1980; Holloway, 1983; Matzke and Riederer, 1991; Santos-Bento et al., 2001) and their occurrence in soil lipids would thus reflect an input from roots and bark.
- α, ω -Diacids are formed by microbial oxidation of fatty acids, with the intermediate formation of ω -hydroxy acids (Eglinton and Hunneman, 1968; Hita et al., 1996).

The distribution observed for the ω -hydroxy acids points to a predominant contribution of suberin and thus supports a suberin origin for the α, ω -diacids. However, based on similarities in the distributions of the ω -hydroxy acids and the α, ω -diacids, the formation of the latter by microbial oxidation cannot be excluded.

3.2.6.4. *n*-Alkan-1-ols. In the saponified lipids from the three fractions, a series of primary *n*-alcohols with an

even-over-odd carbon number predominance ($CPI_{23-26} = 0.5$) is detected as trimethylsilyl ethers, ranging from C_{16} to C_{28} (Fig. 9). Such even-carbon-numbered alkanols with a similar range were identified in the saponified lipids from two acidic soils (Amblès et al., 1991), upon saponification of an acidic andosol (Naafs and Van, 2002) and pyrolysis of macromolecular lipids from an acidic anmoor soil (Gobé et al., 2000). The distribution of the alkanols in the saponified lipids being markedly different from that observed for the free lipids (Fig. 5), these alcohols appear to mainly correspond to moieties occurring in high molecular weight, non GC-amenable molecules. Long chain alkanols are typical constituents of higher plant wax esters and C_{20} – C_{32} compounds with a predominance of the C_{22} and C_{24} homologues occur in suberins (Eglinton and Hunneman, 1968; Eglinton et al., 1968; Matzke and Riederer, 1991; Nierop, 1998; Santos-Bento et al., 2001). It is thus likely that most of the alkanols observed in the saponified lipids are directly derived from such biomolecules. However, incorporation of microbially altered compounds into high molecular weight lipids should also be considered. The oxidation of *n*-alkanes can however be ruled out since it would lead to odd-carbon-numbered alkanols as stressed by Amblès et al. (1989a). In contrast, microbial reduction of long chain fatty acids may have played a role in alkanol formation, as suggested by Jambu et al. (1993).

3.2.6.5. Dehydroabiatic acid. Dehydroabiatic acid is detected, after saponification in the lipids of the silt and clay fractions; this acid is widely used as a conifer biomarker (Simoneit, 1986). Indeed, it originates from the oxidation of dehydroabietane which occurs as a natural component of resins. The occurrence of this acid in the saponified lipids reveals that it has been incorporated into high molecular weight and/or polar lipids upon humification. It must be noted that this specific marker of the vegetation is not detected in the sand. Whereas the free lipids show remarkable differences in composition

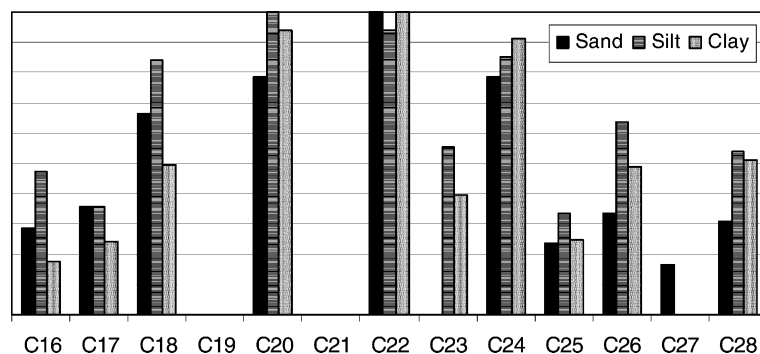


Fig. 9. *n*-Alkan-1-ol distribution in the saponified lipids from the three particle-size fractions.

between the three particle-size fractions, the saponified lipids are rather similar. Indeed, fatty acids, hydroxy acids, diacids and alkanols exhibit almost the same distributions in the saponified lipids whatever the considered fraction. As discussed above, these compounds mainly originate from cutin, suberin and wax esters. Due to their high intrinsic resistance, these biopolymers and high molecular weight lipids remain largely unaltered even when not protected within a fine-grained mineral matrix. The survival of cutin and suberin was also evidenced through lipid analysis of lacustrine sediments (Eglinton et al., 1968). In contrast, low molecular weight compounds recovered as free lipids are preferentially preserved in the fine fractions, especially the clay one.

4. Conclusions

Particle-size fractionation provided new insight into both the lipid sources and their preservation mechanisms. The main results of this study are the following:

- Lipids are preferentially located in the fine fractions, especially in the clay one.
- Lipid sources show differences between the three particle-size fractions, with predominant bacterial contribution in the sand fraction and higher plant input dominating the fine fractions as shown by fatty acid, alkane and *n*-alkan-1-ol distributions. In addition, lignin degradation products (aromatic acids) are observed in the silt and clay fractions. The free lipids of the latter two fractions also contain *n*-alkan-2-ones, probably originating from oxidation reactions catalysed by the mineral phase.
- A differential degradation of free lipids depending on the fraction size is revealed, with a low level of degradation in the sand fraction globally due to major input of fresh OM, substantial degradation in the silt fraction and a preferential preservation in the clay fraction as revealed for example by the persistence of short alkanes and unsaturated acids. This is likely due to adsorption or physical protection provided by the fine minerals as commonly considered for soils and sediments. Thus, Meyers and Ishiwatari (1993) have assigned the high quantity of alkanes and acids observed in the lipids of clay-rich samples of recent sediments to the sorption capacity of clay, and Schulten and Schnitzer (1990) reported a large retention capacity of clay in various soils.
- An intrinsic resistance to biodegradation of biopolymers such as cutin and suberin and wax esters was indicated by the lack of differential degradation observed for the cutin-bound moieties in these compounds depending on fraction-size, in contrast with free lipids. These bound moieties, released by saponification of these three extracts, include fatty acids, ω -

hydroxy acids, β -hydroxy acids, α , ω -diacids and *n*-alkan-1-ols. Dehydroabietic acid, a biomarker of conifer resin was also detected in the silt and clay fractions.

- Incorporation of resistant molecules and some microbial degradation products into high molecular weight structure during humification was also reflected by lipid analysis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dominique Arrouays and Claudy Jolivet for providing soil samples and information on the sampling site. Béatrice Allard is thanked for her assistance and comments throughout this study. We also thank two anonymous reviewers for constructive comments.

Guest Associate Editor—Jose del Rio

References

- Albro, P.W., 1976. Bacterial Waxes: Chemistry Biochemistry of Natural Waxes. Elsevier, Amsterdam. pp. 419–445.
- Alperin, M.J., Balesdent, J., Benner, R.H., Blough, N.V., Christman, R.F., Druffel, E.R.M., Frimmel, F.H., Guggenberger, G., Repeta, D.J., Richnow, H.H., Swift, R.S., 1995. How can we best characterize and quantify pools and fluxes of nonliving organic matter? In: Zepp, R.G., Sonntag, C. (Eds.), The Role of Nonliving Organic Matter in the Earth's Carbon Cycle. Wiley, New York, pp. 67–80.
- Amblès, A., Jacquesy, J.C., Jambu, P., Joffre, J., Maggi-Churin, R., 1991. Polar lipid fraction in soil: a kerogen-like matter. *Organic Geochemistry* 17, 341–349.
- Amblès, A., Jambu, P., Ntsikoussalabongui, B., 1989a. Evolution des lipides naturels d'un podzol forestier induite par l'apport d'engrais minéraux: hydrocarbures, cétones, alcools. *Science du sol* 27, 201–214.
- Amblès, A., Magnoux, P., Jambu, P., Jacquesy, J.C., Fustec, E., 1989b. Effects of addition of bentonite on the hydrocarbon fraction of a podzol soil (A₁ horizon). *Journal of Soil Science* 40, 685–694.
- Amundson, R., 2001. The carbon budget in soils. *Annual Review of Earth and Planet Science* 29, 535–562.
- Anderson, D.W., Saggat, S., Bettany, J.R., Stewart, J.W.B., 1981. Particle size fractions and their use in studies of soil organic matter: I. The nature and distribution of forms of carbon, nitrogen, and sulfur. *Soil Science Society American Journal* 45, 767–772.
- Andreux, F., Munier-Lamy, C., 1994. Genèse et propriétés des molécules humiques. In: Masson (Ed.), *Pédologie.2. Constituants et propriétés du sol*. Bonneau et Souchier, pp. 109–142.
- Baas, M., Pancost, R., Van Geel, B., Sinninghe Damsté, J.P., 2000. A comparative study of lipids in *sphagnum* species. *Organic Geochemistry* 31, 535–541.

- Balesdent, J., Besnard, E., Arrouays, D., Chenu, C., 1998. The dynamics of carbon in particle-size fractions of soil in a forest-cultivation sequence. *Plant and Soil* 201, 49–57.
- Boon, J.J., de Leeuw, J.W., Schenk, P.A., 1975. Organic geochemistry of Walvis Bay diatomaceous ooze – I. Occurrence and significance of the fatty acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 39, 1559–1565.
- Brooks, P.W., Maxwell, J.R., Patience, R.L., 1978. Stereochemical relationships between phytol and phytanic acid, dihydrophytol and C18 ketone in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 1175–1180.
- Bull, I.D., Van Bergen, P.F., Nott, C.J., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 2000. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – V. The fate of lipids in different long-term experiments. *Organic Geochemistry* 31, 389–408.
- Bull, I.D., Van Bergen, P.F., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – II, Soils from the hoosfield spring barley experiment treated with different quantities of manure. *Organic Geochemistry* 28, 11–26.
- Buyanovsky, A.G., Aslam, M., Wagner, G.H., 1994. Carbon turnover in soil physical fractions. *Soil Science Society American Journal* 58, 1167–1173.
- Cayet, C., Lichtfouse, E., 2001. Delta ^{13}C of plant-derived *n*-alkanes in soil particle-size fractions. *Organic Geochemistry* 32, 253–258.
- Christensen, B.T., 1987. Use of particle size fractions in soils organic matter studies. *INTECOL Bulletin* 15, 113–123.
- Christensen, B.T., 1996. Carbon in primary and secondary organomineral complexes. In: M.R.A.S. Carter, B.A. (Ed.), *Structure and Organic Matter Storage in Agricultural Soils*. Lewis, pp. 97–165.
- Cranwell, P.A., 1981. Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* 3, 79–89.
- Dinel, H., Schnitzer, M., 1990. Soil lipids: origin, nature, content, decomposition, and effect on soil physical properties. In: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York, pp. 397–429.
- Duchaufour, P., 2001. *Introduction à la science du sol*. Dunod, Paris.
- Eglinton, G., Hunneman, D.H., 1968. Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids- III. the mass spectra of the methyl esters trimethylsilyl ethers of aliphatic hydroxy acids. A facile method of double bond location. *Organic Mass Spectrometry* 1, 593–611.
- Eglinton, G., Hunneman, D.H., Douraghi-Zadeh, K., 1968. Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids – II. The hydroxy acids and fatty acids of a 5000-year-old lacustrine sediment. *Tetrahedron* 24, 5929–5941.
- Eswaran, H., Van Den Berg, E., Reich, P., 1993. Organic carbon in soils of the world. *Soil Science Society American Journal* 57, 192–194.
- Faure, P., Schlepp, L., Elie, M., Burkle-Vitzthum, V., Michels, R., 2003. Low-temperature air oxidation of *n*-alkanes in the presence of Na smectite. In: 225th ACS National Meeting, New Orleans.
- Feller, C., Casabianca, H., Cerri, C., 1991a. Renouvellement du carbone des fractions granulométriques d'un sol ferrallitique forestier (Brésil) mis en culture de canne à sucre. *Cahier de l'ORSTOM, série pédologie* 26, 365–369.
- Feller, C., Fritsch, E., Poss, R., Valentin, C., 1991b. Effet de la texture sur le stockage et la dynamique des matières organiques dans quelques sols ferrugineux et ferrallitiques (Afrique de l'Ouest, en particulier). *Cahier de l'ORSTOM, série pédologie* 26, 25–36.
- Gobé, V., Lemée, L., Ambès, A., 2000. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Organic Geochemistry* 31, 409–419.
- Goossens, H., Düren, R.R., De Leeuw, J.W., Schenk, P.A., 1989. Lipids and their mode of occurrence in bacteria et sediments – II. Lipids in the sediment of a stratified, freshwater lake. *Organic Geochemistry* 14, 27–41.
- Grasset, L., Ambès, A., 1998. Aliphatic lipids released from a soil humin after enzymatic degradation of cellulose. *Organic Geochemistry* 29, 893–897.
- Gregorich, E.G., Kachanoski, R.G., Voroney, R.P., 1988. Ultrasonic dispersion of aggregates: distribution of organic matter in size fractions. *Canadian Journal of Soil Science* 68, 395–403.
- Gregorich, E.G., Kachanoski, R.G., Voroney, R.P., 1989. Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregate disruption. *Journal of Soil Science* 40, 649–659.
- Haddad, R.I., Martens, C.S., Farrington, J.W., 1992. Quantifying early diagenesis of fatty acids in a rapidly accumulating coastal marine sediment. In: Eckardt, C.B., Maxwell, J.R., Larter, S.R., Manning, D.A.C. (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry*, 1991. Pergamon, Oxford, pp. 205–216.
- Han, J., Calvin, M., 1969. Hydrocarbon distribution of algae and bacteria, and microbiological activity in sediments. *Proceeding of National Academy of Science USA* 64, 436–443.
- Hassink, J., Bouwman, L.A., Zwart, K.B., Bloem, J., Brussard, L., 1993. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and C and N mineralization in grassland soils. *Geoderma* 57, 105–128.
- Hita, C., Parlanti, E., Jambu, P., Joffre, J., Ambès, A., 1996. Triglyceride degradation in soil. *Organic Geochemistry* 25, 19–28.
- Holloway, P.J., 1983. Some variations in the composition of suberin from cork layers of higher plants. *Phytochemistry* 22, 495–502.
- Ikan, R., Baedecker, M.J., Kaplan, I.R., 1975. Thermal alteration experiments on organic matter in recent marine sediment – II Isoprenoids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 30, 187–194.
- Jaffé, R., Elismé, T., Cabrera, A.C., 1996. Organic geochemistry of seasonally flooded rain forest soils: molecular composition and early diagenesis of lipid components. *Organic Geochemistry* 25, 9–17.
- Jambu, P., Ambès, A., Dinel, H., Secouet, B., 1991. Incorporation of natural hydrocarbons from plant residues into an hydromorphic humic podzol following afforestation and fertilization. *Journal of Soil Science* 42, 629–636.
- Jambu, P., Ambès, A., Jacquesy, J.C., Secouet, B., Parlanti, E., 1993. Incorporation of natural alcohols from plant residues into an hydromorphic forest-podzol. *Journal of Soil Science* 44, 135–146.

- Jambu, P., Fustec, E., Jacquesy, R., 1978. Les lipides des sols: nature, origine, évolution, propriétés. *Science du sol*, bulletin de l'AFES 4, 229–240.
- Jolivet, C., 2000. Le carbone organique des sols des Landes de Gascogne, variabilité spatiale et effets des pratiques sylvicoles et agricoles. Ph.D. thesis, university of Bourgogne, p. 313.
- Jolivet, C., Arrouays, D., Lévêque, J., Andreux, F., Chenu, C., 2003. Organic carbon dynamics in soil particle-size separates of sandy spodosols when forest is cleared for maize cropping. *European Journal of Soil Science* 54, 257–268.
- Kögel-Knabner, I., De Leeuw, J.W., Tegelaar, E.W., Hatcher, P.G., Kerp, H., 1994. A lignin-like polymer in the cuticle of spruce needles: implications for the humification of spruce litter. *Organic Geochemistry* 21, 1219–1228.
- Kolattukudy, P.E., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990–1000.
- Matzke, K., Riederer, M., 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185, 233–245.
- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20, 867–900.
- Morrison, R.I., 1969. Soil lipids. *Organic Geochemistry: Methods and Results*, 558–575.
- Moucaw, J., Fustec, E., Jambu, P., Jacquesy, J.C., 1981. Decomposition of lipids in soils: free and esterified fatty acids, alcohols and ketones. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 461–468.
- Murray, K.E., Schoenfeld, R., 1955. Studies of waxes – XI. The hydroxy acids of Carnauba wax. *Australian Journal of Chemistry* 8, 437–443.
- Naafs, D., Van Bergen, P.F., 2002. A qualitative study on the chemical composition of ester-bound moieties in an acidic andosolic forest soil. *Organic Geochemistry* 33, 189–199.
- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., Pons, D., 2000. Effects of fungal infection on lipid extract composition of higher plant remains: comparison of shoots of a Cenomanian conifer, uninfected and infected by extinct fungi. *Organic Geochemistry* 31, 1743–1754.
- Nierop, K.G.J., 1998. Origin of aliphatic compounds in a forest soil. *Organic Geochemistry* 29, 1009–1016.
- Oades, J.M., Vassallo, A.M., Waters, A.G., Wilson, M.A., 1987. Characterization of organic matter in particle size and density fractions from a red-brown earth by solid-state ^{13}C NMR. *Australian Journal of Soil Research* 25, 71–82.
- Padley, F., Gunstone, F.D., Hardwood, J.L., 1992. Occurrence and characteristics of oils and fats. In: Gunstone, F.D., Hardwood, J.L., Padley, F.B. (Eds.), *The Lipid Handbook*. Chapman & Hall, London, pp. 47–224.
- Preston, C.M., Shipitalo, S.-E., Dudley, R.L., Fyfe, C.A., Mathur, S.P., Levesque, M., 1987. Comparison of ^{13}C CPMAS NMR and chemical techniques for measuring the degree of decomposition in virgin and cultivated peat profiles. *Canadian Journal of Soil Science* 67, 187–198.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. *Microbial lipids*. Academic Press, New York.
- Riederer, M., Matze, K., Ziegler, F., Kögel-Knabner, I., 1993. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soil. *Organic Geochemistry* 20, 1063–1076.
- Rieley, G., Collier, R.J., Jones, D.M., Eglinton, G., 1991. The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K. – I. source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record. *Organic Geochemistry* 17, 901–912.
- Santos-Bento, M.F., Pereira, H., Cunha, M.A., Moutinho, A.M.C., Van den Berg, K.J., Boon, J.J., 2001. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 57, 45–55.
- Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H., 1971. *Lignins*. Wiley, New York.
- Schmidt, M., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kögel-Knabner, I., 1997. Does ultrasonic dispersion and homogenization by ball milling change the chemical structure of organic matter in geochemical samples? a CPMAS ^{13}C NMR study with lignin. *Organic Geochemistry* 26, 491–496.
- Schmidt, M., Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., 1999. Evaluation of an ultrasonic dispersion procedure to isolate primary organomineral complexes from soils. *European Journal of Soil Science* 50, 87–94.
- Schulten, H.-R., Leinweber, P., Sorge, C., 1993. Composition of organic matter in particle-size fractions of an agricultural soil. *Journal of Soil Science* 44, 677–691.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M., 1990. Aliphatics in soil organic matter in fine-clay fractions. *Soil Science Society American Journal* 54, 98–105.
- Simoneit, B.R.T., 1986. Cyclic terpenoids of the geosphere. In: Johns, R.B. (Ed.), *Biological markers in the sedimentary record*. Elsevier, Amsterdam, pp. 43–99.
- Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W., 1963. Gas-Liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of American Chemical Society* 84, 2497–2507.
- Tulloch, A., 1976. Chemistry of waxes of higher plants. In: Kolattukudy, P.E. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier, Amsterdam.
- Van Bergen, P.F., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1997. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Organic Geochemistry* 26, 117–135.
- Volkman, J.K., Farrington, J.W., Gagosian, R.B., Wakeham, S.G., 1981. Lipid composition of coastal marine sediments from the Peru upwelling region. *Advances in Organic Geochemistry*, 228–240.
- Wakeham, S.G., 1999. Monocarboxylic, dicarboxylic and hydroxy acids released by sequential treatments of suspended particles and sediments of Black Sea. *Organic Geochemistry* 30, 1059–1074.
- Wannigama, G.P., Volkman, J.K., Gillan, F.T., Nichols, P.D., Johns, R.B., 1981. A comparison of lipid components of the fresh and dead leaves and pneumatophores of the mangrove *Avicennia Marina*. *Phytochemistry* 20, 659–666.
- Young, L.Y., Frazer, A.C., 1987. The fate of lignin and lignin-derived compounds in anaerobic environments. *Geomicrobiology Journal* 5, 261–293.

Spectroscopic and pyrolytic features and abundance of the macromolecular refractory fraction in a sandy acid forest soil (Landes de Gascogne, France)

K. Quénéa^{a,b}, S. Derenne^{a,*}, C. Largeau^a, C. Rumpel^b, A. Mariotti^b

^a LBCOP, UMR CNRS 7573, ENSCP, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France

^b BiomCO, INRA-CNRS-UPMC, bât EGER, 78850 Thiverval-grignon, France

Received 20 April 2004; accepted 9 October 2004

(returned to author for revision 19 July 2004)

Available online 9 December 2004

Abstract

The insoluble, non-hydrolysable, macromolecular fraction was isolated from an acid sandy forest soil from Cestas (Landes de Gascogne, south west France) through successive hydrolysis with TFA and HCl. This refractory organic matter (ROM) accounts for a large part, ca. one third, of the total organic matter of the soil. Characterisation via a combination of elemental analysis, FTIR and solid-state ¹³C NMR spectroscopy, conventional pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation with tetramethylammonium hydroxide showed a complex composition for the ROM, including contributions from lignin, suberin, condensed tannins, higher plant waxes, suberin and polysaccharides attributed to cellulose. The latter probably survived the extensive acid treatment used to isolate the ROM, thanks to protection within the ligno-cellulose complex and/or to a high degree of crystallinity. Suberin also likely benefitted from some physical protection. In contrast, protein-derived moieties and bacterial lipids do not seem to be significant contributors. The occurrence of some of the above components is more or less efficiently revealed (or even not for cellulose and suberin) depending on the particular analytical method.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Soil organic matter represents a considerable pool of carbon estimated at 1500×10^{12} kg (Eswaran et al., 1993; Alperin et al., 1995) and a large fraction of this pool is composed of humin, i.e. insoluble macromolecular material. Humin can account for up to 80 wt% of total

organic matter (OM) in some soils (Almendros and Sanz, 1992). Moreover, recent studies have shown that part of it can exhibit a conspicuous resistance to drastic laboratory hydrolysis (Poirier et al., 2000, 2002, 2003). This refractory, non-hydrolysable, macromolecular organic matter (ROM) might be significantly implicated in two major environmental processes. Firstly, radiocarbon dating showed a greater age for the hydrolysis residue (e.g. Paul et al., 1997), indicating the possible role of this soil organic matter fraction as a sink in the global carbon cycle, through contribution to the stable pool, with low turnover rates of centuries to millennia.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 4427 6716; fax: +33 1 4325 7975.

E-mail address: sylvie-derenne@enscp.jussieu.fr (S. Derenne).

Secondly, the fate of pollutants in soil, through complex-forming reactions. Accordingly, it is important to derive detailed information on ROM abundance, origin and chemical composition in various types of soil. In the studies mentioned above, the ROM was isolated from a loamy soil from France and from a ferralic soil from Congo, through treatment of only the fine ($<50\ \mu\text{m}$) fraction, i.e. the fraction containing soil organic matter (SOM) with a high degree of humification.

In the present work, the insoluble, non-hydrolysable, macromolecular fraction was isolated from an acid sandy forest soil from Cestas (Landes de Gascogne, southwest France). The fresh coarse debris was eliminated by sieving at 2 mm before the isolation treatment, so as to obtain, and allow examination of, the whole refractory fraction of the soil. The isolated ROM was quantified and its chemical structure was examined via a combination of bulk (elemental analysis), spectroscopic (FTIR and solid-state ^{13}C NMR) and pyrolytic (conventional and thermally assisted hydrolysis and methylation) methods.

2. Materials and methods

2.1. Sample

The soil was collected from the upper layer (0–30 cm) of a plot located near to Cestas (southwest France) in a maritime pine (*Pinus pinaster*) forest. This acid soil (pH 4.3 measured in water) is a sandy spodosol (Jolivet et al., 2003) and has been regularly fertilised with inorganic fertiliser of about 40 years for wood production (Jolivet, 2000). Coarse fresh plant debris was removed by sieving at 2 mm. The sieved soil exhibits a total organic carbon content (TOC) of 2.6 wt% and a C/N atomic ratio close to 30.

2.2. Isolation protocol

Isolation was performed on 200 g of sieved soil. Free lipids were first removed by extraction with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, v/v) using a solvent/soil ratio (v/wt) of 6/1 (ml/g) and stirring for 18 h at room temperature, prior to centrifugation for 15 min at 1400g. This extraction was repeated three times. The detailed study of the lipid fraction thus obtained is reported in Quénéa et al. (2004). Afterwards, humic and fulvic acids were removed with NaOH 1 M/ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.2 M (1/1, v/v). The insoluble fraction thus obtained (humin plus minerals) was submitted to dialysis until neutrality to eliminate residual $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. The next steps consisted of stepwise acid hydrolysis of humin under reflux with gradual increase in heating time and acid concentration. As previously described by Allard et al. (1998), trifluoroacetic acid (TFA) and HCl were used (2 N TFA for 3 h (2 $\times$),

4 N TFA for 18 h, 6 N HCl for 1 h, 3 h and 6 h), so as to avoid artefact production through the formation of insoluble condensation products. After each hydrolysis step, the solid material was stirred under reflux in water (ca. 500 ml) for 1 h (3 $\times$) and recovered by centrifugation (15 min at 1400g). Finally, the ROM was isolated after demineralisation, using 6 N HCl and 48% HF (1/2, v/v) at room temperature for one day (2 $\times$). The acid treatment was followed by neutralisation through re-suspension in water and, finally, by extraction with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, v/v) under the same conditions as above, so as to eliminate the soluble organic compounds possibly freed through destruction of the mineral matrix of the soil. The ROM thus isolated was dried until constant weight (ca. 24 h) in an oven at 40 °C. Elemental analysis was performed at the “Service Central de Microanalyse du CNRS”, Vernaison, France.

2.3. Spectroscopic studies

FTIR spectra were recorded as KBr pellets with a Bruker 45 spectrometer. Solid-state ^{13}C NMR spectra were obtained at 100.62 MHz on a Bruker MSL 400 spectrometer with a recycle time of 5 s. High power decoupling, cross-polarisation (CP), with contact times of 1 and 3 ms and magic angle spinning (MAS) 20 kHz, were used.

2.4. Pyrolytic studies

Curie point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (CuPy-GC/MS) was performed using a Fischer 0316 Curie point flash pyrolyser. The sample (ca. 3–4 mg) was pyrolysed for 10 s using ferromagnetic tubes (10 mm length, 2 mm i.d.) with a Curie temperature of 650 °C under a 5 mL min $^{-1}$ He flow. The pyrolysis unit was directly coupled to the GC/MS system: Hewlett Packard HP-5890 gas chromatograph (30 m CPSil5CB capillary column, i.d. 0.25 mm, film thickness 0.5 μm) and Hewlett Packard HP-5889A mass spectrometer (electron energy 70 eV, ion source temperature 250 °C, scanning from m/z 40 to 650, 0.7 scan/s). The temperature of the GC oven was programmed from 100 to 300 °C at a rate of 2 °C min $^{-1}$ after a first stage at 50 °C for 10 min to allow better separation of the most volatile pyrolysis products. For Curie point thermally assisted hydrolysis and methylation (CuTHM) with tetramethylammonium hydroxide (TMAH), the same conditions as above were used. The sample (ca. 3–4 mg) was thoroughly crushed in a mortar with a large excess (ca. 5 mL) of TMAH (25 wt% in water) and dried prior to loading in the ferromagnetic tube. Heating to 650 °C of the Curie point flash pyrolyser was started immediately after insertion of the sample in the injection port.

3. Results and discussion

3.1. ROM abundance and elemental composition

Efficient demineralisation was achieved by the HF/HCl treatment, as indicated by the low content of residual ash of only 4 wt% retained in the isolated material. Analysis of the ROM showed a TOC content of 58.7 wt% and 1.59 g of ROM (corrected for ash) were obtained for 100 g of sieved soil. From the above values and the TOC content of the soil (2.6 wt%), it appeared that the carbon of the isolated ROM represents 34% of the total initial carbon. The non-hydrolysable insoluble macromolecular fraction thus accounts for a substantial part of the total organic matter. Nitrogen is preferentially eliminated during ROM isolation, due to hydrolysis of N-containing components such as proteinaceous materials. This preferential removal is reflected in the markedly higher C/N atomic ratio of the isolated ROM: 61 against 30 for the OM of the sieved soil. Elemental analysis showed an H/C atomic ratio of only 0.9 for the isolated material. This relatively low value ruled out a major contribution from aliphatic moieties, such as alkyl chains, to the macromolecular structure of the ROM.

3.2. ROM spectroscopic features

The FTIR spectrum (Fig. 1) exhibits relatively weak bands at 2970, 2925 and 2850 cm^{-1} corresponding to alkyl groups (symmetric and asymmetric C–H stretching in CH_2 and CH_3), in agreement with the relatively low aliphaticity inferred from elemental analysis data. The spectrum is dominated by a broad band centred at 3400 cm^{-1} (OH groups), absorptions at 1710 cm^{-1}

(C=O functions), 1600 cm^{-1} (predominantly aromatic C=C bonds) and several bands in the 1050–1260 cm^{-1} range (ether and/or alcohol C–O bonds).

The solid-state CP/MAS ^{13}C NMR spectrum (Fig. 2) is dominated by an aliphatic peak in the 10–40 ppm range, with a maximum at 30 ppm corresponding to methylenic carbon atoms in aliphatic chains. This feature may seem at variance with the lack of predominance by such aliphatic structures showed by elemental and FTIR data. However, it is well documented that the relative abundance of the aliphatic moieties can be largely overestimated using CP/MAS solid-state ^{13}C NMR spectroscopy of macromolecular material that also contains condensed units, such as polyaromatic and highly cross-linked structures in macromolecular material. Indeed, carbon atoms in the latter structures cannot be “seen” by this spectroscopic method when they are too far from protons, since they cannot be reached by spin diffusion. Such a bias was observed for various types of natural materials and for mixtures of model compounds (e.g. Hatcher et al., 1981; Wilson et al., 1987; Oades et al., 1987; Preston et al., 1997; Poirier et al., 2000). In contrast to this lack of detection (or incomplete detection) of the carbon atoms in condensed units, the carbon atoms in aliphatic chains are very efficiently detected so that their relative abundance can be significantly overestimated. The underestimation of the condensed aromatic and highly crosslinked carbon atoms can be somewhat reduced by using high contact times in order to improve polarisation and high spinning rates and spin out chemical shift anisotropy. However, even under such conditions (contact time 3 ms and spinning rate of 20 kHz) the ROM spectrum still exhibits some predominance of the aliphatic peak. In addition to the signal at 30 ppm, the spectrum exhibits several

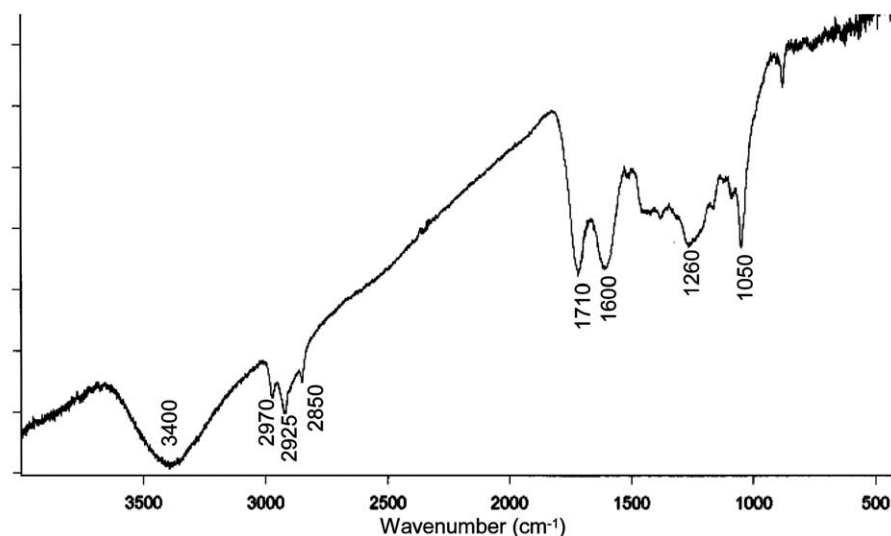


Fig. 1. Fourier transform infrared spectrum of Cestas ROM.

