

Université de Montréal

**Spéciation et biodisponibilité de métaux traces (Cd, Cu, Ni, Pb Zn) dans la
rhizosphère de sols contaminés**

par
Pascale Legrand

Département de géographie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M.Sc.)
en géographie

janvier 2004

© Pascale Legrand, 2004



G

59

U54

2004

V.011

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Spéciation et biodisponibilité de métaux traces (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) dans la
rhizosphère de sols contaminés

présenté par :
Pascale Legrand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Lael Parrott
François Courchesne
André Roy

SOMMAIRE

Les conditions biogéochimiques particulières de la rhizosphère, induites par la proximité des racines, influencent la spéciation et la biodisponibilité des métaux traces. Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de la spéciation des métaux traces à l'interface sol:plante, les objectifs de cette étude sont i) de comparer le fractionnement en phase solide de métaux traces (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) entre la matrice de sol, la rhizosphère externe et la rhizosphère interne dans les horizons minéraux de sols forestiers le long d'un gradient de contamination et ii) de déterminer l'activité du cuivre libre (Cu^{2+}) en solution et d'établir des relations avec le pH, le carbone organique dissous (DOC) et le cuivre total dissous.

Trois sites localisés à 2.5, 15 et 43 km d'une fonderie de Cu-Ni dans la région de Sudbury en Ontario ont été sélectionnés en fonction de leur niveau de contamination. Les racines fines de bouleaux blancs (*Betula papyrifera* Marsh.) de même que la matrice de sol ont été prélevées dans l'horizon B. La rhizosphère fut par la suite séparée des racines puis divisée en deux composantes; la rhizosphère externe et interne. Les résultats montrent que les fractions potentiellement disponibles de Cd, Cu et Ni, mesurées dans des extraits à l'eau et au BaCl_2 , reflètent le degré de contamination des sols de sorte que leurs concentrations présentent un gradient de contamination qui suit l'ordre: site 1 > site 2 > site 3. Dans la plupart des cas, les concentrations les plus élevées des divers métaux et extractions sont mesurées dans la rhizosphère externe ou interne alors que la matrice de sol renferme les concentrations les plus faibles. La fraction potentiellement disponible ($\text{H}_2\text{O} + \text{BaCl}_2$) des divers métaux ne représente qu'une faible partie de la fraction totale (digestion avec les acides $\text{HNO}_3\text{-HCl}$) dans la matrice (3 %) et la rhizosphère interne (7 %). L'activité de Cu^{2+} dans les extraits à l'eau diminue en fonction de la distance à la source de contamination, mais demeure semblable parmi les trois composantes de sol pour un site donné. Toutefois, le pourcentage de Cu dissous présent sous la forme ionique libre est systématiquement plus élevé dans la matrice de sol que dans la rhizosphère, dans les trois sites à l'étude. Les ratios molaires de Cu dissous / DOC sont semblables pour les trois composantes de sol d'un site donné, indiquant que le pouvoir de complexation de la matière organique est d'une intensité comparable dans la matrice et dans la rhizosphère. L'activité de Cu^{2+} est prédite de façon optimale en utilisant

DOC dans la matrice ($r^2 = 0.707$), le pH et le Cu dissous dans la rhizosphère externe ($r^2 = 0.731$) et le pH et le DOC dans la rhizosphère interne ($r^2 = 0.903$).

Mots clés : Biodisponibilité, rhizosphère, métaux traces, spéciation, activité ionique

ABSTRACT

Specific characteristics occur in the rhizosphere as a consequence of root activities, which in turn impact on the speciation and bioavailability of nutrients and trace metals. In order to better understand the processes involved in the fractionation of trace metals in the rhizosphere, the objectives of this study are i) to contrast the solid phase fractionation of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) among the inner rhizosphere, the outer rhizosphere and the bulk components of forest mineral soils along a soil contamination gradient and ii) to determine Cu^{2+} activity in the liquid phase and establish the relationships with pH, dissolved organic carbon (DOC) and total dissolved Cu.

Three sites located at distances of 2.5, 15 and 43 km from a Cu-Ni smelter in the Sudbury area of Ontario were selected on the basis of their level of soil contamination. The fine roots of white birch trees (*Betula papyrifera* Marsh.) were sampled in the B horizon along with the bulk soil. The rhizosphere material was detached from the roots and further separated into two components; the outer and the inner rhizosphere. Results indicate that the potentially available pools of Cd, Cu and Ni, measured in H_2O and BaCl_2 extracts, reflect the level of soil contamination and follow the gradient: site 1 > site 2 > site 3. In most cases, either the outer or the inner rhizosphere contains significantly higher metal concentrations than the bulk soil. The potentially available metal pool ($\text{H}_2\text{O} + \text{BaCl}_2$) represents a small fraction of the total-recoverable (HNO_3 -HCl digestion) metal content both in the bulk soil (3 %) and the inner rhizosphere (7 %), and is systematically higher in the rhizosphere. The Cu^{2+} activities in the water extract decrease with distance from the smelter, but are very similar between the three soil components for a given site. However, the water-soluble Cu fraction present in the free Cu^{2+} ion form is systematically higher in the bulk soil than in the outer or the inner rhizosphere at all sites. The water-soluble Cu / DOC molar ratios are similar for the three soil components of any given site, suggesting that the complexation power of organic matter is of a relatively similar magnitude in the three soil components. The pCu^{2+} activities are best predicted using DOC in the bulk soil ($r^2 = 0.707$), with pH and water-soluble Cu in the outer rhizosphere ($r^2 = 0.731$) and with pH and DOC in the inner rhizosphere ($r^2 = 0.903$).

Keywords: Bioavailability, rhizosphere, trace metals, speciation, ion activity

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XIII
INTRODUCTION	1
1. CONTEXTE DE LA RECHERCHE	3
1.1. HISTORIQUE ET DÉFINITION DE LA RHIZOSPHERE	3
1.2. ACTIVITÉ ET FONCTIONS DES RACINES	4
1.2.1. Matériel organique libéré par les racines – classification et manifestation	4
<i>1.2.1.1. Produits racinaires</i>	4
<i>1.2.1.2. Enrichissement de la rhizosphère en carbone et matière organique</i>	7
1.2.2. Associations symbiotiques – fonctions et effets	10
1.2.3. Variation des valeurs de pH dans la rhizosphère	14
1.2.4. Altération des minéraux dans la rhizosphère	18
1.3. SPÉCIATION ET BIODISPONIBILITÉ DES MÉTAUX TRACES	22
1.3.1. Concepts	22
<i>1.3.1.1. Spéciation</i>	22
<i>1.3.1.2. Biodisponibilité</i>	22
<i>1.3.1.3. Toxicité</i>	23
1.3.2. Spéciation et biodisponibilité dans la rhizosphère	26
<i>1.3.2.1. Fractions solubles et échangeables</i>	26
<i>1.3.2.2. Forme ionique libre</i>	29
1.3.3. Rôle de la matière organique dans la biodisponibilité des métaux traces	33
1.3.4. Rôle du pH	34
2. PROBLÉMATIQUE ET MÉTHODE	39

2.1. PROBLÉMATIQUE	39
2.2. OBJECTIFS ET STRATÉGIES D'ÉCHANTILLONNAGE	40
3. SPECIATION AND BIOAVAILABILITY OF TRACE METALS (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) IN THE RHIZOSPHERE OF CONTAMINATED SOILS	45
3.1. INTRODUCTION	45
3.2. MATERIALS AND METHODS	49
3.2.1. Study area	49
3.2.2. Experimental design, site description and sample collection	49
3.2.3. Laboratory analyses	51
3.2.3.1. <i>Chemical and physical soil properties</i>	51
3.2.3.2. <i>Solid phase trace metal fractionation</i>	52
3.2.3.3. <i>Liquid phase speciation of total dissolved Cu</i>	53
3.2.3.4. <i>Statistical analyses</i>	54
3.3. RESULTS AND DISCUSSION	54
3.3.1. Soil properties	54
3.3.2. Solid phase trace metal fractionation	56
3.3.2.1. <i>Soil contamination gradient at Sudbury</i>	56
3.3.2.2. <i>Soil component gradient</i>	62
<i>Absolute concentrations</i>	62
<i>Enrichment ratios</i>	63
3.3.2.3. <i>Metal fractionation</i>	66
3.3.3. Liquid phase Cu speciation	69
3.3.3.1. <i>Cu²⁺ activity</i>	69
3.3.3.2. <i>Dissolved Organic Carbon (DOC) concentrations</i>	72
3.3.3.3. <i>pH values</i>	76
3.3.3.4. <i>Multiple regression analyses</i>	77
3.4. CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS	80
4. CONCLUSION	83
5. RÉFÉRENCES	87
ACCORD DES COAUTEURS	XIV

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1.** Modèle conceptuel de la disponibilité des nutriments dans trois compartiments du sol (Gobran et Clegg, 1996). 9
- Figure 1.2.** Anatomie d'une ectomycorhize. Au centre du schéma se trouve la racine (cylindre central et parenchyme cortical), entourée de la gaine mycélienne et des hyphes fongiques (mycélium extraradriculaire) constituant l'ectomycorhize (Gobat *et al.*, 1998). 12
- Figure 1.3.** Comparaison des valeurs de pH dans H₂O de la rhizosphère et la matrice ("bulk") dans les horizons Bf, BC et C de trois sites forestiers au Québec (PGJ, LAT et CON) (Courchesne *et al.*, 2001). 15
- Figure 1.4.** Variations spatiales des valeurs de pH en fonction de l'assimilation d'anions ou de cations (Marschner et Römheld, 1996). 17
- Figure 1.5.** a) Alignement tangentiel des grains de minéraux; b) Fractures sur le grain de quartz en contact avec la racine; c) Dissolution partielle du minéral en contact avec la racine (April et Keller, 1990). 21
- Figure 1.6.** Solubilité des différents complexes inorganiques monomériques de Cu en fonction du pH dans le sol (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). 30
- Figure 1.7.** Équilibre entre la phase solide et la solution de sol (McBride, 1994). 32
- Figure 1.8.** Mobilité de divers métaux en fonction du pH dans le sol (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). 35
- Figure 1.9.** Relation entre les valeurs de pH de la rhizosphère et les concentrations de Zn et Mn observées dans les tiges de fèves (*Phaseolus vulgaris* L.) (Marschner et Römheld, 1996). 37
- Figure 1.10.** Répartition des formes inorganiques de Pb en fonction du pH (Wang et Benoit, 1996). 37
- Figure 2.1.** Localisation de la région d'étude et des sites d'échantillonnage. 43
- Figure 2.2.** a) Technique d'échantillonnage des arbres sélectionnés; b) Horizons organiques et minéraux d'un podzol; c) Prélèvement des racines et de la matrice de sol dans l'horizon B sous un bouleau blanc au site 1. 44
- Figure 3.1.** Concentrations of total-recoverable Cd and Pb (Total) in the bulk soil determined by HNO₃-HCl digestion at each sampling site. Mean values and standard deviations are calculated from the field and the laboratory

- replicates. The three sites did not show any significant differences in either total-recoverable Cd or Pb. 57
- Figure 3.2.** Concentrations of water-soluble Cd, Cu and Ni in the three soil components at each site. Values and standard deviations are means of the field and laboratory replicates..... 60
- Figure 3.3.** Trace metal fractionation for a) Cd, b) Cu, c) Ni, d) Pb and e) Zn in the bulk soil and the inner rhizosphere at each sampling site. The values for each fraction were determined by differencing, where the BaCl₂ exchangeable fraction (BaCl₂) = BaCl₂ – H₂O; the organo-complexed fraction (Na-pyro) = Na-pyro – BaCl₂ – H₂O; the residual fraction (HNO₃-HCl) = HNO₃-HCl – Na-pyro – BaCl₂ – H₂O. 67
- Figure 3.4.** a) Cu²⁺ activities and b) percentage of water-soluble Cu (Cu(H₂O)) present as Cu²⁺ in the three soil components along a soil contamination gradient. Values and standard deviations are means of the field and laboratory replicates..... 71
- Figure 3.5.** Values of a) dissolved organic carbon (DOC) in the water extract and b) pH (H₂O) in the three soil components along a soil contamination gradient. Values and standard deviations are means of the field and laboratory replicates..... 73
- Figure 3.6.** pCu²⁺ as a function of log₁₀ dissolved organic carbon (DOC) in H₂O extract and pH(H₂O). 78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Classification des matériaux organiques libérés par les racines.	5
Tableau 1.2. Comparaison de quelques propriétés chimiques de deux ectomycorhizosphères (ECS-A et ECS-B) et d'une matrice de sol (N-ECM). Les écarts-types des valeurs moyennes sont entre parenthèses (adapté de Arocena <i>et al.</i> , 1999).	9
Tableau 1.3. Effets toxiques de certains métaux traces sur des processus contrôlés par l'activité des microorganismes (adapté de Kabata-Pendias et Pendias, 1992).	24
Tableau 1.4. Biodisponibilité des métaux en fonction de leur spéciation (adapté de Kabata-Pendias et Pendias, 1992).	27
Tableau 1.5. Concentrations de cinq métaux extraits au BaCl ₂ dans la rhizosphère (R) et la matrice (M). * Les concentrations des métaux sont significativement différentes dans les deux composantes de sol avec un niveau de signification $p < 0.05$ (Test de Wilcoxon) (adapté de Courchesne <i>et al.</i> , 2001).	27
Tableau 1.6. Différences entre les concentrations extraites au BaCl ₂ dans la rhizosphère et la matrice de sol de différentes plantes ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Les différences significatives sont indiquées comme * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Test de Wilcoxon) (adapté de Schöttelndreier et Falkengren-Grerup, 1999).	28
Tableau 3.1. Chemical and physical properties of the bulk soil in the B horizon at the three sampling sites. Values in parentheses are standard deviations calculated from laboratory triplicates.	55
Tableau 3.2. Mineral abundance in the clay-sized particles of the B horizons at the three sites.	55
Tableau 3.3. Mean trace metal concentrations of field and laboratory replicates for the three soil components and at each site. Values in parentheses are standard deviations.	58
Tableau 3.4. Differences in mean metal concentrations between the three sampling sites for a given soil component and extraction.	59
Tableau 3.5. Average Inner rhizosphere / Bulk soil ratios ^a for trace metal concentrations.	64

- Tableau 3.6.** The pCu^{2+} value, Cu^{2+} and total H_2O soluble Cu concentrations, pH and DOC values measured in the three soil components at various distances from the smelter. Values in parentheses are standard deviations of laboratory triplicates. 70
- Tableau 3.7.** Regression coefficients (r^2) and level of significance (p) of pCu^{2+} values against pH in H_2O , \log_{10} dissolved organic carbon in H_2O (DOC), \log_{10} Cu dissolved in H_2O (Cu (H_2O)) and \log_{10} total-recoverable soil Cu (Total Cu)..... 78
- Tableau 3.8.** Best fit multiple linear regressions of pCu^{2+} values against pH in H_2O , \log_{10} dissolved organic carbon in H_2O (DOC) and \log_{10} Cu dissolved in H_2O (Cu (H_2O)). 79

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

AAS	Atomic absorption spectrophotometer
CEC	Capacité d'échange cationique
Cu-ISE	Copper ion selective electrode / Électrode sélective de cuivre
DC	Dithionite-citrate
DCB	Dithionite-citrate-bicarbonate
DOC	Dissolved organic carbon / Carbone organique dissous
EC	Electrical conductivity
ICP-AES	Inductively coupled plasma – atomic emission spectrometer
ICP-MS	Inductively coupled plasma – mass spectrometer
MO	Matière organique
OM	Organic matter
PES	Polyethersulfone
PSI	Pounds per square inch
r	Coefficient de corrélation
r ²	Coefficient de régression
SOM	Soil organic matter
TMG	Trace metal grade
TOC	Total organic carbon
UP	Ultra-pure
XRD	X-ray diffraction

REMERCIEMENTS

François, merci pour ta générosité et tes conseils chaque fois judicieux. J'apprécie grandement la liberté d'agir qui m'a permis d'évoluer à mon rythme. Ce fut un plaisir de travailler ainsi. Merci pour ta clarté d'esprit et ta rigueur professionnelle.