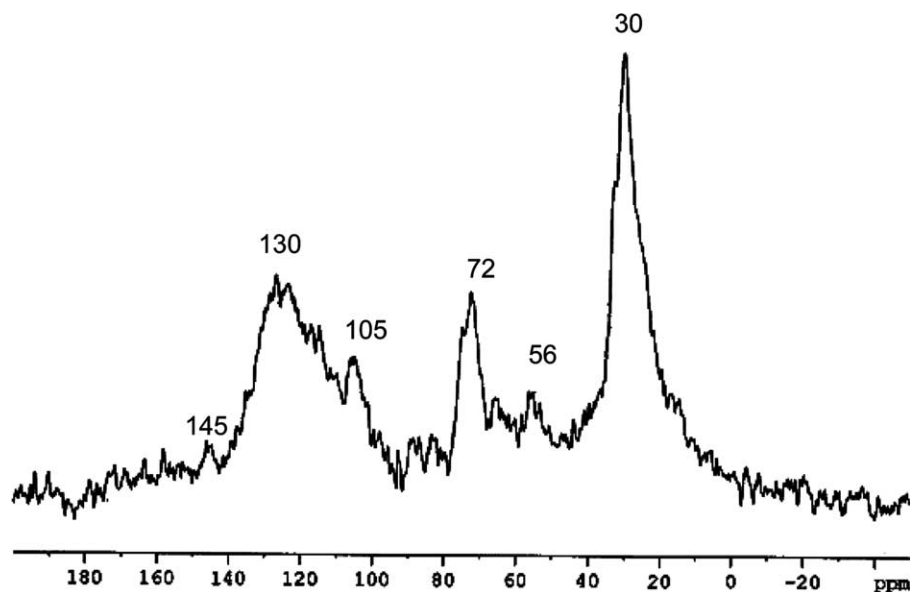


Fig. 2. Solid-state ^{13}C NMR spectrum of Cestas ROM (contact time 3 ms, MAS 20 kHz).

relatively intense peaks. The peaks at 72 ppm (oxygen-linked carbon atoms in pyran units) and 105 ppm (anomeric carbon atoms in glycosidic linkages) reflect the presence of polysaccharides like cellulose (e.g. [Pastorova et al., 1994](#); [Preston, 1996](#)). The weak peaks at 145 ppm (oxygen-linked aromatic carbon atoms) and at 56 ppm (methoxyl groups) may reflect the presence of lignin (e.g. [Hatcher, 1987](#); [Preston, 1996](#)). Condensed tannins may also contribute to the 145 ppm peak. The main ^{13}C resonances for such compounds constitute a peak around 105 ppm (non-protonated aromatic carbon atoms α to oxygen-linked aromatic carbon atoms) and a double peak at 145–155 ppm (phenolic carbon atoms; [Wilson and Hatcher, 1988](#); [Preston et al., 1997](#)). These peaks interfere with resonances from polysaccharides and lignin, respectively. The broad resonance in the 110–140 ppm range can be attributed to olefinic and/or aromatic carbons; it corresponds chiefly to the latter based on the FTIR data and may include the aromatic carbon atoms of lignin and condensed tannins not substituted by oxygen.

Taken together the FTIR and solid-state ^{13}C NMR spectra indicate the occurrence of a large variety of oxygen-containing groups. In addition, ^{13}C NMR reveals the presence of polysaccharides attributed to cellulose and also points to the presence of lignin and maybe of condensed tannins. It is well documented that most lignin fractions are not solubilised by hydrolysis (e.g. [Kögel-Knabner et al., 1994](#); [Poirier et al., 2003](#)). Cellulose resists TFA treatment ([Amelung et al., 1996](#)) but can be hydrolysed by heating with strong acids like HCl unless it is in a highly crystalline form. The survival of a cellulose fraction in the isolated ROM is therefore prob-

ably related to lignin occurrence and the resulting protection of cellulose microfibrils within the so-called ligno-cellulose complex and/or to a high degree of crystallinity. Condensed tannins are ubiquitous in higher plants and highly resistant to hydrolysis ([de Leeuw and Largeau, 1993](#)). Such aromatic compounds have been previously shown to contribute to the refractory fraction of the loamy forest and crop soils examined by [Poirier et al. \(2000, 2003\)](#).

3.3. ROM thermal degradation

3.3.1. CuPy-GC/MS

The total ion current (TIC) trace obtained with CuPy-GC/MS is dominated by levoglucosenone (peak 11; [Fig. 3](#) and [Table 1](#)). Several other typical pyrolysis products of polysaccharides (e.g. [Pouwels et al., 1989](#); [Pastorova et al., 1994](#)), i.e. anhydrosugars and furanoic compounds, are also observed in high relative abundance: 2-furancarboxaldehyde (3), methylfurancarboxaldehyde (5), dihydrobenzofuran (17) and levoglucosan (23). The lack of significant amounts of levulinic acid indicated that the cellulose fraction was not substantially altered upon the acid treatment since the latter compound is the major pyrolysis product of acid-altered saccharides ([Almendros et al., 1997](#)). This lack of substantial alteration of cellulose in the isolated ROM is likely related to protection by lignin.

A number of phenolic products (phenol, alkyl phenols, methoxyphenols and benzene diols) were also observed in the ROM pyrolysate, including several compounds in high relative abundance ([Fig. 3](#) and [Table 1](#)); 2-methoxyphenol (10, one of the main peaks), 2,6-

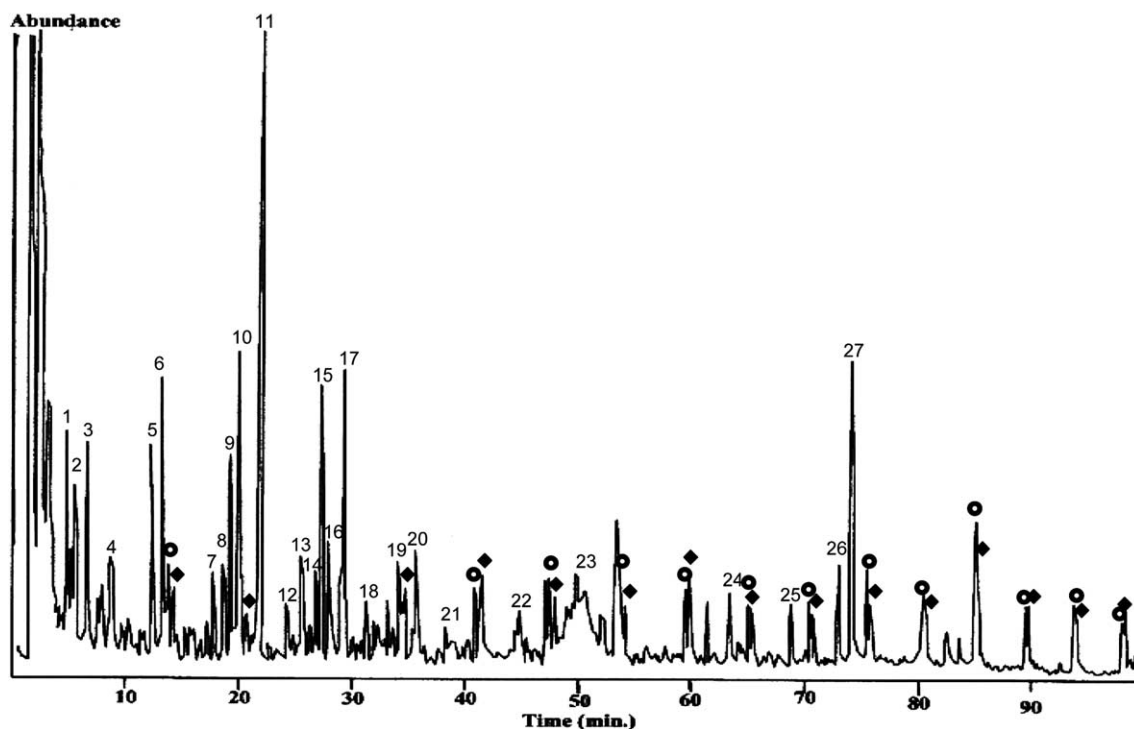


Fig. 3. Total ion current trace of 650 °C Curie point pyrolysate of Cestas ROM. See Table 1 for identification of numbered peaks; *n*-alkanes (♦), *n*-alk-1-enes (●).

dimethoxyphenol (21) and C₁- to C₃-substituted methoxyphenols (15, 19, 20 and 22) are typical products of lignin, the mono- and dimethoxylated compounds being derived from guaiacyl and syringyl units, respectively (e.g. Saiz-Jimenez and de Leeuw, 1986; Hatcher and Clifford, 1997). Acetophenone (8) is also a typical product in lignin pyrolysates.

Phenol (6) and C₁- and C₂-alkylphenols (7, 9, 12 and 13) are ubiquitous pyrolysis products that can be generated from several groups of biomacromolecules, including lignin, polysaccharides and tannins (Saiz-Jimenez and de Leeuw, 1986; Almendros et al., 1997; van Heemst et al., 1999). Some of these compounds in the ROM pyrolysate are likely related to lignin. The occurrence of these phenols suggests that part of the lignin moieties in the ROM had undergone alteration since demethoxylation is a major process during diagenetic alteration of lignin (e.g. Hatcher and Spiker, 1988). The presence of some altered lignin moieties is also supported by the occurrence in the pyrolysis products of 1,2-benzenediol (16) and 4-methyl-1,2-benzenediol (18) that can originate from demethylated and/or demethoxylated units in degraded lignin (Gonzalez-Vila et al., 1996); however, these two compounds could also originate from condensed tannins (Galletti and Reeves, 1992). The high relative abundance of the methoxyphenols and of the other phenolic compounds supports a substantial contribution

of lignin to the ROM, including both unaltered and altered lignin. Some condensed tannins also probably contribute to this refractory fraction.

Relatively weak peaks corresponding to *n*-alkane/*n*-alk-1-ene doublets were detected (Fig. 3). The mass chromatogram of *m/z* 57 shows a homologous series of doublets ranging from C₉ to C₃₂ with a maximum in the C₁₀–C₂₃ range (Fig. 4). No significant odd- or even-carbon-number predominance was observed in the latter range, whereas the longer homologues from C₂₃ on are predominantly odd carbon-numbered. Such *n*-alkane/*n*-alk-1-ene doublets commonly occur in the pyrolysates of natural macromolecular organic materials (e.g. Largeau et al., 1986) where they originate chiefly from the homolytic cleavage of C–C bonds in polymethylene chains. It thus appears that some polymethylene chains, including long chains up to C₃₂, contribute to the macromolecular structure of the ROM. The occurrence of such chains has previously been observed upon pyrolysis of various fractions of soil organic matter ranging from complex lipids (Gobé et al., 2000) to the insoluble non-hydrolysable fraction (Augris et al., 1998). Different possible sources considered for these chains are: highly aliphatic, non-hydrolysable, biomacromolecules of higher plants, i.e. cutan or suberan (Tegelaar et al., 1989, 1995; van Bergen et al., 1997; Augris et al., 1998; Nierop, 1998), or of microorganisms

Table 1

Products formed upon 650 °C Curie point pyrolysis of Cestas ROM and their origin (L: Lignin, Ps: Polysaccharide, (L): can also partly originate from other sources, like polysaccharides and tannins)

Peak number	Compound ^a	Origin
1	Ethylbenzene	
2	Dimethylbenzene	
3	2-Furancarboxaldehyde	Ps
4	Propylbenzene	
5	Methylfurancarboxaldehyde	Ps
6	Phenol	(L)
7	2-Methylphenol	(L)
8	Acetophenone	L
9	3-Methylphenol	(L)
10	2-Methoxyphenol	L
11	Levoglucosenone	Ps
12	2,4-Dimethylphenol	(L)
13	3-Ethylphenol	(L)
14	Naphthalene	
15	4-Methyl-2-methoxyphenol	L
16	1,2-Benzenediol	(L)
17	Dihydrobenzofuran	Ps
18	4-Methyl-1,2-benzenediol	(L)
19	4-Ethyl-2-methoxyphenol	L
20	4-Ethenyl-2-methoxyphenol	L
21	2,6-Dimethoxyphenol	L
22	4-Propenyl-2-methoxyphenol	L
23	Levoglucosan	Ps
24	C ₁₄ acid	
25	C ₁₅ acid	
26	C _{16:1} acid	
27	C ₁₆ acid	
•	<i>n</i> -Alk-1-enes	
♦	<i>n</i> -Alkanes	

^a Acids were analysed as methyl esters.

(Lichtfouse et al., 1995) and lipids condensed into resistant macromolecular structures (Almendros and Sanz, 1992; Almendros et al., 1996). The distribution of the *n*-alkane/*n*-alk-1-ene doublets generated from the ROM is characterised by an extended carbon number range and a wide maximum with similar intensities, except for the longest homologues. The former features have been observed for some cutans and suberans (Tege-laar et al., 1989, 1995). In contrast, the distribution of the longest homologues, predominantly odd carbon numbered for the ROM, does not recall the distribution reported for cutans (rather regular decrease in intensity with increasing carbon number) and suberans (sharp decrease in intensity from C₂₀) so far examined. Such similarities and differences suggest that the doublets probably originate both from cutans and/or suberans and from long chain lipids of higher plants. The latter lipids were condensed in the macromolecular structure of the Cestas ROM and they would largely contribute to the longest chain doublets.

Whatever their origin, these polymethylene chains from cutans/suberans and condensed lipids only afford a relatively minor contribution to the refractory material of the Cestas soil, in agreement with the low H/C atomic ratio of only 0.9 determined by elemental analysis. Indeed, the *n*-alkane/*n*-alk-1-ene doublets only occur in low relative abundance in the pyrolysate (Fig. 3). Furthermore, the effective contribution of the aliphatic chains is still lower than suggested by the relative abundance of the doublets, because pyrolysis tends to overestimate such aliphatic moieties compared with other moieties like polysaccharidic material and (to a lesser extent) lignin (Poirier et al., 2000). This bias is due to the markedly higher yield of GC-amenable volatile pyrolysis products generated from the aliphatic moieties. The C₂ and C₃ alkylbenzenes (1, 2 and 4) may originate from cyclisation/aromatisation of aliphatic chains as commonly observed for pyrolysates (e.g. Largeau et al., 1986). Relatively large amounts of palmitic acid (27) occur in the pyrolysate along with minor amounts of C₁₄, C₁₅ and C_{16:1} fatty acids (24–26). These acids originate from the thermal cleavage of esters that were sterically protected in the macromolecular structure of the ROM and, hence, not hydrolysed by the extensive acid treatment applied for its isolation.

3.3.2. CuTHM-GC/MS

Thermally assisted hydrolysis and methylation in the presence of TMAH has been mainly applied in the recent years to a range of macromolecular materials, including soil organic matter and the refractory fraction of recent sediments (e.g. Schulten and Sorge, 1995; Nie-rop, 1998; Chefetz et al., 2000; Garcette-Lepecq et al., 2001). Compared to conventional pyrolysis, THM affords a more efficient cleavage of macromolecular structures, especially those with oxygen-containing linkages like esters or ethers. Furthermore, the carboxylic acid and the hydroxy groups are methylated in situ, thus making GC-amenable a number of polar pyrolysis products. In addition, secondary reactions like decarboxylation and dehydration are limited (e.g. Challinor, 1994; Clifford et al., 1995; del Río, 1996).

The TIC trace obtained using CuTHM(TMAH)-GC/MS of the Cestas ROM shows a large number of components [Fig. 5(a) and Table 2]. The first part of the chromatogram [Fig. 5(b)] shows chiefly the methylated counterparts of the phenolic compounds derived from lignin and observed in the conventional pyrolysate. These methylated products correspond to most of the identified methoxy- and dimethoxybenzenes (9, 11, 20, 23, 24, 30 and 35). Such compounds are typical products generated upon THM of lignin through cleavage of the β-O-4 linkages by TMAH (Hatcher and Minard, 1995). The occurrence of methoxyphenols (17, 25, 27, 28, and 34) and of phenol and alkylphenols (8, 14 to 16, 19, 21 and 22) indicates that methylation was incomplete. This

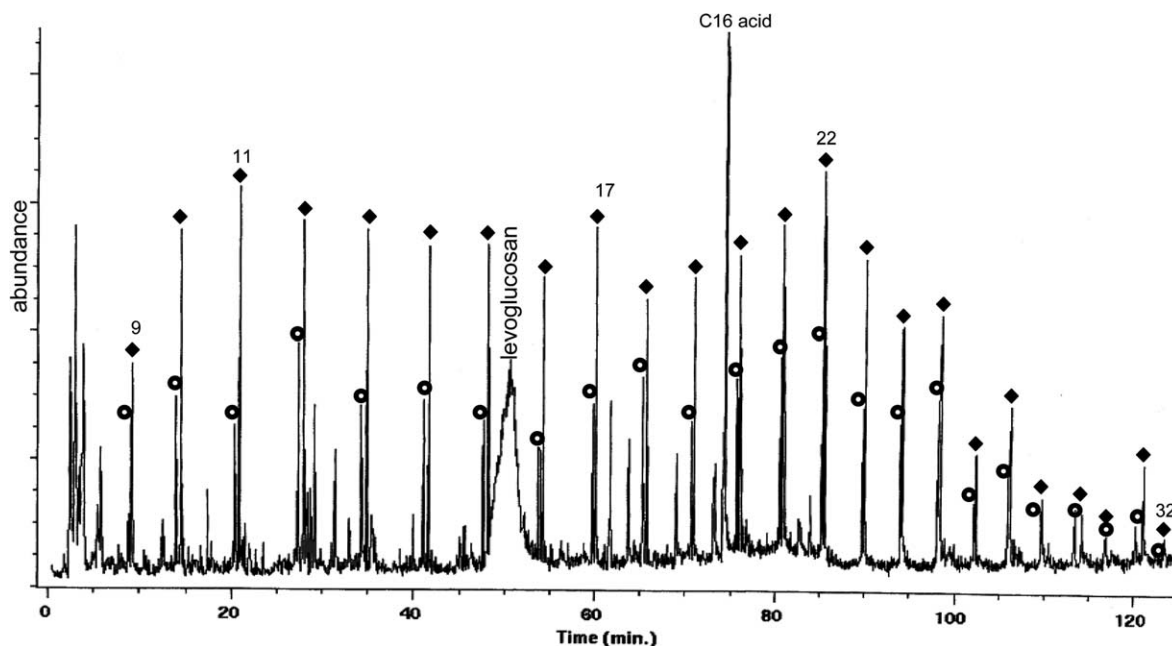


Fig. 4. Ion chromatogram (m/z 57) showing the distribution of n -alk-1-enes (●) and n -alkanes (◆) in 650 °C Curie point pyrolysate of Cestas ROM (other products, exhibiting an ion at m/z 57, like levoglucosan and palmitic acid methyl ester, are also observed).

was previously observed in THM experiments, for example with standard lignin (Gauthier et al., 2003) and attributed to insufficient contact between the reagent and the solid material. This problem would be especially important with non-hydrolysable macromolecular materials like the ROM studied here. Indeed, this refractory material contains potentially labile linkages, such as ethers, not affected by acid attack during the isolation treatment due to efficient steric protection. TMAH access to these linkages is also probably difficult so that the corresponding products are partly generated through purely thermal reaction. In addition to phenolic compounds, THM of lignin results in the production of methyl esters of aromatic carboxylic acids, including various methoxy-substituted products, not formed upon conventional pyrolysis (Clifford et al., 1995; Martín et al., 1995). Several of these compounds were generated from the ROM (26, 36, 37, 38, 40, 42–45) with 42 and 44 dominating the first part of the trace; 3,4-dimethoxyacetophenone (41) and 3,4-dimethoxybenzaldehyde (39) are also methylated THM products related to lignin.

Previous studies indicated that products related to carbohydrates are generally lacking or occur in only small amounts in THM products (Clifford et al., 1995). In agreement with these observations, none of the numerous polysaccharide-derived compounds that abundantly occurred in the conventional pyrolysate were generated upon THM of the ROM.

The second part of the trace shows the most abundant peaks [Fig. 5(a)]. These chiefly correspond to the

methylated counterparts, as methyl esters and methyl ethers, of normal carboxylic acids: alkanolic acids, alkenoic acids, ω -hydroxy alkanolic acids and α,ω -alkanedioic acids (Fig. 6). These acids, except for palmitic acid and minor amounts of C_{14} , C_{15} and $C_{16:1}$ fatty acids, were not observed in the conventional pyrolysate. The series of alkanolic acid ranges from C_6 to C_{30} , and exhibits a trimodal distribution (maximum at C_{16} and submaxima at C_8 and C_{26}). No clear cut odd- or even-carbon number predominance is observed in the C_6 – C_{13} range, whereas the even carbon numbered compounds predominate for the higher homologues. The monounsaturated alkenoic acids correspond to a minor series ranging from only C_6 to C_{16} . This series shows a maximum at C_8 and does not exhibit any clear carbon number predominance so that its distribution is similar to the distribution of the alkanolic acids in the C_6 – C_{13} range. An abundant series of even carbon-numbered ω -hydroxy alkanolic acids is observed in the C_{16} – C_{28} range with a maximum at C_{22} and this compound is one of the major peaks in the second part of the trace. The α,ω -alkanedioic acids correspond to a minor series of even-carbon-numbered compounds ranging from C_{20} to C_{26} ; α,ω -diacids can be formed by microbial oxidation of fatty acids, with the intermediate formation of ω -hydroxy acids (Eglinton and Hunneman, 1968; Hita et al., 1996). However, marked differences in the distribution of the n -alkanoic acids, including the presence of both even- and odd-carbon numbered homologues,

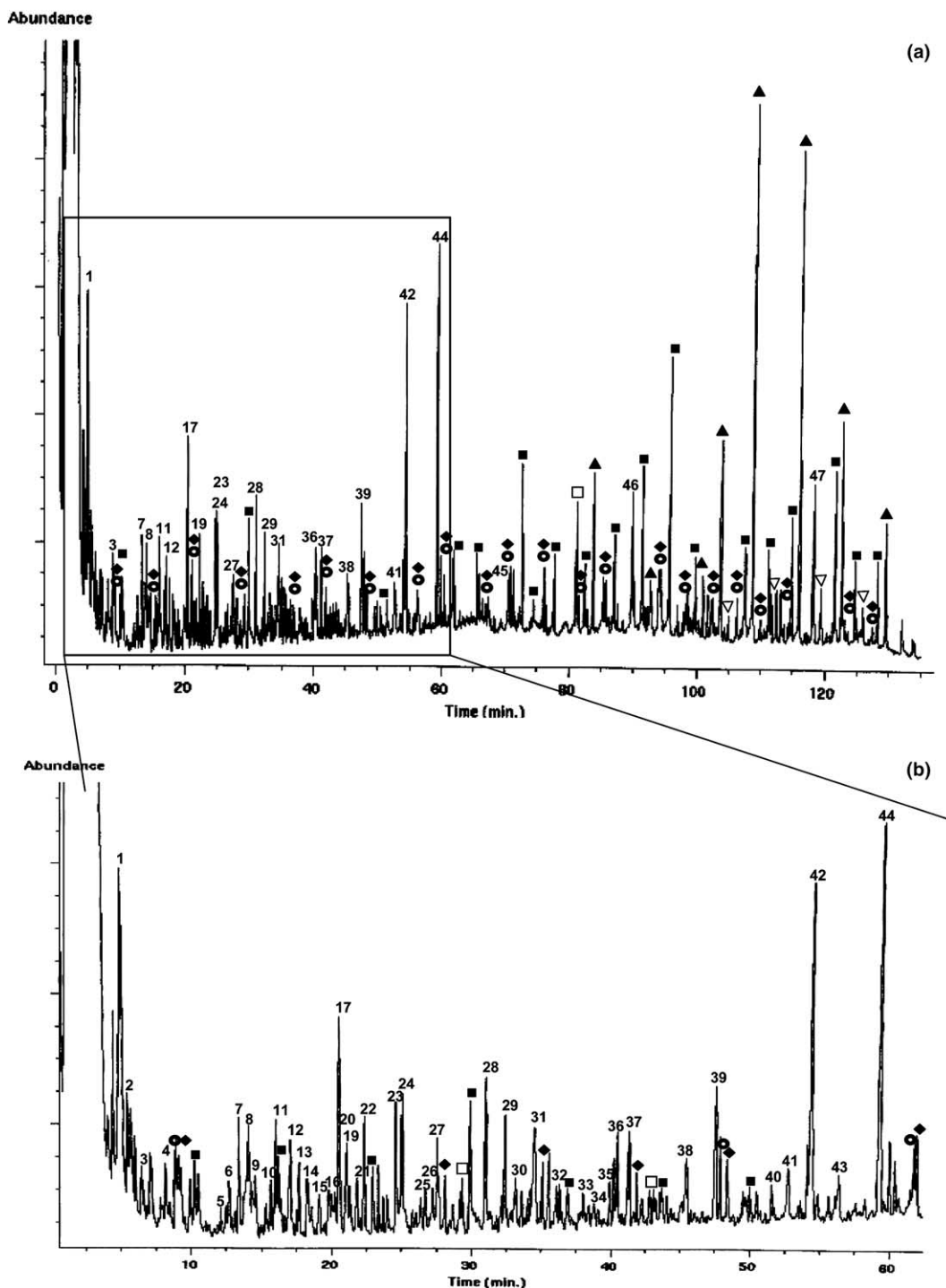


Fig. 5. (a) Total ion current trace of 650 °C Curie point pyrolysate of Cestas ROM in presence of TMAH, (b) expanded area of the beginning of the trace. See Table 2 for identification of numbered peaks; *n*-alkanes (♦), *n*-alk-1-enes (●).

compared to the distributions of the former two series, comprising exclusively even-carbon numbered compounds, rules out such an origin.

In fact, these two series reveal the presence of suberin in the ROM. Indeed, ω -hydroxy alkanolic acids and α,ω -alkanedioic acids are typical products of suberin when

Table 2
Products formed upon 650 °C Curie point THM of Cestas ROM

Peak number	Compound ^a
1	Toluene
2	Ethylbenzene
3	1,4-Dimethylbenzene
4	1,2-Dimethylbenzene
5	Propylbenzene
6	1-Ethyl-4-methylbenzene
7	Unidentified
8	Phenol
9	1-Methoxy-2-methylbenzene
11	1-Methoxy-4-methylbenzene
12	Butanedioic acid
13	1,2-Ethanediol-1-(2-furanyl)
14	2-Methylphenol
15	4-Methylphenol
16	3-Methylphenol
17	4-Methoxyphenol
19	Dimethylphenol
20	1-Ethyl-4-methoxybenzene
21	2,4,6-Trimethylphenol
22	Ethyl,methylphenol
23	1,2-Dimethoxybenzene
24	Ethenyl-3-methoxybenzene
25	Methyl-1,4-dimethoxyphenol
26	3-Methylbenzoic acid
27	2-Methoxy-4-methylphenol
28	5-Methoxy-2,3-dimethylphenol
29	2-Hydroxy-3-methyl benzaldehyde
30	4-Ethyl-2-methoxybenzene
31	Trimethoxybenzene
32	2-Methylnaphthalene
33	4-Methyl-3-methoxy benzoic acid
34	2,6-Dimethoxyphenol
35	1,2-Dimethoxy-4-ethenylbenzene
36	3-Methoxybenzoic acid
37	4-Methoxybenzoic acid
38	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid
39	3,4-Dimethoxybenzaldehyde
40	4-Methoxybenzenepropanoic acid
41	3,4-Dimethoxyacetophenone
42	3,4-Dimethoxybenzoic acid
43	3,4-Dimethoxy benzeneacetic acid
44	3-(4-Methoxyphenyl-2-)propenoic acid (<i>p</i> -coumaric acid)
45	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid)
46	Unidentified
47	Unidentified
◆	<i>n</i> -Alk-1-enes
●	<i>n</i> -Alkanes
■	Acids
□	Unsaturated acids
▲	ω-Hydroxyacids
▽	Diacids

^a Acids were analysed as methyl esters.

submitted to THM (Gonzalez-Vila et al., 1996; del Rio and Hatcher, 1998). Suberins are polyesters, forming a protective barrier on the underground surfaces of plants and also occur in bark. These insoluble biomacromolecules are mostly composed of interesterified ω-hydroxy alkanolic acids and α,ω-alkanedioic acids (e.g. Kolattukudy, 1976, 1980; Holloway, 1983). The resulting aliphatic domains in suberins are also covalently linked by ester linkages to aromatic domains composed of aromatic carboxylic acids like ferulic acid and *p*-coumaric acid. Upon conventional pyrolysis, suberins do not generate significant amounts of specific GC-amenable pyrolysis products (Gonzalez-Vila et al., 1996). In contrast, THM results in efficient ester cleavage, releasing the typical monomers of suberins (Gonzalez-Vila et al., 1996; del Rio and Hatcher, 1998; Santos-Bento et al., 2001). The distributions observed in the present case for the ω-hydroxy alkanolic acids and the α,ω-alkanedioic acids are similar to those reported upon THM of standard suberins in the above studies; accordingly, these distributions indicate a suberin contribution to the ROM. The aromatic domains of suberin are probably the source of part of the *p*-coumaric acid and ferulic acid [44 and 45 in Fig. 5(a)], but several other sources can also be considered for these aromatic acids, including lignin (e.g. Clifford et al., 1995). The long chain *n*-alkanoic acids up to C₃₀ may also originate partly from suberin since such acids also contribute to suberin structure (e.g. Kolattukudy, 1976). The presence of suberin was recently evidenced through THM of soil samples (Nierop, 1998, 2001) and an important contribution of root-derived components, especially of suberin, was reported by the latter author for an acid sandy soil. In addition, a major contribution of suberin to the alkyl components of soil organic matter was inferred from solid-state ¹³C NMR data (Kögel-Knabner et al., 1992). However, all these previous studies were performed on the bulk of the organic matter of the soil, only the lipid fraction being removed, and not on the insoluble non-hydrolysable fraction as in the present case.

Cutins, the insoluble polyesters forming a protective layer on the aerial surfaces of plants, like leaves and twigs, exhibit the same type of structure as the aliphatic domains of suberins and are also readily detected using THM (de Leeuw and Baas, 1993). However, suberins and cutins are differentiated by the chain length of their monomeric units and the abundance of mid-chain hydroxy or keto functions (e.g. Kolattukudy, 1976, 1980; Holloway, 1982; Matzke and Riederer, 1991): long chains (>C₂₀) are dominant for suberins while shorter chains occur in cutins and much fewer mid-chain oxygenated groups often occur for suberins compared to cutins. The distributions of the ω-hydroxy alkanolic acids and α,ω-alkanedioic acids generated from the Cestas ROM and the lack of significant amounts of mid-chain substituted products thus indicate that the polyester

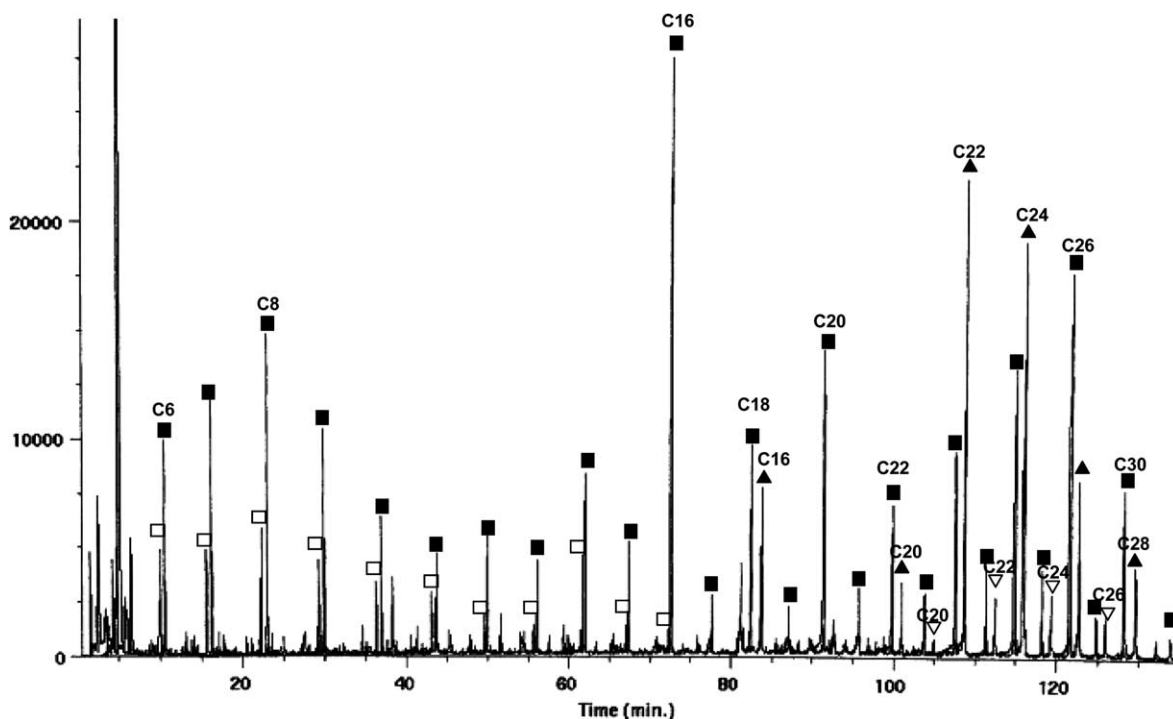


Fig. 6. Summed ion chromatogram (m/z 55 and 74) showing distribution of acids (as methyl esters) in 650 °C Curie point pyrolysate of Cestas ROM in presence of TMAH: n -alkanoic acids (■), n -alkenoic acids (□), ω -hydroxy acids (▲) and α,ω -diacids (▽).

contribution to this refractory fraction corresponds to suberin rather than cutin. This is also supported by the lack of significant amounts of C_{12} and C_{14} hydroxy alkanolic acids since the latter are abundant components of pine cutin whereas they are absent from pine suberin (e.g. Nierop and Verstraten, 2004). The similar distributions observed for the ω -hydroxy alkanolic acids and α,ω -alkanedioic acids from the Cestas ROM, compared to standard suberins, suggest that the suberin fraction of the ROM is probably not (or only weakly) altered. The occurrence of suberin rather than cutin within the Cestas soil is in accordance with field observations indicating that the bulk OM derived from aerial parts of the plants remains on the acid soil surface due to low biological activity.

Suberin, like cutin, being a polyester based on a network of interesterified monomeric units, is potentially a hydrolysable biopolymer. Thus, no biopolyesters were retained in the refractory components isolated from maize leaves by using successive TFA and HCl treatments (Poirier et al., 2003). However, some other experiments aimed at releasing the monomeric units of cutin through hydrolysis, resulted in only partial depolymerisation and an insoluble residue was retained (e.g. Holloway, 1973). Similarly, the present observations indicate that the suberin fraction of the Cestas soil (or at least a part of it) survived the extensive hydrolysis treatment applied for

ROM isolation. The occurrence of this non-hydrolysable fraction should reflect either intrinsic resistance to hydrolysis and/or physical protection by some resistant components in the heterogeneous matrix of the ROM. Some increase in the relative contribution of suberin-related components to soil organic matter was previously observed with age (Rumpel et al., 2002) and also upon long term soil acidification (Nierop and Verstraten, 2003). It was considered by Kögel-Knabner et al. (1992) that increased cross-linking of suberin might occur in soil. This would result in increasing resistance to biodegradation and also to chemical hydrolysis. However in the latter study, as in the present one, pyrolysis data did not afford evidence of an especially high degree of cross-linking for the resistant material isolated through hydrolysis treatment. Accordingly, the resistance to hydrolysis of the suberin fraction occurring in the ROM of the Cestas soil would chiefly reflect physical protection rather than cross-linking, although some contribution of the latter process cannot be completely ruled out.

Doublets of n -alkanes/ n -alk-1-enes were observed for both conventional and THM experiments and they exhibited similar distributions. However, the relative abundance of these doublets was still lower in the latter case, thus reflecting the higher efficiency of THM in terms of production of GC-amenable products. The distribution of the doublets rules out tight relationships

with suberin or cutin. In contrast, as discussed in the section on conventional pyrolysis, this distribution is consistent with an origin from cutan and/or suberan for a large part of the doublets. However, the above observations, indicating a substantial contribution of suberin to the ROM while no cutin contribution occurred, favour a suberan source rather than a cutan one for these doublets.

Contrary to the predominantly even-carbon numbered *n*-alkanoic acids in the C₁₄–C₃₀ range, the shorter C₆–C₁₃ *n*-alkanoic and *n*-alkenoic acids are unlikely to be directly related to unaltered (or weakly altered) lipids or biopolymers. Such acids probably correspond to oxidative degradation products of lipids as observed by Amblès et al. (1994) for extracts from a forest podzol. The resulting short chain products were subsequently protected against further alteration. This protection results either from incorporation into the macromolecular components of the ROM through covalent linkages via non-hydrolysable ester bonds or from entrapment in the three dimensional macromolecular structure of the ROM, as observed for various low molecular weight products from humin (Grasset et al., 2002). The lack of branched alkanolic acids in the THM products suggests that no substantial amounts of bacterial components contributed to the ROM, since such acids 'especially the *iso* and *anteiso* ones' are typical bacterial markers (e.g. Perry et al., 1979; Boon et al., 1975; Meyers and Ishiwatari, 1993; Garcette-Lepecq et al., 2001). Such a weak bacterial input is consistent with the low bacterial growth typically observed in acid soils (e.g. Motavalli et al., 1995).

No nitrogen-containing products were detected either in the conventional pyrolysate or in the THM products. In contrast, previous studies have shown that these two methods can afford various nitrogenous compounds, including pyrroles, indoles, pyridines and nitriles, from the refractory fraction isolated from recent sediments and from the whole organic matter of soils (e.g. van Bergen et al., 1998; Garcette-Lepecq et al., 2000, 2001; Nie-rop et al., 2001). Upon THM of the refractory OM of recent sediments, a number of other nitrogen-containing compounds (piperidines, pyrimidines and triazines) and methyl derivatives of amino acids have also been observed in high relative abundance (Garcette-Lepecq et al., 2000). These nitrogen-containing products are thought to be derived from proteinaceous materials, especially from melanoidin type macromolecules formed by random condensation of monomers and other alteration products of proteins and polysaccharides (Mailard, 1917). It was noted, however, that melanoidins are not well detected by pyrolysis, especially when they exhibit a high degree of cross-linking (Poirier et al., 2000). Poor detection is also encountered for such melanoidins when using solid-state ¹³C NMR (Poirier et al., 2000). In contrast, melanoidins exhibit intense FTIR

absorptions around 1630 and 1710 cm⁻¹, but such absorptions are far from being specific. Based on the low nitrogen content and high C/N atomic ratio of the ROM and the results of thermal degradation, it appears that protein-derived materials do not afford a large contribution to the ROM. However, some contribution of highly cross-linked melanoidins cannot be discarded.

4. Conclusions

The main conclusions derived from bulk analysis, spectroscopic (FTIR and solid state ¹³C NMR) and pyrolytic (conventional and THM) studies of the insoluble and non-hydrolysable material isolated from an acid sandy forest soil are:

- This refractory fraction (ROM) accounts for a large part, ca. one third, of the whole organic matter of the soil.
- Elemental analysis and spectroscopic features rule out a major contribution of alkyl chains, and hence a highly aliphatic nature for this ROM, while a variety of oxygen-containing groups occurs along with aromatic units.
- Unaltered and weakly altered (demethoxylated) lignin occur in the ROM and also, probably, some condensed tannins.
- Polysaccharidic material, attributed to cellulose, survived in the isolated ROM, in spite of the drastic acid treatment and its chemical structure remained largely unaltered, probably due to efficient protection within ligno-cellulose complex and/or high crystallinity.
- Suberin affords a substantial contribution and specific products originating from its aliphatic domains were observed upon THM, thus reflecting a substantial input of root-derived material to the ROM. Although this polymer is based on interesterified monomeric units, its survival in the ROM chiefly reflects a high degree of steric protection within the macromolecular matrix.
- Suberan only occurs as a minor component in the ROM, in spite of its non-hydrolysable nature, thus indicating a low input of this intrinsically refractory biomacromolecular material to the OM in the Cestas soil.
- Fatty acids, with an extended carbon number range, are present in the ROM. They are either linked to the macromolecular structure, through sterically protected and thus non-hydrolysable ester bonds, or trapped within this structure. Some of them, the short chain ones, correspond to oxidative degradation products of lipids, while the others directly originate from biomolecules, including suberin and higher plant waxes.

- The ROM exhibits a low nitrogen content. Furthermore, no N-containing products were detected either upon conventional pyrolysis or upon THM. Accordingly, protein-derived moieties do not afford a significant contribution to the ROM. However, the occurrence of some highly cross-linked melanoidins, barely detectable via thermal degradation or spectroscopic observations, cannot be discarded.
- The lack of branched compounds in the acids released from the ROM through pyrolysis points to the lack of a significant contribution of bacterial components to these acid moieties.
- Different constituents of the ROM were evidenced by conventional pyrolysis and by THM. Thus, the occurrence of cellulose was readily revealed by the former method but not by the latter, whereas a reverse situation was found for the suberin fraction.

Acknowledgements

We thank Drs D. Arrouays and C. Jolivet (Unité de Sciences du Sol, INRA, Orléans) for providing the soil sample from Cestas and general information on this material. Y. Pouet and J. Macquet are also gratefully acknowledged for technical support for pyrolytic and NMR studies, respectively. Drs. K. Nierop and P. Hatcher are acknowledged for detailed and constructive reviews.

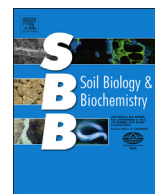
Associate Editor—Ian Bull

References

- Allard, B., Templier, J., Largeau, C., 1998. An improved method for the isolation of artifact-free algalanans from microalgae. *Organic Geochemistry* 28, 543–548.
- Almendros, G., Sanz, J., 1992. A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin. *Geoderma* 53, 79–95.
- Almendros, G., Guadalix, M.E., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., 1996. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humin. *Organic Geochemistry* 24, 651–659.
- Almendros, G., Dorado, J., Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., 1997. Pyrolysis of carbohydrate-derived macromolecules: its potential in monitoring the carbohydrate signature of geopolymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 40–41, 599–610.
- Alperin, M.J., Balesdent, J., Benner, R.H., Blough, R.F., Christman, R.F., Druffel, E.R.M., Frimmel, F.H., Guggenberger, G., Repeta, D.J., Richnow, H.H., Swift, R.S., 1995. How can we best characterize and quantify pools and fluxes of nonliving organic matter. In: Zepp, C., Sonntag, C. (Eds.), *The Role of Nonliving Organic Matter in the Earth's Carbon Cycle*. Wiley, New York, pp. 67–80.
- Ambles, A., Jambu, P., Parlanti, E., Joffre, E., Riffe, C., 1994. Incorporation of natural monoacids from plant residues into an hydromorphic forest podzol. *European Journal of Soil Science* 45, 175–182.
- Amelung, W., Cheshire, M.V., Guggenberger, G., 1996. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1631–1639.
- Augris, N., Balesdent, J., Mariotti, A., Derenne, S., Largeau, C., 1998. Structure and origin of insoluble and non-hydrolyzable, aliphatic organic matter in a forest soil. *Organic Geochemistry* 28, 119–124.
- Boon, J.J., de Leeuw, J.W., Schenk, P.A., 1975. Organic geochemistry of Walvis Bay diatomaceous ooze – I. Occurrence and significance of the fatty acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 39, 1559–1565.
- Challinor, J.M., 1994. On the mechanism of high temperature reactions of quaternary ammonium hydroxides with polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 29, 223–224.
- Chefetz, B., Chen, Y., Clapp, C.E., Hatcher, P.G., 2000. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil Science Society of America Journal* 64, 583–589.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, P.G., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetraethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23, 169–175.
- de Leeuw, J.W., Baas, M., 1993. The behaviour of esters in the presence of tetramethylammonium salts at elevated temperatures; flash pyrolysis or flash chemolysis?. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 26, 175–184.
- de Leeuw, J.W., Largeau, C., 1993. A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. In: Engel, M., Macko, S. (Eds.), *Organic Geochemistry. Principles and Applications*. Plenum Press, New York.
- del Rio, J.C., Hatcher, P.G., 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 29, 1441–1451.
- del Rio, J.C., Martín, F., Gonzalez-Vila, F.J., 1996. Thermally assisted hydrolysis and alkylation as a novel pyrolytic approach for the structural characterization of natural biopolymers and geomacromolecules. *Trends in Analytical Chemistry* 15, 70–79.
- Eglinton, G., Hunneman, D.H., 1968. Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids – III. The mass spectra of the methyl esters trimethylsilyl ethers of aliphatic hydroxy acids. A facile method of double bond location. *Organic Mass Spectrometry* 1, 593–611.
- Eswaran, H., van den Berg, E., Reich, P., 1993. Organic carbon in soils of the world. *Soil Science Society of America Journal* 57, 192–1949.
- Galletti, G.C., Reeves, J.B., 1992. Pyrolysis/gas chromatography/ion trap detection of polyphenols (vegetal tannins):

- preliminary results. *Organic Mass Spectrometry* 27, 226–230.
- Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Largeau, C., Bouloubassi, I., Saliot, A., 2000. Origin and formation pathways of kerogen-like organic matter in recent sediments of the Danube delta (northwestern Black Sea). *Organic Geochemistry* 31, 1663–1683.
- Garcette-Lepecq, A., Derenne, S., Largeau, C., Bouloubassi, A., Saliot, A., 2001. Thermally assisted hydrolysis and methylation of kerogen-like organic matter in a recent sediment of the Danube delta (northwestern Black Sea). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 147–164.
- Gauthier, A., Derenne, S., Largeau, C., Dupont, L., Guillon, J., Dumonceau, J., Aplincourt, M., 2003. Comparative study of ligno-cellulosic material from wheat straw and of pure and mixed standard compounds via solid state ^{13}C NMR spectroscopy, conventional pyrolysis and TMAH thermochemolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 67, 277–293.
- Gobé, V., Lemée, L., Amblès, A., 2000. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Organic Geochemistry* 31, 409–419.
- Gonzalez-Vila, F.J., del Rio, J.C., Martin, F., Verdejo, T., 1996. Pyrolytic alkylation-gas chromatography-mass spectrometry of model polymers. Further insights into the mechanism and scope of the technique. *Journal of Chromatography A* 750, 155–160.
- Grasset, L., Guignard, C., Amblès, A., 2002. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetraethylammonium acetate. *Organic Geochemistry* 33, 181–188.
- Hatcher, P.G., 1987. Chemical structural studies of natural lignin by dipolar dephasing solid-state C-13 nuclear magnetic resonance. *Organic Geochemistry* 11, 31–39.
- Hatcher, P.G., Clifford, D.J., 1997. The Organic Geochemistry of coal: From plant materials to coal. *Organic Geochemistry* 27, 257–274.
- Hatcher, P.G., Minard, R.D., 1995. Comment on the origin of benzenecarboxylic acids in pyrolysis methylation studies. *Organic Geochemistry* 23, 991–994.
- Hatcher, P.G., Spiker, E.C., 1988. Selective degradation of plant biomolecules. In: Frimmel, F.H., Christman, R.F. (Eds.), *Humic Substances and Their Role in the Environments*. Wiley, New York, pp. 59–74.
- Hatcher, P.G., Maciel, G.E., Dennis, L.W., 1981. Aliphatic structure of humic acids; a clue to their origin. *Organic Geochemistry* 3, 43–48.
- Hita, C., Parlanti, E., Jambu, P., Joffre, J., Amblès, A., 1996. Triglyceride degradation in soil. *Organic Geochemistry* 25, 19–28.
- Holloway, P.J., 1973. Cutins of *Malus pumila* fruits and leaves. *Phytochemistry* 12, 2913–2920.
- Holloway, P.J., 1982. The chemical constitution of plant cutins. In: Cutler, D.F., Alvin, K.L., Price, C.E. (Eds.), *The Plant Cuticle*. Academic Press, New York, pp. 45–85.
- Holloway, P.J., 1983. Some variations in the composition of suberin from cork layers of higher plants. *Phytochemistry* 22, 495–502.
- Jolivet, C., 2000. Le carbone organique des sols des Landes de Gascogne, variabilité spatiale et effets des pratiques sylvicoles et agricoles. Ph.D. thesis, Université d'Orléans, 313p.
- Jolivet, C., Arrouays, D., Lévêque, J., Andreux, F., Chenu, C., 2003. Organic carbon dynamics in soil particle-size separates of sandy spodosols when forest is cleared for maize cropping. *European Journal of Soil Science* 54, 257–268.
- Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., 1992. Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles: implications for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules. *The Science of the Total Environment* 117/118, 175–185.
- Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Tegelaar, E.W., Hatcher, H., Kerp, H., 1994. A lignin-like polymer in the cuticle of spruce needles: implications for the humification of spruce litter. *Organic Geochemistry* 21, 1219–1228.
- Kolattukudy, P.E., 1976. *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier, Amsterdam.
- Kolattukudy, P.E., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990–1000.
- Largeau, C., Derenne, S., Casadevall, E., Kadouri, A., Sellier, N., 1986. Pyrolysis of immature torbanite and resistant biopolymer (PRB A) isolated from extant alga *Botryococcus braunii*. Mechanism of formation and structure of torbanite. In: Rullkötter, J. (Ed.), *Advances in Organic Geochemistry*. Pergamon Press, Oxford, pp. 1023–1032.
- Lichtfouse, E., Dou, S., Girardin, C., Grably, M., Balesdent, J., Behar, F., Vandenbroucke, M., 1995. Unexpected ^{13}C -enrichment of organic components from wheat crop soils: evidence for the in situ origin of soil organic matter. *Organic Geochemistry* 23, 865–868.
- Mailland, L.C., 1917. Identité des matières humiques de synthèse avec les matières humiques naturelles. *Annales de chimie (Paris)* 7, 113–152.
- Martin, F., del Rio, J.C., Gonzalez-Vila, F.J., Verdejo, T., 1995. Thermally assisted hydrolysis and alkylation of lignins in the presence of tetra-alkylammonium hydroxides. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 35, 1–13.
- Matzke, K., Riederer, M., 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., *Fagus sylvatica* L.. *Planta* 185, 233–245.
- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine Organic Geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20, 867–900.
- Motavalli, P.P., Palm, C.A., Parton, W.J., Elliot, E.T., Frey, S.D., 1995. Soil pH and organic C dynamics in tropical forest soils: Evidence from laboratory and simulation studies. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1589–1599.
- Nierop, K.G.J., 1998. Origin of aliphatic compounds in a forest soil. *Organic Geochemistry* 29, 1009–1016.
- Nierop, K.G.J., 2001. Temporal and vertical organic matter differentiation along a vegetation succession as revealed by pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 111–132.
- Nierop, K.G.J., Verstraten, J.M., 2003. Organic matter formation in sandy subsurface horizons of dutch coastal dunes in relation to soil acidification. *Organic Geochemistry* 34, 499–513.

- Nierop, K.G.J., Verstraten, J.M., 2004. Rapid molecular assessment of the bioturbation extent in sandy soil horizons under pine using ester-bound lipids by on-line thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 1081–1088.
- Nierop, K.G.J., Pullemen, M.M., Marinissen, J.C.Y., 2001. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: a study using pyrolysis techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 755–764.
- Oades, J.M., Vassallo, A.M., Waters, A.G., Wilson, M.A., 1987. Characterization of organic matter in particle size and density fractions from a red-brown earth by solid-state ^{13}C NMR. *Australian Journal of Soil Research* 25, 71–82.
- Pastorova, I., Botto, R.E., Arisz, P.W., Boon, J.J., 1994. Cellulose char structure: a combined analytical Py-GC-MS, FTIR, and NMR study. *Carbohydrate Research* 262, 27–47.
- Paul, E.A., Follett, R.F., Leavitt, S.W., Halvorson, A., Peterson, G.A., Lyon, D.J., 1997. Radiocarbon dating for determination of soil organic matter pool sizes and dynamics. *Soil Science Society of American Journal* 61, 1058–1067.
- Perry, G.J., Volkman, J.K., Johns, R.B., Bavor, H.J., 1979. Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1715–1725.
- Poirier, N., Derenne, S., Balesdent, J., Mariotti, A., Massiot, C., Largeau, C., 2003. Isolation and analysis of the non-hydrolysable fraction of a forest soil and an arable soil (Lacadée, southwest France). *European Journal of Soil Science* 54, 243–255.
- Poirier, N., Derenne, S., Balesdent, J., Rouzaud, J.N., Mariotti, C., Largeau, C., 2002. Abundance and composition of the refractory organic fraction of an ancient, tropical soil (Pointe Noire, Congo). *Organic Geochemistry* 33, 383–391.
- Poirier, N., Derenne, S., Rouzaud, J.N., Largeau, C., Mariotti, J., Balesdent, J., Maquet, J., 2000. Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France). *Organic Geochemistry* 31, 813–827.
- Pouwels, A.D., Eijkel, G.B., Boon, J.J., 1989. Curie-point pyrolysis-capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 14, 237–280.
- Preston, C.M., 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science* 161, 144–166.
- Preston, C.M., Trofymow, J.A., Sayer, B.G., Niu, J.N., 1997. ^{13}C nuclear resonance spectroscopy with cross-polarisation and magic angle spinning investigation of the proximate-analysis fractions used to assess litter quality in decomposition studies. *Canadian Journal of Botany* 75, 1601–1613.
- Quénéa, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2004. Variation in lipid relative abundance and composition among different particle-size fractions of a forest soil. *Organic Geochemistry* 35, 1355–1370.
- Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F., 2002. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry* 33, 1131–1142.
- Saiz-Jimenez, C., de Leeuw, J.W., 1986. Lignin pyrolysis products: their structures and their significance as biomarkers. *Organic Geochemistry* 10, 869–876.
- Santos-Bento, M.F., Pereira, H., Cunha, M.A., Moutinho, K.J., van den Berg, K.J., Boon, J.J., 2001. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 57, 45–55.
- Schulten, H.-R., Sorge, C., 1995. Pyrolysis methylation mass spectrometry of whole soils. *European Journal of Soil Science* 46, 567–579.
- Tegelaar, E.W., de Leeuw, J.W., Saiz-Jimenez, C., 1989. Possible origin of aliphatic moieties in humic substances. *The Science of Total Environment* 81/82, 1–17.
- Tegelaar, E.W., Hollman, G., van der Vegt, P., de Leeuw, J.W., Holloway, P.J., 1995. Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: recognition of an insoluble, non-hydrolyzable, aliphatic biomacromolecule (suberan). *Organic Geochemistry* 23, 239–250.
- van Bergen, P.F., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1997. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Organic Geochemistry* 26, 117–135.
- van Bergen, P.F., Nott, C.J., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – IV. Preliminary results from a study of the effect of soil pH on organic matter decay. *Organic Geochemistry* 29, 1779–1795.
- van Heemst, J.D.H., van Bergen, P.F., Stankiewicz, A., de Leeuw, J.W., 1999. Multiple sources of alkylphenols produced upon pyrolysis of DOM, POM and recent sediments. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 52, 239–256.
- Wilson, M.A., Hatcher, P.G., 1988. Detection of tannins in modern and fossil barks and in plant residues by high-resolution solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Organic Geochemistry* 12, 539–546.
- Wilson, M.A., Vassallo, A.M., Perdue, A.M., Reuter, J.H., 1987. Composition and solid state nuclear magnetic resonance study of humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Analytical Chemistry* 59, 551–558.



Incorporation of ^{13}C labelled shoot residues in *Lumbricus terrestris* casts: A combination of transmission electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry

A. Vidal ^a, L. Remusat ^b, F. Watteau ^{c, d}, S. Derenne ^a, K. Quenea ^{a, *}

^a UMR Milieux environnementaux, transferts et interactions dans les hydrosystèmes et les sols (METIS), UMR 7619, Sorbonne Université UPMC-CNRS-EPHE, 4 place Jussieu, F-75252 Paris, France

^b Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux, et de Cosmochimie (IMPMC), UMR CNRS 7590, Sorbonne Universités-UPMC-IRD-Muséum National d'Histoire Naturelle, CP52 – 57 rue Cuvier, F-75005 Paris, France

^c Laboratoire Sols et Environnement (LSE), UMR 1120, Université de Lorraine-INRA, 2 avenue de la Forêt de Haye-TSA 40602, F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

^d Observatoire Terre Environnement de Lorraine (OTELO), CNRS-Université de Lorraine, UMS 3562, 15 rue Notre Dame des Pauvres, BP 20, F-54501 Vandœuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2015

Received in revised form

13 October 2015

Accepted 23 October 2015

Available online 6 November 2015

Keywords:

Earthworms

Organic matter incorporation

Soil microorganisms

Isotopic labelling

Microscale analyses

ABSTRACT

Earthworms transform organo-mineral associations in soil, especially by incorporating fresh residues inside casts where the microbial abundance and activity are enhanced. The heterogeneous distribution of organic carbon in these structures influences decomposition levels at the microscale. The incorporation of ^{13}C labelled plant residues by *Lumbricus terrestris* inside cast was investigated, through the innovative combination of two fine scale imaging techniques: transmission electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS). The association of these methods sheds new lights on organo-mineral structures. Different types of organic matter (plant residues, microbial remains) were identified in the casts and the freshly incorporated residues could be differentiated from the indigenous organic matter thanks to $\delta^{13}\text{C}$ NanoSIMS mapping. ^{13}C labelled bacteria and fungi abundance and diversity highlight their preeminent role in litter decomposition within casts. Labelled plant residues observed at various stages of decomposition and microorganisms presented highly variable $\delta^{13}\text{C}$ values, emphasizing the complexity of organic matter dynamics and the importance of microscale analyses to describe this variability. Thus, the combination of NanoSIMS and TEM shows great potential to relate organic matter stages of decomposition with their ^{13}C signature.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Organic matter is a key resource for soil fauna and microorganisms. Earthworms account for the main invertebrate biomass in soils (Edwards, 2004) and are recognized as essential soil engineers (Lavelle et al., 1998). These saprophagous invertebrates ingest both organic (plant residues and microorganisms) and mineral (soil particles) materials, in different proportions depending on their ecological category. Anecic earthworms, which are the dominant ecological category in European ecosystems, feed on surface litter

which is dragged into their burrows (Lee, 1985). During ingestion, soil and plant residues are mixed, intimately associated with mucus and excreted along burrows or at the soil surface in the form of casts (Guggenberger et al., 1996; Six et al., 2004). This diet influences organic matter evolution within soil, i.e. incorporation, degradation and sequestration (Lee, 1985). Indeed, when plant residues are deposited on the soil surface, they can either be mineralized, releasing CO_2 to the atmosphere, or transferred into the soil as various organic compounds. Earthworms favour the transfer of carbon into soil aggregates (Fonte et al., 2012; Arai et al., 2013), casts and burrows (Jégou et al., 2000; Stromberger et al., 2012). In general, casts, burrow walls and their surroundings present larger carbon concentrations compared to bulk soil or aggregates formed by physical or microbial processes (Jégou et al., 2000; Fonte et al., 2012). However, the impact of earthworms on soil and

* Corresponding author. UPMC, Tour 56-66, 4 place Jussieu, 75252 Paris, France. Tel.: +33 01 44 27 42 21.

E-mail address: katell.quenea@upmc.fr (K. Quenea).

Table 1

Composition of the soil used in the experiment.

Characteristics	Units	Values
Clay (<2 µm)	g kg ⁻¹	189
Loam (2–50 µm)	g kg ⁻¹	248
Sand (50–2000 µm)	g kg ⁻¹	563
Total carbonates (CaCO ₃)	g kg ⁻¹	19.0
CEC Metson	cmol kg ⁻¹	9.90
Organic carbon	g kg ⁻¹	0.12
Nitrogen	g kg ⁻¹	0.01

casts carbon stock is variable, depending on the studied time scales (Lubbers et al., 2013). In the presence of earthworms, a short term mineralization, decreasing the stock of carbon, is usually followed by a long term protection of carbon in soils (Brown et al., 2000). The initial mineralization step is mainly induced by an increase in the microbial activity due to the presence of readily available carbon from mucus or plant residues (Brown, 1995). After few months or years, the drying and ageing of casts tighten the bonds between organic matter, mucus and mineral particles (Brown et al., 2000). This phenomenon leads to the formation of organo-mineral aggregates with higher stability (Six et al., 2004; Zangerlé et al., 2011) where recalcitrant organic matter is integrated and protected from decomposition (Shipitalo and Protz, 1989). The effect of earthworms on carbon cycling has been widely studied using biochemical methods (Hong et al., 2011; Zangerlé et al., 2011). In addition, artificial ¹³C labelling litter has been used to follow the fate of carbon in the soil in the presence of earthworms (Fonte et al., 2007; Fahey et al., 2013). The large scale of analyses used in these studies does not give the possibility to visualize the interaction between soil–plant–microorganisms. However, the heterogeneous distribution of organic carbon in soil structures induces contrasted microbial activity areas. This distribution inside casts using *in situ* fine scale imaging has been little investigated, despite the high potential of this approach.