Marie-Claude, pour une foule de raisons, merci mille fois. Parmi les conseils méthodologiques en laboratoire et les séances d'entraînement se trouvent de nombreuses situations pour lesquelles je te suis reconnaissante. Par tes nombreux encouragements, tu m'as toujours donné le coup de pouce dont j'avais besoin pour continuer à avancer.

Tout au long de ce projet, j'ai été entourée de personnes qui m'ont facilité la tâche à de nombreux égards. Merci donc à Bruno, Véronique, Julie, Benoît, Isabelle et Corinne pour votre aide précieuse apportée sur le terrain et en laboratoire.

Je tiens également à remercier mes parents, Marie et Éric, qui, par leurs attentions propres, m'encouragent depuis longtemps. Merci pour toutes les opportunités que vous m'avez offertes.

Finalement, Olivier, tu ne lis ici qu'une pointe de ma gratitude. Merci d'avoir toujours su comment m'aider. La certitude et la patience que tu démontres ont toujours eu raison des périodes plus cahoteuses, tu m'impressionneras toujours. Merci de m'avoir épaulée en travaillant à côté de moi, ce fut plus facile et souvent plus drôle ainsi!

INTRODUCTION

La rhizosphère est un microenvironnement où de nombreux processus liés à l'activité et à l'exsudation racinaires sont actifs. Il a été démontré qu'un nombre important de processus biogéochimiques surviennent dans cette portion millimétrique de sol en contact avec les racines et ce, de façon plus intense que dans la matrice de sol environnante. Parmi ces processus, on remarque entre autres un enrichissement en carbone et matière organique, la concentration et la diversification des microorganismes, de même que l'acidification du sol et l'altération accrue des minéraux présents dans la rhizosphère. Les conditions biogéochimiques particulières de la rhizosphère influencent également la spéciation des métaux traces, qui peut différer des formes chimiques observées dans la matrice du sol. Toutefois, on ignore si la magnitude de l'effet rhizosphère varie selon le milieu d'étude et, de plus, les mécanismes responsables de la spéciation des métaux traces à l'interface sol:plante ne sont pas totalement élucidés. L'étude de la rhizosphère suscite donc un grand intérêt puisque les conditions particulières de ce microenvironnement, situé à proximité des sites d'absorption des nutriments par les racines, modifient l'intensité des processus observés dans la matrice, permettant du même coup l'accroissement des connaissances sur les mécanismes biogéochimiques contrôlant le cycle des métaux traces dans les écosystèmes forestiers.

Le projet de recherche porte sur des sites contaminés de la région de Sudbury, dans la province de l'Ontario (Canada). Trois sites ont été retenus, ceux-ci étant localisés sur un transect linéaire se déployant de l'ouest vers l'est à partir d'une même source de métaux, la fonderie de Falconbridge. À chacun de ces sites, les racines d'un nombre variable de bouleaux blancs (*Betula papyrifera* Marsh.) (n = 3 à 6) ainsi que la matrice de sol environnante ont été prélevées et ramenées en laboratoire, où la rhizosphère a par la suite été séparée des racines. La rhizosphère récupérée et la matrice de sol ont été l'objet d'analyses chimiques afin de répondre aux objectifs du projet qui sont i) d'effectuer une comparaison du fractionnement en phase solide de cinq métaux traces (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) entre la matrice de sol, la rhizosphère externe et la rhizosphère interne dans les horizons minéraux de sols forestiers le long d'un gradient de contamination et ii) de déterminer l'activité du cuivre libre (Cu^{2+}) en solution et d'établir des relations avec le carbone organique dissous (DOC), le pH et

le cuivre total dissous. L'accent est mis sur les formes chimiques facilement extractibles de même que sur l'activité ionique en solution puisque ces fractions sont potentiellement les plus biodisponibles dans les sols. De plus, l'échantillonnage le long d'un gradient de contamination permet l'analyse d'un large éventail de concentrations de métaux dans les sols et assure également l'évaluation de l'effet de la rhizosphère en fonction du niveau de contamination des sols. Les résultats permettent ainsi de jeter un nouvel éclairage sur les mécanismes responsables des variations des formes chimiques observées entre la rhizosphère et la matrice.

Ce mémoire est présenté de façon non-conventionnelle et comprend quatre sections. Dans la première section, nous présentons une mise en contexte du projet qui permet de cerner les caractéristiques propres à la rhizosphère, et d'évaluer l'influence de chacune sur la spéciation et la disponibilité des métaux traces. Ainsi, nous présentons tout d'abord un bref historique ainsi que quelques définitions courantes utilisées pour caractériser la rhizosphère. Ensuite, les activités et fonctions des racines sont abordées sous les thèmes des produits racinaires et de l'enrichissement en carbone et matière organique dans la rhizosphère, des associations symbiotiques racinaires, des valeurs de pH ainsi que de l'altération des minéraux dans ce micro-environnement. La spéciation et la biodisponibilité des métaux traces de même que la notion de toxicité sont abordées à la fin de cette première section. La deuxième section présente la problématique de recherche, les objectifs spécifiques et la stratégie d'échantillonnage développée. La troisième section se présente sous la forme d'un article intitulé "Speciation and bioavailability of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in the rhizosphere of contaminated soils". Cet article a été écrit en collaboration avec M.-C. Turmel, S. Sauvé et F. Courchesne. L'ensemble des analyses en laboratoire ont été réalisées avec l'assistance technique et méthodologique de M.-C. Turmel sous la supervision de mon directeur de recherche F. Courchesne. De plus, j'ai également bénéficié des conseils de S. Sauvé pour une partie des analyses. À titre de premier auteur, j'ai participé activement à chacune des étapes de réalisation de ce projet de recherche. Ainsi, j'ai contribué à la formulation des objectifs de recherche, effectué l'échantillonnage sur le terrain et également procédé à toutes les analyses en laboratoire de même qu'à l'interprétation des résultats et à la rédaction. Finalement, la dernière section de ce mémoire résume les principaux résultats présentés dans l'article de même que les conclusions générales de l'étude.

1. CONTEXTE DE LA RECHERCHE

1.1. HISTORIQUE ET DÉFINITION DE LA RHIZOSPHERE

La première utilisation du terme *rhizosphère* est attribuée à Hiltner qui, en 1904, désigna ainsi une zone pédologique spécifique en contact avec les racines où les microorganismes étaient présents en grande quantité. Cette première définition de la rhizosphère conférait donc un caractère distinct à un microenvironnement en fonction de la diversité et de la quantité de microorganismes retrouvés en périphérie des racines. De nombreuses définitions émergèrent par la suite, basées soit sur des séparations opérationnelles ou sur des caractéristiques particulières observées dans cet environnement. Ainsi, Nye (1986) définit la rhizosphère comme étant les premiers 1 à 4 mm de sol en contact avec les racines, alors qu'Hinsinger (1998) résume la pensée de nombreux chercheurs en définissant la rhizosphère comme étant le volume de sol directement influencé par l'activité des racines. L'effet de la rhizosphère est souvent défini en fonction du domaine de recherche. Par exemple, cet effet a été circonscrit comme étant le rayon jusqu'auquel l'abondance microbienne est la moitié de l'abondance calculée à la surface des racines (Newman et Watson, 1977). Cette abondance microbienne n'est toutefois qu'une des expressions de l'effet de la rhizosphère. Cet effet peut, par exemple, concerner d'autres caractéristiques telles le pH, le contenu en matière et carbone organique de même que le taux d'altération des minéraux.

D'autre part, il est important de mentionner que la rhizosphère n'est pas une entité statique, ce microenvironnement évolue plutôt constamment dans le temps et l'espace (Bowen et Rovira, 1991; Gobran et Clegg, 1996; Gobran *et al.*, 1998). Les limites de la rhizosphère sont donc difficiles à établir puisque l'extension de cet environnement varie selon les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol (Lombi *et al.*, 2001). L'extension spatiale de la rhizosphère varie aussi selon l'espèce végétale, la présence ou l'absence de radicelles et d'associations symbiotiques (Hinsinger, 1998).

Malgré son faible volume dans l'espace (la rhizosphère ne représente que 1 à 3 % du volume total du sol), l'effet de la rhizosphère ne doit pas être négligé puisque cet environnement situé en périphérie des racines est le lieu de nombreuses

interactions entre le sol, les microorganismes et les racines, interactions essentielles dans le processus de nutrition des plantes.

1.2. ACTIVITÉ ET FONCTIONS DES RACINES

La rhizosphère possède des caractéristiques uniques conférées par les effets conjugués de l'activité biologique des plantes et sa proximité aux racines. Ces caractéristiques s'observent à la fois au niveau physique, chimique et biologique. Les racines sont la voie privilégiée par les plantes afin de leur assurer une nutrition adéquate. Celles-ci, par l'entremise de divers mécanismes, sont ainsi responsables de l'acquisition de l'eau et de macro- et micronutriments essentiels à la croissance des plantes à partir du substrat minéral (Hinsinger, 1998). L'activité des racines se traduit de plusieurs façons, notamment à travers les divers mécanismes d'acquisition et d'assimilation des nutriments puisés dans le sol, la libération de nombreux types d'exsudats racinaires, l'action mécanique des racines et également par la présence d'un nombre accru et diversifié de microorganismes leur étant associés à l'interface sol:racines. Chacun de ces processus modifie d'une manière particulière l'environnement dans lequel il évolue.

1.2.1. Matériel organique libéré par les racines – classification et manifestation

1.2.1.1. Produits racinaires

Les racines libèrent une grande quantité de matériel organique, désigné de façon générale sous le terme d'exsudats racinaires. Ceux-ci sont divisés en plusieurs catégories qui varient selon les auteurs. Le tableau 1.1 répertorie quelques-unes des classifications utilisées pour caractériser les substances organiques racinaires. La majorité des catégories sont établies selon le mode d'excrétion des racines. Ainsi, le terme *exsudat racinaire* ne convient pas tout à fait pour désigner l'ensemble des substances organiques puisqu'il ne fait référence qu'aux produits diffusés ou lessivés des racines. Malgré cette observation, ce terme sera tout de même utilisé dans le texte pour désigner les produits racinaires en général. Comme on peut le constater dans le tableau, de nombreuses sources d'énergie complexes telles les exsudats, les sécrétions, les mucilages et les lysats contribuent sur une base continue aux processus biogéochimiques qui ont lieu au pourtour du système racinaire. Parmi ces

Tableau 1.1. Classification des matériaux organiques libérés par les racines.

Rovira <i>et al.</i> (1979)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exsudats racinaires (complexes de faible poids moléculaire) 2. Sécrétions (complexes de faible ou fort poids moléculaire) 3. Lysats (autolyse des parois cellulaires épidermales) 4. Mucilage (embout de la racine, polysaccharides, cellules épidermales) 5. Mucigel (matériaux gélatineux à la surface des racines, comprend le mucilage, les cellules de bactéries et leurs produits métaboliques, les colloïdes minéraux et la MO du sol)
Dormaar (1988)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Composés simples et solubles (monosaccharides, acides aminés) 2. Composés polymérisés (mucilages) 3. Composés stables (résidus de membranes cellulaires)
Uren et Reisenauer (1988)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Substances diffusées des cellules épidermales (sucres, acides inorganiques, acides aminés) 2. Substances excrétées (CO₂, bicarbonate, éthylène, protons, électrons) 3. Substances sécrétées (mucilage, protons, électrons, enzymes, sidérophores, composés allopathiques) 4. Débris racinaires (cellules et tissus morts, contenu cellulaire)
El-Shatnawi et Makhadmeh (2001)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exsudats solubles dans l'eau (sucres, acides aminés, acides organiques, hormones et vitamines lessivées des racines) 2. Substances sécrétées (hydrates de carbone polymériques, enzymes) 3. Lysats 4. Gaz (Éthylène, CO₂) 5. Mucilage 6. Mucigel
Lombi <i>et al.</i> (2001)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exsudats solubles dans l'eau (sucres, acides organiques, acides aminés) 2. Exsudats insolubles dans l'eau (parois cellulaires, tissus morts, mucilage)

substances, les acides organiques sont la fraction la plus importante des exsudats racinaires, non seulement du point de vue quantitatif mais également par leur impact sur la mobilisation des nutriments. Ces acides organiques sont une source essentielle en carbone pour la population microbienne et jouent également un rôle important dans l'altération des minéraux, la complexation et l'acquisition des micro- et macronutriments (Jones et Darrah, 1994; Jungk, 1996; Gobran *et al.*, 1998; Marschner, 1998). Les organismes présents dans la rhizosphère (mycorhizes, fungi et diverses bactéries) libèrent également des substances organiques s'apparentant aux exsudats racinaires. Parmi les produits racinaires, mentionnons les sidérophores, qui sont des acides organiques de faible poids moléculaire des plus efficaces surtout dans la mobilisation et l'assimilation de Fe, mais également de Zn (Perry *et al.*, 1987; Vaughan *et al.*, 1993). Les sidérophores, libérés par certaines parties des racines actives, constituent une source potentielle de carbone pour les bactéries. Ces acides contribuent ainsi à une augmentation substantielle du nombre de microorganismes dans la rhizosphère (Manthey *et al.*, 1994). Les microorganismes peuvent libérer à leur tour des composés organiques facilitant l'absorption de divers métaux tels Mn et possiblement Cd (Salt *et al.*, 1995). Toutefois, on note qu'il est difficile de distinguer les effets de l'activité racinaire de ceux des microorganismes, ainsi que des produits leur étant associés (Dormaar, 1988).

Les acides organiques revêtent également une importance particulière compte tenu de leur capacité à former des complexes et des chélates non seulement avec les nutriments mais surtout avec les métaux traces (Mench et Martin, 1991; Petersen et Böttger, 1991). Un cation associé à un liant, organique ou inorganique, ayant des paires d'électrons libres est défini comme un complexe. Toutefois, lorsque plusieurs atomes métalliques à l'intérieur d'un liant organique déterminent la nature de celui-ci, ce complexe est "multidenté" et est alors défini comme un chélate (Morgan et Stumm, 1991; Vaughan *et al.*, 1993).