Nanoscale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) provides elemental and isotopic maps of organic and/or mineral materials at high spatial resolution (submicron). NanoSIMS brings the capacity to spatially track an isotopic label, hence identifying specific locations of components (Clode et al., 2009; Vogel et al., 2014). It has mainly been used in cosmochemistry, material science, biology and geology (McMahon et al., 2006; Herrmann et al., 2007a; Hoppe et al., 2013). It has recently been applied to soil science, first focussing on soil microorganisms (Herrmann et al., 2007b) and then to characterize organo-mineral associations in soil (Hatton et al., 2012; Heister et al., 2012; Keiluweit et al., 2012; Mueller et al., 2012; Remusat et al., 2012; Mueller et al., 2013; Vogel et al., 2014; Rumpel et al., 2015). Most of the efforts have focused on developing methodologies for calibration (Hatton et al., 2012), sample preparation (Mueller et al., 2012) or quantification of compounds in an artificial soil (Heister et al., 2012). Vogel et al. (2014) went a step further by reporting encouraging results on the proportion of OM associated to mineral particles in soil in the presence of labelled litter. A recent study compared the incorporation, after three years, of ¹³C and ¹⁵N labelled roots at two soil depths and demonstrated, thanks to the NanoSIMS, contrasting processes of stabilization depending on soil depths (Rumpel et al., 2015). Studies using NanoSIMS to understand the role of earthworms in soil are scarce. Gicquel et al. (2013) have double labelled earthworms with N and S to follow their fate in the earthworm intestinal epithelium and in the burrows of a peat soil using NanoSIMS. Thus, NanoSIMS shows great potential to investigate both physical and chemical roles of earthworms at the nanoscale.

Despite the high spatial resolution of the NanoSIMS, the identification of soil organic matter as plant residues or

microorganisms, such as bacteria or fungi, remains challenging. Combinations of NanoSIMS with other microscopic techniques are required (Moore et al., 2012; Remusat et al., 2012; Poch and Virto, 2014). The coupling of NanoSIMS with scanning electron microscopy (SEM) (Heister et al., 2012) or scanning transmission X-ray microscopy (STXM) and near edge X-ray absorption fine structure spectroscopy (NEXAFS) (Remusat et al., 2012) is helpful to identify the nature of the organic material sampled by NanoSIMS. The combination with the nm-scale resolution of the transmission electron microscopy (TEM) can be very powerful in identifying microstructures (Moore et al., 2012). It has also proven its efficiency to investigate organo-mineral associations in soil micro-aggregates (Watteau et al., 2006, 2012) and earthworm burrows (Pey et al., 2013) and casts (Pey et al., 2014). TEM has been used with NanoSIMS to study the structural and chemical properties in plant physiology (Clode et al., 2009; Misson et al., 2009; Smart et al., 2010; Moore et al., 2011).

This work aimed at investigating the incorporation and decomposition of plant residues in soil at the microscale using imaging techniques. To meet this objective, we analyzed two contrasted samples: (1) artificially ¹³C labelled litter prior to its incorporation inside casts and (2) plant residues incorporated inside the structurally complex earthworm casts and the microorganisms implied in their decomposition. We used, for the first time in this field of study, the innovative combination of two fine-scale imaging techniques, namely TEM and NanoSIMS, to characterize the nature of organic matter and to locate and determine the origin of incorporated organic matter thanks to ¹³C labelling.

2. Materials and methods

2.1. The experimental setup

The labelling experiment was performed using a mesocosm filled with approximately 75 L of a loamy-sand soil collected in a pasture (Oise, France). The soil characteristics were obtained from the Laboratoire d'Analyses des Sols (LSA) in Arras (France) (Table 1). The mesocosm was placed in a greenhouse where the soil humidity and temperature were maintained at 23% and 13 °C, respectively. Six anecic earthworms of the *Lumbricus terrestris* species were deposited onto the mesocosm.

Plants of Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) were artificially labelled in ¹³C (2.9 atom %) at the Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA) in Cadarache (France). Plants were grown under a controlled and constant ¹³CO₂ enriched atmosphere. Plant shoots were dried and subsequently mixed and homogenized during 40 s with a laboratory blender (Waring Commercial) in order to obtain few millimetre sticks. 250 g of such residues were deposited on the soil surface. After six months of experiment, residues were no longer visible at the soil surface. Some of the recognizable casts were randomly collected at the soil surface, on the same day, creating a composite sample. The initial litter deposited at the soil surface at the beginning of the experiment and the casts were analyzed for carbon and nitrogen using a Vario

Table 2

Initial litter and cast composition. n: Replicate number of analyses. Numbers in brackets indicate the standard error.

Measurements	Organic carbon	Nitrogen	C:N
Units	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	–
Litter (n = 13)	4.1 (0.7)	0.28 (0.2)	14.8 (1.2)
Casts (n = 3)	0.3 (0.2)	0.03 (0.0)	9.8 (0.1)

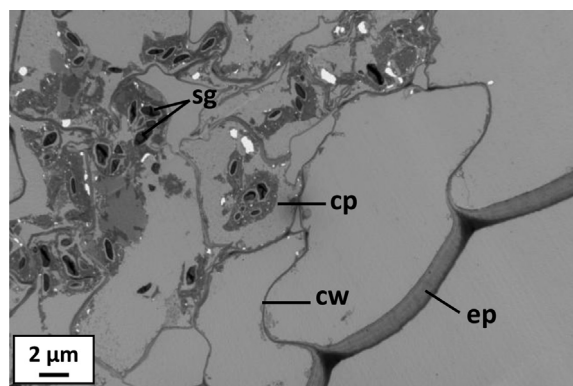


Fig. 1. TEM micrographs of initial shoots of *Lolium multiflorum*. cp, Chloroplast area; cw, cell wall; ep, epidermis; sg, starch grain.

pyrocube – Micromass Isoprime® installed at the UMR IEES (UPMC, Paris) (Table 2).

2.2. Ultrastructural analyses by TEM

Initial litter and fresh casts (2 g) were chemically fixed with osmium tetroxide and cast structure was physically preserved with agar (Watteau et al., 2006). About ten cubes of few mm³ were cut in the core of the composite cast sample, dehydrated in graded acetone series, and embedded in epoxy resin (Epon 812) until complete polymerization. Five repetitions were thus obtained for the litter and cast samples. Ultrathin sections of 80–100 nm were obtained using a diamond knife on a Leica Ultracut S ultramicrotome. The sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and analyzed with a JEOL EMXII transmission electron microscope operating at 80 kV. Each section was investigated in order to obtain a general view of the considered section and the occurrence of representative structures.

2.3. Nano-scale analyses by NanoSIMS

For NanoSIMS analyses, ultrathin sections of 200 nm from the same block of dehydrated osmium-fixed samples as for TEM were used in order to obtain twin sections, making possible the identification of the structures with nanoSIMS. To ensure charge

dissipation, samples were coated with 10 nm of gold. Images were acquired using the NanoSIMS 50 (Cameca, France) located at Museum National d'Histoire Naturelle in Paris, France. Sample surface was sputtered by a 1.5 pA Cs⁺ beam to obtain a 20 × 20 μm² images divided into 256 × 256 pixels, at 1 ms/pixel raster speed, with an approximate spatial resolution of 100 nm. Secondary images of ¹²C[−], ¹²C¹⁴N[−], ¹³C¹⁴N[−], ¹⁶O[−] and ²⁸Si[−] were simultaneously collected; between 50 and 70 frames were accumulated. It must be noted that the beam never got through the 200 nm thick samples, implying a very low sputtering rate (less than 0.04 nm/s). Prior to each acquisition, the sample surface was presputtered over 30 × 30 μm² using a 100 pA Cs⁺ beam for 10 min to remove gold coating and surface contamination and to reach sputtering steady-state. The images were processed using the L'IMAGE® software (L. Nittler, Carnegie Institution, USA). The ¹³C¹⁴N[−]/¹²C¹⁴N[−] ratio was used to generate ¹³C isotopic maps, relative to the PDB standard. For the sake of clarity, the values will be turned δ¹³C in the following. It must be noted that ¹²C¹⁴N[−] emission from the epoxy resin is negligible compared to the organic matter signal. A kerogen standard was used to check for instrumental stability over the course of the analytical session. As the instrumental fractionation was lower than 5‰ during the session, it was neglected for the δ¹³C correction. The resin was masked on the δ¹³C maps using a threshold defined thanks to the ¹²C¹⁴N pixel distribution. In brief, we determined that resin count rate was about 10,000 counts/s. Thus, we could mask the resin-rich areas and kept, for the isotopic images, only areas with the largest count rate. Regions of interest (ROI) were manually drawn to isolate microorganisms or plant residues and determine their isotopic composition. A total of seven NanoSIMS images were acquired on samples from the labelled experiment. The initial labelled litter was analyzed and images were used for the interpretation of cast images.

3. Results

3.1. Labelled litter characterization

Labelled litter TEM images revealed plant tissues such as thin cell walls, chlorophyll parenchyma and epidermis cells (Fig. 1). Within the cells of the parenchyma, chloroplast areas containing starch grains were recognized. Similar features were identified on NanoSIMS images (Fig. 2). The mean δ¹³C value for plant tissue was 1004‰. Cell walls and chloroplasts presented different mean δ¹³C

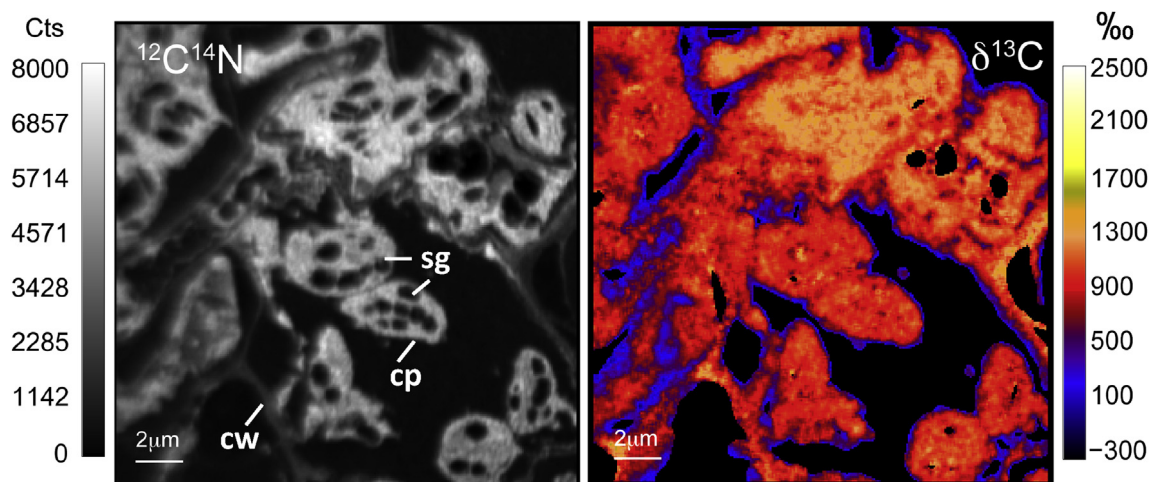


Fig. 2. NanoSIMS images of the ¹²C¹⁴N[−] and δ¹³C in initial shoots of *Lolium multiflorum*. For the isotopic image, a mask was applied to remove the resin contribution, using a defined threshold for the ¹²C¹⁴N[−] signal. Black regions hence represent either a hole on the section or resin. cp, Chloroplast area; cw, cell wall; ep, epidermis cell; sg, starch grain.

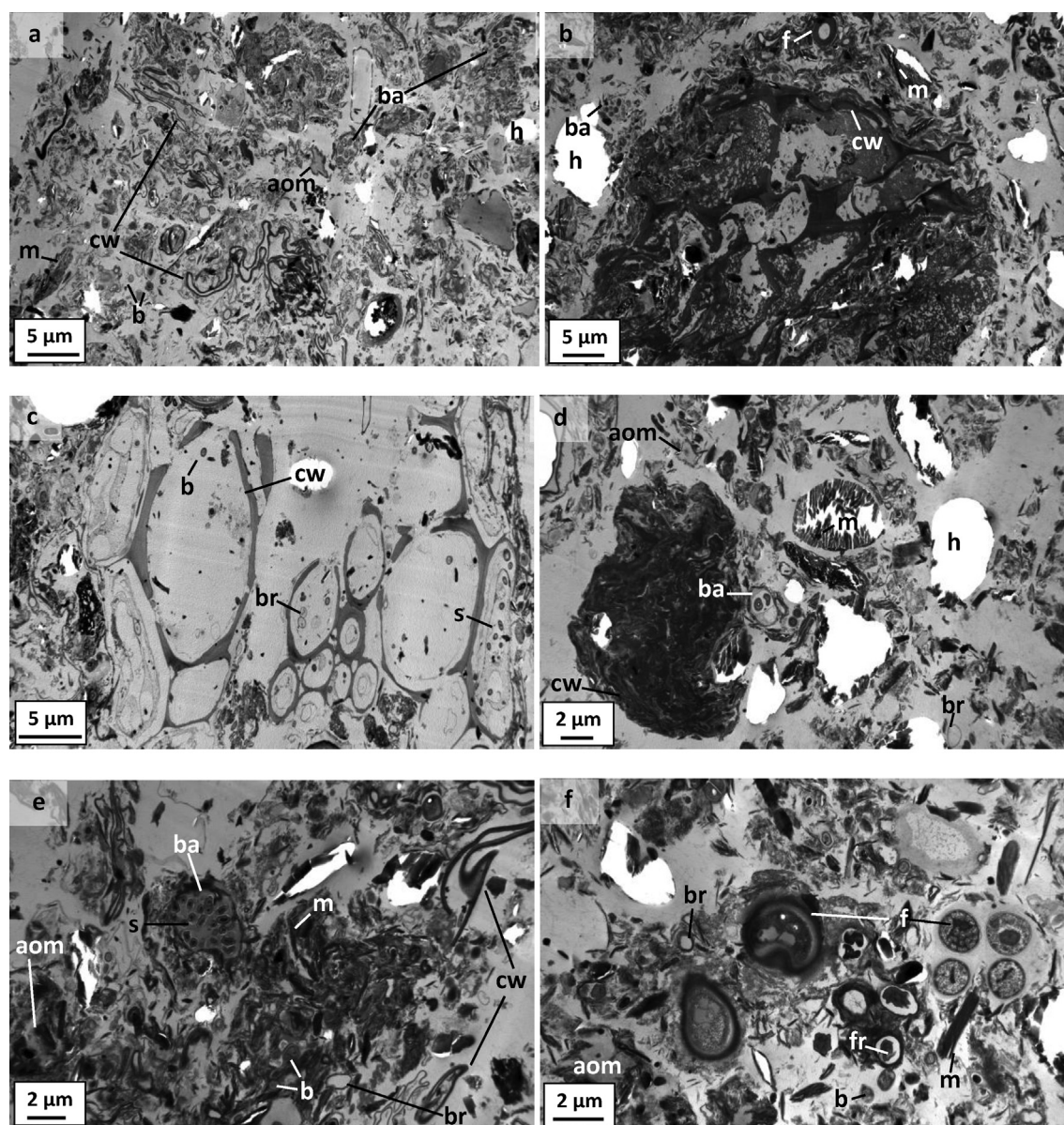


Fig. 3. TEM micrographs of casts of *Lumbricus terrestris*. (a) Differently-sized organic and mineral particles, isolated or associated; (b) packed plant cells; (c) degraded cell walls; (d) Organo-mineral aggregate; (e) Organo-mineral and bacterial aggregates and (f) Fungi. aom, amorphous organic matter; b, bacteria; ba, bacterial aggregate; br, bacterial residue; cw, cell wall; f, fungi; fr, fungal residue; h, hole; m, mineral; s, bacterial spore.

values, with 804 (standard error: 120) and 1041 (standard error: 57) ‰, respectively.

3.2. Earthworm casts characterization

The investigated cast contained organic and mineral particles with different sizes, either isolated or associated into aggregates (Fig. 3a). Aggregates showed variable proportion of organic matter – plant residues and microorganisms – and minerals. Organic constituents presented a large diversity of nature. Plant tissues could still be identified and they exhibited various degradation stages as a function of their fragmentation and degradation level (Fig. 3b and c). Vegetal tissues were still recognizable even though cells were packed (Fig. 3b) or cell walls degraded (Fig. 3c). Many long and twisting ‘laces’ (Fig. 3a) resembling to thin cell walls of initial litter (Fig. 1), were therefore recognized as cell walls residues. Cell walls residues were either isolated (Fig. 3a) or included in aggregates with quartz or clays (Fig. 3a and d). Minerals were also

present as isolated particles (Fig. 3a and d). Microorganisms were also frequently observed. As plant tissues were not completely degraded, bacteria colonized these residues (Fig. 3c). Bacteria could also be observed either isolated or forming colonies (Fig. 3a) and/or associated within aggregates (Fig. 3a and d). Amorphous organic matter, likely including exopolymers produced by bacteria was associated with minerals to form typical bacterial aggregates (Fig. 3e and f). Most of these bacteria still appeared intact, but some residues were present as bacterial cell walls (Fig. 3a and f) and spores, recognized for their dark core and coat (Willey et al., 2008) (Fig. 3c and e). Some fungi, intact or as residues were identified, based on their size (>bacteria) and/or their thick cell wall as in extant organisms (Fig. 3f).

The different organic components in casts were identified on NanoSIMS images with a high degree of confidence thanks to their typical size and shape as observed on TEM images. In addition the high $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ confirmed the biological origin of the observed structures. The ‘laces’ identified as plant cell walls on TEM images

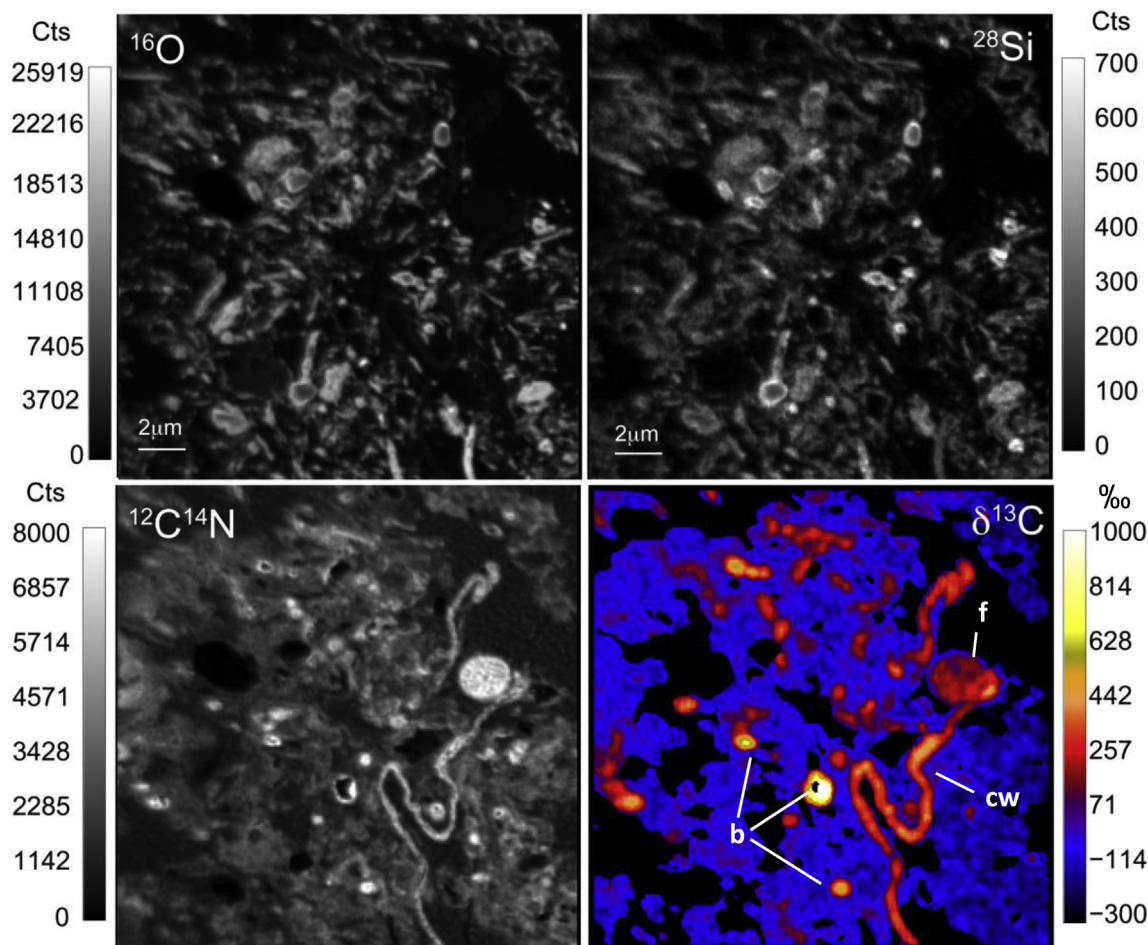


Fig. 4. NanoSIMS maps of ^{16}O -, ^{28}Si -, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ - and $\delta^{13}\text{C}$ illustrating the organic matter diversity in casts of *Lumbricus terrestris*. For the isotopic image, a mask was applied to remove the epoxy resin contribution, using a defined threshold for the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ - element. b, Bacteria; cw, cell wall; f, fungi.

(Fig. 3a) were recognizable in NanoSIMS images (Fig. 4), along with structures identified as bacteria, isolated or forming colonies in aggregates and few fungi (Figs. 4 and 5). The organic nature of the identified structures was confirmed by the high carbon and nitrogen content evidenced by the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ - signal (Figs. 4 and 5). The ^{28}Si and $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ images clearly indicated the presence of organo-mineral associations as observed on TEM images. The $\delta^{13}\text{C}$ maps revealed the presence of labelled and unlabelled organic matter, which were heterogeneously distributed in earthworm casts (Figs. 4 and 5). Both plant residues and microorganisms were labelled. Labelled cell walls from plant residues were easily recognizable (Fig. 4). Structures identified as labelled microorganisms were mainly represented by individual bacteria in aggregates (Fig. 4) or gathered as colonies (Fig. 5). Labelled fungi were also observed (Fig. 4). For example, on Fig. 4, the $\delta^{13}\text{C}$ for plant residues, bacteria and fungi reached 279, 304 and 191‰, respectively.

For the seven images obtained on the investigated casts, the mean $\delta^{13}\text{C}$ was 54‰, varying from −5 to 148‰ (Table 3). A total of 38 and 66 ROI were drawn from the images, for plant residues and bacteria, respectively. Thus, we obtained the isotopic values for each selected ROI. No significant differences in $\delta^{13}\text{C}$ were observed between labelled material in plant residues, bacteria and fungi. Plant residues and bacteria presented a mean $\delta^{13}\text{C}$ of 238 and 334‰, respectively. 70% of the labelled bacteria presented a $\delta^{13}\text{C}$ between 150 and 350‰, whereas plant residues were more uniformly distributed between 0 and 550‰ (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. Incorporation of plant residues in casts

TEM and NanoSIMS images reveal a complex spatial organization of organic and mineral constituents in the earthworm casts. Casts are known to be rich in organic matter from many studies using biochemical (Bossuyt et al., 2004, 2005; Pulleman et al., 2005; Oyedele et al., 2006; Fahey et al., 2013) and TEM (Pey et al., 2014) approaches. The association of TEM and NanoSIMS analyses enables to distinguish, on a same sample, the different constituents inside the casts and to determine if they originated from the ^{13}C labelled litter deposited on the soil surface.

As expected, the observations of the image allow the visualization of the incorporation of plant residues by earthworms inside casts. Moreover we identified plant residues in various stages of degradation (Fig. 3), originating either from residues previously incorporated in the soil ($\delta^{13}\text{C} < 0$) or from the added labelled litter (Figs. 4 and 5). The time of residence, the localization and the way the litter was incorporated in the soil structure could influence decomposition of the plant residues. Thus, the different stages of degradation of plant residues could result from degradation having occurred before the beginning of the experiment or from differences in residue localization on, or in, the soil structure. The various degradation levels could also result from different litter incorporation techniques by earthworms. Indeed, residues can be

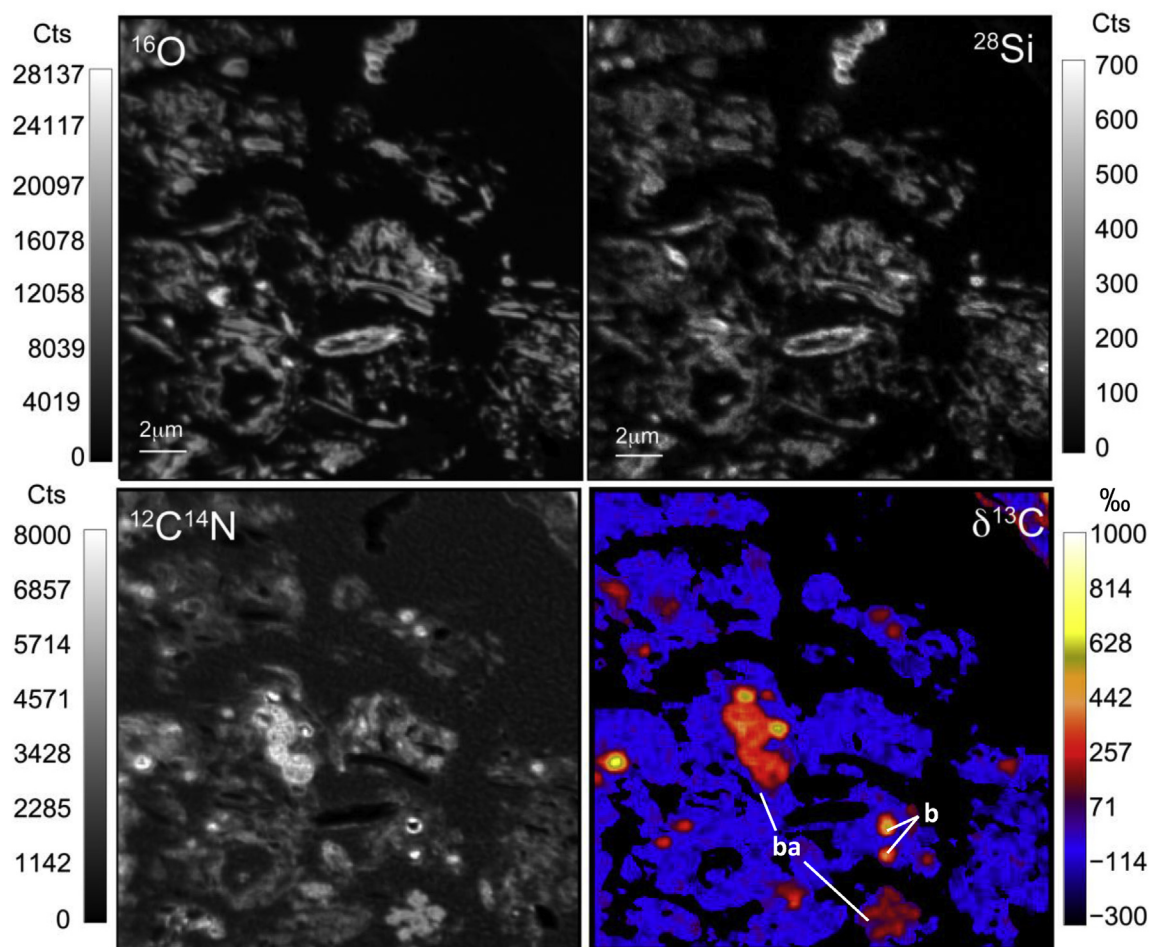


Fig. 5. NanoSIMS maps of ^{16}O -, ^{28}Si -, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ - and $\delta^{13}\text{C}$ in casts of *Lumbricus terrestris*, highlighting the presence of individual bacteria (b) and bacterial aggregate (ba). For the isotopic image, a mask was applied to remove the epoxy resin contribution, using a defined threshold for the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ element.

incorporated directly or indirectly by earthworms. During the direct incorporation by ingestion, residues are highly fragmented by the grazing activity of earthworms and grinded during the transit, especially passing the gizzard where they are submitted to strong muscular contractions in the presence of mineral particles (Shipitalo and Protz, 1989). The indirect incorporation consists in a pre-oral mechanism, so-called ‘ploughing-in’ of residues, where litter is embedded by fresh casts which initiate microbial decomposition (Cortez and Bouché, 1998). The presence of hardly, partially or totally decomposed plant cells on TEM and NanoSIMS images could suggest that both mechanisms took place in the studied casts.

4.2. Abundant microorganisms in casts

Cast images obtained in this study show an important microbial population as observed in previous studies using TEM (Barois et al., 1993; Pey et al., 2014) or microbial analysis (Postma-Blaauw et al., 2006; Frouz et al., 2011). TEM and NanoSIMS images of the earthworm casts reveal the presence of bacteria both in active and spore forms, as observed by Pey et al. (2014). The presence of few spores may indicate that some active bacteria encountered unsuitable environmental condition during the transit in the mobile anoxic microarea formed by the earthworm gut inducing sporulation (Brown, 1995; Drake and Horn, 2007). As the gut transit time is long for anecic earthworms, especially for *L. terrestris* (from 8 to 20 h)

(Hartenstein and Amico, 1983), some microorganisms get more time for adaptation and multiplication (Brown, 1995). Surviving cells and spores can then rapidly multiply and recover their activity in casts (Brown, 1995). Indeed, the increased surface area of plant residues incorporated in casts and the high concentration of readily available carbon contained in mucus secreted by earthworms, favours proliferation of bacteria and their further decomposition of residues (Parle, 1963; Brown, 1995; Amador and Göres, 2007; Frouz et al., 2011). Bacteria occur in the investigated cast either isolated or in cluster inside aggregates (Fig. 5). The presence of bacterial cluster was reported to be frequent in casts compared to bulk soil and interpreted as a consequence of higher organic matter content (Kristufek et al., 1994; Frouz et al., 2011). We also observed fungi in the casts (Figs. 3 and 4). Tiwari and Mishra (1993) have shown that fungi are more abundant and present a higher diversity in casts compared to bulk soil. More specifically, anecic earthworms generally favour the development of rapidly growing fungi that can easily assimilate materials in casts (Moody et al., 1995). As in the case of bacteria, this development can be explained by the favourable growth conditions in casts (Brown, 1995).

4.3. Residues decomposition and the role of microorganisms in casts

The $\delta^{13}\text{C}$ values of the plant residues observed in earthworm casts are lower than those of the initial litter (238 vs 1004‰). Two

Table 3
 $\delta^{13}\text{C}$ values for the total NanoSIMS image, labelled plant residues, bacteria and fungi. The total $\delta^{13}\text{C}$ values of NanoSIMS images were obtained using a same threshold defined thanks to the $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ distribution. For each category; n: number of manually drawn ROI used to obtain the mean $\delta^{13}\text{C}$ values, the minimum and maximum of the $\delta^{13}\text{C}$ values are also indicated. The images 5 and 6 correspond to Figs. 4 and 5, respectively.

Images id	Total	Plant residues	Bacteria	Fungi
Units	‰	‰ (min; max)	‰ (min; max)	‰
1	72	250 (n = 4) (22; 401)	186 (n = 13) (14; 497)	NA
2	104	253 (n = 12) (20; 509)	395 (n = 4) (122; 597)	NA
3	–5	129 (n = 1) –	408 (n = 7) (109; 943)	NA
4	47	176 (n = 6) (45; 326)	483 (n = 2) (258; 707)	NA
5	10	279 (n = 3) (201; 358)	304 (n = 17) (109; 723)	191 (n = 1)
6	3	158 (n = 4) (31; 270)	236 (n = 12) (144; 489)	NA
7	148	421 (n = 8) (281; 633)	326 (n = 11) (115; 665)	NA

explanations can be put forward to account for this difference. First, heterogeneity of labelling cannot be excluded as Nguyen Tu et al. (2013) have demonstrated that leaves from labelled Ryegrass grown under constant $^{13}\text{CO}_2$ -enriched atmosphere present important isotope variability, among and within leaves. In this respect, the fragments of residues incorporated by earthworms in the investigated casts would originate from poorly labelled litter fragments, as observed on the nanoSIMS image of initial litter (Fig. 2). However, the isotope variability between initial litter and plant residues in casts is much larger than observed by Nguyen Tu et al. (2013) among and within leaves (76% vs 20%). Thus, this hypothesis would at most count for a minor contribution to this difference. Secondly, selective degradation of plant residues may have resulted in ^{13}C depletion as non-structural compounds from litter such as sugars, which are rapidly lost as dissolved carbon, are more strongly labelled than structural compounds such as lignin (Benner et al., 1987; Fahey et al., 2011). Thus, degradation would result in a decrease of the $\delta^{13}\text{C}$ of remaining plant residues (Benner et al., 1987). This hypothesis is supported by the presence of lignin-rich plant cell walls as the main recognizable labelled plant residues on NanoSIMS images of the casts (Fig. 4), the cell constituents having been rapidly degraded. This selective degradation may take place during assimilation by microorganism or by earthworms during ingestion. An indicator of the microbial decomposition is the labelling of microorganisms in casts (Figs. 4 and 5). Indeed, microorganisms are not originally abundant in the initial litter and their mean $\delta^{13}\text{C}$ value is of 334‰ in the casts, highlighting their role in residue decomposition. Furthermore, it has been demonstrated that the high microbial biomass, diversity and activity in casts lead to the recycling of plant residue constituents by microorganisms and their mineralization (Postma-Blaauw et al., 2006). Labile plant

constituents are the main source of microbial products (Cotrufo et al., 2013) because they are efficiently assimilated by microbes and litter cell contents present higher lability than cell walls (Fahey et al., 2011). Thus, microorganisms have probably used the labelled dissolved carbon contained in plant residues. The presence of bacterial cluster in the casts (Fig. 5) confirms that it stands for a ‘hotspot’ for microbial activity. Indeed, the presence of labile substrate creates favourable conditions for microbial development and activity, as recently reviewed by Kuzyakov and Blagodatskaya (2015). The selective degradation of plant residues may also occur upon ingestion by earthworms. Indeed, the latter preferentially assimilate labile carbon and generally little digest and assimilate cell wall constituents (Brown and Double, 2004; Curry and Schmidt, 2007).

In addition to the mean decrease of $\delta^{13}\text{C}$ between initial litter and plant residues in casts, a large variability in values was observed for plant residues present in casts (from 20 to 633‰). Again, this may be explained by the labelled heterogeneity or, more likely, the presence of residues of various decomposition stages in cast. We also observed a high variability of $\delta^{13}\text{C}$ value for bacteria (from 14 to 943‰). Clode et al. (2009) interpreted this variability as the presence of different species that incorporated ^{13}C at different rates or by different cellular activity at the sampling time. As TEM images showed various living states of bacteria, the ‘cellular activity’ hypothesis is likely.

5. Conclusion

Earthworms are recognized as soil engineers that create organo-mineral structures influencing organic carbon incorporation and protection in the soil. The heterogeneous distribution of organic carbon in these structures induces areas with contrasting decomposition levels at the microscale. The combination of TEM and NanoSIMS imaging highlighted the complex microscale organization in earthworm casts. By comparing morphologies on the NanoSIMS and TEM images, the different organic components (plant residues and microorganisms) could be identified within the casts and their associations with mineral particles could be described. This allowed us to assess the influence of earthworm activity on the organic carbon incorporation in casts. Images also revealed that casts are populated with abundant and diverse microorganisms, which actively participate in litter decomposition, as demonstrated by their high labelling. Thanks to ^{13}C labelling and NanoSIMS imaging, we identified the labelled litter incorporated in casts by earthworms. We also observed a significant decrease of $\delta^{13}\text{C}$ from the intact litter to plant residues incorporated in the casts, suggesting decomposition between this two contrasted samples. The various stages of plant residues decomposition and the high variability of $\delta^{13}\text{C}$ values for plant residues and microorganisms highlighted the complexity of organic matter dynamics

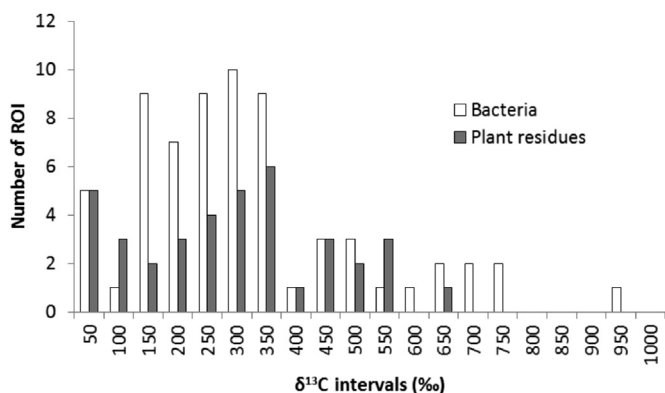


Fig. 6. $\delta^{13}\text{C}$ histograms for bacteria and plant residues, with a 50‰ interval. The number of manually drawn ROI was 38 and 66, for plant residues and bacteria, respectively.

and the importance of microscale analyses to identify and explain this variability. The combination of NanoSIMS and TEM shows great potential to relate organic matter states of decomposition with their ^{13}C signature. Further work is in process to develop this potential.

Acknowledgements

Véronique Vaury (UPMC) is acknowledged for the EA-IRMS analyses, Andriana Gonzalez-Cano for the assistance on the NanoSIMS analyses, as well as Justine Paoli (Faculté de médecine – Université de Lorraine) and Maxime Maire for the preparation of ultra-thin sections. This study benefits from the financial support from the EC2CO program from the French National Institute of Sciences of the Universe (CNRS/INSU). The National NanoSIMS facility at the MNHN was established by funds from the CNRS, Région Ile de France, Ministère délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche, and the MNHN. We thank the chief editor Claire Chenu and the anonymous reviewers for their constructive comments.

References

- Amador, J.A., Görres, J.H., 2007. Microbiological characterization of the structures built by earthworms and ants in an agricultural field. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2070–2077.
- Arai, M., Tayasu, I., Komatsuzaki, M., Uchida, M., Shibata, Y., Kaneko, N., 2013. Changes in soil aggregate carbon dynamics under no-tillage with respect to earthworm biomass revealed by radiocarbon analysis. *Soil and Tillage Research* 126, 42–49.
- Barois, I., Villemain, G., Lavelle, P., Toutain, F., 1993. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *International Workshop on Methods of Research on Soil Structure/Soil Biota Interrelationships* 56, 57–66.
- Benner, R., Fogel, M.L., Sprague, E.K., Hodson, R.E., 1987. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature* 329, 708–710.
- Bossuyt, H., Six, J., Hendrix, P.F., 2004. Rapid incorporation of carbon from fresh residues into newly formed stable microaggregates within earthworm casts. *European Journal of Soil Science* 55, 393–399.
- Bossuyt, H., Six, J., Hendrix, P.F., 2005. Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 251–258.
- Brown, G., 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil* 170, 209–231.
- Brown, G.G., Double, B.M., 2004. Functional interactions between earthworms, microorganisms, invertebrates and plants. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*, pp. 213–240. Boca Raton, Florida.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36, 177–198.
- Clode, P.L., Kilburn, M.R., Jones, D.L., Stockdale, E.A., Cliff, J.B., Herrmann, A.M., Murphy, D.V., 2009. In situ mapping of nutrient uptake in the rhizosphere using nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiology* 151, 1751–1757.
- Cortez, J., Bouché, M.B., 1998. Field decomposition of leaf litters: earthworm–microorganism interactions — the ploughing-in effect. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 795–804.
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Denef, K., Paul, E., 2013. The microbial efficiency-matrix stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19, 988–995.
- Curry, J.P., Schmidt, O., 2007. The feeding ecology of earthworms — a review. *Pedobiologia* 50, 463–477.
- Drake, H.L., Horn, M.A., 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology* 61, 169–189.
- Edwards, C.A., 2004. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*, pp. 3–11.
- Fahey, T., Yavitt, J., Sherman, R., Groffman, P., Fisk, M., Maerz, J., 2011. Transport of carbon and nitrogen between litter and soil organic matter in a northern hardwood forest. *Ecosystems* 14, 326–340.
- Fahey, T., Yavitt, J., Sherman, R., Maerz, J., Groffman, P., Fisk, M.C., Bohlen, P.J., 2013. Earthworm effects on the incorporation of litter C and N into soil organic matter in a sugar maple forest. *Ecological Applications* 23, 1185–1201.
- Fonte, S., Kong, A.Y.Y., Van Kessel, C., Hendrix, P.F., Six, J., 2007. Influence of earthworm activity on aggregate-associated carbon and nitrogen dynamics differs with agroecosystem management. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1014–1022.
- Fonte, S., Quintero, D.C., Velásquez, E., Lavelle, P., 2012. Interactive effects of plants and earthworms on the physical stabilization of soil organic matter in aggregates. *Plant and Soil* 359, 205–214.
- Frouz, J., Kristůfek, V., Livečková, M., van Loo, D., Jacobs, P., Van Hoorebeke, L., 2011. Microbial properties of soil aggregates created by earthworms and other factors: spherical and prismatic soil aggregates from unreclaimed post-mining sites. *Folia Microbiologica* 56, 36–43.
- Gicquel, A., Francez, A.-J., Delhay, T., Gruau, G., Hallaire, V., Binet, F., 2013. Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Biogeochemistry* 112, 165–177.
- Guggenberger, G., Thomas, R.J., Zech, W., 1996. Soil organic matter within earthworm casts of an anecic–endogeic tropical pasture community, Colombia. *Applied Soil Ecology* 3, 263–274.
- Hartenstein, R., Amico, L., 1983. Production and carrying capacity for the earthworm *Lumbricus terrestris* in culture. *Soil Biology and Biochemistry* 15, 51–54.
- Hatton, P.-J., Remusat, L., Zeller, B., Derrien, D., 2012. A multi-scale approach to determine accurate elemental and isotopic ratios by nano-scale secondary ion mass spectrometry imaging. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26, 1363–1371.
- Heister, K., Höschen, C., Pronk, G., Mueller, C., Kögel-Knabner, I., 2012. NanoSIMS as a tool for characterizing soil model compounds and organomineral associations in artificial soils. *Journal of Soils and Sediments* 12, 35–47.
- Herrmann, A.M., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P.L., Pett-Ridge, J., Kilburn, M.R., Murphy, D.V., O'Donnell, A.G., Stockdale, E.A., 2007a. Nano-scale secondary ion mass spectrometry — a new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: a review article. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1835–1850.
- Herrmann, A.M., Clode, P.L., Fletcher, I.R., Nunan, N., Stockdale, E.A., O'Donnell, A.G., Murphy, D.V., 2007b. A novel method for the study of the biophysical interface in soils using nano-scale secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 29–34.
- Hong, H.N., Rumpel, C., Des Tureaux, T.H., Bardoux, G., Billou, D., Duc, T.T., Jouquet, P., 2011. How do earthworms influence organic matter quantity and quality in tropical soils? *Soil Biology and Biochemistry* 43, 223–230.
- Hoppe, P., Cohen, S., Meibom, A., 2013. NanoSIMS: technical aspects and applications in cosmochemistry and biological geochemistry. *Geostandards and Geo-analytical Research* 37, 111–154.
- Jégou, D., Cluzeau, D., Hallaire, V., Balesdent, J., Tréhen, P., 2000. Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *European Journal of Soil Biology* 36, 27–34.
- Keilueit, M., Bougoure, J.J., Zeglin, L.H., Myrold, D.D., Weber, P.K., Pett-Ridge, J., Kleber, M., Nico, P.S., 2012. Nano-scale investigation of association of microbial nitrogen with iron (hydr)oxides in a forest soil O-horizon. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 95, 213–226.
- Kristufek, V., Tajovský, K., Pizl, V., 1994. Ultrastructural analysis of the intestinal content of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoffm. (Annelida, Lumbricidae). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 41, 283–290.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184–199.
- Lavelle, P., Pashanasi, B., Charpentier, F., Rossi, J.-P., Derouard, L., Andre, J., Ponge, J.F., Bernier, N., 1998. Large-scale effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics. *Earthworm Ecology* 103–122.
- Lee, K.E., 1985. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Academic Press, Sydney, Orlando.
- Lubbers, I., Van Groenigen, K.J., Fonte, S.J., Six, J., Brussaard, L., Van Groenigen, J.W., 2013. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. *Nature Climate Change* 3, 187–194.
- McMahon, G., Glassner, B.J., Lechene, C.P., 2006. Quantitative imaging of cells with multi-isotope imaging mass spectrometry (MIMS)—nanoautography with stable isotope tracers. *Applied Surface Science* 252, 6895–6906.
- Misson, J., Henner, P., Morello, M., Floriani, M., Wu, T.-D., Querquén-Kern, J.-L., Février, L., 2009. Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. *Environmental and Experimental Botany* 67, 353–362.
- Moody, S.A., Briones, M.J.L., Pearce, T.G., Dighton, J., 1995. Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1209–1213.
- Moore, K., Lombi, E., Zhao, F.-J., Grovenor, C.M., 2012. Elemental imaging at the nanoscale: NanoSIMS and complementary techniques for element localisation in plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 3263–3273.
- Moore, K., Schröder, M., Wu, Z., Martin, B.G.H., Hawes, C.R., McGrath, S.P., Hawkesford, M.J., Feng Ma, J., Zhao, F.-J., Grovenor, C.R.M., 2011. High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots. *Plant Physiology* 156, 913–924.
- Mueller, C.W., Kölbl, A., Hoeschen, C., Hillion, F., Heister, K., Herrmann, A.M., Kögel-Knabner, I., 2012. Submicron scale imaging of soil organic matter dynamics using NanoSIMS — from single particles to intact aggregates. *Organic Isotopes in Soil* 42, 1476–1488.
- Mueller, C.W., Weber, P.K., Kilburn, M.R., Hoeschen, C., Kleber, M., Pett-Ridge, J., 2013. Advances in the analysis of biogeochemical interfaces. *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 1–46.
- Nguyen Tu, T.T., Biron, P., Maseyk, K., Richard, P., Zeller, B., Quénéa, K., Alexis, M., Bardoux, G., Vaury, V., Girardin, C., Pouteau, V., Billou, D., Bariac, T., 2013. Variability of ^{13}C -labeling in plant leaves. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27, 1961–1968.
- Oyedele, D.J., Schjønning, P., Amusan, A.A., 2006. Physicochemical properties of earthworm casts and uningested parent soil from selected sites in south-western Nigeria. *Ecological Engineering* 28, 106–113.

- Parle, J.N., 1963. A microbiological study of earthworm casts. *Journal of General Microbiology* 31, 13–22.
- Pey, B., Cortet, J., Watteau, F., Cheynier, K., Schwartz, C., 2013. Structure of earthworm burrows related to organic matter of a constructed Technosol. *Geoderma* 202–203, 103–111.
- Pey, B., Cortet, J., Capowiez, Y., Nahmani, J., Watteau, F., Schwartz, C., 2014. Technosol composition affects *Lumbricus terrestris* surface cast composition and production. *Ecological Engineering* 67, 238–247.
- Poch, R., Virto, I., 2014. Micromorphology techniques for soil organic carbon studies. In: Hartemink, A.E., McSweeney, K. (Eds.), *Soil Carbon, Progress in Soil Science*. Springer International Publishing, pp. 17–26.
- Postma-Blaauw, M.B., Bloem, J., Faber, J.H., van Groenigen, J.W., de Goede, R.G.M., Brussaard, L., 2006. Earthworm species composition affects the soil bacterial community and net nitrogen mineralization. *Pedobiologia* 50, 243–256.
- Pulleman, M., Six, J., Uyl, A., Marinissen, J.C.Y., Jongmans, A.G., 2005. Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Applied Soil Ecology* 29, 1–15.
- Remusat, L., Hatton, P.-J., Nico, P.S., Zeller, B., Kleber, M., Derrien, D., 2012. NanoSIMS study of organic matter associated with soil aggregates: advantages, limitations, and combination with STXM. *Environmental Science & Technology* 46, 3943–3949.
- Rumpel, C., Baumann, K., Remusat, L., Dignac, M.-F., Barré, P., Deldicque, D., Glasser, G., Lieberwirth, I., Chabbi, A., 2015. Nanoscale evidence of contrasted processes for root-derived organic matter stabilization by mineral interactions depending on soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 85, 82–88.
- Shipitalo, M.J., Protz, R., 1989. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma* 45, 357–374.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Advances in Soil Structure Research* 79, 7–31.
- Smart, K.E., Smith, J.A.C., Kilburn, M.R., Martin, B.G.H., Hawes, C., Grovenor, C.R.M., 2010. High-resolution elemental localization in vacuolate plant cells by nano-scale secondary ion mass spectrometry. *The Plant Journal* 63, 870–879.
- Stromberger, M.E., Keith, A.M., Schmidt, O., 2012. Distinct microbial and faunal communities and translocated carbon in *Lumbricus terrestris* drilospheres. *Soil Biology and Biochemistry* 46, 155–162.
- Tiwari, S.C., Mishra, R.R., 1993. Fungal abundance and diversity in earthworm casts and in uningested soil. *Biology and Fertility of Soils* 16, 131–134.
- Vogel, C., Mueller, C.W., Höschel, C., Buegger, F., Heister, K., Schulz, S., Schlöter, M., Kögel-Knabner, I., 2014. Submicron structures provide preferential spots for carbon and nitrogen sequestration in soils. *Nature Communications* 5.
- Watteau, F., Villemin, G., Burtin, G., Jocteur-Monrozier, L., 2006. Root impact on the stability and types of micro-aggregates in silty soil under maize. *European Journal of Soil Science* 57, 247–257.
- Watteau, F., Villemin, G., Bartoli, F., Schwartz, C., Morel, J.L., 2012. 0–20 µm aggregate typology based on the nature of aggregative organic materials in a cultivated silty topsoil. *Soil Biology and Biochemistry* 46, 103–114.
- Willey, J., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2008. Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology*, seventh ed. McGraw Hill Higher Education, New York.
- Zangerlé, A., Pando, A., Lavelle, P., 2011. Do earthworms and roots cooperate to build soil macroaggregates? A microcosm experiment. *Geoderma* 167–168, 303–309.



Molecular fate of root and shoot litter on incorporation and decomposition in earthworm casts



Alix Vidal, Katell Quenea*, Marie Alexis, Sylvie Derenne

UMR Milieux environnementaux, transferts et interactions dans les hydrosystèmes et les sols (METIS), UMR 7619, UPMC, CNRS, EPHE, 4 place Jussieu, F-75252 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2016

Received in revised form 12 July 2016

Accepted 4 August 2016

Available online 12 August 2016

Keywords:

TMAH-Py-GC-MS

Root, shoot

Lumbricus terrestris

Lignin-derived compounds

Cutin

Suberin

ABSTRACT

Roots and shoots have contrasting molecular composition and decomposition rate in soils and the mechanisms regulating these rates are still debated. Earthworms have a strong influence on litter decomposition and their feces (casts) are complex and dynamic organo-mineral structures. This study aimed at monitoring the incorporation and decomposition of root and shoot litter in earthworm casts at the molecular scale. Casts were collected from a mesocosm experiment, 2, 4, 8, 24 and 54 weeks after the addition of root or shoot litter to the soil surface. Molecular characterization was achieved for litter and casts using pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry after in situ tetramethylammonium hydroxide derivatization (TMAH-Py-GC-MS). To maximize understanding of the processes occurring in casts, the study used principal components analysis and specific molecular dynamics monitoring. The fate of root litter in casts was reflected principally in aromatic compound dynamics, while aliphatic compound evolution enabled monitoring of shoot litter fate in casts. Earthworms rapidly incorporated both roots and shoots into casts, resulting in a phase dominated by litter incorporation up to two months of the experiment. After two months, the decomposition of shoot and root (to a lesser extent) litter incorporated into casts was the dominant process. Two pools of lignin-derived compounds were identified, one originating from undecomposed litter (mainly non-oxidized) and one resulting from litter decomposition (more oxidized). Moreover, the significant contribution of aliphatic compounds, such as ω -hydroxyalkanoic and *n*-alkanedioic acids, by the end of the experiment and in control samples suggested that compounds with a greater degree of oxidation could be preferentially preserved in earthworms casts on a longer term.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Soil organic matter (SOM) is a complex mixture of compounds originating from plants, animals and microorganisms, present in various physical (Totsche et al., 2010) and chemical forms (Kögel-Knabner, 2002). More than being a key element for soil function and evolution, SOM also represents a potential important carbon sink (Jobbágy and Jackson, 2000). Due to its complexity, the processes implied in its formation, decomposition and stabilization need to be further investigated (Schmidt et al., 2011; Stockmann et al., 2013; Lehmann and Kleber, 2015).

Plant residues represent the main contributor to SOM and their constituents can be used to monitor SOM formation and dynamics (Kögel-Knabner, 2002). The relative contribution from root and shoot litter to SOM has been the subject of many studies in the last few decades, revealing important discrepancies regarding their respective fate in soil (Balesdent and Balabane, 1996; Gale and

Cambardella, 2000; Puget and Drinkwater, 2001; Lu et al., 2003; Rasse et al., 2005; Mendez-Millan et al., 2010; Mambelli et al., 2011; Comeau et al., 2013). It is now recognized that roots decompose at a slower rate than shoots, so root-derived carbon may play a key role in soil carbon sequestration (Chefetz et al., 2000; Rasse et al., 2005; Feng and Simpson, 2007). However, reasons accounting for the difference in decomposition rate between roots and shoots in soils remain debated. Part of the explanation should rely on their contrasting molecular composition. Indeed, cutin and suberin are biopolymers in leaf cuticles and plant roots, respectively, and these biopolymers exhibit some chemical differences (Kolattukudy, 1981; Kögel-Knabner, 2002).

Incorporation and decomposition of roots and shoots in soil are highly dependent on the action of the soil fauna. More specifically, earthworms play a major role in SOM dynamics in temperate areas (Edwards, 2004). Most earthworms feed on both soil mineral matter/OM and fresh plant residues deposited on the soil surface. The ingestion and gut transit of mineral and organic elements enhance their mixing and complexation with mucus, resulting in the rejection of organo-mineral aggregates called casts (Lee, 1985; Six et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: katell.quenea@upmc.fr (K. Quenea).

2004). The feeding habit of earthworms can have a significant impact on soil organic carbon (OC) concentration and dynamics in aggregates (Fonte et al., 2007, 2012; Hong et al., 2011; Arai et al., 2013) and down the soil profile (Jégou et al., 2000). During the gut transit and in fresh casts, the mineralization of OC is generally enhanced due to the favorable microbial conditions, combined with the fragmentation of plant residues and partial destruction of soil structures (Martin et al., 1987; Lavelle and Martin, 1992; Brown et al., 2000; Drake and Horn, 2007; Vidal et al., 2016). However, carbon stabilization is promoted in drying and aging casts (Martin, 1991; Lavelle and Martin, 1992; Brown et al., 2000) due to the appearance of clay-polyvalent cation-OM linkages strengthening organo-mineral bonds (Shipitalo and Protz, 1989). It has been demonstrated that earthworm feeding behavior is influenced by litter quality and palatability, but little is known about the impact of earthworms on root incorporation and decomposition in soil (Curry and Schmidt, 2007; Zangerlé et al., 2011).

Studies using molecular analysis to investigate the general impact of earthworms on SOM composition and dynamics are scarce (Filley et al., 2008; Crow et al., 2009). Filley et al. (2008) and Crow et al. (2009) used CuO oxidation to characterize the influence of earthworms in a US forest on the molecular composition of litter residues and soil particulate OM, respectively. The influence of earthworms on SOM has been mainly studied using total carbon content and/or carbon isotopes (Lavelle et al., 1998; Jégou et al., 2000; Six et al., 2004; Fonte et al., 2012; Stromberger et al., 2012; Fahey et al., 2013). In contrast, the number of studies investigating the chemical composition of casts is limited (Guggenberger et al., 1996; Hong et al., 2011) and mainly aimed at comparing casts with bulk soil. For example, Guggenberger et al. (1996) characterized OM in casts and surrounding soil collected in Colombia using CuO oxidation, acid hydrolysis and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. They highlighted the abundance of microbial-derived and lignin-derived molecules in casts vs. soil. Hong et al. (2011) used CuO oxidation and pyrolysis coupled to gas chromatography and mass spectrometry (Py-GC-MS) to compare soil and casts from Vietnam, according to their aggregate size. They showed that the protection of OM is enhanced in small size aggregates of casts. However, to the best of our knowledge, the short and longer term dynamics of litter incorporation and decomposition in casts has not been studied at the molecular level.

The aim of the present study was to monitor the incorporation and decomposition of root or shoot litter in earthworm casts using molecular characterization. Earthworm casts were collected at various time steps through the year of a mesocosm experiment and their molecular characterization was achieved using Py-GC-MS. Py-GC-MS has been commonly used for > 30 yr to characterize SOM at the molecular level (Derenne and Quénéa, 2015). In addition to details of SOM origin, pyrolysis provides information on its stage of decomposition, especially using in situ derivatization with tetramethylammonium hydroxide (TMAH), which has improved the identification and monitoring of lignin moieties, cutin/suberin and tannin markers in soils (Nierop, 2001; Derenne and Quénéa, 2015).

2. Material and methods

2.1. Experimental design

Earthworm casts were collected from a 1 yr mesocosm experiment taking place in a greenhouse under controlled conditions. Three PVC containers (length 80 cm, diameter 40 cm) were filled with ca. 75 l of a loamy sand soil collected from a permanent grass-

land in the North of France. The soil was sieved at 4 mm for homogenization and large plant residues and mesofauna were removed. Before the beginning of the experiment, soil containers were pre-incubated for 6 months. Each container was sprayed weekly with water and seedlings or moss in the mesocosms were eliminated, before and after the beginning of the experiment. Soils were kept at ca. 13 °C and 23% humidity during the year of the experiment.

At the beginning of the experiment, six earthworms were added per container (26.8 ± 0.5 g fresh biomass per container). A low density of earthworms was chosen to simulate habitat conditions and favor their survival (Fründ et al., 2010). The common epi-anecic earthworm *Lumbricus terrestris* was used. Earthworms were provided by the SARL Lombri'carraz (France) and were received at adult stage, with an average weight of 4.5 g.

Root and shoot litter (250 g) from Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) were applied on the soil surface in two separate mesocosms. A third mesocosm was used as a control (i.e. containing no plant residue). Prior to the experiment, roots were separated from shoots and chopped for 40 s with a laboratory blender (Waring Commercial) in order to provide residues a few mm in size. Plants had been artificially labeled with ^{13}C at the Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA) at Cadarache (France), under a controlled and constant $^{13}\text{CO}_2$ enriched atmosphere. The mean $\delta^{13}\text{C}$ values were 1324‰ (± 43) and 1632‰ (± 16) for the roots and shoots, respectively.

A composite cast sample (ca. 5 g) was collected from the soil surface in the three mesocosms, at five intervals: 2, 4, 8, 24 and 54 weeks after adding roots or shoots and earthworms. All samples were freeze-dried and ground. The casts collected from mesocosms containing roots, shoots or no litter are indicated below as Cast-Root, Cast-Shoot and Cast-Control, respectively. The $\delta^{13}\text{C}$ values and OC content of all samples, obtained using an elemental analyzer coupled to a mass spectrometer (Vario pyro cube – Micro-mass Isoprime) after decarbonation (Harris et al., 2001) are presented in Table 1.

After 24 weeks, plant litter was no longer observed on the soil surface in the mesocosm containing shoots. In the mesocosm containing roots, litter was still observed on the soil surface, occupying < 10% of it. After 1 yr, no litter could be observed at the soil surface of any mesocosm.

2.2. Py-GC-MS TMAH analysis

Root and shoot litter samples, as well as cast samples, were submitted to Curie point pyrolysis in the presence of TMAH. The samples (5–9 mg, depending on OC content) were impregnated with a few drops of TMAH in MeOH at 25% (1/1, w/w) prior to loading into ferromagnetic tubes. Samples were pyrolysed with a Curie temperature of 650 °C for 10 s using a pyrolysis unit (Pilodist), coupled to a gas chromatograph (GC Trace Thermo) and a mass spectrometer (MS DSQ Thermo). After 10 min at 50 °C, the GC oven temperature was programmed from 50 °C to 310 °C at 2 °C/min. As TMAH induces in situ methylation, for the sake of clarity, the carbon number of the parent compound is used for aliphatic products.

So as to derive semi-quantitative information from TMAH-Py-GC-MS, peaks of interest were selected on the total ion current (TIC) and integrated to determine their peak area. The relative abundance of each compound was calculated by dividing its GC peak area by the sum of areas of all the selected pyrolysis products.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R statistical software. Principal component analysis (PCA) was performed on 22 selected variables for the 15 cast samples using the multivariate

Table 1 $\delta^{13}\text{C}$ values and OC content for Cast-Control, Cast-Root and Cast-Shoot samples over time (numbers in parentheses indicate standard deviation, $n = 3$).

Week	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			Organic carbon (g/kg)		
	Cast-Control	Cast-Root	Cast-Shoot	Cast-Control	Cast-Root	Cast-Shoot
2	−25.9 (0.9)	668 (7.5)	550 (8.9)	17.9 (1.2)	25.7 (1.0)	23.9 (0.5)
4	−24.5 (1.5)	351 (3.7)	505 (11)	17.3 (0.5)	26.6 (0.2)	24.7 (1.8)
8	−25.3 (1.3)	673 (25)	938 (3.0)	19.0 (2.2)	55.0 (0.8)	34.9 (1.2)
24	−27.5 (0.2)	671 (1.3)	627 (12)	18.8 (0.1)	42.7 (1.6)	29.8 (1.4)
54	−28.6 (0.1)	127 (8.2)	168 (1.9)	16.8 (2.5)	22.2 (0.6)	20.6 (1.6)

analysis package 'FactoMineR'. Root and shoot litter samples were used as illustrative samples. The Shapiro-Wilk test was applied to all variables. As most of the variables were not normally distributed, values were transformed into ranks before analysis.

3. Results and discussion

3.1. Root and shoot litter molecular characteristics

The recognition of specific indicators of roots and shoots is a prerequisite for monitoring their fate in earthworm casts. Suberin and cutin are commonly considered as typical biopolymers of root and shoot tissue, respectively (Kögel-Knabner, 2002) and their monomers have been used to trace the root- and shoot-derived OM in soil (Del Río and Hatcher, 1998; Nierop, 2001; Otto and Simpson, 2006; Mendez-Millan et al., 2010). However, the monomeric composition of these biopolymers is different, depending on vegetation type (Nierop, 2001).

The thermochemolysates of the root and shoot litter samples comprised two main types of products (Fig. 1A and B) as commonly reported in TMAH-Py-GC-MS analysis of plant biomass and soils (e.g. Clifford et al., 1995; Del Río and Hatcher, 1998; Chefetz et al., 2000; Nierop, 2001): (i) aromatic compounds which encompassed mainly lignin- and/or suberin-derived compounds from *p*-coumaryls (**H**), guaiacyls (**G**) and syringyls (**S**), as well as more ubiquitous phenols (**P**) and (ii) aliphatic compounds, which were represented by *n*-alkanoic acids, *n*-alkanedioic acids and ω -hydroxyalkanoic acids, as well as *n*-alkanols and *n*-alkanes. In the present study, aliphatic compounds can derive from free lipids, bound lipids, cutin and/or suberin.