Les acides organiques parviennent donc à diminuer la toxicité des métaux en formant des chélates qui isolent le métal de son environnement (Sposito, 1989; Nardi *et al.*, 2002). De plus, par le biais de divers mécanismes directs ou indirects tels l'acidification, la dissolution et les processus d'oxydation et de réduction, ces acides ont la possibilité de solubiliser et donc de mobiliser les nutriments et les métaux traces (Uren et Reisenauer, 1988; Manthey *et al.*, 1994; Marschner, 1995; Hinsinger, 1998; Gobran *et al.*, 1999; Lasat, 2002). L'exsudation de composés organiques par les

racines influence également la solubilité et l'acquisition d'ions (nutriments et métaux traces) par leurs effets sur l'activité microbienne, les propriétés physiques de la rhizosphère et la dynamique de croissance des racines (Cieśliński *et al.*, 1998; El-Shatnawi et Makhadmeh, 2001; Nardi *et al.*, 2002). Le système sol:plante a ainsi la capacité de réagir à des variations dans les conditions d'approvisionnement en nutriments. Ainsi, suite à un appauvrissement en nutriments dans la rhizosphère, on peut observer une libération importante d'exsudats racinaires destinés à dissoudre une plus grande quantité de nutriments, auparavant non-disponibles pour les plantes (Gobran *et al.*, 1999). Par exemple, la libération de carbone organique dissous (DOC) et d'acide oxalique entraîne l'acidification du milieu environnant, et la mobilisation subséquente de P et S ainsi que des métaux traces (Marshner et Dell, 1994; Gobran *et al.*, 1999).

Une partie des acides organiques libérés par les racines est aussi lessivée, mais la plupart des acides organiques libres seront soit assimilés et décomposés par les microorganismes, soit complexés aux métaux, ou encore adsorbés aux sites d'échanges anioniques du sol (Jones et Brassington, 1998). Les recherches avancent souvent que les acides organiques empêchent les métaux toxiques de pénétrer à l'intérieur des racines par le biais des mécanismes de complexation et de chélation (Manthey *et al.*, 1994; Ross et Kaye, 1994). Toutefois, selon Jones et Brassington (1998), il n'existerait pas de preuves directes confirmant ces processus, étant donné les difficultés techniques rencontrées dans l'analyse de la rhizosphère et le manque de connaissances au sujet des acides organiques. Les résultats de leur étude montrent plutôt que la majorité des acides organiques (citrique, oxalique, malique et acétique) libérés dans le sol est rapidement adsorbée au complexe d'échange du sol. Ces acides ne seraient donc pas aussi actifs que prévu dans la mobilisation et la complexation des nutriments et des métaux traces.

1.2.1.2. Enrichissement de la rhizosphère en carbone et matière organique

On observe dans la rhizosphère un enrichissement en carbone et matière organique (MO) comparativement à la matrice de sol (Bowen et Rovira, 1991; Marschner et Römheld, 1996; Hinsinger, 1998). Cet enrichissement est induit par les exsudats racinaires et les microorganismes présents en grand nombre à proximité des racines de même qu'à la présence de ces racines, de leurs produits de décomposition et des fungi leur étant associés (Vaughan *et al.*, 1993; Gobran *et al.*, 1998; Arocena

et al., 1999; Gobran *et al.*, 1999; Courchesne *et al.*, 2001). En effet, l'apport important en C près des racines augmente la biomasse et le nombre de microorganismes (fungi et bactéries) qui, à leur tour, deviennent une source importante de matière organique dans la rhizosphère (Hinsinger, 1998). Une bonne partie des exsudats sera assimilée et désintégrée par les microorganismes, mais leur libération continue dans la rhizosphère contribue tout de même à maintenir un niveau supérieur en matière organique dans ce compartiment du sol (Lombi *et al.*, 2001).

Jusqu'à 30 % du C assimilé par les plantes serait ainsi libéré par les racines dans la rhizosphère (Whipps et Lynch, 1986). La majorité de ce C se perdrait passivement sous la forme d'exsudats solubles dans l'eau (Vaughan *et al.*, 1993). Après la chute des feuilles, l'activité des racines serait donc le mécanisme libérant le plus de C organique dans le sol (Gobran *et al.*, 1998). Par ailleurs, les fungi et autres microorganismes présents dans la rhizosphère constituent des réserves significatives de C. À leur mort, leur biomasse contribue donc de façon substantielle aux contenus élevés en C total (et en azote) dans le sol de la rhizosphère (Arocena *et al.*, 1999).

Tel qu'illustré à la figure 1.1 par le modèle conceptuel de Gobran et Clegg (1996), la matière organique dans la rhizosphère a pour effet d'augmenter le nombre de sites d'échanges disponibles près des racines. La matière organique sert donc de réservoir pour les nutriments, et permet également de diminuer la toxicité des métaux traces par sa capacité à former des complexes avec ces métaux. La matière organique peut également augmenter la capacité de rétention en eau du sol, et ainsi améliorer la qualité du substrat pour les plantes.

La matière organique du sol est hétérogène. Elle comprend des composés simples de faible poids moléculaire tels les acides aminés, phénoliques et aliphatiques, et contient également des composés plus complexes tels les substances humiques (Vaughan *et al.*, 1993). Toutes ces substances organiques ont la capacité de complexer les cations en solution. Par contre, lorsqu'en présence de composés organiques, la sorption d'ions métalliques à la surface des minéraux du sol peut soit être augmentée, diminuée ou simplement ne pas être affectée (Hayes et Traina, 1998). La direction de l'effet dépend d'interactions complexes entre le type de minéraux présents, les ions métalliques et la nature des composés organiques.

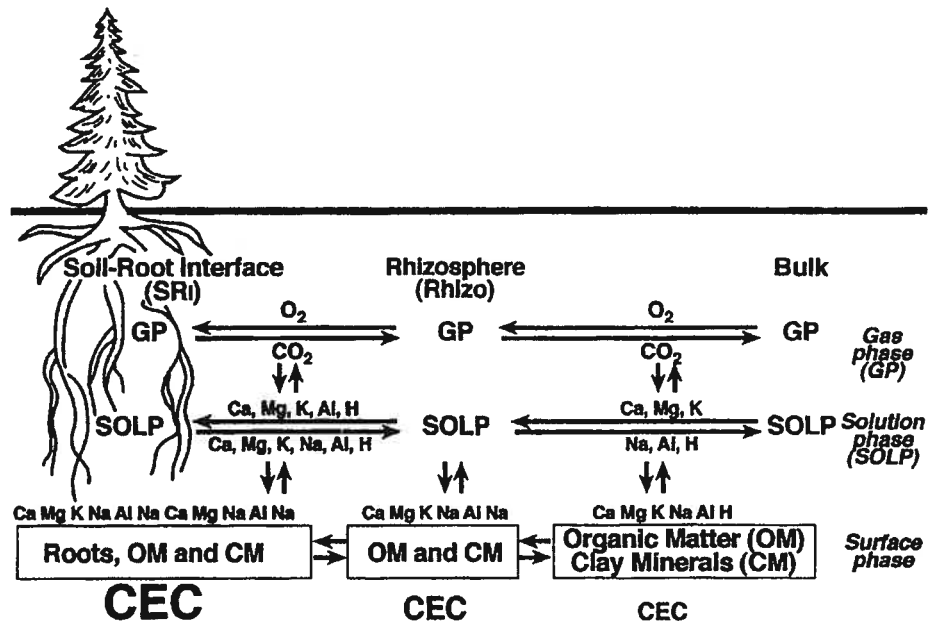


Figure 1.1. Modèle conceptuel de la disponibilité des nutriments dans trois compartiments du sol (Gobran et Clegg, 1996).

Tableau 1.2. Comparaison de quelques propriétés chimiques de deux ectomycorhizosphères (ECS-A et ECS-B) et d'une matrice de sol (N-ECM). Les écarts-types des valeurs moyennes sont entre parenthèses (adapté de Arocena *et al.*, 1999).

Propriétés du sol	ECS-A	ECS-B	N-ECM
pH	4.6 (0.25)	4.9 (0.26)	5.2 (0.60)
Carbone total ($g\ kg^{-1}$ sol)	39 (5.1)	22 (2.9)	13 (3.0)
Azote total ($g\ kg^{-1}$ sol)	1.6 (0.2)	1.0 (0.1)	0.7 (0.03)
CEC ($cmol\ kg^{-1}$ sol)	10 (0.40)	6.8 (0.54)	4.9 (0.35)

Quelques études en milieu forestier ont montré l'enrichissement préférentiel en matière organique dans la rhizosphère comparativement à la matrice. Par exemple, Arocena *et al.* (1999) ont analysé les propriétés chimiques de sols de l'ectomycorhizosphère (sol en contact avec les ectomycorhizes) en comparaison avec des sols en dehors de l'ectomycorhizosphère sous couvert coniférien (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.). Leurs résultats indiquent que la CEC était plus élevée dans l'ectomycorhizosphère (tableau 1.2). Ce contenu supérieur est le résultat d'une accumulation préférentielle de matière organique près des ectomycorhizes, cette matière offrant de nombreux sites d'échanges cationiques. Les concentrations en C et en N étaient également plus élevées dans l'ectomycorhizosphère.

Gobran et Clegg (1996) ont quant à eux échantillonné des sols sous couvert coniférien (*Picea abies* (L.) Karst.). Ils ont observé une CEC plus élevée dans la rhizosphère que dans la matrice, de même qu'un pourcentage de matière organique plus important (23.0 % dans la rhizosphère contre 9.8 % dans la matrice). Ils ont attribué le fort contenu en matière organique à la biomasse microbienne plus importante dans la rhizosphère. Finalement, Courchesne *et al.* (2001) ont comparé le contenu en carbone organique dans la rhizosphère et la matrice de trois sites forestiers au Québec. Ils montrent que les concentrations en carbone organique, à la fois sous la forme solide et dissoute, sont systématiquement plus élevées près des racines que dans la matrice de sol. Ils attribuent cette accumulation en périphérie des racines à l'exsudation de même qu'à la décomposition des racines, ainsi qu'à l'intensité de l'activité microbienne dans cet environnement.

1.2.2. Associations symbiotiques – fonctions et effets

Les associations symbiotiques présentes à la surface des racines jouent un rôle prépondérant dans l'acquisition et l'assimilation des nutriments. Ces associations, appelées mycorhizes, sont situées à l'embout des racines et sont en quelque sorte le prolongement de celles-ci. Elles améliorent la superficie couverte par les racines et permettent ainsi aux plantes d'acquérir des nutriments dans le sol en dépensant moins d'énergie (George *et al.*, 1994; Manthey *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1994; Jungk, 1996; Marschner, 1998; Leyval et Joner, 2001). L'impact des mycorhizes sur les caractéristiques de la rhizosphère est fondamental puisque ces associations symbiotiques finissent par modifier les caractéristiques biogéochimiques du milieu

dans lequel elles évoluent et ce, par l'entremise de leurs exsudats de même que par leur implication dans l'acquisition des nutriments.

La majorité des espèces végétales ont des mycorhizes. Selon Leyval et Joner (2001), il existe trois catégories de mycorhizes. Celles-ci sont départagées en fonction du pH du sol qu'elles occupent et du contenu en matière organique. La caractéristique commune à tous les types de mycorhizes est la présence d'hyphes fongiques extraradicaux. De façon générale, on retrouve les *mycorhizes éricoides* dans les écosystèmes alpins de haute latitude ayant des sols acides avec un contenu élevé en MO, les *ectomycorhizes* dans les forêts boréales et tempérées, dans les sols ayant un contenu moindre en MO et un pH moins acide, alors que les *mycorhizes arbusculaires* sont associées aux plantes herbacées des sols agricoles et des écosystèmes tropicaux ayant un pH neutre et un faible contenu en MO (Marschner, 1998; Leyval et Joner, 2001). La figure 1.2 schématise l'anatomie d'une ectomycorhize entourant une racine.

Les mycorhizes ont plusieurs fonctions dont l'acquisition des nutriments, l'absorption d'eau, l'accroissement de la tolérance des plantes aux conditions sèches, et une résistance accrue aux maladies (Sharma *et al.*, 1994). De plus, les mycorhizes offrent de nombreux sites d'échange sur lesquels les nutriments et les métaux traces peuvent être adsorbés. Ces sites agissent donc comme réservoirs et permettent de minimiser les écarts quant à la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère (Grayston *et al.*, 1996). Les sites d'échange des mycorhizes assurent également la fonction de protection des plantes contre les métaux traces pouvant être toxiques (Wilkins, 1991; Marschner et Dell, 1994). La fonction principale des mycorhizes demeure d'acheminer les nutriments aux racines à l'aide de leurs hyphes fongiques. Toutefois, des effets indirects liés aux mycorhizes sont également observés, notamment au niveau des conditions chimiques dans la rhizosphère tels la libération d'exsudats par les hyphes et l'acidification du milieu environnant. En effet, les hyphes fongiques des mycorhizes peuvent augmenter la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère en solubilisant les minéraux contenant ces éléments. Cette solubilisation est attribuée à l'acidification de leur environnement par la libération d'acides organiques (Leyval et Joner, 2001). Dans une situation d'appauvrissement en micronutriments, les mycorhizes peuvent, par effet direct, extraire l'élément requis du sol à l'aide d'hyphes fongiques et acheminer l'élément jusqu'à la plante, ou par effet indirect, jouer sur l'activité racinaire et microbienne (George *et al.*, 1994). En

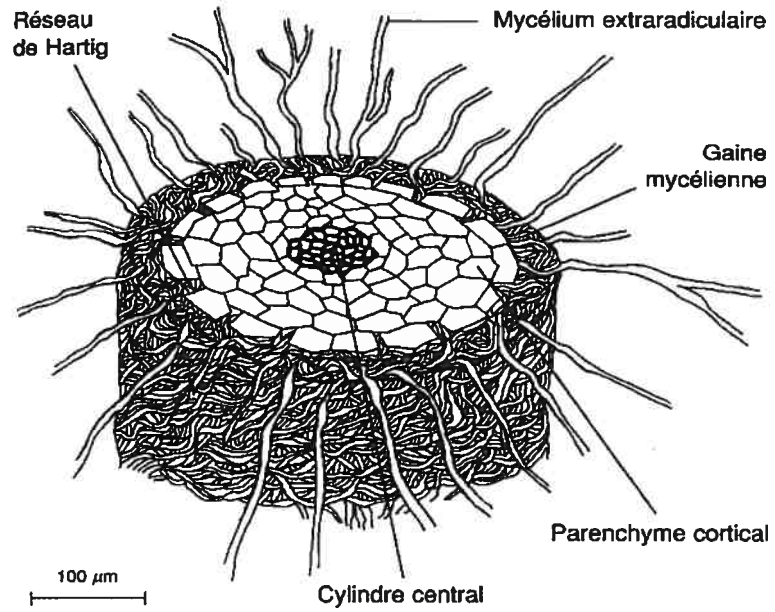


Figure 1.2. Anatomie d'une ectomycorhize. Au centre du schéma se trouve la racine (cylindre central et parenchyme cortical), entourée de la gaine mycélienne et des hyphes fongiques (mycélium extraradicaire) constituant l'ectomycorhize (Gobat *et al.*, 1998).

présence excessive de micronutriments, les mycorhizes peuvent également protéger la plante de ces surplus en emmagasinant les éléments indésirables sur les sites d'échange des tissus fongiques.