The first part of the GC traces comprised aromatic products commonly assigned to lignin and tannins, although a contribution from the aromatic domain of suberin (Bernards, 2002) should also be considered. Aromatic products were dominated by guaiacyls (**G**), in both root and shoot samples and especially the 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid methyl ester (**G5**). This compound, along with the 3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid methyl ester (**H1**), are typical for non-woody lignin (Clifford et al., 1995), in agreement with the ryegrass origin of the root and shoot litter. Syringyl derivatives [3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (**S1**) and 3,4,5-trimethoxybenzoic acid methyl ester (**S2**)] were also identified in the root sample, but contributed less to the shoot sample. The other main difference between root and shoot samples lay in the high relative abundance of 4-methoxybenzoic acid methyl ester (**P3**) with respect to 1,4-dimethoxybenzene (**P1**) in the root sample. **P3** is classified as a lignin-derived compound (e.g. Chefetz et al., 2000; Nierop, 2001) and was previously identified in roots of ryegrass (Whitehead et al., 1979). In contrast, **P1** is not a lignin pyrolysis product (Chefetz et al., 2000).

The same aromatic products were observed in both root and shoot litter thermochemolysates but their relative abundance with respect to aliphatic compounds was higher for the root sample. The higher concentration of aromatic compounds in root tissue has been reported in various studies (e.g. Dignac et al., 2005; Hoyos-

Santillan et al., 2015) and considered to reflect the contribution of the aromatic domain of suberin (Bernards, 2002; Otto et al., 2005). Thus, the evolution of the relative abundance of the aromatic compounds and the fate of some specific pyrolysis products, especially abundant in roots, such as **P3**, were used below to monitor root incorporation and decomposition in casts.

C_{16} to C_{32} *n*-alkanoic acids, along with unsaturated counterparts $\text{C}_{18:1-2}$, were observed in both roots and shoots, with a maximum at C_{16} . C_{16} and C_{18} *n*-alkanoic acids are ubiquitous in living organisms (Del Río and Hatcher, 1998; Nierop, 2001). However, the C_{20} and C_{24} *n*-alkanoic acids were more abundant in roots than shoots. Moreover, the C_{22} , C_{24} and C_{26} ω -hydroxyalkanoic acids could be found in the root sample, whereas they were virtually absent from the shoot sample (Fig. 1A and B). In contrast, C_{26} and C_{28} *n*-alkanols, as well as C_{29} , C_{31} and C_{33} *n*-alkanes, commonly present in plant biomass (Bull et al., 2000; Wiesenberger et al., 2004), were more abundant in shoots than roots. Thus, aliphatic compounds showed major differences between root and shoot residues, as reported in previous studies (Nierop, 2001; Otto and Simpson, 2006; Mendez-Millan et al., 2010). This likely reflected the differences in molecular composition between cutin and suberin biopolymers (Kögel-Knabner, 2002). Suberin monomers are known to comprise longer carbon chains ($\text{C} \geq 20$) than cutin (Kolattukudy, 1980). The relative abundance of *n*-alkanes + *n*-alkanols and long chain ω -hydroxyalkanoic acids could be used to monitor the fate of shoots and roots in casts, respectively.

3.2. Cast-Control molecular contribution

The pyrolysis products from Cast-Control samples could (i) originate from the OM initially presents in the soil and/or (ii) be produced by earthworms during gut transit. Thus, the analysis of Cast-Control samples collected from the mesocosm without shoot or root litter allowed assessment of the contribution of the SOM and/or earthworm products to casts, independently from the incorporation of shoot or root constituents. The GC trace of the Cast-Control sample collected after two weeks of experiment is presented in Fig. 1C.

All the compounds identified in root and shoot litter samples were present in the Cast-Control sample (Fig. 1C). However, the relative contribution of aliphatic compounds to the total pyrolysis products was significantly higher than for root and shoot samples. First, this could reflect the selection of aliphatic compounds in soil by earthworms or the production of these compounds during gut transit. It has been shown that earthworms tend to avoid plant residues with high lignin content (Tian et al., 1995) and are not able to decompose lignin without microorganism participation (Neuhausser et al., 1978; Curry and Schmidt, 2007). Filley et al. (2008) showed in a litter bag experiment, that the proportion of aliphatic compounds decreased in tulip poplar leaf litter, in the presence of earthworms after six months of decay. This suggests that earthworms might favor aliphatic compound incorporation in soils. However, we are not aware of any work on the selection or production of aliphatic compounds by earthworms. Second, it could also reflect the predominance of aliphatic compounds in

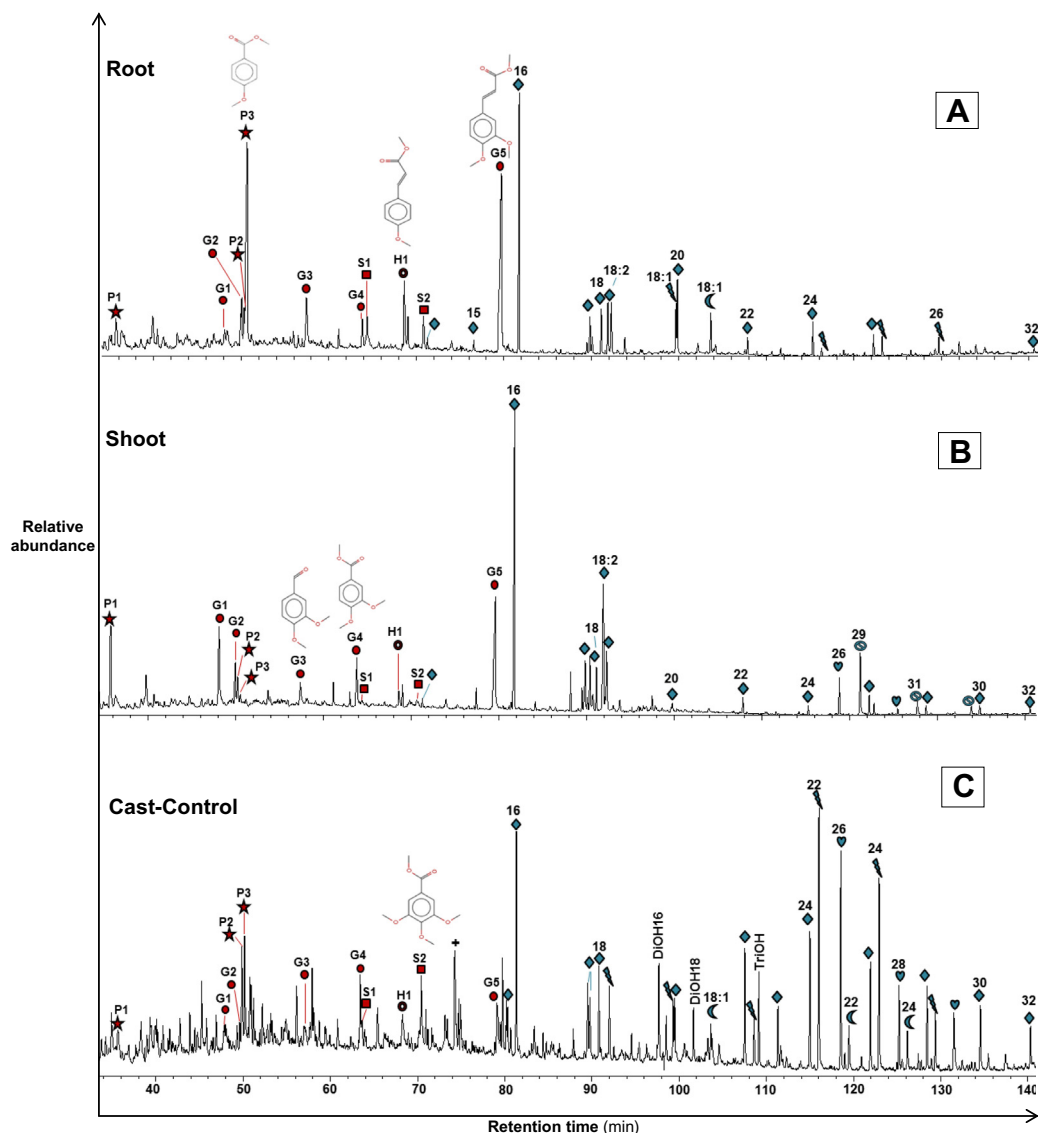


Fig. 1. TIC trace of 650 °C Curie point pyrolysates of **A**, root litter; **B**, shoot litter and **C**, Cast-Control sample, after two weeks. Some compounds are illustrated with their structures. Aromatic compounds (red symbols) including compounds derived from: **G** for guaiacyl (●), **S** for syringyl (■) and **H** for coumaryl (●), as well as other phenolic compounds (★); aliphatic compounds (blue symbols) including methyl esters of *n*-alkanoic acids (◆), ω -hydroxyalkanoic acids (⚡), *n*-alkanedioic acids (◐), *n*-alkanes (⊙), *n*-alkanols (♥), 8,16 - 9,16 and 10, 16 or 18 dihydroxyhexadecanoic acids (**DiOH16**), 9,10,18 trihydroxyoctadecanoic acid (**TriOH**) and contaminants (+). Numbers indicate chain length.

the soil and their ingestion by earthworms. This is in agreement with a common view (Riederer et al., 1993; Feng and Simpson, 2007; Lorenz et al., 2007), according to which aliphatics are less degraded than aromatic compounds in soil. Hence, they represent an important pool of stable OM.

The 8,16 - 9,16 and 10,16 dihydroxyhexadecanoic acids (**DiOH16**) and 9,10,18 trihydroxyoctadecanoic acid (**TriOH**) were identified in the Cast-Control trace. Under the conditions used, the three isomers of **DiOH16** coeluted (Del Río and Hatcher, 1998). Along with the **TriOH**, the **DiOH16** is a pyrolysis product of cuticles (Del Río and Hatcher, 1998) and they were commonly identified in cutin and/or suberin products (Otto and Simpson, 2006). ω -Hydroxyalkanoic acids ranging from C_{16} to C_{26} and maximizing at C_{22} were the dominant series in the chromatogram. Along with ω -hydroxyalkanoic acids, the occurrence of C_{22} and C_{24} *n*-alkanedioic acids supported a suberin origin for these compounds (Kolattukudy, 1980; Nierop, 2001). This was confirmed

by the dominant aromatic compound **P3**, as observed for the root sample, although to a lesser extent (Fig. 1A). The next dominant aromatic compounds were 1,2,4-trimethoxy benzene (**P2**), **S2** and **G5**, which were observed in both root and shoot samples but in higher relative abundance in roots for **S2** and **G5**.

All the compounds in the Cast-Control sample reflected the cast OM originating mainly from higher plants. This is consistent with the feeding habits of earthworms, which select soil fractions rich in OM (Curry and Schmidt, 2007). More specifically, the Cast-Control sample reflected an important contribution from root-derived compounds. This higher contribution from root vs. shoot derived compounds has frequently been observed for soil samples (Chefetz et al., 2000; Rasse et al., 2005; Feng and Simpson, 2007; Wiesenberger et al., 2010). Thus, cast molecular composition may reflect the earlier vegetation contribution to the soil used in the experiment, as reported in many studies (Chefetz et al., 2000; Nierop et al., 2001), and in agreement with the > 50 yr permanent

pasture land use of the soil collected for the experiment. For confirmation, earthworm casts should be compared with bulk soil, which was beyond the goal of the present study.

3.3. Fate of root and shoot residues in earthworm casts

Cast-Root and Cast-Shoot samples released the same pyrolysis products as Cast-Control, whatever the time interval, but in different relative abundances. In order to highlight potential differences in OM composition between the different casts, a PCA was carried out. During the last decade, such multivariate analysis of pyrolysis products has revealed a powerful statistical tool for characterizing SOM origin and evolution (Buurman et al., 2007; Carr et al., 2013; Schellekens et al., 2013; Hoyos-Santillan et al., 2015). Prior to the application of PCA, one chromatogram from Cast-Root and Cast-Shoot was entirely described and the most abundant compounds were assigned and integrated in all chromatograms. In the PCA, aromatic compounds and aliphatic compounds were distinguished (Table 2). The 11 selected aromatic compounds were used as 11 separated variables as most of them had specific origins and different contributions to root and shoot litter samples. For example, 4-methoxybenzoic acid methyl ester (P3) had a significantly higher relative abundance in root vs. shoot sample products. In total, 40 aliphatic compounds were used in the PCA. In order to make data interpretation easier (i.e. limiting the number of variables), aliphatic compounds were considered either individually or gathered according to their common origin, leading to 11 aliphatic variables. For example, long even chain *n*-alkanoic acids ($\geq C_{20}$) were gathered to form a higher plant indicator (FAeven; Chefetz et al., 2000). *n*-Alkanoic acids C_{16} (FA16) and C_{18} were used as two vari-

ables, as C_{16} is one of the dominant compounds in all chromatograms and, unlike long chain *n*-alkanoic acids, C_{16} and C_{18} are present in most organisms and can be derived from both cutin and suberin, as well as plant wax (Nierop, 2001). Details concerning the variables (composition and main origin) are presented in Table 2.

3.3.1. Root and shoot molecular differences are reflected in casts

The PCA generated two factors (F1 and F2) explaining 65% of the variance (Fig. 2A and B). F1 clearly separated Cast-Root from Cast-Control and Cast-Shoot samples. F2 clearly separated Cast-Control and Cast-Shoot samples (Fig. 2B). On the PCA, Cast-Control samples were represented mainly by the higher relative abundance of *n*-alkanoic acids (FAeven), ω -hydroxyacids (ω OH), *n*-alkanedioic acids (Dia) and C_{16} dihydroxyacids (DiOH16) and were poorly represented by 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid, methyl ester (G5). The differentiation between Cast-Shoot and Cast-Root reflected the main differences in compound relative abundances highlighted in the root and shoot chromatograms (Fig. 1A and B). Cast-Root samples were characterized by a high relative contribution from aromatic compounds and with a similar composition to root litter products (Fig. 2B). Aliphatic compounds were relatively more abundant in Cast-Control and Cast-Shoot samples. The latter could be further distinguished through the higher relative abundance of the long chain *n*-alkanes (Alk) and *n*-alkanols (OH) (Fig. 2B). The shoot litter sample was slightly distant from Cast-Shoot samples and was characterized as being opposite to Cast-Control samples. As a result, Cast-Shoot samples exhibited intermediate molecular characteristics between shoot litter and Cast-Control samples. Altogether, these observations revealed a clear

Table 2

Pyrolysis products used for PCA. Most of the common names for the non-methylated form of aromatic compounds are indicated between brackets; the probable origins and/or significance of each product or group of products, with key references are also mentioned.

Code	Compound	Main origin and significance	Key references
Aromatic compounds			
<i>Guaiacyl derived</i> ●			
G1	3-Methoxybenzoic acid, methyl ester	Lignin derived	Nierop (2001)
G2	4-Ethenyl-1,2-dimethoxybenzene	Typical of grass type lignin	Clifford et al. (1995)
G3	3,4-Dimethoxy benzaldehyde (vanillin)	Lignin derived	Nierop (2001)
G4	3,4-Dimethoxybenzoic acid, methyl ester (vanillic acid)	Lignin derived	Nierop (2001)
G5	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid, methyl ester (4-vinylguaiacol or ferulic acid)	Lignin derived, identified from suberin	González-Vila et al. (1996) and Nierop (2001)
<i>Syringyl derived</i> ■			
S1	3,4,5-Trimethoxy benzaldehyde (syringaldehyde)	Lignin derived	Nierop (2001)
S2	3,4,5-trimethoxybenzoic acid, methyl ester (syringyl acid)	Lignin derived, identified from suberin	Chefetz et al. (2000), Nierop (2001), and Otto et al. (2005)
<i>Coumaryl derived</i> ●			
H1	3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid, methyl ester (4-vinylphenol or p-coumaric acid)	Typical of grass type lignin	Clifford et al. (1995)
<i>Other phenolic compounds</i> ★			
P1	1,4-Dimethoxy benzene	Non lignin derived	Chefetz et al. (2000)
P2	1,2,4-Trimethoxy benzene (4-methoxy catechol)	Cellulose and starch	Fabbri and Helleur (1999)
P3	4-Methoxybenzoic acid, methyl ester	Lignin derived	Chefetz et al. (2000) and Nierop (2001)
Aliphatic compounds			
FAmicro	C_{14} , C_{14i} , $C_{15i,a}$, $C_{16:1}$ and $C_{17i,a}$ <i>n</i> -alkanoic acids ◆	Microorganisms	Quénéa et al. (2012)
FAeven	C_{20-34} even chain <i>n</i> -alkanoic acid ◆	Higher plants	Chefetz et al. (2000)
FA16	C_{16} <i>n</i> -alkanoic acid ◆	Ubiquitous	Nierop (2001)
FA18	C_{18} <i>n</i> -alkanoic acid ◆	Ubiquitous	Wiesenberg et al. (2010)
FA18uns	$C_{18:1}$ <i>n</i> -alkanoic acid ◆	Ubiquitous	Wiesenberg et al. (2010)
Alk	C_{25-33} <i>n</i> -alkanes ●	Higher plants	Wiesenberg et al. (2010)
OH	C_{26-34} <i>n</i> -alkanols ♥	Higher plants	Quénéa et al. (2006)
ω OH	C_{20-26} even chain ω -hydroxyalkanoic acids ⚡	Suberin derived	Kolattukudy (1980) and Nierop (2001)
Dia	C_{22} and C_{24} <i>n</i> -Alkanedioic acids ☾	Suberin derived	Kolattukudy (1980) and Nierop (2001)
DiOH16	8,16 - 9,16 and 10, 16 dihydroxyhexadecanoic acids	Cutin derived	Riederer et al. (1993) and Del Río and Hatcher (1998)
TriOH	9,10,18 trihydroxyoctadecanoic acid	Cutin and suberin derived	Otto and Simpson (2006)

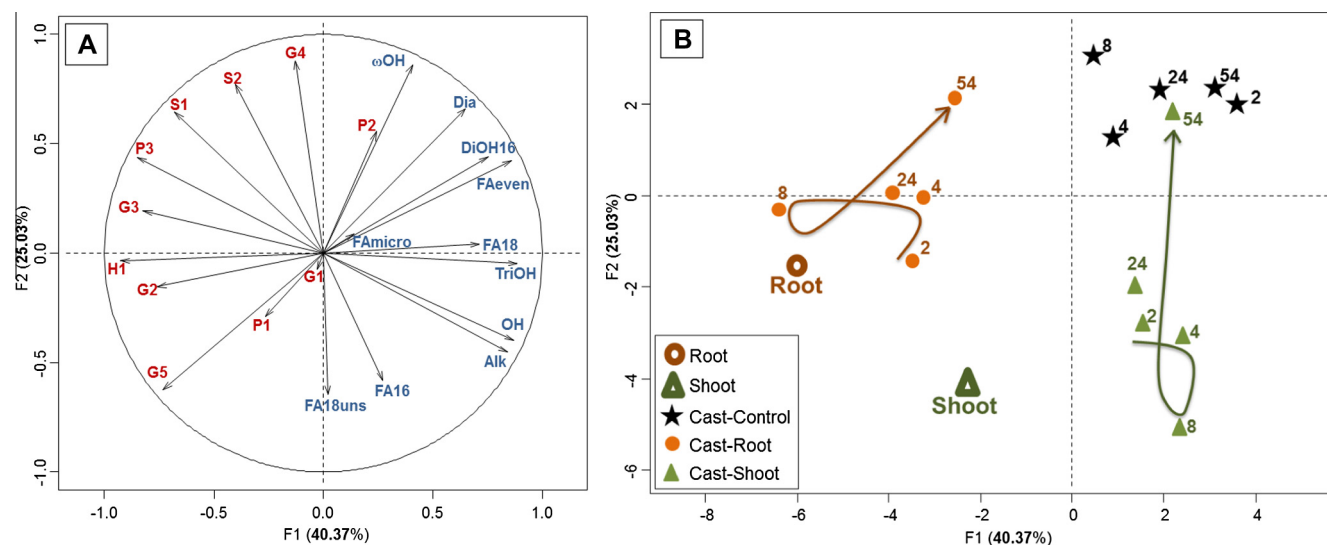


Fig. 2. PCA carried out with the 22 variables (see Table 2 for description) of the 15 cast samples, with root and shoot litter used as illustrative samples. **A**, distribution of variables on the correlation circle and **B**, distribution of the cast samples, with root and shoot litter illustrative samples. Numbers indicated next to samples correspond to the number of weeks after the beginning of the experiment.

contribution from root and shoot litter to the respective Cast-Root and Cast-Shoot samples. This was confirmed by the $\delta^{13}\text{C}$ values of Cast-Root and Cast-Shoot compared with Cast-Control samples after two weeks (668‰, 550‰ and –26‰, respectively; Table 1). This observation corroborates the feeding habit of earthworms, which consume fresh residues at the soil surface and incorporate them into casts (Lee, 1985). The results illustrate the ability of earthworms to ingest both types of litter.

3.3.2. Incorporation of fresh residues into casts and decomposition

Besides reflecting roots and shoots being incorporated by earthworms, the PCA also provided information about the rate of incorporation of fresh residues into casts and decomposition therein. In order to facilitate the interpretation and representation of the PCA results, the latter were coupled to histograms assessing the relative abundance of compounds or groups of compounds over the year of experiment, representative of Cast-Control, Cast-Root and Cast-Shoot samples, respectively (Fig. 3). *n*-Alkanedioic acids (**Dia**) and ω -hydroxyacids (ωOH) were relatively more abundant in Cast-Control samples than other samples, and the sum of these compounds was used to represent Cast-Control sample dynamics (**Dia** + ωOH) (Fig. 3A). As 4-methoxybenzoic acid methyl ester (**P3**) was the most abundant lignin-derived compound from root litter, its evolution along the year of experiment was used to follow the root contribution to Cast-Root samples (Fig. 3B). Finally, Cast-Shoot samples were characterized by higher *n*-alkane (**Alk**) and *n*-alkanol (**OH**) relative abundances than other samples, and the sum of these compounds was used to represent Cast-Shoot dynamics (**Alk** + **OH**) (Fig. 3C).

For Control-Cast samples, the molecular composition barely evolved from 2 to 54 weeks of the experiment as shown by the homogenous group formed by the samples in the PCA (Fig. 2B) and the rather constant **Dia** + ωOH relative abundance between 4 and 54 weeks (Fig. 3A). However, between 2 and 4 weeks, the **Dia** + ωOH relative abundance slightly decreased in Control-Cast. This trend was also observed for **TriOH**, **FAeven** and **OH** (data not shown). A positive priming effect could be hypothesized in Cast-Control, although a possible increase in the relative contribution from other compounds cannot be excluded. The priming effect consists of significant mineralization of the OM originally present in the soil, induced by an input of fresh OM (Fontaine et al., 2007, 2011; Kuzyakov, 2010). This mechanism is based on the fact

that microorganisms depend on the energy available to decompose the recalcitrant OM present in the soil. As no fresh plants were added to the Cast-Control, this priming effect was probably induced by the action of earthworms. It has been shown that earthworms increase the contact between SOM and microorganisms during ingestion (Lavelle and Martin, 1992). Moreover, it was shown that the mucus, produced in high amount by earthworms during ingestion, contains high concentrations of easily available compounds, such as carbohydrates (Martin et al., 1987; Schmidt et al., 1999; Pan et al., 2010). These factors tend to stimulate microbial activity and induce a priming effect in the presence of earthworms (Lu et al., 2003; Coq et al., 2007).

In the PCA, both Cast-Root and Cast-Shoot samples could be separated into three groups according to the date of sampling (Fig. 2B): after (1) 2, 4 and 24 weeks, (2) 8 weeks and (3) 54 weeks. Cast-Root and Cast-Shoot samples collected after 8 weeks were molecularly closer to the root and shoot litter (to a lesser extent), respectively, than the samples from the first group. This observation was confirmed by the evolution along the year of **P3** (Fig. 3B) and **Alk** + **OH** (Fig. 3C) relative abundance from Cast-Root and Cast-Shoot, respectively. Indeed, **P3** and **Alk** + **OH** relative abundance increased between 4 and 8 weeks, for Cast-Root and Cast-Shoot, respectively. Moreover, an increase in the $\delta^{13}\text{C}$ value between 4 and 8 weeks for both Cast-Root (from 351‰ to 673‰) and Cast-Shoot (505‰ to 938‰) was observed (Table 1). Molecular analysis, together with isotopic analysis and OC content indicated an increasing concentration of the OM deriving from fresh plant residues in casts. Two mechanisms can account for these results: (i) incorporation of fresh litter and/or (ii) re-ingestion of older casts. Indeed, after a few months, earthworms are able to re-ingest their casts in which litter has been partially decomposed by microorganisms (Brown et al., 2000).

The third group in the PCA corresponded to samples collected after 54 weeks (Fig. 2B). Cast-Root and Cast-Shoot samples collected after 54 weeks evolved from the characteristics of the group of the other Cast-Root and Cast-Shoot samples, respectively, towards those of the Cast-Control samples. Moreover, **P3** (Fig. 3B) and **Alk** + **OH** (Fig. 3C) decreased continuously from 8 weeks until the end of the experiment, in Cast-Root and Cast-Shoot, respectively. This highlighted the idea that the decomposition of the root and shoot litter incorporated into casts was particularly enhanced after 8 weeks. The PCA showed a different rate of decomposition

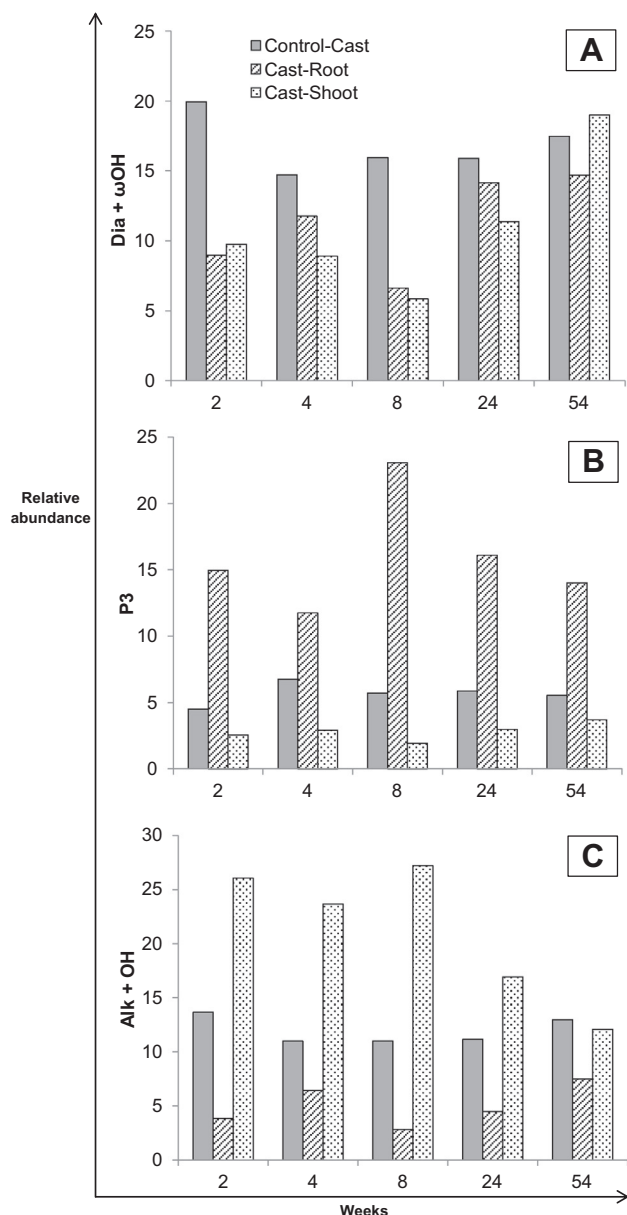


Fig. 3. Relative abundances of **A**, the sum of C_{20} , C_{22} , C_{24} and $C_{26\omega}$ -hydroxyalkanoic acids and C_{22} and C_{24} n -alkanedioic acids (**Dia + ω OH**); **B**, 4-methoxybenzoic acid methyl ester (**P3**) and **C**, The sum of C_{25-33} n -alkanes and C_{26-34} n -alkanols (**Alk + OH**) from Cast-Control, Cast-Root and Cast-Shoot samples.

between Cast-Root and Cast-Shoot samples. Indeed, after 54 weeks, the Cast-Shoot sample could not be differentiated from Cast-Control samples, the shoot litter incorporated into casts probably having undergone intense decomposition (Fig. 2B). The same trend was noted for the Cast-Root samples, although they did not reach the Cast-Control sample molecular characteristics after 54 weeks. Thus, even though Cast-Root and Cast-Shoot samples had similar isotopic and OC content values after 54 weeks (Table 1), the molecular characterization revealed a different molecular evolution of the Cast-Root samples. The slower evolution of Cast-Root samples probably reflected the combination of two factors:

- (i) Decomposition was slightly masked by the extended incorporation of roots after 24 weeks. Indeed, after 24 weeks, the mesocosm containing roots still had a small quantity of roots at the soil surface, while shoot litter had entirely

disappeared from the soil surface in the mesocosm containing shoots. This would reflect the lower “palatability” of root vs. shoot litter for earthworms (Bouché and Kretzschmar, 1974; Curry and Schmidt, 2007).

- (ii) Roots incorporated into casts and/or root-derived compounds decomposed at a slower rate than shoot residues, partly because of their chemical composition, as reviewed by Rasse et al. (2005).

The decrease in lignin-derived compound relative abundance, such as **P3** (Fig. 3B), in Cast-Root samples between 8 and 54 weeks, is consistent with previous results obtained from soils, revealing that lignin derived from fresh residues decomposed rapidly and was not preferentially preserved in soil (Rasse et al., 2006; Feng and Simpson, 2007; Lorenz et al., 2007). The ability of soil microorganisms, especially fungi, to alter and/or decompose lignin has been long acknowledged (Tuor et al., 1995; Filley et al., 2002; Dignac et al., 2005). Moreover, the decomposition of root residues in casts between 8 and 54 weeks was reflected in the oxidation of lignin-derived compounds. Indeed, in the PCA (Fig. 2A and B), while the Cast-Root sample after 8 weeks of experiment tended to be highly represented by 3,4-dimethoxybenzaldehyde (**G3**), after 54 weeks it was represented mainly by its acid counterpart (**G4**). Similarly a slight increase in the syringyl acid (**S2**) contribution vs. that of the aldehyde (**S1**) was observed between 8 and 54 weeks from the Cast-Root samples. The oxidation of guaiacyl and syringyl moieties is known to reflect the degradation of lignin (Mulder et al., 1991; Hatcher et al., 1995; Huang et al., 1998; Nierop, 2001). This process has been especially observed when carried out by fungi (Saiz-Jimenez and de Leeuw, 1984; Mulder et al., 1991; Goñi et al., 1993). Fungi, especially in the case of anecic earthworms, develop rapidly in casts, where they are abundant and can easily assimilate organic compounds (Tiwari and Mishra, 1993; Moody et al., 1995; Vidal et al., 2016). They are therefore likely to be active in the degradation of lignin compounds contained in litter incorporated into earthworm casts. In the longer term, oxidized lignin components (**G4** and **S2**) might represent a more stabilized pool of casts and finally of SOM. According to Rasse et al. (2006), lignin derived from undecomposed plants (rapid turnover) evolved in the short term towards oxidized lignin preferentially adsorbed onto soil minerals (slower turnover) and was thus potentially preserved from decomposition (Filley et al., 2002). For confirmation, longer term analysis should therefore be performed on earthworm casts.

The relative abundance of **Dia + ω OH** increased during decomposition in both Cast-Root and Cast-Shoot samples (Figs. 2A and B and 3A), becoming closer to the Cast-Control characteristics. The same trend was observed for dihydroxyhexadecanoic acids (**DioH16**; data not shown) and trihydroxyoctadecanoic acid (**TriOH**; data not shown). This probably reflected the preservation of these compounds in earthworm casts along the year of the experiment, even though their production during degradation of root and shoot litter in Cast-Root and Cast-Shoot samples, respectively, cannot be excluded. Feng and Simpson (2007) showed that hydroxyalkanoic acids were present in bound lipids of deep soil horizons, emphasizing their preferential preservation in soil with respect to lignin compounds. All these compounds showed a greater degree of oxidation than other aliphatic compounds and such oxidized compounds could be preferentially stabilized in casts via adsorption onto soil minerals (Eusterhues et al., 2003; Feng et al., 2005; Chefetz and Xing, 2009). For example, Rumpel et al. (2004) observed that hydroxyalkanoic acids were particularly preserved in fine particle size soil fractions, with high adsorption surface area. Moreover, it was reported that earthworms tended to protect compounds from decomposition by incorporating them into microaggregates (Guggenberger et al.,

1996; Hong et al., 2011). Thus, oxidized compounds were probably protected from decomposition in earthworm casts and might be preferentially stabilized in soil on a longer term.

4. Conclusions

TMAH-Py-GC-MS analysis followed by multivariate analysis enabled the molecular composition dynamics of earthworm casts, to be expressed at various time intervals over a one year experiment. Moreover, the results contributed to shedding new light on the interaction between earthworms and root litter. Roots and shoots were rapidly incorporated by earthworms within casts. Two phases dominated by the incorporation of litter were detected, potentially revealing (i) the incorporation of fresh residues during the first month of the experiment and (ii) the incorporation of fresh residues potentially combined with the re-ingestion of older casts between the first and second months. From two months until the end of the experiment, cast molecular characteristics revealed a phase dominated by litter decomposition in casts, the decomposition of shoot litter being more rapid than that of root litter. After one year, the casts in the mesocosm containing shoots showed similar molecular characteristics to casts used as controls, which was not the case for that containing roots. Shoot and root decomposition was monitored via aliphatic compound evolution (i.e. decrease in long carbon chain *n*-alkane and *n*-alkanol relative abundances) and aromatic compound evolution (i.e. decrease in 4-methoxybenzoic acid methyl ester relative abundance), respectively. Non-oxidized lignin was rapidly decomposed in earthworm casts, whereas the abundance of oxidized lignin tended to increase, highlighting the need to differentiate undecomposed lignin present in fresh litter from decomposed lignin to unravel the processes of decomposition and stabilization of carbon in soils. The relative abundance of compounds with a high degree of oxidation (i.e. ω -hydroxyalkanoic, *n*-alkanedioic, dihydroxyhexadecanoic and trihydroxyoctadecanoic acids) was important in casts used as controls and increased upon decomposition of other casts. It can be suggested that, the more oxidized the compounds, the more preserved they are in casts, probably due to increased adsorption onto mineral particles. Casts greatly contribute to the soil composition, as earthworms can produce approximately 50 t/ha/year of casts on grassland soil surfaces (Lee, 1985). Thus, the fast incorporation of OM into cast aggregates and subsequent physical protection from decomposition should play a significant role in soil carbon stabilization. Longer term analyses are required to confirm this assumption.

Acknowledgements

T.T. Nguyen Tu is acknowledged for help in setting up the experiment. We would also like to thank C. Anquetil for technical support. The study benefited from financial support from the EC2CO program from the French National Institute of Sciences of the Universe (CNRS/INSU). We thank two anonymous reviewers for constructive comments.

Associate Editor—I. Kögel Knabner

References

- Arai, M., Tayasu, I., Komatsuzaki, M., Uchida, M., Shibata, Y., Kaneko, N., 2013. Changes in soil aggregate carbon dynamics under no-tillage with respect to earthworm biomass revealed by radiocarbon analysis. *Soil and Tillage Research* 126, 42–49.
- Balesdent, J., Balabane, M., 1996. Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1261–1263.
- Bernards, M.A., 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80, 227–240.
- Bouché, M., Kretschmar, A., 1974. Fonction des lombriciens II: Recherches méthodologiques pour l'analyse du sol ingéré (étude du peuplement de la station RCP-165/PBI). *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 11, 127–139.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36, 177–198.
- Bull, I.D., va Bergen, P.F., Nott, C.J., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 2000. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments—V. The fate of lipids in different long-term experiments. *Organic Geochemistry* 31, 389–408.
- Buurman, P., Peterse, F., Almendros Martin, G., 2007. Soil organic matter chemistry in allophanic soils: a pyrolysis-GC/MS study of a Costa Rican Andosol catena. *European Journal of Soil Science* 58, 1330–1347.
- Carr, A.S., Boom, A., Chase, B.M., Meadows, M.E., Roberts, Z.E., Britton, M.N., Cumming, A.M.J., 2013. Biome-scale characterisation and differentiation of semi-arid and arid zone soil organic matter compositions using pyrolysis-GC/MS analysis. *Geoderma* 200–201, 189–201.
- Chefetz, B., Chen, Y., Clapp, C.E., Hatcher, P.G., 2000. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil Science Society of American Journal* 64, 283–289.
- Chefetz, B., Xing, B., 2009. Relative role of aliphatic and aromatic moieties as sorption domains for organic compounds: a review. *Environmental Science and Technology* 43, 1680–1688.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23, 169–175.
- Comeau, L.-P., Lemke, R.L., Knight, J.D., Bedard-Haughn, A., 2013. Carbon input from ^{13}C -labeled crops in four soil organic matter fractions. *Biology and Fertility of Soils* 49, 1179–1188.
- Coq, S., Barthès, B.G., Oliver, R., Rabary, B., Blanchart, E., 2007. Earthworm activity affects soil aggregation and organic matter dynamics according to the quality and localization of crop residues—an experimental study (Madagascar). *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2119–2128.
- Crow, S.E., Filley, T.R., McCormick, M., Szlavecz, K., Stott, D.E., Gamblin, D., Conyers, G., 2009. Earthworms, stand age, and species composition interact to influence particulate organic matter chemistry during forest succession. *Biogeochemistry* 92, 61–82.
- Curry, J.P., Schmidt, O., 2007. The feeding ecology of earthworms – a review. *Pedobiologia* 50, 463–477.
- Del Río, J.C., Hatcher, P.G., 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography–mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 29, 1441–1451.
- Derenne, S., Quénéa, K., 2015. Analytical pyrolysis as a tool to probe soil organic matter. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 111, 108–120.
- Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Rasse, D.P., Bardoux, G., Balesdent, J., Girardin, C., Chenu, C., Mariotti, A., 2005. ^{13}C natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Clouseaux experimental field (France). *Geoderma* 128, 3–17.
- Drake, H.L., Horn, M.A., 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology* 61, 169–189.
- Edwards, C.A., 2004. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In: Edwards, Clives A., (Ed.), *Earthworm Ecology*, pp. 3–11.
- Eusterhues, K., Rumpel, C., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., 2003. Stabilisation of soil organic matter by interactions with minerals as revealed by mineral dissolution and oxidative degradation. *Organic Geochemistry* 34, 1591–1600.
- Fabbri, D., Helleur, R., 1999. Characterization of the tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49, 277–293.
- Fahey, T.J., Yavitt, J.B., Sherman, R.E., Maerz, J.C., Groffman, P.M., Fisk, M.C., Bohlen, P.J., 2013. Earthworm effects on the incorporation of litter C and N into soil organic matter in a sugar maple forest. *Ecological Applications* 23, 1185–1201.
- Feng, X., Simpson, A.J., Simpson, M.J., 2005. Chemical and mineralogical controls on humic acid sorption to clay mineral surfaces. *Organic Geochemistry* 36, 1553–1566.
- Feng, X., Simpson, M.J., 2007. The distribution and degradation of biomarkers in Alberta grassland soil profiles. *Organic Geochemistry* 38, 1558–1570.
- Filley, T.R., Cody, G.D., Goodell, B., Jellison, J., Noser, C., Ostrofsky, A., 2002. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *Organic Geochemistry* 33, 111–124.
- Filley, T.R., McCormick, M.K., Crow, S.E., Szlavecz, K., Whigham, D.F., Johnston, C.T., van den Heuvel, R.N., 2008. Comparison of the chemical alteration trajectory of *Liriodendron tulipifera* L. leaf litter among forests with different earthworm abundance. *Journal of Geophysical Research Biogeosciences* 113, 1–14.
- Fontaine, S., Barot, S., Barre, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280.
- Fontaine, S., Henault, C., Aamor, A., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revalliot, S., Maron, P.A., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 86–96.
- Fonte, S.J., Kong, A.Y.Y., van Kessel, C., Hendrix, P.F., Six, J., 2007. Influence of earthworm activity on aggregate-associated carbon and nitrogen dynamics

- differs with agroecosystem management. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1014–1022.
- Fonte, S., Quintero, D.C., Velásquez, E., Lavelle, P., 2012. Interactive effects of plants and earthworms on the physical stabilization of soil organic matter in aggregates. *Plant Soil* 359, 205–214.
- Fründ, H.-C., Butt, K., Capowiez, Y., Eisenhauer, N., Emmerling, C., Ernst, G., Potthoff, M., Schädler, M., Schrader, S., 2010. Using earthworms as model organisms in the laboratory: recommendations for experimental implementations. *Pedobiologia* 53, 119–125.
- Gale, W.J., Cambardella, C.A., 2000. Carbon dynamics of surface residue- and root-derived organic matter under simulated no-till: 1-Reference to trade names and companies is made for information purposes only and does not imply endorsement by the USDA. *Soil Science Society of American Journal* 64, 190–195.
- Gañi, M.A., Nelson, B., Blanchette, R.A., Hedges, J.L., 1993. Fungal degradation of wood lignins: geochemical perspectives from CuO-derived phenolic dimers and monomers. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 3985–4002.
- González-Vila, F.J., Del Río, J.C., Martín, F., Verdejo, T., 1996. Pyrolytic alkylation-gas chromatography-mass spectrometry of model polymers further insights into the mechanism and scope of the technique. *Journal of Chromatography* 750, 155–160.
- Guggenberger, G., Thomas, R.J., Zech, W., 1996. Soil organic matter within earthworm casts of an anecic-endogeic tropical pasture community, Colombia. *Applied Soil Ecology* 3, 263–274.
- Harris, D., Horváth, W.R., van Kessel, C., 2001. Acid fumigation of soils to remove carbonates prior to total organic carbon or ^{13}C isotopic analysis. *Soil Science Society of American Journal* 65, 1853–1856.
- Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dible, S.D., Carson, D.M., 1995. Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23, 881–888.
- Hong, H.N., Rumpel, C., Henry des Tureaux, T., Bardoux, G., Billou, D., Tran Duc, T., Jouquet, P., 2011. How do earthworms influence organic matter quantity and quality in tropical soils? *Soil Biology and Biochemistry* 43, 223–230.
- Hoyos-Santillan, J., Lomax, B.H., Large, D., Turner, B.L., Boom, A., Lopez, O.R., Sjögersten, S., 2015. Getting to the root of the problem: litter decomposition and peat formation in lowland Neotropical peatlands. *Biogeochemistry* 126, 115–129.
- Huang, Y., Stankiewicz, B.A., Eglinton, G., Snape, C.E., Evans, B., Latter, P.M., Ineson, P., 1998. Monitoring biomacromolecular degradation of *Calluna Vulgaris* in a 23 year field experiment using solid state ^{13}C -NMR and pyrolysis-GC/MS. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1517–1528.
- Jégou, D., Cluzeau, D., Hallaire, V., Balesdent, J., Tréhen, P., 2000. Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrecto deagardi* and consequences on C transfers in soil. *European Journal of Soil Biology* 36, 27–34.
- Jobbágy, E.G., Jackson, R.B., 2000. The vertical distribution of the soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications* 10, 423–436.
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 139–162.
- Kolattukudy, P.E., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990–1000.
- Kolattukudy, P.E., 1981. Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annual Review of Plant Biology* 32, 539–567.
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1363–1371.
- Lavelle, P., Martin, A., 1992. Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soils of the humid tropics. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1491–1498.
- Lavelle, P., Pashanasi, B., Charpentier, F., Rossi, J.-P., Derouard, L., Andre, J., Ponge, J.-F., Bernier, N., 1998. Large-scale effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics. *Earthworm Ecology*, 103–122.
- Lee, K.E., 1985. Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. Academic Press, Sydney, Orlando.
- Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528, 60–68.
- Lorenz, K., Lal, R., Preston, C.M., Nierop, K.G.J., 2007. Strengthening the soil organic carbon pool by increasing contributions from recalcitrant aliphatic bio (macro)molecules. *Geoderma* 142, 1–10.
- Lu, Y., Watanabe, A., Kimura, M., 2003. Carbon dynamics of rhizodeposits, root- and shoot-residues in a rice soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1223–1230.
- Mambelli, S., Bird, J.A., Gleixner, G., Dawson, T.E., Torn, M.S., 2011. Relative contribution of foliar and fine root pine litter to the molecular composition of soil organic matter after in situ degradation. *Organic Geochemistry* 42, 1099–1108.
- Martin, A., Cortez, J., Barois, I., Lavelle, P., 1987. Les mucus intestinaux de ver de terre moteur de leurs interactions avec la microflore. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 24, 549–558.
- Martin, A., 1991. Short- and long-term effects of the endogeic earthworm *Millsonia anomala* (Omodeo) (Megascolecidae, Oligochaeta) of tropical savannas, on soil organic matter. *Biology and Fertility of Soils* 11, 234–238.
- Mendez-Millan, M., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Derenne, S., 2010. Can cutin and suberin biomarkers be used to trace shoot and root-derived organic matter? A molecular and isotopic approach. *Biogeochemistry* 106, 23–38.
- Moody, S.A., Briones, M.J.L., Pearce, T.G., Dighton, J., 1995. Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1209–1213.
- Mulder, M.M., Pureveen, J.B.M., Boon, J.J., Martínez, A.T., 1991. An analytical pyrolysis mass spectrometric study of *Eucryphia cordifolia* wood decayed by white-rot and brown-rot fungi. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 19, 175–191.
- Neuhauser, E.F., Hart-Nstein, R., Connors, W.J., 1978. Soil invertebrates and the degradation of vanillin, cinnamic acid, and lignins. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 431–435.
- Nierop, K.G., 2001. Temporal and vertical organic matter differentiation along a vegetation succession as revealed by pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 111–132.
- Nierop, K.G., van Lagen, B., Buurman, P., 2001. Composition of plant tissues and soil organic matter in the first stages of a vegetation succession. *Geoderma* 100, 1–24.
- Otto, A., Shunthirasingham, C., Simpson, M.J., 2005. A comparison of plant and microbial biomarkers in grassland soils from the Prairie Ecozone of Canada. *Organic Geochemistry* 36, 425–448.
- Otto, A., Simpson, M.J., 2006. Sources and composition of hydrolysable aliphatic lipids and phenols in soils from western Canada. *Organic Geochemistry* 37, 385–407.
- Pan, X., Song, W., Zhang, D., 2010. Earthworms (*Eisenia foetida*, Savigny) mucus as complexing ligand for imidacloprid. *Biology and Fertility of Soils* 46, 845–850.
- Puget, P., Drinkwater, L.E., 2001. Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous green manure. *Soil Science Society of America Journal* 65, 771–779.
- Quénéa, K., Largeau, C., Derenne, S., Spaccini, R., Bardoux, G., Mariotti, A., 2006. Molecular and isotopic study of lipids in particle size fractions of a sandy cultivated soil (Cestas cultivation sequence, southwest France): sources, degradation, and comparison with Cestas forest soil. *Organic Geochemistry* 37, 20–44.
- Quénéa, K., Mathieu, J., Derenne, S., 2012. Soil lipids from accelerated solvent extraction: influence of temperature and solvent on extract composition. *Organic Geochemistry* 44, 45–52.
- Rasse, D., Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil* 269, 341–356.
- Rasse, D.P., Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Mariotti, A., Chenu, C., 2006. Lignin turnover in an agricultural field: from plant residues to soil-protected fractions. *European Journal of Soil Sciences* 57, 530–538.
- Riederer, M., Matzke, K., Ziegler, F., Kögel-Knabner, I., 1993. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soils. *Organic Geochemistry* 20, 1063–1076.
- Rumpel, C., Eusterhues, K., Kögel-Knabner, I., 2004. Location and chemical composition of stabilized organic carbon in topsoil and subsoil horizons of two acid forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 177–190.
- Saiz-jimenez, C., de Leeuw, J.W., 1984. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of isolated, synthetic and degraded lignins. *Organic Geochemistry* 6, 417–422.
- Schellekens, J., Barberá, G.G., Buurman, P., Pérez-Jordà, G., Martínez-Cortizas, A., 2013. Soil organic matter dynamics in Mediterranean A-horizons—the use of analytical pyrolysis to ascertain land-use history. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 104, 287–298.
- Schmidt, O., Scrimgeour, C.M., Curry, J.P., 1999. Carbon and nitrogen stable isotope ratios in body tissue and mucus of feeding and fasting earthworms (*Lumbricus festivus*). *Oecologia* 118, 9–15.
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E., 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49–56.
- Shipitalo, M.J., Protz, R., 1989. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma* 45, 357–374.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research* 79, 7–31.
- Stockmann, U., Adams, M.A., Crawford, J.W., Field, D.J., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., McBratney, A.B., Courcelles, V.R., Singh, K., Wheeler, I., Angers, D.A., Baldock, J., Bird, M., Brookes, P.C., Chenu, C., Jastrow, J.D., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, A.G., Parton, W.J., Whitehead, D., Zimmermann, M., 2013. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 164, 80–99.
- Stromberger, M.E., Keith, A.M., Schmidt, O., 2012. Distinct microbial and faunal communities and translocated carbon in *Lumbricus terrestris* drilospheres. *Soil Biology and Biochemistry* 46, 155–162.
- Tian, G., Brussaard, L., Kang, B.T., 1995. Breakdown of plant residues with contrasting chemical compositions under humid tropical conditions: effects of earthworms and millipedes. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 277–280.
- Tiwari, S.C., Mishra, R.R., 1993. Fungal abundance and diversity in earthworm casts and in uningested soil. *Biology and Fertility of Soils* 16, 131–134.
- Totsche, K.U., Rennert, T., Gerzabek, M.H., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., Spiteller, M., Vogel, H.-J., 2010. Biogeochemical interfaces in soil: the interdisciplinary challenge for soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173, 88–99.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A., 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* 41, 1–17.

- Vidal, A., Remusat, L., Watteau, F., Derenne, S., Quénéa, K., 2016. Incorporation of ^{13}C labelled shoot residues in *Lumbricus terrestris* casts: a combination of transmission electron microscopy and nanoscale secondary ion mass spectrometry. *Soil Biology and Biochemistry* 93, 8–16.
- Whitehead, D.C., Buchan, H., Hartley, R.D., 1979. Composition and decomposition of roots of ryegrass and red clover. *Soil Biology and Biochemistry* 11, 619–628.
- Wiesenberg, G.L.B., Schwarzbauer, J., Schmidt, M.W.I., Schwark, L., 2004. Source and turnover of organic matter in agricultural soils derived from n-alkane/n-carboxylic acid compositions and C-isotope signatures. *Organic Geochemistry* 35, 1371–1393.
- Wiesenberg, G.L.B., Gocke, M., Kuzyakov, Y., 2010. Fast incorporation of root-derived lipids and fatty acids into soil – evidence from a short term multiple pulse labelling experiment. *Organic Geochemistry* 41, 1049–1055.
- Zangerlé, A., Pando, A., Lavelle, P., 2011. Do earthworms and roots cooperate to build soil macroaggregates? A microcosm experiment. *Geoderma* 167–168, 303–309.



Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water

K. Quenea^{a,1}, I. Lamy^{b,2}, P. Winterton^{c,3}, A. Bermond^{d,4}, C. Dumat^{e,*}

^a BioMCo, UPMC, UMR 7618, PO box 120, 4 place Jussieu, 75251 Paris cedex 05, France

^b INRA, Unité de science du sol, 78026 Versailles, France

^c Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 09, France

^d AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris cedex 05, France

^e Ecolab, UMR 5245, ENSAT Av. Agrobiopole 31326 Auzeville, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2008

Received in revised form 1 October 2008

Accepted 29 November 2008

Available online 25 January 2009

Keywords:

Soil organic matter turnover

Stable isotopic carbon ratio

Trace metal behaviour

Size fractionation

Waste water

ABSTRACT

Only scarce field studies concern the consequences of natural soil organic matter (SOM) and metal interactions on SOM dynamics in soils. We investigated the interactions of four metals (Pb, Zn, Cu and Cd) with the SOM associated to five different size fractions (between 2000 μm and $<2 \mu\text{m}$) of a sandy top soil contaminated by waste water. Metal, organic carbon and nitrogen concentrations were measured and chemical extractions (with $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and EDTA) were also performed to assess the variations of SOM–metal interactions irrespective of the size fraction. In addition, as in that selected contaminated site, maize (C_4 plant), replaced C_3 crops 15 years ago, natural isotopic ^{13}C labelling gave new insights into SOM turnover. First, the results suggest that metals influence the SOM dynamics in that sandy soil: a C_3 “old carbon” enrichment was observed in the small or clay size fractions, while the “new” C_4 carbon associated with sandy soil particles presents a rapid turnover. Metal accumulation in the clay fraction is attributed to particulate organic matter (poorly associated) and SOM decay which overtime accumulated metals and eventually these metal–SOM associations prevent the biological decomposition of such carbon pools. Moreover, the $\delta^{13}\text{C}$ signals, C/N ratios and results from chemical extractions clearly showed differences in the origin, nature and reactivity of the SOM as a function of the size fraction with consequences on the metal behaviour. Differences were observed between metals studied: Zn seems to be mainly bound to SOM associated with clay particles, while Pb seems to prefer to interact directly with the mineral surfaces versus the SOM.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Due to various anthropogenic activities, potentially toxic metals are accumulated in soils, with a risk of water and biota contamination (Alloway, 1995). The design of pertinent soil criteria for environment protection and remediation relies on an understanding of the mechanisms controlling metal behaviour (Cecchi et al., 2008; Arshad et al., 2008). Among the various reactive soil constituents, soil organic matter (SOM) has a large sorption capacity towards metals (Yin et al., 2002). The metal–SOM interaction has various and complex consequences both on the solubility, mobility and bioavailability of metals (Impellitteri et al., 2002) and on SOM turnover (Boucher et al., 2005).

Generally, solid phase SOM is associated with retention, decreased mobility and reduced bioavailability of trace metals (Sauvé et al., 2000). But cationic metals that would ordinarily precipitate at the pH values of most soils are sometimes maintained in solution through complexation with soluble organics (Ferrand et al., 2006). Furthermore, metals participate and/or affect biogeochemical cycles in soils and influence the soil biota (Barajas-Aceves et al., 1999).

Reactive soil components are obviously in interaction (Dumat et al., 1997) and SOM consists of various components with a wide range of turn-over times, weight, reactivity and chemical nature: therefore the way such interactions are studied is complex (Woomer et al., 1994). The studies concerning one extracted soil component are open to criticism, conversely, methods of soil particle-size fractionation can be used to assess the distribution of metals in soils (Ducaroir and Lamy, 1995) and provide information on the SOM behaviour.

The metal distribution among the different soil components can be estimated using specific chemical reagents in order to discriminate the total metal content over various operationally defined fractions in the solid phase (Tessier et al., 1979; Dumat et al., 2001). For instance, sodium pyrophosphate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) is used to dissolve SOM:

* Corresponding author. Tel.: +33 5 62 19 39 03; fax: +33 5 62 19 39 01.

E-mail addresses: katell-quenea@enscp.fr (K. Quenea), lamy@versailles.inra.fr (I. Lamy), peter.winterton@univ-tlse3.fr (P. Winterton), bermond@inapg.inra.fr (A. Bermond), camille.dumat@ensat.fr (C. Dumat).

¹ Fax: +33 1 44 27 67 16.

² Fax: +33 1 30 83 32 59.

³ Fax: +33 5 61 55 83 58.

⁴ Fax: +33 1 44 08 16 46.

pyrophosphate complexes the metals which stabilize the SOM and the hydrogen bonds between OM and minerals are broken (Dumat et al., 1997). In contrast, EDTA is a powerful but unspecific complexing agent: the metals adsorbed both by SOM and oxides are extracted (Miller et al., 1986). The comparison of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and EDTA metal extractions should improve the estimation of metals specifically linked to SOM.

In soils where the vegetation changes from C_3 to C_4 (or vice versa), the variations in the natural abundance of ^{13}C ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio) in SOM over time can be used to identify organic carbon sources in the soil (Schwartz et al., 1996) or to determine the SOM turnover rate (Balesdent and Mariotti, 1996). Using that tool, Dumat et al. (2006) highlighted the influence of metals on the SOM turnover on pseudogley brown leached soils strongly contaminated by inorganic atmospheric fallout from a smelter. However, only scarce field studies concern the consequences of natural SOM–metal interactions on SOM dynamics: supplementary studies in various pedologic and pollution contexts are therefore needed.

In the present work a contaminated sandy top soil under maize that had received waste water applications was used to investigate the interactions between four metals (Pb, Cd, Zn and Cu) and SOM. The tested hypothesis throughout these experiments was a significant influence of organic matter–metal interaction both on SOM dynamics and metals fate.

2. Materials and methods

2.1. Soil sample preparation and soil properties

The studied sandy luvisols, in the north of the Paris basin, has been precisely described by Lamy et al. (2006). Moreover the site management history is widely exposed in several publications (Bourennane et al., 2006; Lamy et al., 2006; Dère et al., 2006, 2007): wastewater irrigation of garden markets occurred from 1899 to 2002 (average $40,000 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$).

In comparison with experiments performed in controlled laboratory conditions, only few study dealing with organic matter–metals interactions concern field experimentations based on concrete case. Our study offers an original experimental design from this point of view. The studied site has been considered only after metal contamination has been noticed, which means: several years after that the spreading has been forbidden, thus the waste water was not available for analysis. However Dère et al. (2006, 2007) observed that metals concentrations in the sandy topsoil have increased by tenfold compared to the pedogeochemical background and concluded to a soil metal pollution due to waste water spreading.

Field sampling was oriented to collect representative soil samples weighing 40 kg in closed bags. After mixing, all the samples were air dried and sieved to exclude particles larger than 2 mm to give the bulk soil. Thereafter trace metal, carbon and nitrogen concentrations were measured. The cation exchange capacity (CEC), determined by the ammonium acetate method at pH 7 (Metson's method, AFNOR NF X 31130) was $4.9 \text{ Cmol}^+(\text{g})^{-1}$ and the $\text{pH}_{\text{water}} = 7.1$.

2.2. Physical fractionation of the various soil size fractions

Before particle size fractionation, an initial physical dispersion of the soil samples was performed by end-to-end shaking overnight in pure de-ionised water in order to minimise the potential variations of metal speciation that could occur with chemical dispersion. The solid/solution ratio was 1/5 (m/V) with the use of glass balls favouring the soil dispersion. The suspensions were then sieved through a series of grids (AFNOR French reference) with decreasing mesh size (2000, 200 and 50 μm). Then the fractions (20 $\mu\text{m} < \text{size} < 50 \mu\text{m}$) and (2 $\mu\text{m} < \text{size} < 20 \mu\text{m}$) were obtained by sedimentation at normal gravity (g), during times determined by Stokes' law. The $< 2 \mu\text{m}$

fractions were finally obtained after concentration of the suspensions by centrifuging at 39,200 g for 1 h at 15 °C on a Beckman Avanti J30I apparatus. All the particles recovered were air dried at 60 °C, weighed, ground (200 μm) and homogenised.

2.3. Measure of metal concentrations and chemical extractions

The total metal concentrations in the various soil size fractions were analysed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) on a Jobin Yvon JYESS 4.03 apparatus, after triple acid digestion (HF , HCl and HNO_3) of the solid samples. The digestion protocol and measurement accuracy were checked by reference to a known standard soil (GRX2). It indicated the efficiency of the digestion protocol and of the ICP-AES assay (within $\pm 1\%$). All the results correspond to the mean of two replicates.

Two extractions were performed on separate sub-samples. The $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ extractions were performed with the procedure of Vieiriae et al. (1993). The contact time was 16 h, with 0.1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ at $\text{pH} = 10$: maximum efficiency is for $\text{pH} > 9$ (Asher and Bar-Yosef, 1982). The EDTA extraction conditions were chosen such that EDTA was in excess at equilibrium (Gesthem and Bermond, 1998). The contact time was 24 h, with 0.05 M EDTA at $\text{pH} = 6.5$. The various solid phase fractionations were performed at room temperature (20 °C), with a solid/solution ratio of 1/10, with two replicates per sample. In order to obtain a solution free of solid material before filtration, a strong centrifugation (50,000 g) was performed on the $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ extracts (20,000 g for EDTA extracts). After each extraction, the soil was rinsed with deionised water to limit precipitation of metals and to improve the extraction efficiency. The extracts and rinses were analysed after filtration (0.2 μm), for metals using ICP-AES. Analyses of soil extractions were calibrated using standard solutions made with the extracting agents.

2.4. Amounts of organic carbon and stable carbon isotopic signals ($\delta^{13}\text{C}$)

The ploughed contaminated topsoil (0–30 cm), which has been under maize (C_4 metabolism with $\delta^{13}\text{C}$ from -10 to -12%) for 15 years, was previously used for garden markets cultures, presenting a C_3 metabolism ($\delta^{13}\text{C}$ from -27.6 to -30.5%). That C_3 – C_4 sequence allows natural labelling of organic matter in relation with the dynamics of the carbon sources (Bender, 1971; O'Leary, 1981; Collister et al., 1994). Organic carbon and nitrogen contents of the soil samples were determined by dry combustion in a Carlo Erba NA 1500 CHN elemental analyser. Stable carbon isotope ratios of SOM and plants were measured on a Fisons SIRA 10 Isotope Ratio Mass Spectrometer. ^{13}C natural abundance was expressed in δ units, by reference to the international standard PDB (marine carbonate: belemnite from the PEE Dee formation) (Craig, 1957), according to the following equation:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{‰}} = \frac{\left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right]_{\text{sample}} - \left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right]_{\text{PDB}}}{\left[\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right]_{\text{PDB}}} \times 1000.$$

All samples were sieved to 1 mm, ground to 100 μm and homogenised. Organic carbon, nitrogen and $\delta^{13}\text{C}$ were measured in duplicate, with previous elimination of carbonates by acidification. According to Balesdent and Mariotti (1996) and Boutton (1996), mean $\delta^{13}\text{C}$ (‰) reference values for carbon isotopic composition are around -27 for C_3 plants (mainly trees, rice, wheat, certain grass species), -14 for C_4 plants (mainly maize, tropical grasses and certain other grasses) and -8 for current atmospheric CO_2 .