Le rôle joué par les mycorhizes dans l'assimilation des nutriments semble varier selon le type d'association symbiotique. Par exemple, la mobilisation de nutriments par l'exsudation de composés organiques semble être fréquente pour les ectomycorhizes, mais elle est toutefois peu courante pour les mycorhizes arbusculaires (George *et al.*, 1994). Les exsudats libérés par les hyphes d'ectomycorhizes incluent les acides organiques, phénoliques et les sidérophores. Par contre, ces exsudats n'ont pas été observés pour les hyphes des mycorhizes arbusculaires. La mobilisation de nutriments par les hyphes d'ectomycorhizes n'implique pas nécessairement une assimilation subséquente plus importante par la plante (George *et al.*, 1994; Marschner, 1998). En effet, les nutriments peuvent simplement s'accumuler dans les tissus des hyphes fongiques et ne pas être transférés à la plante. Les mycorhizes semblent donc jouer un rôle important dans le transfert des nutriments vers la plante en régulant les quantités assimilées et ce, généralement au bénéfice de la plante. Il existe toutefois des cas où les mycorhizes ne semblent avoir aucun effet ou même avoir un effet négatif dans le transfert des nutriments, au détriment de la plante (Marschner, 1998).

Établir des énoncés généraux au sujet des mycorhizes et de leurs effets sur la disponibilité des nutriments est donc difficile, car ces effets dépendent de l'élément concerné, des conditions du sol, du type de plante et du type d'association symbiotique à l'étude (George *et al.*, 1994; Lasat, 2002). Il existe aussi des résultats contradictoires quant aux effets des mycorhizes sur l'assimilation des métaux par les plantes (Marschner, 1995). Chaque cas est spécifique quoique la majorité des résultats disponibles montrent que les mycorhizes empêcheraient l'assimilation excessive de métaux (Adamo *et al.*, 1998; Joner *et al.*, 2000; Leyval et Joner, 2001; Lasat, 2002). Les métaux seraient en effet adsorbés aux parois cellulaires à l'intérieur des mycorhizes et des racines, mais ne seraient pas transférés en grande quantité vers le système aérien des plantes.

Les recherches portant sur l'assimilation des nutriments dans la rhizosphère doivent ainsi tenir compte des effets des mycorhizes étant donné l'ubiquité de ces associations symbiotiques en milieu naturel et leurs effets sur l'assimilation des métaux par les plantes.

1.2.3. Variation des valeurs de pH dans la rhizosphère

La rhizosphère et la matrice de sol affichent fréquemment des différences significatives de valeurs de pH pouvant aller jusqu'à une ou deux unités (Bowen et Rovira, 1991; Gobran *et al.*, 1999; Lombi *et al.*, 2001). Plusieurs mécanismes ont été avancés pour tenter d'expliquer cette distinction majeure. Encore une fois, les différences reliées aux valeurs de pH s'expliquent par la proximité de la rhizosphère aux racines, plus particulièrement aux sites d'échanges et d'absorption des nutriments par les racines. Quelques études ont été menées, la plupart sur des plantes agricoles, afin de faire ressortir les différences entre la rhizosphère et la matrice au niveau des valeurs de pH (Kirlaw et Bouldin, 1987). D'autres études ont aussi été réalisées en milieu non perturbé (Gobran et Clegg, 1996; Braun *et al.*, 2001; Courchesne *et al.*, 2001; Séguin *et al.*, 2003). En effet, plusieurs études en milieu forestier ont observé l'acidification de la rhizosphère comparativement aux valeurs de pH de la matrice. Dans tous les cas, les valeurs de pH étaient plus basses dans la rhizosphère (figure 1.3), et ce peu importe le type de couvert forestier à l'étude. En outre, deux études menées sur le pH dans l'ectomycorhizosphère sont arrivées à la même conclusion, soit l'observation d'une acidification des sols en périphérie des ectomycorhizes (Arocena *et al.*, 1999; Arocena et Glowa, 2000).

Plusieurs processus, tous reliés directement ou indirectement à l'activité des plantes et à leur système racinaire, contribuent à l'acidification de la rhizosphère. Parmi ces processus, la production de CO₂ par respiration racinaire a été avancée à quelques reprises (Nye, 1986; Gobran *et al.*, 1998). Le CO₂ est libéré à la surface des racines au cours du processus de respiration. On a suggéré que ce gaz pouvait contribuer à l'acidification dans son environnement immédiat de production. Toutefois, le CO₂ ne demeurerait pas dans la rhizosphère, il serait plutôt rapidement diffusé hors de cet environnement vers l'ensemble du sol minéral. Son effet acidifiant serait dilué dans la matrice de sol et ne pourrait expliquer complètement l'acidification observée dans la rhizosphère (Nye, 1986). Un autre processus serait l'exsudation d'acides organiques par les racines ainsi que la production microbienne d'acides à partir du carbone libéré par les racines (Nye, 1986; Manthey *et al.*, 1994; Jungk, 1996; Gobran *et al.*, 1998; Hinsinger, 1998; Courchesne *et al.*, 2001). Ce processus a par contre un effet minime, voire quasi-négligeable sur la

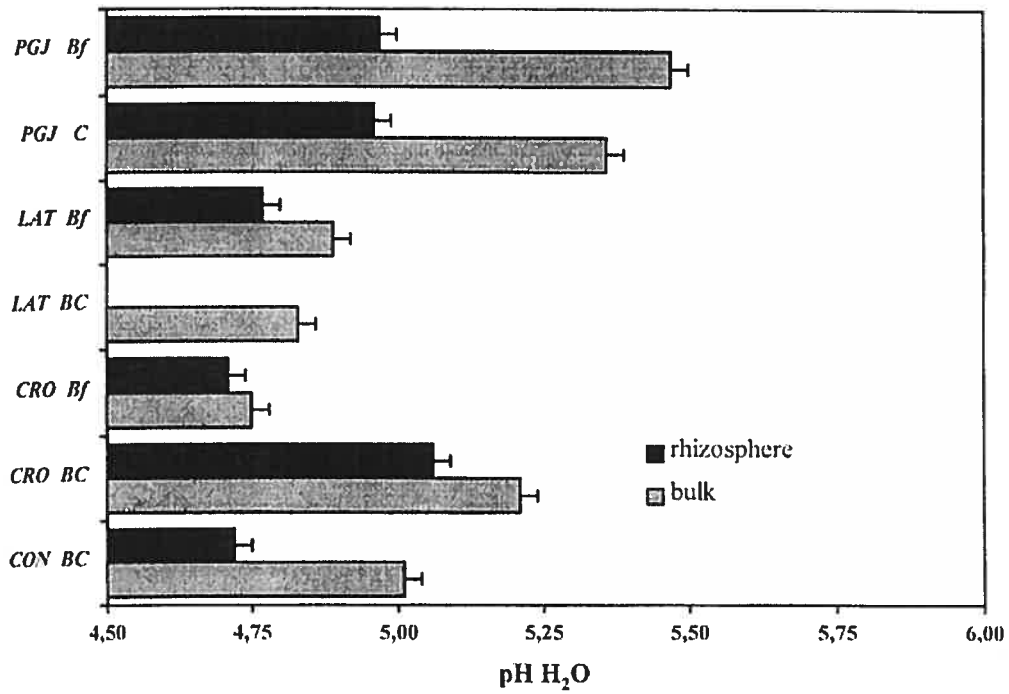


Figure 1.3. Comparaison des valeurs de pH dans H₂O de la rhizosphère et la matrice (“bulk”) dans les horizons Bf, BC et C de trois sites forestiers au Québec (*PGJ*, *LAT* et *CON*) (Courchesne *et al.*, 2001).

modification des valeurs de pH dans la rhizosphère. En effet, les acides organiques de faible poids moléculaire n'ont pas été retrouvés en grande quantité dans la rhizosphère (Nye, 1986; Jones et Brassington, 1998) soit parce que les quantités libérées ne sont pas suffisantes ou plutôt parce que ces composés sont rapidement métabolisés par les microorganismes ou adsorbés à la surface des minéraux du sol. Petersen et Böttger (1991) ajoutent que la libération d'acides organiques ne contribuerait qu'à seulement 0.2 à 0.3 % du processus d'acidification observé dans la rhizosphère.

Le processus qui contribue le plus significativement à l'acidification de la rhizosphère est celui de l'assimilation différentielle de cations ou d'anions par les racines. En effet, il a été démontré qu'il existe un déséquilibre des charges électriques dans la solution de sol, suite à une assimilation des cations en quantité supérieure à celle des anions. Ce déséquilibre provoque l'excrétion excédentaire d'ions H^+ par les racines et l'acidification subséquente de la rhizosphère (Nye, 1986; Bowen et Rovira, 1991; Petersen et Böttger, 1991; Hinsinger et Jaillard, 1993; Jungk, 1996; Gobran *et al.*, 1998; Hinsinger, 1998; Courchesne *et al.*, 2001; Lombi *et al.*, 2001). De la même façon, la libération d'anions OH^- ou HCO_3^- par les racines suite à une assimilation plus importante d'anions résulterait en une alcalinisation de la rhizosphère (Bowen et Rovira, 1991; Hinsinger et Jaillard, 1993; Jungk, 1996; Courchesne *et al.*, 2001). Les racines réagissent donc à un débalancement ionique dans la solution de sol en libérant soit des cations (H^+) ou des anions (OH^-) pour compenser le déséquilibre ionique créé par les besoins nutritionnels de la plante. La direction et l'intensité des changements acide-base dans la rhizosphère dépendent du type de plante ainsi que des caractéristiques du sol, telles la valeur initiale de pH et le pouvoir tampon du sol (Marschner et Römheld, 1996). Selon Römheld (1986), l'origine géographique des espèces végétales est également un facteur déterminant dans l'intensité du changement de pH de la rhizosphère. Par exemple, la rhizosphère d'espèces provenant de milieux tropicaux humides (telles *Glycine max.* (L.) Merr.) ne subit aucune acidification alors que la rhizosphère d'espèces de milieux tempérés (*Pisum sativum* L.) subit une légère acidification. Les espèces de milieux semi-arides (*Cicer arietinum* L. et *Lens culinaris* Medik.) déclenchent quant à elles une acidification plus importante de leur rhizosphère.

L'azote (N) joue un rôle majeur dans l'équilibre ionique anion-cation de la plante puisque c'est le macronutriment le plus en demande, et donc le plus limitant

pour la majorité des plantes (Marschner, 1995). Ainsi, dans les sols acides tels les podzols, la principale forme sous laquelle N sera assimilé est le cation NH_4^+ , puisque le taux de nitrification est très lent (Nye, 1986). Le prélèvement préférentiel de N sous la forme de NH_4^+ plutôt que NO_3^- résultera en un déséquilibre des charges électriques dans la solution. Les racines réajusteront celui-ci en libérant des cations sous la forme d'ions H^+ , et acidifieront du même coup la rhizosphère (figure 1.4). Braun *et al.* (2001), mentionnent qu'avec l'ajout expérimental de NH_4^+ dans le sol, l'acidification des solutions de sol prélevées *in situ* sous couvert forestier est encore plus importante. Toutefois, il faut mentionner que l'acidification peut être un phénomène très localisé. En effet, plusieurs parties d'une même racine sont susceptibles de réagir différemment à des conditions externes identiques. En effet, il existe des processus locaux, à l'échelle racinaire, qui rendront plus acides ou plus alcalines différentes régions à la surface des racines (Jaillard *et al.*, 1996; Marschner et Römheld, 1996; Marschner, 1998). Par exemple, il est reconnu que l'embout apical de la racine est souvent plus acide, car c'est le lieu d'excrétion maximale des protons (figure 1.4) (Marschner et Römheld, 1996).

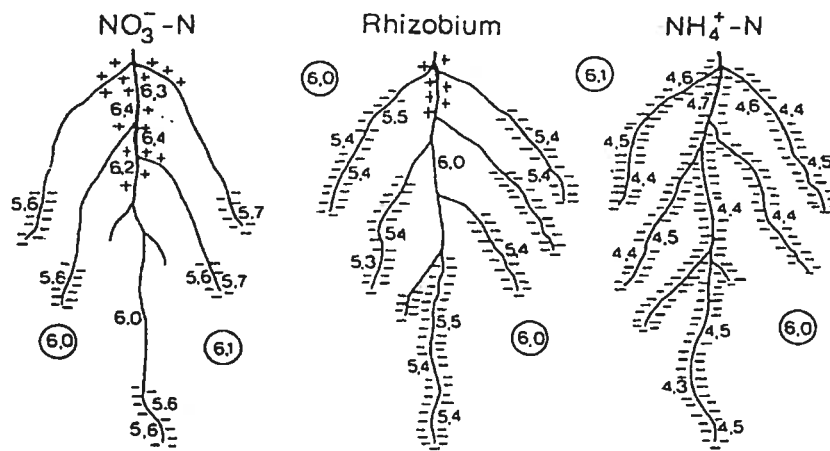


Figure 1.4. Variations spatiales des valeurs de pH en fonction de l'assimilation d'anions ou de cations (Marschner et Römheld, 1996).

1.2.4. Altération des minéraux dans la rhizosphère

Plusieurs études ont montré l'effet des racines et des microorganismes leur étant associés sur la composition minéralogique de la rhizosphère (April et Keller, 1990; Kodama *et al.*, 1994; Courchesne et Gobran, 1997; Arocena et Glowa, 2000). Les résultats de ces recherches montrent plusieurs différences entre la rhizosphère et la matrice de sol, notamment au niveau de la composition minéralogique et du contenu en cations majeurs. Les différences minéralogiques entre ces deux compartiments sont attribuées aux conditions d'altération plus intenses dans la rhizosphère. En effet, ces études confirment la transformation chimique des minéraux qui s'opère en présence d'exsudats racinaires ainsi que des acides organiques libérés par les microorganismes. La transformation des minéraux en contact avec ces substances organiques s'effectue par l'altération des grains exposés, soit par la dissolution d'ions à la surface ou à l'intérieur même des minéraux. Par ailleurs, plusieurs études ont été menées pour illustrer la capacité des racines à puiser des macronutriments directement des minéraux du sol, en phase solide, lorsque ceux-ci sont l'unique source disponible pour l'approvisionnement des plantes en nutriments essentiels (Hinsinger *et al.*, 1991; Hinsinger *et al.*, 1992; Hinsinger et Jaillard, 1993; Jongmans *et al.*, 1997). Toutefois, la quasi-totalité des connaissances portant sur l'altération des minéraux dans la rhizosphère provient d'études réalisées dans des serres, la plupart sur des espèces agricoles et sur des minéraux renfermant des nutriments essentiels pour les plantes. Les études sur l'altération des minéraux dans la rhizosphère en milieu forestier demeurent peu nombreuses.

Toutes les études menées en serres sur différentes espèces végétales et sous conditions contrôlées ont présenté des résultats similaires quant à la transformation minéralogique et l'altération concourante des minéraux étudiés. Par exemple, Hinsinger *et al.* (1991), Hinsinger *et al.* (1992) et Hinsinger et Jaillard (1993) ont montré la transformation rapide, de l'ordre de quelques jours à quelques semaines, d'un mica (la phlogopite) en vermiculite lorsque ce mica était la seule source de K disponible pour assurer les besoins nutritionnels de la plante. Le K était libéré de la phlogopite (minéral interstratifié) par l'activité racinaire. Hinsinger *et al.* (1993) ont poursuivi ces recherches et mentionnent par ailleurs que la libération du K de l'espace interfoliaire de la phlogopite a nécessité une dissolution acide de la structure du mica,

provoquée par la baisse de pH induite par les racines dans la rhizosphère. Selon eux, l'excrétion de protons serait le mécanisme responsable de la transformation de la phlogopite. Dans le même ordre d'idée, Hinsinger et Jaillard (1993) mentionnent que la libération du K-interfoliaire, non-échangeable, ne se produit que lorsque les racines ont épuisé la réserve de K-échangeable présente sur le complexe d'échange et dans la solution de sol de la rhizosphère.

Par ailleurs, Kodama *et al.* (1994) ont étudié la rhizosphère de sols agricoles utilisés pour la culture de maïs. Les analyses ont montré un contenu en micas environ 5 % plus faible dans la rhizosphère que dans la matrice et un contenu en vermiculite et minéraux argileux interstratifiés environ 6 % plus élevé dans la rhizosphère que la matrice. L'importance de la proximité des racines dans le processus d'altération est une fois de plus démontré par la présence de particules de vermiculite concentrées en périphérie ou directement sur la surface des racines, là où les mucilages sont localisés.

Mojallali et Weed (1978) ainsi que Leyval et Berthelin (1991) ont identifié les mycorhizes comme agents d'altération importants de la biotite et de la phlogopite. Ils montrent la capacité des mycorhizes à appauvrir plus rapidement la solution de sol et le complexe d'échange en K dans la rhizosphère, et ainsi leur capacité à engendrer une libération plus importante de K-interfoliaire, non-échangeable. Leyval et Berthelin (1991) démontrent également l'importance des microorganismes non-symbiotiques (bactéries) dans l'altération de micas présents dans la rhizosphère de pins (*Pinus sylvestris* L.). La perte de K des micas est attribuée à la production d'acides organiques par les microorganismes dans la rhizosphère. Ils montrent donc que les microorganismes (symbiotiques et non-symbiotiques) permettent une altération plus intense par l'acidification et une meilleure exploitation du volume de sol.

Une des rares études portant sur la composition minéralogique de la rhizosphère de sols forestiers (April et Keller, 1990) a permis d'illustrer des différences entre la rhizosphère et la matrice au niveau des caractéristiques physiques, chimiques, minéralogiques et du même coup sur l'état de l'altération dans ces deux compartiments. La rhizosphère des sols forestiers étudiés présentait des caractéristiques qualitatives d'altération physique distinctes, telles l'alignement tangentiel des grains de phyllosilicates en périphérie des racines (figure 1.5a), ainsi qu'un plus grand nombre de fractures sur la surface des grains directement en contact

avec les racines (figure 1.5b). Par ailleurs, une altération chimique a également été relevée pour ce même compartiment. En effet, les auteurs ont montré, pour un échantillon seulement, qu'une dissolution préférentielle des grains en contact avec les racines avait possiblement eu lieu, en se basant sur la morphologie recourbée des minéraux près des racines, minéraux qui épousent en quelque sorte la forme des racines avoisinantes (figure 1.5c). Des différences au niveau de la composition minéralogique existaient également. Ainsi, la kaolinite de la rhizosphère avait une stabilité thermique supérieure à celle mesurée dans la matrice (et donc un niveau de cristallinité supérieur), et ce pour plusieurs échantillons. Ce contraste entre les deux compartiments s'expliquait entre autres par un niveau d'altération plus intense dans la rhizosphère, ainsi que par la présence accrue de liants organiques dans ce même environnement.

Une autre étude réalisée en milieu forestier avec l'épinette de Norvège (*Picea abies* (L.) Karst) par Courchesne et Gobran (1997) a montré l'effet des racines sur l'altération des minéraux dans la rhizosphère d'un sol podzolique en milieu naturel. L'analyse minéralogique des particules argileuses a démontré un appauvrissement en amphiboles et phyllosilicates expansibles dans la rhizosphère comparativement à la matrice. L'effet de la rhizosphère et donc de l'activité des racines variait selon la nature du minéral analysé dans l'ordre suivant : amphiboles > plagioclases > feldspaths potassiques, l'amphibole étant un minéral facilement altérable alors que les feldspaths sont plus résistants. Les auteurs ont également noté une accumulation d'Al et Fe extractibles à l'oxalate dans la rhizosphère, ces éléments étant des produits d'altération des divers minéraux comme l'amphibole et les feldspaths.

Il existe donc de nombreuses observations confirmant le caractère distinct de la rhizosphère au plan de l'intensité du processus d'altération des minéraux. Certaines études ont démontré qu'il y avait une différence significative entre la matrice et la rhizosphère au niveau de la composition minéralogique, cette différence étant expliquée par une altération accrue dans la rhizosphère (April et Keller, 1990; Courchesne et Gobran, 1997; Arocena *et al.*, 1999). Il a ainsi été démontré que la rhizosphère est un environnement plus corrosif pour les minéraux facilement altérables que la matrice de sol. Les minéraux plus résistants subissent également une altération accrue dans la rhizosphère mais l'impact sur leur composition minéralogique est moindre. D'autres études ont plutôt tenté de cerner les mécanismes à l'origine de cette altération (Mojallali et Weed, 1978; Leyval et Berthelin, 1991;

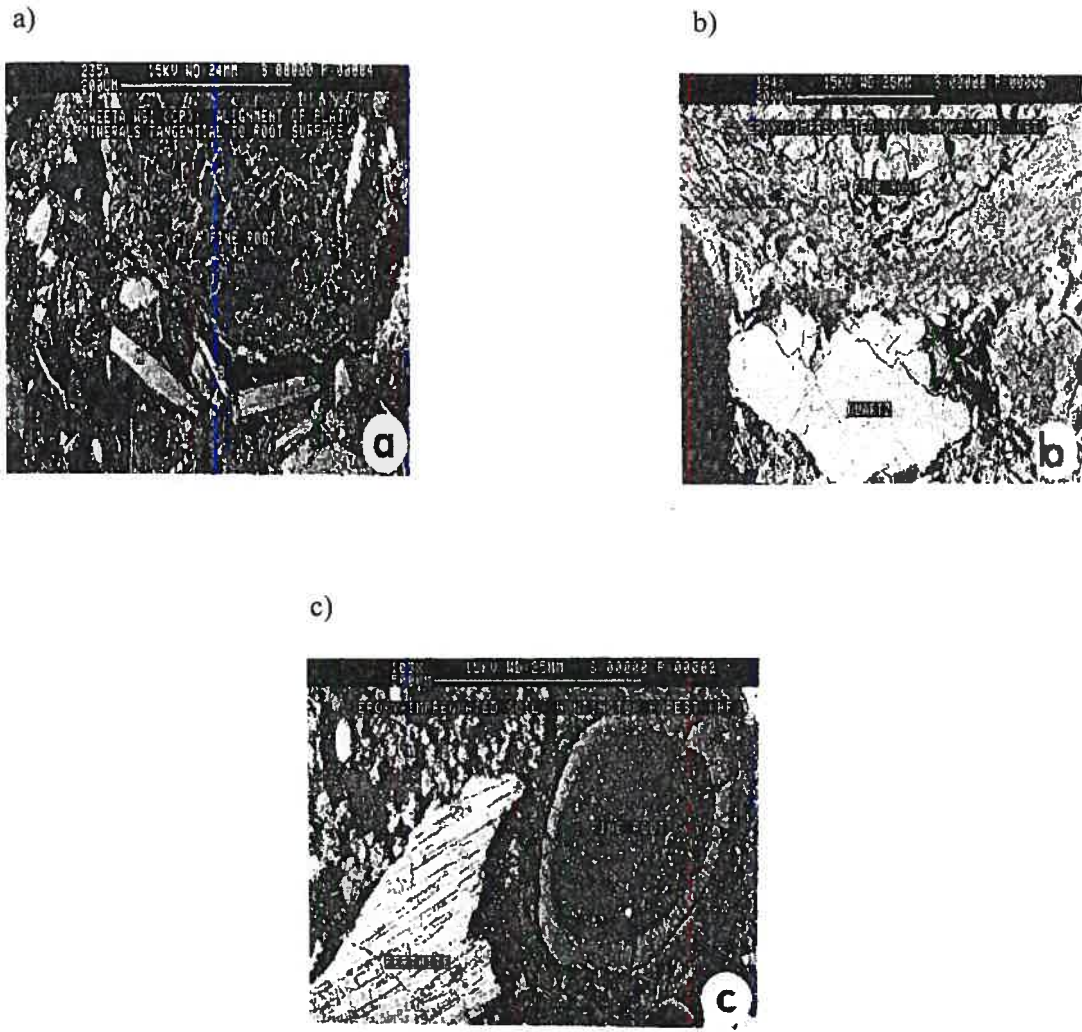


Figure 1.5. a) Alignement tangentiel des grains de minéraux; b) Fractures sur le grain de quartz en contact avec la racine; c) Dissolution partielle du minéral en contact avec la racine (April et Keller, 1990).

Hinsinger *et al.*, 1993). Parmi ceux-ci, mentionnons l'excrétion d'ions H^+ par les racines et l'acidification subséquente de la rhizosphère, les mycorhizes et leur capacité d'augmenter la surface d'échange, les mucilages, les acides organiques libérés par les bactéries et les hyphes fongiques des mycorhizes. L'accumulation préférentielle et la transformation de la matière organique d'origine végétale et microbienne dans la rhizosphère est un facteur clé dans l'intensification du processus d'altération, en raison de la production importante d'acides et de complexes organiques. Tous ces processus peuvent également avoir un impact direct sur la solubilité et la spéciation des métaux traces dans la rhizosphère. En effet, on y observe un plus haut taux de dissolution des minéraux et les métaux deviennent ainsi disponibles pour une assimilation subséquente par les plantes.

1.3. SPÉCIATION ET BIODISPONIBILITÉ DES MÉTAUX TRACES

1.3.1. Concepts

1.3.1.1. Spéciation

Le concept de spéciation réfère à l'assemblage des diverses formes chimiques sous lesquelles on retrouve les métaux dans le sol. Ainsi, les métaux traces peuvent être présents sous plusieurs formes chimiques dans le sol; ions libres, métaux solubles dans l'eau, localisés sur les sites d'échanges, complexés à la matière organique, associés à des solides inorganiques amorphes ainsi que présents dans la structure cristalline des minéraux du sol. La spéciation des métaux traces dans la rhizosphère est affectée par plusieurs processus qui eux, sont tous induits par la proximité des racines. Ainsi, l'exsudation de composés organiques par les racines, les mycorhizes et la population microbienne, l'enrichissement en carbone organique, l'acidification et l'altération des minéraux sont autant de processus qui contribuent à modifier la spéciation des métaux traces en comparaison à la matrice (Assadian et Fenn, 2001).

1.3.1.2. Biodisponibilité

La biodisponibilité, quant à elle, est plutôt définie comme la capacité d'un métal à être transféré d'un compartiment donné d'un sol vers un organisme vivant (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Dans le même ordre d'idée, un élément chimique sera qualifié de biodisponible s'il est présent sous la forme ionique libre (ou s'il peut

facilement être transformé sous cette forme); s'il peut être acheminé rapidement jusqu'aux racines, à une échelle temporelle appropriée pour la croissance des plantes; et/ou s'il intervient dans le développement des plantes, une fois absorbé par les racines (Nolan *et al.*, 2003). La biodisponibilité d'un métal est non seulement fonction de la concentration totale de ce métal dans le sol mais également des conditions physico-chimiques (pH, contenu en matière organique) et biologiques (microorganismes, exsudats) retrouvées dans le sol (Hayes et Traina, 1998). Toutefois, il est maintenant bien établi que la concentration totale d'un métal dans le sol ne renseigne pas complètement sur sa disponibilité pour les plantes et n'est pas un bon indicateur de son potentiel toxique (Vaughan *et al.*, 1993; McBride, 1994). En effet, il faut plutôt obtenir de l'information sur le fractionnement des métaux en phase solide et leur spéciation en phase liquide afin d'estimer de façon plus adéquate la disponibilité et la toxicité de ces éléments.

1.3.1.3. Toxicité

Bien que certains métaux traces tels que le Cu et le Zn (ainsi que le Ni dans une moindre mesure) soient des micronutriments essentiels à la croissance des plantes, ces éléments peuvent devenir toxiques lorsque leurs concentrations dépassent un certain seuil dans les sols. Au même titre, d'autres éléments traces n'ayant aucune fonction connue chez les plantes (Cd, Hg et Pb par exemple) sont considérés toxiques. La toxicité des métaux a un effet sur l'ensemble du biota, tous les organismes vivants étant sensibles à des concentrations excessives de métaux. Par contre, l'intensité du potentiel toxique variera selon l'organisme. Ainsi, les fungi et les actinomycètes sont parmi les organismes les plus tolérants face à des concentrations élevées de métaux traces (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). En général, les sols contaminés en métaux traces présenteront toutefois une croissance microbienne de même qu'une activité enzymatique réduite. Des contenus élevés en métaux traces peuvent également inhiber certaines fonctions microbiennes, notamment la fixation d'azote de même que le processus de nitrification (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Le tableau 1.3 montre ainsi trois processus microbiens affectés par la présence de métaux traces en fonction de leur concentration dans le sol.