2.5. Statistical data treatment

Data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) with one factor, using the software Statistica, Edition '98 (StatSoft Inc., Tulsa,

Table 1Metal concentrations (mg kg⁻¹), organic C (%), N (%) and C/N of the various size fractions of the contaminated sandy top soil

Soil size fraction	Concentration (mg kg ⁻¹)				%		
	Pb	Zn	Cu	Cd	C	N	C/N
2000–200 µm	43.2±5	258±19	32±11	0.06±0.02	1.26±0.075	0.04±0.005	31.5
200–50 µm	94.2±7	429±16	93.6±15	0.46±0.05	1.24±0.05	0.07±0.005	17.71
50–20 µm	340±22	1893±98	296.7±21	4±0.2	3.4±0.1	0.21±0.015	16.33
20–2 µm	749±54	4112±165	429±33	13.15±0.3	5.5±0.3	0.42±0.03	13.12
<2 µm	1560±19	7688±73	1267±94	22.5±2	7.2±0.3	0.67±0.05	10.75

OK, USA). For each bioassay, mean values with different letters represent a significant difference ($p < 0.05$) as measured by the LSD Fisher test. Letters are reported on the figures.

3. Results

3.1. Amounts of trace metals, carbon and nitrogen in the various size fractions

For the bulk topsoil sample: (i) trace metal concentrations (mg kg⁻¹) were [Pb]=142, [Zn]=1233, [Cu]=68 and [Cd]=1.8; (ii) organic carbon (%) and nitrogen (%) concentrations are respectively 1.75 and 0.15, with a C/N value of 11.7. These results are given as the means of the two replicates and the relative standard deviation never exceeded 7%. Compared with the natural pedogeochemical background values ([Pb]=5.9 mg kg⁻¹, [Zn]=13.4 mg kg⁻¹, [Cu]=3.9 mg kg⁻¹ and [Cd]=0.1 mg kg⁻¹), our results indicate a significant contamination of the top soil (Lamy et al., 2006).

Particle size fractionation of soil samples resulted in the recovery of 98±0.5% of the initial sample mass. The size distribution observed was: 42.3% (2000 µm>fraction>200 µm), 40.4% (200 µm>fraction>50 µm), 5.4% (50 µm>fraction>20 µm), 4.5% (20 µm>fraction>2 µm) and 7.4% fraction<2 µm i.e. the sand fractions (fine and coarse) accounted for 80% of the total weight.

The results of total metal and organic carbon concentrations in the different soil particle size classes are given in Table 1. Whatever the metal considered, the concentration strongly increased as the size decreased according to Harter and Naidu (1995): 30–40 times for Zn, Pb and Cu and 375 times for Cd. The clay fraction is also that with the highest levels of organic carbon and nitrogen. The concentrations measured increased from 1.3% C and 0.04% N in the 2000–200 µm fraction to 7.2% C and 0.7% N in the clay fraction. The proportion of the different soil particle size classes was multiplied by the concentration of the metals in each class to give the actual quantity of each metal in

each size class (Fig. 1). The determination of these different metal pools demonstrated the relevance of focussing both on the clay fraction and on the sum of the different coarse fractions in order to study the SOM–metal interaction.

3.2. Chemical extractions

The results of the chemical extractions performed on the sandy top soil size fractions for Zn (A), Cu (B), Pb (C) and Cd (D) are reported both in Fig. 2: quantities of metals extracted (mg of the metal per kg of soil fraction) by EDTA or Na₄P₂O₇ and in Fig. 3: ratios of the quantities of metals extracted by EDTA or Na₄P₂O₇ divided by the total metal content of that size fraction. The data of Fig. 2 indicate that the quantities extracted per unit weight of the fraction increased with decreasing particle size. However, for the ratios (Fig. 3), the reverse trend was generally observed, in particular with Na₄P₂O₇ extraction: a large proportion of metals extractable from the coarse fraction and in the 20–2 µm fraction.

In the clay fraction, more Zn and Cu were extracted with Na₄P₂O₇ than with EDTA (Fig. 2). Moreover, higher proportions of Zn and Cu were extracted by Na₄P₂O₇ than Cd and Pb (Fig. 3) suggesting two different patterns depending on the metal.

3.3. Use of the $\delta^{13}\text{C}$ signal to study the organic matter dynamics in relation with metals

Fig. 4 gives: (a) $\delta^{13}\text{C}$ and (b) C₄/C₃ ratio between carbon of C₄ origin and total organic carbon for the different size fractions (Balesdent and Mariotti, 1996; Dumat et al., 2006). The value of $\delta^{13}\text{C}$ for the topsoil was between –21.8‰ for the coarse fraction and –23.2‰ for the fine fraction. No $\delta^{13}\text{C}$ values for organic matter from waste water are available from the literature, however a $\delta^{13}\text{C}$ signature of –25.4‰ measured for anaerobically digested sludge from South West France (Parat et al., 2007) could give a general idea. In fact, the quantity of organic carbon in waste waters is generally very low compared to the carbon inputs from plants, therefore the influence of the organic matter from waste waters on the $\delta^{13}\text{C}$ signature of the SOM can be ignored considering the much greater inputs of organic matter from C₃ and C₄ plants.

4. Discussion and conclusion

4.1. SOM and metal interaction

The comparison between EDTA (a powerful but unspecific metal chelating agent) and Na₄P₂O₇ (which mobilises metals bound to SOM) (Fig. 2) suggests that a significant part of all the metals is bound to the SOM. That hypothesis is moreover supported by total concentrations results: carbon from the clay fraction represented more than 25% of the total soil carbon and the highest proportion of metals was also Na₄P₂O₇ extracted from this fraction. For lead and zinc, two metals with high total concentrations in the sandy top soil, the following empirical equations between metal concentrations (expressed in mg kg⁻¹) and organic carbon concentrations (expressed in percent) were determined: [Pb]=228.59×[C]–294.93 with a correlation coefficient (r) of 0.96 and [Zn]=1150.4×[C]–1412.6 with $r=0.95$.

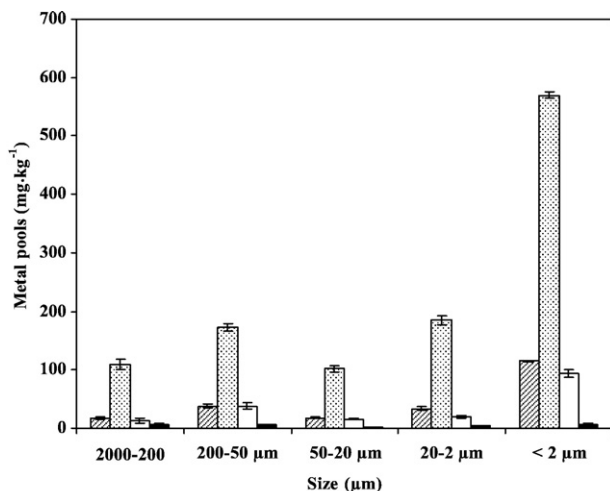


Fig. 1. Metal pools (Pb: ▨, Zn: ▩, Cu: □ and Cd: ■) in the different size fractions of the topsoil.

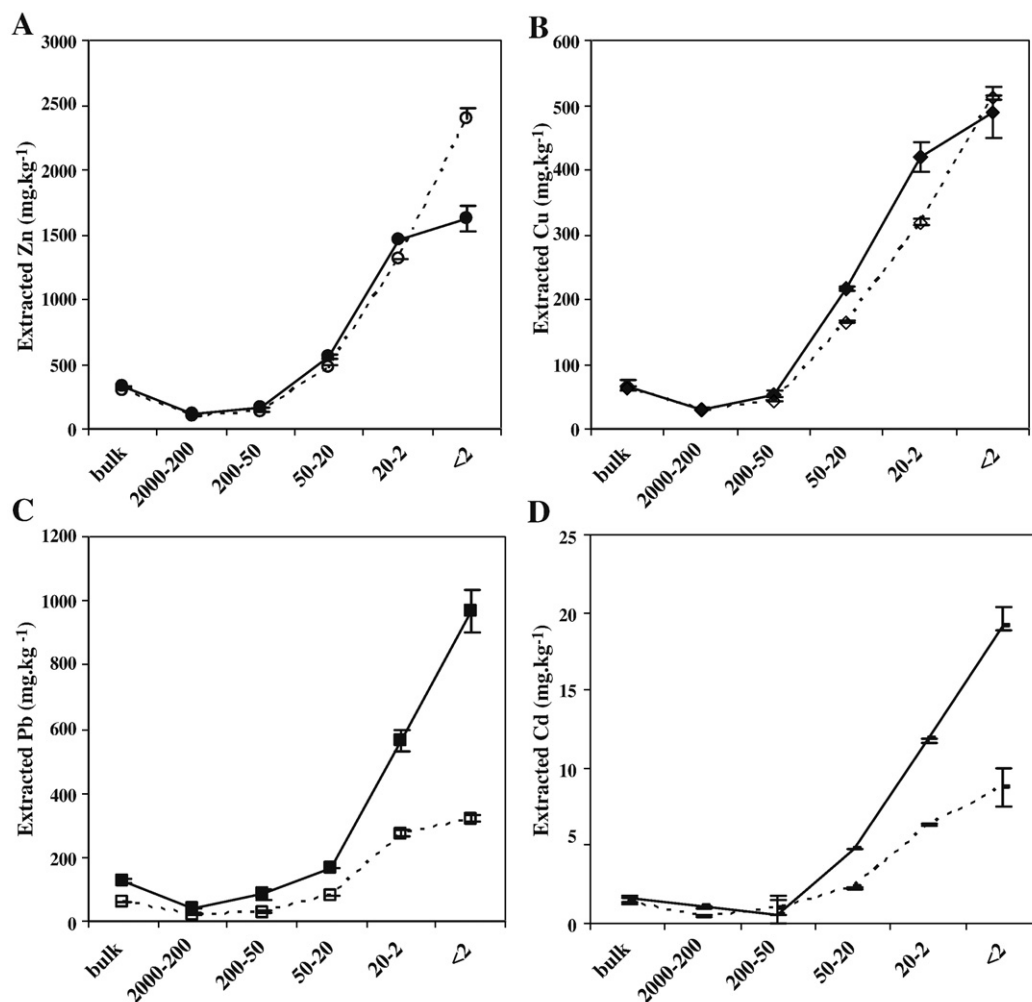


Fig. 2. Chemical extractions performed on various size fractions of the sandy topsoil. Quantities of metals extracted (mg of the metal per kg of soil fraction) by EDTA or $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. A) Zn-EDTA: ● and Zn- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: ○; B) Cu-EDTA: ◆ and Cu- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: ◇; C) Pb-EDTA: ■ and Pb- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: □; D) Cd-EDTA: ▲ and Cd- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: △.

However in relation to SOM influence, two different behaviours were observed for the four studied metals. For Zn and Cd, the quantities extracted by EDTA and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ were fairly similar (except for Zn in the case of clay fraction: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 > \text{EDTA}$) suggesting that these two metals were preferentially linked to the SOM (Fig. 2). In contrast, for lead and cadmium, the quantities extracted by EDTA were significantly higher than the quantities extracted by $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; other soil components (like clay minerals or oxides) significantly interact with these two metals (Dumat et al., 2001; Cecchi et al., 2008).

The general trend observed was that of a decrease of metal proportions extracted by $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ with the decrease of the soil particle size: the metal extraction yield was greater in sand and in the 20–2 μm fractions compared with the clay fraction (Fig. 3). The efficiency of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ could be influenced by the nature of the SOM and by the interactions between SOM and other soil components. Indeed, with decreasing particle size, Table 1 shows a decrease in C/N ratio, in agreement with a change in the chemical nature of the SOM (Dormaar, 1984; Besnard et al., 2001). Two different pools of metals with contrasting behaviours (in relation with the SOM characteristics) could be present in the soil: metals in the coarse fractions and metals in the clay fraction.

The coarsest fraction was mainly composed of sand and poorly degraded particulate organic matter (POM) (Cambaradella and Elliott, 1992). Minerals in the 2000–20 μm fraction were relatively inert, so the interaction between these minerals and metals should mainly be weak such as electrostatic bonding; POM (with high specific surface area) may therefore play a significant role (Besnard et al., 2001).

Sequential extraction performed by Dère et al. (2007) on the bulk fraction of the same sandy topsoil ranked lability (potential to be remobilized from solid phase to soil solution) as: $\text{Zn} \gg \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Cd}$. Doelsch et al. (2006) also observed the high lability of Zn in sewage sludge. In the coarse fractions of the soil, the metals associated with POM will therefore mainly be under relatively labile forms.

During biodegradation, the level of SOM oxidation increases (Baldock et al., 1997), leading to an increase of its reactivity towards metals. Since the level of humification increases as particle size decreases, SOM from the fine fraction constitutes a highly reactive pool for binding metals. Moreover, the metals arrived in the sandy top soil simultaneously with organic matter from the waste water, the metals could therefore have already been associated with dissolved organic matter (Vaca-Paulín et al., 2006; Doelsch et al., 2006). In addition, Wong et al. (2007) concluded that dissolved organic matter interacts with the clay minerals becoming less accessible to microorganisms. Due to its higher stability against microorganism degradation, the SOM of the clay fraction could have a stabilization effect on the metals and reduce their bioavailability (Dabkowska-Naskret, 2003).

4.2. Use of the $\delta^{13}\text{C}$ signal to study organic matter dynamics in relation with metals

The measurement for the topsoil (under maize for 15 years) of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) between –21.8 (coarse fraction) and –23.2 (clay fraction), whereas the value of –12.5‰ has been measured on a maize sample

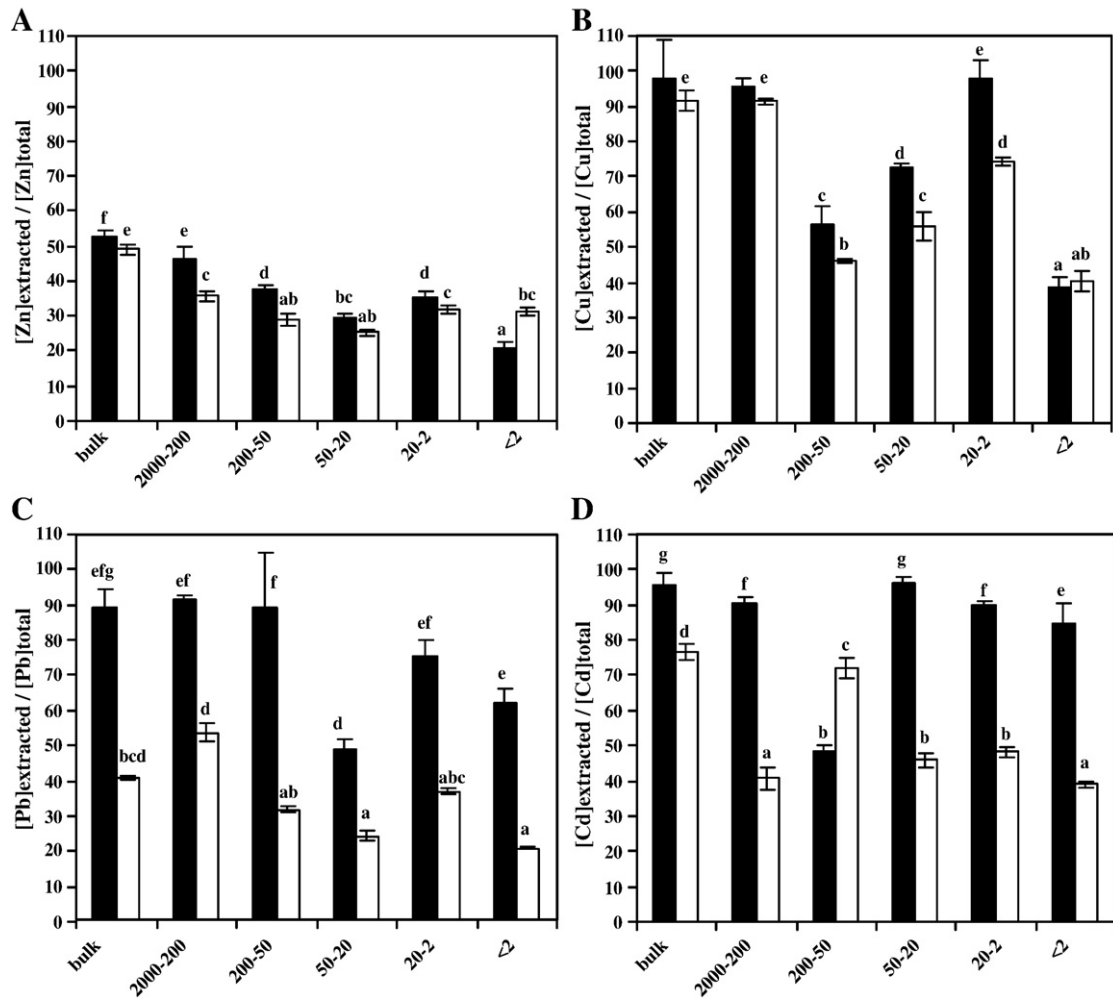


Fig. 3. Chemical extractions performed on various size fractions of the sandy topsoil. Ratios (%) of the quantities of metals extracted by EDTA (■) or Na₄P₂O₇ (□) divided by the total metal content of that size fraction. A) Zn, B) Cu, C) Pb and D) Cd.

composed of crushed leaves and stalks by Jolivet et al. (2003), indicates that the SOM is relatively unaffected by the maize $\delta^{13}\text{C}$. From the C_4/C ratios calculated, the amount of SOM of C_4 origin was seen to be under 40% and decreased with the soil size fraction: 0.4 for the 2000–200 μm fraction and 0.3 for the clay fraction. Balesdent and Mariotti (1996) or Balesdent et al. (1987) estimated the residence time of carbon in size fractions of different uncontaminated soils under maize for 13 years: the expected proportion of new C_4 carbon from maize in the coarse fraction (2000–200 μm) of these uncontaminated soils was 80%. Balesdent and Mariotti (1996) concluded that turnover times were 4 ± 1.5 years for the 2000–200 μm fraction and 13 ± 2 years for the 200–50 μm fraction. In contrast all fractions finer than 10 μm exhibited a slow turnover. Our results are therefore consistent with a preferential accumulation of old C_3 organic matter in the polluted soil, particularly in the clay fraction. Even in heavily metal contaminated soils, biological activity occurs (Valsecchi et al., 1995; Aoyama and Nagumo, 1997), but alterations of organic matter decomposition are reported (Berg et al., 1991; Cotrufo et al., 1995).

In comparison with more contaminated “old” C_3 plant residues in the clay fraction, the “new” C_4 maize residues left in the soil (after the harvest) were mineralised more quickly. The POM is poorly associated with the soil mineral matrix and has a relatively rapid turnover in comparison with the finest SOM in the clay fraction (Cambaradella and Elliott, 1992; Balesdent, 1996). Parat et al. (2007) suggest an accumulation of plant residues in the coarse fraction of a sludge-contaminated soil by physical protection as the sludge could enhance

aggregate formation. However, the topsoil studied here had been intensively used for crops for several decades and its sandy texture limits the physical protection of SOM (Guggenberger et al., 1995). Moreover, the soil we studied received mainly waste water amendment, so the effect on aggregation was limited.

Some metals are progressively released during the decay of C_3 POM. Then, part of the metals was adsorbed by the reactive colloidal organic matter in the clay fraction (Besnard et al., 2001; Boucher et al., 2005). According to Brookes (1995) or Mhatre and Pankhurst (1997), decreased organic matter decomposition in polluted soils could result from the inhibition of microbial activity by bio-available toxic metals. However, Hattori (1996) concluded that the recalcitrance of plant residues towards microorganism degradation should also be considered. The formation, in the clay fraction, of organo-metallic complexes relatively resistant to biodegradation (Orlov et al., 1988) could therefore result. This hypothesis is consistent with the lack of accumulation of highly contaminated coarse plant residues in the top soil i.e. the microorganisms degrade the fresh organic matter (relatively free of metals and not protected by clay minerals), but tend to leave the old C_3 organic matter residues stabilized by chemical and physical phenomena.

Finally from the results obtained in the present study, it can be concluded that the presence of metals carried by waste water modified the turnover rate of the SOM in the contaminated sandy top soil. A decrease of SOM turnover due to the influence of metals was previously observed for pseudogley brown leached soils strongly contaminated by inorganic atmospheric fallout from a smelter (Dumat

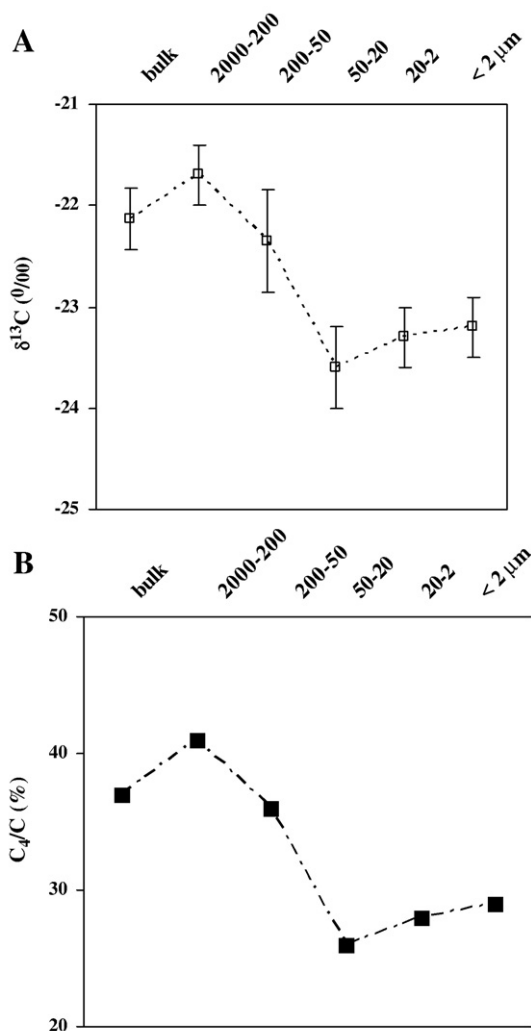


Fig. 4. (a) $\delta^{13}\text{C}$ and (b) C_4/C ratios (%) of the topsoil for the different size fractions.

et al., 2006), i.e. in a very different context. Decreased SOM turnover could therefore be considered as a general phenomenon to take into account when studying carbon sinks and organic matter turnover in polluted soils.

Acknowledgement

The authors thank the French National Environment Program (PNSE 2005) for financial support.

References

- Alloway, B.J., 1995. Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland.
- Aoyama, M., Nagumo, T., 1997. Comparison of the effects of Cu, Pb, As on plant residue decomposition, microbial biomass and soil respiration. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 613–622.
- Arshad, M., Silvestre, J., Pinelli, E., Kallerhoff, J., Kaemmerer, M., Shahid, M., Pradere, P., Dumat, C., 2008. A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium* cultivars. *Chemosphere* 71, 2187–2192.
- Asher, L.E., Bar-Yosef, B., 1982. Effects of pyrophosphate, EDTA and DTPA on zinc sorption by montmorillonite. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 271–275.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Nelson, P.N., Skene, T.M., Golchin, A., Clarke, P., 1997. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *Aust. J. Soil Res.* 35, 1061–1083.
- Balesdent, J., 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 485–493.
- Balesdent, J., Mariotti, A., 1996. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance. In: Boutton, T.W., Yamasaki, S. (Eds.), *Mass Spectrometry of Soil*. Marcel Dekker, New York, pp. 83–111.

- Balesdent, J., Mariotti, A., Guillet, B., 1987. Natural ^{13}C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 19, 25–30.
- Barajas-Aceves, M., Grace, C., Ansorena, J., Dendooven, L., Brookes, P.C., 1999. Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentrations in soils around a mine spoil tip. *Soil Biol. Biochem.* 31, 867–876.
- Bender, M., 1971. Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry* 10, 1239–1244.
- Berg, B., Ekbohm, G., Soderstrom, B., Staaf, H., 1991. Reduction in the decomposition rates of Scots Pine needle litter due to heavy-metal pollution. *Water Air Soil Pollut.* 59, 165–177.
- Besnard, E., Chenu, C., Robert, M., 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environ. Pollut.* 112, 329–337.
- Boucher, U., Lamy, I., Cambier, P., Balabane, M., 2005. Decomposition of leaves of metallophyte *Arabidopsis halleri* in soil microcosms: fate of Zn and Cd from plant residues. *Environ. Pollut.* 135, 323–332.
- Bourennane, H., Dère, C., Lamy, I., Cornu, S., Baize, D., van Oort, F., King, D., 2006. Enhancing spatial estimates of metal pollutants in raw wastewater irrigated fields using a topsoil organic carbon map predicted from aerial photography. *Sci. Total Environ.* 361, 229–248.
- Boutton, T.W., 1996. Stable carbon isotope ratio of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: Boutton, T.W., Yamasaki, S. (Eds.), *Mass Spectrometry of Soil*. Marcel Dekker, New York, pp. 47–82.
- Brookes, P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 19, 269–279.
- Cambaradella, C.A., Elliott, E.T., 1992. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 777–783.
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradère, P., Guirese, M., 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* 144, 287–298.
- Collister, J.W., Rieley, G., Stern, B., Eglinton, G., Fry, B., 1994. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms. *Org. Geochem.* 21 (6/7), 619–627.
- Cotrufo, M.F., De Santo, A.V., Alfani, A., Bartoli, G., De Cristofaro, A., 1995. Effects of urban heavy metal pollution on organic matter decomposition in *Quercus ilex* L. woods. *Environ. Pollut.* 89, 81–87.
- Craig, H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta* 12, 133–149.
- Dabkowska-Naskret, H., 2003. The role of organic matter in association with zinc in selected arable soils from Kujawy region, Poland. *Org. Geochem.* 34, 645–649.
- Dère, C., Lamy, I., van Oort, F., Baize, D., Cornu, S., 2006. Trace metal inputs reconstitution and migration assessment in a sandy Luvisol after 100 years of massive irrigation with raw wastewaters. *C.R. Geosci.* 338, 565–573.
- Dère, C., Lamy, I., Jaulin, A., Cornu, S., 2007. Long-term fate of exogenous metals in a sandy Luvisol subjected to intensive irrigation with raw wastewater. *Environ. Pollut.* 145, 31–40.
- Doelsch, E., Deroche, B., van de Kerchove, V., 2006. Impact of sewage sludge spreading on heavy metal speciation in tropical soils (Réunion, Indian Ocean). *Chemosphere* 65, 286–293.
- Dormaar, J.F., 1984. Monosaccharides in hydrolysates of water-stable aggregates after 67 years of cropping to spring wheat as determined by capillary gas chromatography. *Can. J. Soil Sci.* 64, 647–656.
- Ducaroir, J., Lamy, I., 1995. Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst* 120, 741–745.
- Dumat, C., Cheshire, M.V., Fraser, A., Shand, C., Staunton, S., 1997. The effect of removal of soil organic matter and iron on the adsorption of Cs. *Eur. J. Soil Sci.* 48, 675–684.
- Dumat, C., Chiquet, A., Goody, D., Aubry, E., Morin, G., Juillot, F., Benedetti, M., 2001. Metal ion geochemistry in smelter impacted soils and soil solutions. *Bull. Soc. Geol. Fr.* 172, 539–548.
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F., 2006. A study of the trace metal ion influence on the turn-over of soil organic matter in various cultivated contaminated soils. *Environ. Pollut.* 142, 521–529.
- Ferrand, E., Dumat, C., Leclerc-Cessac, E., Benedetti, M., 2006. Phytoavailability of zirconium in relation with its initial speciation and soil characteristics. *Plant Soil* 287, 313–325.
- Gesthem, J.P., Bermond, A., 1998. EDTA extractability of trace metals in polluted soil: a chemical–physical study. *Environ. Technol.* 19, 409–416.
- Guggenberger, G., Zech, W., Haumaier, L., Christensen, B.T., 1995. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soils. II. CPMAS and solution ^{13}C NMR analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 46, 147–158.
- Harter, R.D., Naidu, R., 1995. Role of the metal-organic complexation in metal sorption by soils. *Adv. Agron.* 55, 219–263.
- Hattori, H., 1996. Decomposition of organic matter with previous cadmium adsorption in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42, 745–752.
- Impellitteri, C.A., Lu, Y., Saxe, J.K., Allen, H.E., Peijnenburg, W.J.G.M., 2002. Correlation of the partitioning of dissolved organic matter fractions with the desorption of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from 18 Dutch soils. *Environ. Int.* 28, 401–410.
- Jolivet, C., Arrouays, D., Lévêque, J., Andreux, F., Chenu, C., 2003. Organic carbon dynamics in soil particle-size separates of sandy spodosols when forest is cleared for maize cropping. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 257–268.
- Lamy, I., van Oort, F., Dère, C., Baize, D., 2006. Use of major- and trace-element correlations to assess metal migration in sandy Luvisols irrigated with wastewater. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 731–740.
- Mhatre, G.N., Pankhurst, C.E., 1997. Bioindicators to detect contamination of soils with special reference to heavy metals. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.

- (Eds.), Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, pp. 349–369.
- Miller, W.P., Martens, W.C., Zelazny, L.W., 1986. Effect of sequence in extraction of trace metals from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 598–601.
- O'Leary, M., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20 (4), 553–567.
- Orlov, D.S., Min'Ko, O.I., Demin, V.V., Sal'Nikov, V.G., Izmaylova, N.B., 1988. Nature and mechanisms of formation of metal–humus complexes. *Sov. Soil Sci.* 21, 32–41.
- Parat, C., Denaix, L., Lévêque, J., Chaussod, R., Andreux, F., 2007. The organic carbon derived from sewage sludge as a key parameter determining the fate of trace metals. *Chemosphere* 69–4, 636–643.
- Sauvé, S., Martinez, C.E., McBride, M., Hendershot, W., 2000. Adsorption of free lead by pedogenic oxides, ferrihydrite and leaf compost. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 595–599.
- Schwartz, D., de Foresta, H., Mariotti, A., Balesdent, J., Massimba, J.P., Girardin, C., 1996. Present dynamics of the savanna–forest boundary in the Congolese Mayombe: a pedological, botanical and isotopic (^{13}C and ^{14}C) study. *Oecologia* 106, 516–524.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844–851.
- Vaca-Paulín, R., Esteller-Alberich, M.V., Lugo-de la Fuente, J., Zavaleta-Mancera, H.A., 2006. Effect of sewage sludge or compost on the sorption and distribution of copper and cadmium in soil. *Waste Manage.* 26, 71–81.
- Valsecchi, G., Gigliotti, C., Farini, A., 1995. Microbial biomass, activity and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 20, 253–259.
- Vieirae, J.M., Domingues, H., Mesquita, M.E., 1993. Sequential extraction of copper and zinc from sewage sludges. Use of organic solvents. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 109–112.
- Wong, J.W.C., Li, K.L., Zhou, L.X., Selvam, A., 2007. The sorption of Cd and Zn by different soils in the presence of dissolved organic matter from sludge. *Geoderma* 137, 310–317.
- Woomer, P.L., Martin, A., Albrecht, A., Resck, D.V.S., Scharpenseel, H.W., 1994. The importance and management of soil organic matter in the tropics. In: Woomer, P.L., Swift, M.J. (Eds.), *The Biological Management of Tropical Soil Fertility*. John Wiley, Chichester, pp. 47–80.
- Yin, Y., Impellitteri, C.A., You, S.J., Allen, H.E., 2002. The importance of organic matter distribution and exact soil: solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *Sci. Total Environ.* 287, 107–119.