Les plantes sont, elles aussi, très sensibles aux concentrations des métaux traces dans les sols. En effet, les végétaux ne tardent pas à montrer des signes de

Tableau 1.3. Effets toxiques de certains métaux traces sur des processus contrôlés par l'activité des microorganismes (adapté de Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

Concentrations des métaux dans le sol (ppm)	Processus inhibés	Éléments en cause	
		Quelquefois	Toujours
≤10	Respiration	Cd, Hg, Ni, Zn	
	Minéralisation de N	Hg	
	Nitrification	Hg	
≤100	Respiration	Cd, Cu, Pb	Hg
	Minéralisation de N	Cd, Cu, Ni, Pb	Hg
	Nitrification	Cd, Cu, Ni, Zn	Hg
≤1000	Respiration		Cd, Cr, Cu, Ni, Zn
	Minéralisation de N		Cr, Cu, Ni, Zn
	Nitrification		Cd, Cr, Cu, Ni
≤10000	Respiration		Pb
	Minéralisation de N		Cd, Pb
	Nitrification		Pb, Zn

toxicité lorsque des concentrations excessives de métaux se retrouvent dans leur organisme. Des symptômes visuels, notamment au niveau de la teinte, de la texture et de la grosseur des feuilles et des racines, de même que des perturbations au niveau des processus métaboliques et la réduction subséquente de la biomasse peuvent apparaître (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

Par le biais de la chaîne alimentaire, les métaux peuvent également avoir un impact sur la santé de l'homme. Ainsi, des concentrations excessives de métaux peuvent être transférées du sol vers les plantes, puis dans les animaux qui consommeront ces plantes, et éventuellement jusque dans l'organisme humain. Le passage de Hg à travers la chaîne alimentaire est certainement le plus problématique étant donné la bioamplification de ce métal, sous la forme mobile CH_3Hg^+ (méthylmercure), dans les organismes vivants. Le phénomène de bioamplification se définit par la propriété de certains contaminants à s'accumuler à des concentrations toujours croissantes lorsque l'on passe des niveaux trophiques inférieurs aux niveaux supérieurs dans la chaîne alimentaire (Carignan, 2002). Cette accumulation croissante dans les organismes est due à la liposolubilité de même qu'à la persistance et aux longs temps d'élimination du méthylmercure. La grande mobilité de CH_3Hg^+ joue également un rôle important dans l'assimilation préférentielle de cette forme de mercure (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Le seuil de toxicité établi pour le mercure est souvent très faible puisqu'il doit tenir compte de la propriété de bioamplification de ce métal dans la chaîne alimentaire. Des concentrations supérieures à ce seuil auront généralement des conséquences néfastes sur la santé de l'organisme, comme ce fut le cas dans la baie de Minamata, au Japon. En effet, une contamination élevée des poissons et des fruits de mer au méthylmercure fut à l'origine d'une multitude de problèmes de santé chez les familles des pêcheurs dans la baie de Minamata. Les principaux effets toxiques observés étaient l'affaiblissement général des muscles, une diminution de la vision ainsi que des fonctions cérébrales et motrices, de même que le coma et la mort dans certains cas (Pierzynski *et al.*, 2000). La contamination fut retracée jusqu'à une industrie qui rejeta plus de 150 tonnes de mercure dans l'effluent de la baie de Minamata entre les années 1950 et 1960.

1.3.2. Spéciation et biodisponibilité dans la rhizosphère

La biodisponibilité d'un métal peut donc être estimée en connaissant l'assemblage des formes chimiques sous lesquelles le métal en solution se trouve (tableau 1.4). De façon générale, l'ion libre en solution est considéré comme étant la forme chimique la plus disponible et donc la plus toxique (Wang et Benoit, 1996; Weng *et al.*, 2001). Toutefois, les fractions solubles et échangeables de même qu'une partie des complexes organo-métalliques sont également considérés comme étant mobiles et potentiellement biodisponibles (Løbersli *et al.*, 1991; Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Par ailleurs, il est important de connaître la biodisponibilité des micronutriments dans la rhizosphère car le statut nutritionnel et la croissance des plantes en dépendent (Lombi *et al.*, 2001).

1.3.2.1. Fractions solubles et échangeables

Certains résultats récents montrent que les fractions les plus disponibles des métaux pour les plantes, soit les formes dissoutes et échangeables, sont plus importante près de l'interface sol:plante que dans la matrice de sol. En effet, dans une étude effectuée sous couvert forestier (*Populus tremuloides* Michx.) le long d'un gradient de contamination, Séguin *et al.* (2003) ont montré que les concentrations de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn solubles dans l'eau étaient plus élevées dans la rhizosphère interne et diminuaient vers la rhizosphère externe jusque dans la matrice de sol. De plus, l'enrichissement en métaux solubles dans la rhizosphère a été confirmé dans chacun des sites d'échantillonnage, peu importe le niveau de contamination des sols. Dans des sols forestiers non-contaminés, Courchesne *et al.* (2001) ont également montré que les concentrations de divers métaux (Al, Fe, Mn, Cu, Zn) échangeables (0.1 M BaCl₂) étaient significativement plus élevées dans la rhizosphère que dans la matrice de sol (tableau 1.5). Dans une étude en serre, sous conditions contrôlées, Wang *et al.* (2002) ont trouvé sous l'espèce de blé *Triticum aestivum* (L.) des fractions disponibles de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn (comprenant les formes solubles, échangeables et associées aux carbonates) dont l'importance suivait l'ordre : rhizosphère proche > matrice proche > rhizosphère > matrice. Cet enrichissement de la fraction biodisponible dans la rhizosphère a également été relevé pour plusieurs nutriments tels Ca, K, Mg et Mn (tableau 1.6) et est principalement attribué à la présence accrue d'exsudats racinaires, de substances organiques, à l'activité des

Tableau 1.4. Biodisponibilité des métaux en fonction de leur spéciation (adapté de Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

Formes chimiques	Biodisponibilité
Cations simples ou complexes en solution	Grande
Cations échangeables inclus dans complexes organiques et inorganiques	Moyenne
Cations inclus dans chélates	Légère
Métaux précipités sur particules de sol	Disponible après dissolution
Métaux liés ou fixés à l'intérieur de substances organiques	Disponible après décomposition
Métaux liés ou fixés à l'intérieur de structures minérales (minéraux primaires ou secondaires)	Disponible après altération et/ou décomposition

Tableau 1.5. Concentrations de cinq métaux extraits au BaCl₂ dans la rhizosphère (R) et la matrice (M). * Les concentrations des métaux sont significativement différentes dans les deux composantes de sol avec un niveau de signification $p < 0.05$ (Test de Wilcoxon) (adapté de Courchesne *et al.*, 2001).

Métal	Composante	Extraction
		BaCl₂
Al (g kg ⁻¹)	R	0.16 (0.08)*
	M	0.06 (0.03)
Fe (g kg ⁻¹)	R	0.02 (0.02)*
	M	0.01 (0.01)
Mn (mg kg ⁻¹)	R	2.63 (2.41)*
	M	0.67 (0.33)
Cu (mg kg ⁻¹)	R	4.04 (3.35)*
	M	1.71 (1.04)
Zn (mg kg ⁻¹)	R	1.96 (1.38)*
	M	0.40 (0.26)

Tableau 1.6. Différences entre les concentrations extraites au BaCl₂ dans la rhizosphère et la matrice de sol de différentes plantes ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Les différences significatives sont indiquées comme * $0.01 < p < 0.05$; ** $0.001 < p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Test de Wilcoxon) (adapté de Schöttelndreier et Falkengren-Grerup, 1999).

Espèces	Ca	K	Mg	Mn
<i>Deschampsia flexuosa</i>	4.3**	0.8*	1.2**	0.2**
<i>Lamium galeobdolon</i>	15.5***	2.3***	3.9***	0.5***
<i>Mercurialis perennis</i>	4.9**	0.3	0.9*	0.1**
<i>Milium effusum</i>	9.2***	1.0**	2.3***	0.4***
<i>Poa nemoralis</i>	8.0***	0.8***	1.7***	0.2***

microorganismes et à la présence de microsites situés près des racines et enrichis en matière organique (Wang et Zabowski, 1998; Schöttelndreier et Falkengren-Grerup, 1999).

D'autres études présentent toutefois des résultats opposés, où la rhizosphère est considérée comme un environnement appauvri en éléments biodisponibles, nutriments et métaux confondus (Dieffenbach *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1997; Göttlein *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Par exemple, dans une étude en pots, Lorenz *et al.* (1997) ont montré que la croissance du radis (*Raphanus sativus* cv. 'Crystal Ball') appauvrissait la rhizosphère en éléments solubles dans l'eau (K, Ca, Mg, P, Mn, Cd et Zn). Cet appauvrissement était relié à l'assimilation de ces éléments par la plante. De plus, à l'aide d'épinettes de Norvège (*Picea abies* (L.) Karst.) prélevées en milieu naturel et transplantées dans un rhizotron, Dieffenbach *et al.* (1997) ont montré une diminution des concentrations de K et de Mg dans la solution de sol près des embouts racinaires et de leurs zones d'élongation. La capacité de réapprovisionnement de la solution de sol en nutriments et en métaux traces par les processus de transport par flux de masse et de diffusion serait le facteur principal expliquant les résultats variés quant à l'enrichissement ou à l'appauvrissement de la rhizosphère en éléments biodisponibles (Jungk, 1996).

L'exposition des plantes et des microorganismes aux métaux, de même que la toxicité qui en découle se font principalement par l'entremise de la solution de sol. Toutefois, bien que la biodisponibilité des éléments soit estimée à partir de la solution de sol, il est tout de même essentiel d'évaluer le fractionnement des éléments en phase solide puisque le taux de réapprovisionnement de la phase liquide du sol est directement contrôlé par la phase solide (Minnich *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 2001; Gummuluru *et al.*, 2002). À titre d'exemple, McGrath *et al.* (1997) et Knight *et al.* (1997) ont montré qu'entre 90 à 99 % du Zn total assimilé par la plante *Thlaspi caerulescens* provenait des fractions non-mobiles de la phase solide du sol (dans ces études, la fraction mobile correspondait aux formes solubles et échangeables de Zn).

1.3.2.2. *Forme ionique libre*

La forme ionique libre est une des nombreuses formes sous lesquelles on retrouve les métaux traces dans la solution de sol. Parmi ces formes, on considère notamment les complexes monomériques et polymériques, de nature organique ou

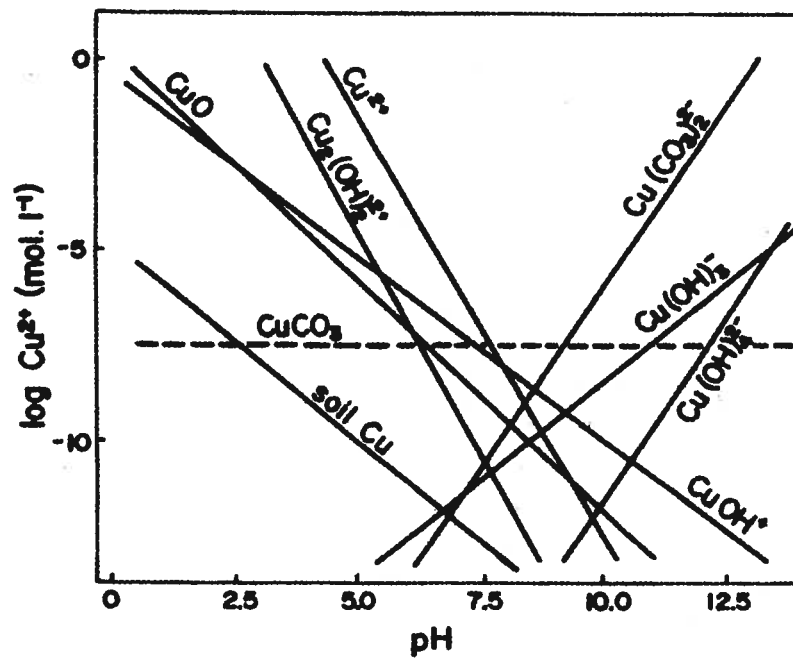


Figure 1.6. Solubilité des différents complexes inorganiques monomériques de Cu en fonction du pH dans le sol (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

inorganique. La figure 1.6 illustre la solubilité des différents complexes inorganiques monomériques de Cu en fonction du pH du sol.

Les ions métalliques libres sont en équilibre constant avec la quantité de liants organiques et inorganiques disponibles en solution ainsi qu'avec les métaux liés à la phase solide sous la forme échangeable ou adsorbée (Morgan et Stumm, 1991; Vaughan *et al.*, 1993; Hayes et Traina, 1998). Ainsi, lorsque l'assimilation des micro- et macronutriments par les racines abaisse la quantité d'ions libres présents près des sites d'absorption, un transfert s'effectue alors à partir des sites d'échange, des complexes et des chélates (par l'entremise des mécanismes de désorption et de dissolution) vers la forme ionique afin de maintenir l'équilibre chimique entre les phases solides et liquides du sol (figure 1.7). Les racines des plantes, les particules de sol et les microorganismes, par l'entremise de processus comme l'adsorption et l'assimilation, sont également des réservoirs pour les ions libres, réservoirs dont la magnitude est influencée par le pH du sol (Vaughan *et al.*, 1993). Ainsi, dans la solution de sol, les métaux peuvent être présents sous la forme ionique libre, quoique cette forme ne représente souvent qu'une très faible fraction du contenu total. Dans des sols forestiers, Sauvé *et al.* (1995) rapportent que la forme ionique libre (Cu^{2+}) ne représente qu'une infime fraction variant entre 1/1 000 000 % et 0.34 % du Cu total dans le sol (obtenu par une digestion à l'acide). La concentration totale du métal, le pH, la concentration des liants organiques et inorganiques, la concentration des métaux en compétition et la présence de surfaces d'adsorption sont autant de facteurs influençant la concentration d'ions libres en solution (Morgan et Stumm, 1991; Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

Il est essentiel de déterminer la spéciation des métaux en phase liquide, et surtout de connaître l'activité ionique des métaux en solution puisqu'en général, la forme ionique libre est considérée comme le meilleur indicateur du potentiel toxique d'un métal (Wang et Benoit, 1996; Weng *et al.*, 2001). En effet, la concentration des métaux dans les racines et/ou les parties aériennes des plantes supérieures corrèle généralement mieux avec la forme ionique simple en solution (Minnich *et al.*, 1987; Sauvé *et al.*, 1996; Knight *et al.*, 1997; Shenker *et al.*, 2001). Par exemple, Sauvé *et al.* (1996) ont montré que les concentrations de Cu dans les tissus de radis (*Raphanus sativus* cv. Cherry Belle), de laitue (*Lactuca sativa* cv. Buttercrunch) et de seigle (*Lolium perenne* cv. Barmultra) affichaient une meilleure corrélation avec l'activité

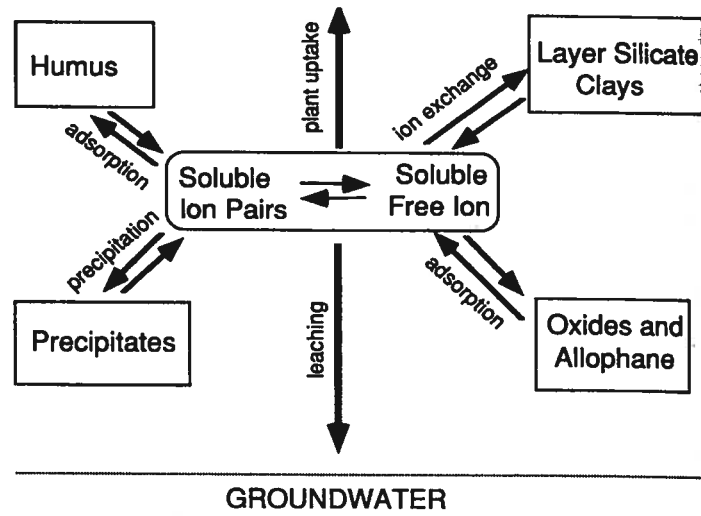


Figure 1.7. Équilibre entre la phase solide et la solution de sol (McBride, 1994).

de Cu^{2+} en solution qu'avec les concentrations totales ou solubles de Cu dans le sol. Dans le même ordre d'idées, Knight *et al.* (1997) ont trouvé une forte corrélation ($r^2 = 0.80$) entre les concentrations de Zn dans les parties aériennes de la plante *Thlaspi caerulescens* et l'activité de Zn^{2+} en solution.

1.3.3. Rôle de la matière organique dans la disponibilité des métaux traces

Le Cu et le Zn (et dans une moindre mesure le Ni) sont des micronutriments remplissant des fonctions spécifiques dans le système végétal. Ils jouent un rôle au niveau du métabolisme des plantes en tant qu'éléments clés pour certaines enzymes. Les systèmes biologiques ont donc su développer des mesures de contrôle pour assurer la disponibilité en tout temps de ces micronutriments, qui sont généralement présents en très petites quantités dans la solution de sol. Une de ces mesures est le mécanisme de chélation des métaux (Vaughan *et al.*, 1993; Laurie et Manthey, 1994). La chélation régularise la solubilité et la disponibilité des métaux pour les plantes. La formation de complexes entre les composés de la matière organique dissoute et les divers métaux est influencée par l'affinité métal-matière organique, la compétition entre cations métalliques, ainsi que le pH et la force ionique de la solution (Vaughan *et al.*, 1993).

Les métaux traces ont chacun une capacité spécifique à former des complexes stables, ou chélates, avec une variété de liants organiques et cette capacité diminue selon l'ordre $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Mn}$ (Vaughan *et al.*, 1993). Dans les sols forestiers acides, le Cu et le Pb ont une forte affinité avec la matière organique et s'associent aisément aux acides fulviques en formant des complexes covalents ou des chélates. Le Zn et le Cd s'associent moins facilement avec les composés organiques, ce qui fait qu'on retrouve ces métaux majoritairement sous les formes d'ions libres, de complexes avec des liants inorganiques ou sous forme échangeable. Ils deviennent ainsi très disponibles pour les plantes (Lasat, 2002). Les métaux liés avec l'acide fulvique et autres substances humiques dans le sol sont considérés moins disponibles que les ions libres et donc également moins toxiques (Løbersli *et al.*, 1991).

Plusieurs études viennent toutefois contredire l'idée que l'assimilation d'éléments par les plantes soit uniquement le fait de la forme ionique libre (Laurie *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1997; Cieśliński *et al.*, 1998). Ainsi, Laurie *et al.* (1991) ont montré que l'ajout d'un agent de chélation dans le sol (EDTA) augmentait les

concentrations de Cu, Zn et Mn dans les parties aériennes de l'orge (*Hordeum vulgare* L.). De la même façon, d'autres auteurs ont mesuré des concentrations supérieures de Cd et de Pb dans les parties aériennes de diverses plantes suite à une hausse concomitante des concentrations d'acides organiques (Huang *et al.*, 1997; Cieśliński *et al.*, 1998; Nigam *et al.*, 2001). De plus, Antoniadis et Alloway (2002) ont montré que des ajouts de DOC dans le sol augmentaient les concentrations de Cd, Ni et Zn extractibles au CaCl_2 , et accroissaient du même coup l'assimilation de ces éléments dans les parties aériennes du seigle (*Lolium perenne* L.).

D'un autre côté, d'autres études soulignent le rôle important joué par la matière organique dans la protection des plantes face à une assimilation excessive de métaux (Manthey *et al.*, 1994; Ross et Kaye, 1994). À titre d'exemple, la toxicité du Cd peut être réduite lorsque ce métal est complexé aux acides fulviques (Cabrera *et al.*, 1988). De la même façon, la toxicité du Cu sera amoindrie en présence de matière organique, l'ion Cu^{2+} ayant une forte tendance à s'associer avec les substances organiques. Shenker *et al.* (2001) mentionnent également que, selon des expériences en culture, les plantes n'absorbent pas ou peu les espèces de Cd présentes sous la forme de complexes solubles organiques. L'absorption de la forme ionique libre (Cd^{2+}) serait plutôt privilégiée par les plantes.

En somme, il existe un débat sur la question de la spéciation des métaux et de l'assimilation préférentielle des diverses formes chimiques des métaux par les plantes. Les conditions sous lesquelles les plantes assimilent de façon préférentielle la forme ionique libre ou les formes complexées des métaux doivent encore être investiguées (Laurie et Manthey, 1994).

1.3.4. Rôle du pH

Les changements acide-base et leurs effets sur les valeurs de pH affectent la solubilité et la disponibilité des nutriments et métaux traces dans la rhizosphère ainsi que leur assimilation par les racines (Jungk, 1996; Lombi *et al.*, 2001). De faibles variations de pH peuvent avoir une grande influence sur la solubilité et la spéciation des métaux en solution (Sanders, 1982; Assadian et Fenn, 2001; Lombi *et al.*, 2001). En général, une diminution des valeurs de pH favorise la dissolution des métaux et facilite leur assimilation par le biota du sol (Lindsay, 1979; Hinsinger, 1998). La figure 1.8 illustre la croissance logarithmique de la solubilité des métaux en fonction

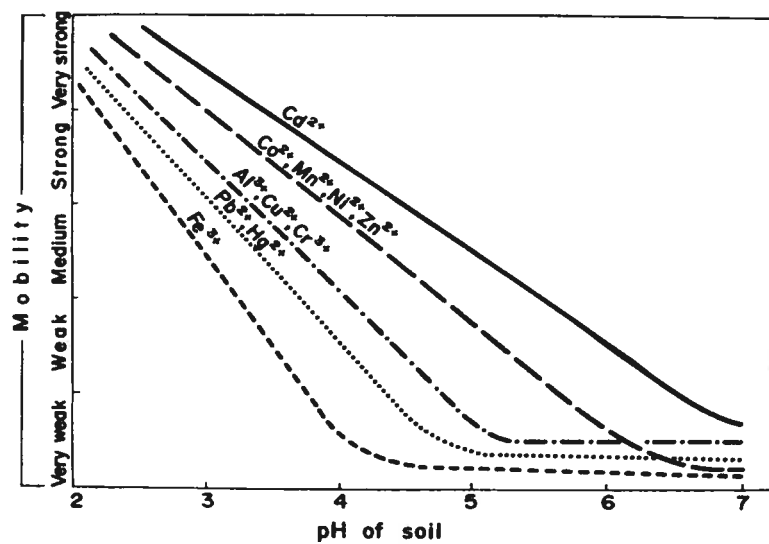


Figure 1.8. Mobilité de divers métaux en fonction du pH dans le sol (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

de la diminution des valeurs de pH. Le point d'inflexion sur les différentes courbes varie selon le métal. Par exemple, le point d'inflexion pour Zn^{2+} se situe à un pH d'environ 6,5 alors qu'il se trouve à un pH de 4 dans le cas de Fe^{3+} .

De plus, Marschner et Römheld (1996) montrent qu'une diminution du pH de la rhizosphère résulte en une augmentation de la disponibilité de Zn (par le processus de désorption) et de Mn (désorption et réduction), ce qui peut entraîner une hausse des concentrations de ces métaux dans les plantes (figure 1.9). Par ailleurs, Arocena et Glowa (2000) montrent que de faibles valeurs de pH dans des échantillons d'ectomycorhizosphère ont pour effet d'augmenter la disponibilité des cations K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} dans la solution de sol par l'altération des minéraux (tels les micas et les feldspaths). De plus, Wang et Benoit (1996) ont montré une désorption de même qu'une solubilisation de l'ion libre Pb^{2+} en présence d'une forte acidité (pH 4) dans le sol (figure 1.10). De faibles valeurs de pH diminuaient aussi le degré de complexation du plomb (Pb) avec les liants inorganiques dissous (OH^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-}). La figure 1.10 illustre l'évolution de la spéciation du plomb avec des liants inorganiques en fonction du pH. On voit qu'à un pH très acide la forme ionique libre (Pb^{2+}) domine alors que les complexes inorganiques deviennent dominants lorsque le pH augmente. De plus, Vulkan *et al.* (2000) ont montré que le pourcentage de Cu dissous présent sous la forme Cu^{2+} variait entre 0.02 et 96 % et que ce pourcentage dépendait fortement des valeurs de pH. En effet, les pourcentages les plus élevés de Cu^{2+} correspondaient aux sols ayant un pH inférieur à 5.5 et où le contenu en Cu dissous était élevé. De la même façon, Sauvé *et al.* (1995) ont montré que des sols à faible contenu en Cu présentait tout de même des valeurs de Cu^{2+} élevées étant donné la forte acidité de ces sols.

La toxicité varie également en fonction des valeurs de pH, ces valeurs ayant une influence directe sur la spéciation des métaux traces. Le degré de toxicité envers le biota est toutefois propre à chaque élément. Ainsi, en milieu aqueux, le Cd serait moins toxique dans un environnement acide que dans un environnement neutre (Lawrence et Holoka, 1987). Par contre, la toxicité de l'ion Al^{3+} est intensifiée en milieu acide. En effet, à un pH inférieur à 5-6, les composés d'Al sont solubilisés et la libération d'Al sous sa forme ionique, potentiellement toxique, est induite.

En somme, que ce soit dans la rhizosphère ou dans la matrice de sol, le fractionnement des métaux traces en phase solide de même que leur spéciation dans la solution de sol dépendent des conditions biogéochimiques du sol et d'interactions

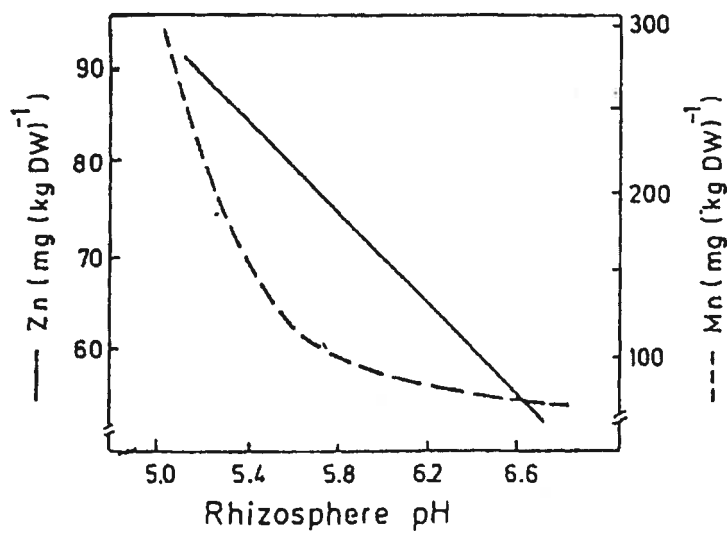


Figure 1.9. Relation entre les valeurs de pH de la rhizosphère et les concentrations de Zn et Mn observées dans les tiges de fèves (*Phaseolus vulgaris* L.) (Marschner et Römheld, 1996).

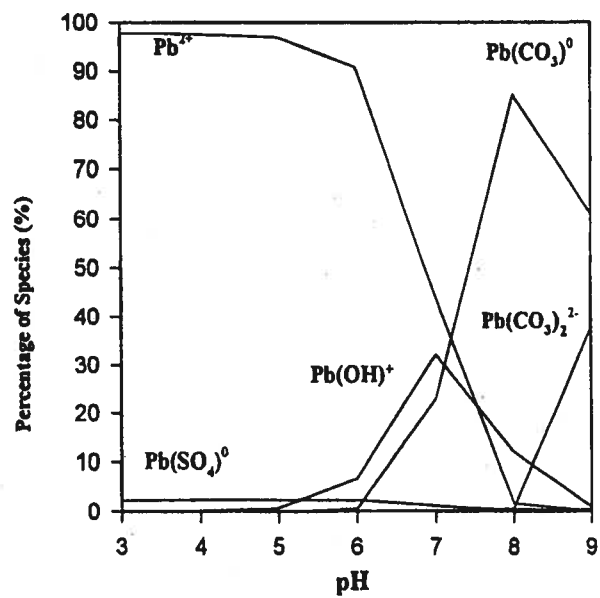


Figure 1.10. Répartition des formes inorganiques de Pb en fonction du pH (Wang et Benoit, 1996).

complexes (adsorption, dissolution, précipitation, chélation) entre de multiples facteurs (contenu en matière organique, pH, microorganismes, exsudats racinaires etc.). De nombreuses avenues de recherche se dégagent ainsi de cette revue de littérature, notamment en ce qui a trait à la question de l'enrichissement ou de l'appauvrissement de la rhizosphère en éléments biodisponibles. De plus, le débat sur l'assimilation préférentielle des ions libres ou des complexes organo-métalliques par les plantes mérite également d'être approfondi. De façon à contribuer à cette question de recherche, il est essentiel d'effectuer la spéciation en phase liquide des métaux traces dans la rhizosphère. Ces avenues de recherche ont ainsi contribué à l'orientation générale de notre étude de même qu'au façonnement de ses objectifs. La problématique, les objectifs spécifiques et les stratégies d'échantillonnage du projet sont détaillés dans la section suivante.

2. PROBLÉMATIQUE ET MÉTHODE

2.1. PROBLÉMATIQUE

Le diagnostic posé sur la disponibilité des nutriments ou sur le niveau de toxicité des métaux traces dans un environnement pédologique donné risque d'être incomplet s'il provient d'observations faites uniquement à partir de la matrice du sol. En effet, une meilleure évaluation du statut nutritionnel du sol et du niveau d'exposition des plantes à des substances potentiellement toxiques devrait considérer les conditions chimiques et physiques de l'environnement proximal des sites d'absorption des nutriments, soit la rhizosphère (Hinsinger, 1998). Il est donc essentiel de considérer la rhizosphère dans les études portant sur la disponibilité des nutriments et des éléments traces puisque l'effet de la rhizosphère est beaucoup plus important que ne le laisse croire le faible volume qu'elle occupe dans le système sol:plante (Courchesne *et al.*, 2001), et puisque cet environnement est stratégique pour la santé des écosystèmes (Vaughan *et al.*, 1993).

Les études illustrant les processus biogéochimiques uniques de la rhizosphère se sont multipliées depuis quelques décennies. Il est maintenant clair que les conditions chimiques de la rhizosphère sont différentes de celles de la matrice, et que cette distinction résulte d'interactions complexes entre le sol, les racines (la plante), les microorganismes de même que le matériel parental (Marschner, 1986; Dormaar, 1988; Lynch, 1990; Bowen et Rovira, 1991; Manthey *et al.*, 1994; Hinsinger, 1998; Gobran *et al.*, 1999; Lombi *et al.*, 2001). Les propriétés de la rhizosphère sont donc spécifiques au système dans lequel elle se développe. Pour mieux comprendre les processus ayant cours dans le système sol:plante, des connaissances approfondies sur la matière organique du sol, les microorganismes et l'activité racinaire de même que les effets de ces composantes l'une sur l'autre sont nécessaires.

Les conditions biologiques et chimiques particulières rencontrées dans la rhizosphère ont, entre autres, un effet sur la spéciation chimique des métaux traces. Les formes chimiques sous lesquelles on retrouve les métaux dans la rhizosphère peuvent différer des formes observées dans la matrice. Il est donc important de connaître la spéciation des métaux traces puisque les différentes formes chimiques reflètent divers degrés de disponibilité pour les plantes. Toutefois, les mécanismes

responsables de cette modification de la spéciation dans la rhizosphère demeurent jusqu'à maintenant peu connus.

La majorité des connaissances actuelles sur les caractéristiques et les processus biogéochimiques de la rhizosphère proviennent d'études réalisées avec des espèces agricoles dans des substrats homogènes riches en nutriments. La plupart du temps, ces travaux sont conduits en serre ou en laboratoire dans des conditions de croissance contrôlée. Ces études ont permis une bonne description des mécanismes ayant cours dans la rhizosphère. Toutefois, le transfert de ces observations obtenues en milieu artificiel à ce qu'on retrouve sur le terrain n'est pas direct (Gobran *et al.*, 1999). Le projet de recherche vise donc à répondre à une question de recherche portant sur la spéciation et la disponibilité des métaux traces dans la rhizosphère par la réalisation d'une étude de terrain sur des espèces arborescentes de milieux forestiers.

2.2. OBJECTIFS ET STRATÉGIES D'ÉCHANTILLONNAGE

Afin de mieux comprendre les processus en jeu dans la spéciation des métaux traces ainsi que l'effet de la rhizosphère sur ces métaux, le projet de recherche aura comme objectifs i) de comparer le fractionnement de métaux traces en phase solide (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) entre la matrice de sol, la rhizosphère externe et la rhizosphère interne dans les horizons minéraux de sols forestiers le long d'un gradient de contamination et ii) de déterminer l'activité du cuivre libre (Cu^{2+}) en solution et d'établir des relations avec le pH, le carbone organique dissous (DOC) et le cuivre total dissous. La biodisponibilité des cinq métaux traces pourra être estimée à partir de leur spéciation dans la rhizosphère. L'accent est mis sur les formes chimiques facilement extractibles de même que sur l'activité ionique en solution puisque ces fractions sont potentiellement les plus biodisponibles dans les sols. De plus, l'échantillonnage le long d'un gradient de contamination permet l'analyse d'un vaste éventail de concentrations de métaux dans les sols et assure également l'évaluation de l'effet de la rhizosphère en fonction du niveau de contamination des sols. Les résultats permettront de jeter un nouvel éclairage sur les mécanismes responsables des variations des formes chimiques observées entre la rhizosphère et la matrice.

Dans notre étude, le terme *fractionnement* sera privilégié pour désigner les diverses formes chimiques des métaux en phase solide, alors que le terme *spéciation*

sera utilisé pour représenter les formes chimiques métalliques en solution, dans la phase liquide. Cette distinction est nécessaire car la détermination des diverses formes chimiques des métaux traces en phase solide est effectuée à partir d'extractions successives (les méthodes d'analyses sont expliquées en détail dans la section 3.2). Ces extractions étant associées de façon opérationnelle à diverses formes chimiques, le terme *fractionnement* convient mieux pour désigner les différentes fractions chimiques obtenues.

Afin de répondre aux deux objectifs de recherche, trois sites ont été sélectionnés dans la région de Sudbury. Ces sites sont localisés sur un transect linéaire se déployant de l'ouest vers l'est, dans l'orientation des vents dominants, à partir d'une même source de métaux, la fonderie de Cu et Ni de Falconbridge (figure 2.1). À chacun de ces sites, les racines d'un nombre variable de bouleaux blancs (*Betula papyrifera* Marsh.) ($n = 3$ à 6) ainsi que la matrice de sol environnante ont été prélevées dans les horizons B puis ramenées en laboratoire, où la rhizosphère a par la suite été séparée des racines (figure 2.2). Les horizons B ont été sélectionnés puisque la majorité des racines fines et vivantes du sol se retrouvent dans les horizons minéraux (Persson *et al.*, 1995). Le nombre de bouleaux blancs échantillonnés permet l'évaluation de la variabilité spatiale des diverses propriétés chimiques à l'étude pour les différentes composantes du sol et ce, dans les trois sites d'échantillonnage. Le choix du bouleau blanc s'explique simplement par le fait que c'est une des seules espèces arborescentes à être présente dans les trois sites d'échantillonnage. En effet, les environs des fonderies sont actuellement en régénération forestière, et le bouleau blanc est une des premières espèces colonisatrices à s'implanter dans ces milieux qui ont été contaminés par les émissions atmosphériques des fonderies pendant plus d'un siècle.

La forte contamination en métaux traces dans la région de Sudbury est à l'origine de sa sélection pour la campagne d'échantillonnage. En effet, les fonderies de Sudbury émettent dans l'atmosphère de grandes quantités de Cu et Ni, et relâchent également les éléments Cd, Pb et Zn dans l'environnement quoique de façon beaucoup moins abondante. Bien qu'ils soient émis en quantités substantiellement réduites actuellement suite au développement de nouvelles technologies et à la réglementation des émissions atmosphériques, jusqu'à 1000 tonnes an^{-1} de Cu et de Ni ont toutefois déjà été relâchées dans l'atmosphère durant les années 1970 (Dudka *et al.*, 1995). Le choix du Cu libre pour la comparaison de la spéciation en solution

entre la rhizosphère et la matrice se justifie d'une part par l'importance de ce contaminant dans la région à l'étude, et d'autre part en raison de l'existence d'un instrument de mesure directe, l'électrode sélective de cuivre (Cu-ISE) qui permet une mesure rapide et efficace de l'activité du Cu libre (Cu^{2+}) en solution. De telles électrodes assurant la mesure de la forme ionique libre n'existent pas pour Ni, Pb et Zn, alors que Cd^{2+} est présent à des niveaux trop faibles pour recourir à l'électrode sélective de Cd. De plus, Sauvé *et al.* (1995) ont montré qu'il n'existait pas ou très peu d'interférences entre le Cu^{2+} et les autres cations métalliques en solution.

La section suivante présente l'article qui a été rédigé suite à la réalisation du projet. L'article intègre une synthèse de la revue de littérature présentée dans la section précédente, de façon à contextualiser les objectifs spécifiques de même que les résultats principaux de notre étude. La méthode d'acquisition de la rhizosphère, les analyses chimiques des métaux traces en phase solide et en solution de même que les traitements statistiques appliqués aux données sont tous présentés de façon détaillée dans la section 3.2 de l'article. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette étude de même qu'une mise en contexte de ces résultats avec ceux de publications antérieures sont ensuite présentés. L'article intègre finalement une conclusion générale portant sur les principaux résultats ayant contribué à l'avancement de nos connaissances sur les mécanismes de fractionnement et de spéciation des métaux traces dans la rhizosphère.

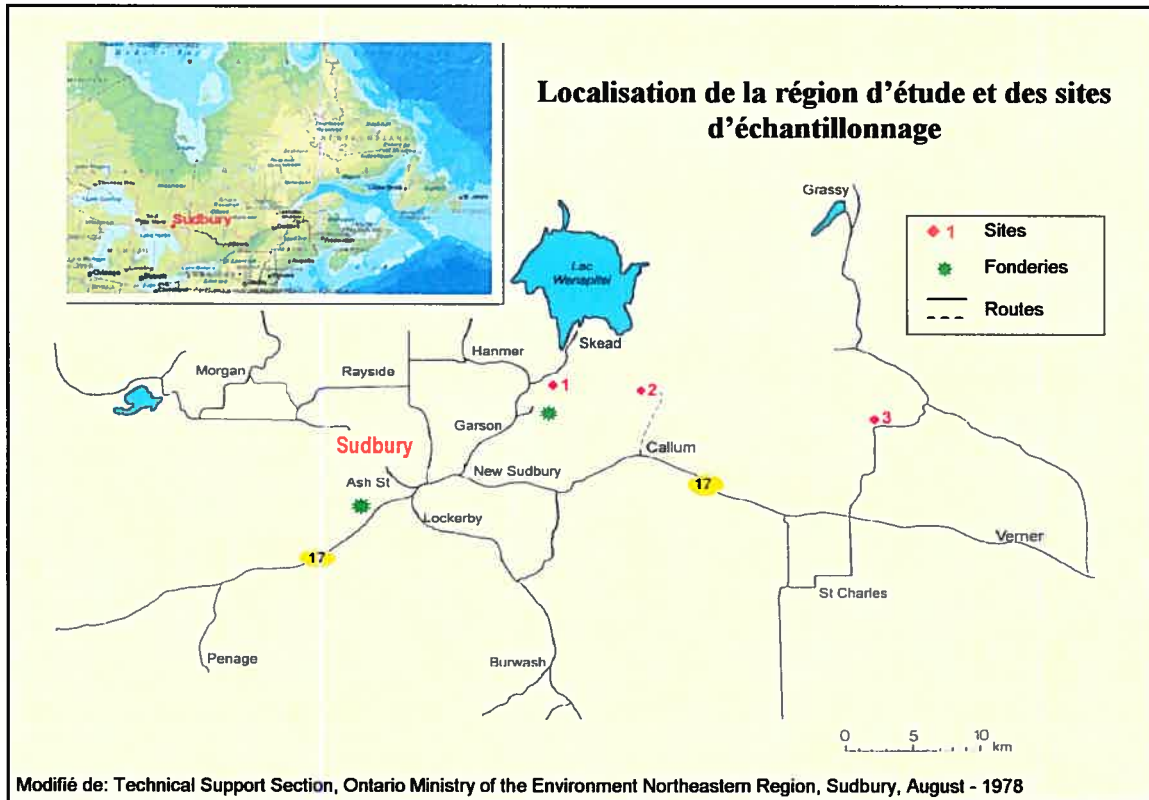


Figure 2.1. Localisation de la région d'étude et des sites d'échantillonnage.

a)



b)



c)



Figure 2.2. a) Technique d'échantillonnage des arbres sélectionnés; b) Horizons organiques et minéraux d'un podzol; c) Prélèvement des racines et de la matrice de sol dans l'horizon B sous un bouleau blanc au site 1.

3. SPECIATION AND BIOAVAILABILITY OF TRACE METALS (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) IN THE RHIZOSPHERE OF CONTAMINATED SOILS

3.1. INTRODUCTION

The rhizosphere has been recognized as a distinct micro-environment in which the properties and the intensity of soil processes differ from those of the bulk soil. Indeed, unique physical, chemical and biological characteristics emerge in the rhizosphere due to its proximity to roots and to the sites of nutrient uptake by plants (Marschner, 1995). The most widely reported changes occurring in the rhizosphere as compared to the bulk soil include acidification, organic matter (OM) enrichment both in the solid and liquid phase, intensified mineral weathering as well as a higher microbial biomass and activity (Gobran *et al.*, 1998). Interestingly, the pH and the OM content are two of the most influential variables in the determination of metal speciation (Lindsay, 1979; McBride, 1994), defined as the distribution of an element into its various chemical forms such as free ions, soluble and exchangeable forms, organic complexes, inorganic fractions adsorbed to or co-precipitated with neoformed solid phases as well as species included into primary mineral structures. Herein, the subdivision of an element into its various chemical forms will be referred to, on the one hand, as fractionation for all the analyses in the solid phase and, on the other hand, as speciation for the analyses in the liquid phase.

The specific physico-chemical and biological characteristics of the rhizosphere such as the pH, the OM content and the exudation of organic substances by roots, mycorrhizae and microorganisms all contribute to the establishment of distinct trace metal species and metal pools covering a range of bioavailability levels (McLaughlin *et al.*, 1998; Assadian and Fenn, 2001). Metal bioavailability varies with the chemical form and can be defined as the capacity of a metal to be transferred from a soil compartment to living organisms such as plants (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Because the total soil metal content does not necessarily reflect the bioavailability of metals and their potential phytotoxicity to plants and soil organisms, the fractionation of trace metals has to be established in order to understand the bioavailability of metals (Vaughan *et al.*, 1993; McBride, 1994). The dissolved free metal ion in the soil solution is generally considered as the most readily available and

therefore the most toxic chemical form (Wang and Benoit, 1996; Weng *et al.*, 2001). Yet, total soluble and exchangeable metal forms in soils as well as some organo-metallic complexes are also considered as mobile and potentially bioavailable chemical forms because of their transfer to plant roots on a time scale corresponding to the rate of plant assimilation (Løbersli *et al.*, 1991; Kabata-Pendias and Pendias, 1992). The determination of trace metals bioavailability is also strongly related to the specific characteristics of the studied plant and to the various soil conditions under which it grows (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

Many studies have shown that the free metal fraction in the soil solution correlates best with metal concentrations found in plant roots and/or shoots. For example, Sauvé *et al.* (1996) showed that Cu concentrations in plant tissues of radish (*Raphanus sativus* cv. Cherry Belle), lettuce (*Lactuca sativa* cv. Buttercrunch) and ryegrass (*Lolium perenne* cv. Barmultra) were best correlated with Cu^{2+} activity in the solution, which was considered a better indicator of bioavailability than total soil or total dissolved Cu concentrations. Minnich *et al.* (1987) also found that Cu accumulation in roots and shoots of young snapbeans (*Phaseolus vulgaris* L.) correlated well with Cu^{2+} activity in soils, and also with DTPA-extractable Cu. In addition, Shenker *et al.* (2001) showed that uptake of Cd by wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) was most influenced by Cd^{2+} activity in solution, while Knight *et al.* (1997) found a strong correlation ($r^2 = 0.80$) between the shoot Zn concentrations of *Thlaspi caerulescens* (J & C Presl.) and Zn^{2+} activity in solution. The importance of the uptake by plants of metals present as metal-organic complexes must also be stressed as several studies have shown evidence of the assimilation of this metal fraction by higher plants. For instance, Laurie *et al.* (1991) showed that the chelating agent EDTA increased the Cu, Zn and Mn concentrations in plant tissues of barley (*Hordeum vulgare* L.). Cie liński *et al.* (1998) showed phytoaccumulation of Cd complexed with low-molecular-weight organic acids (LMWOAs) in durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*), while Huang *et al.* (1997) found increased Pb concentrations in shoots of corn (*Zea mays* L. cv. Fiesta) and pea (*Pisum sativum* L. cv. Sparkle) with the addition of organic chelates in Pb-contaminated soils. Currently, we know that the chemical forms under which preferential uptake of micronutrients by plants occurs vary with the type of plants. It is clear, however, that the processes involved are still a matter of debate (Laurie and Manthey, 1994).

There is currently no consensus on whether rhizospheric processes augment or impoverish the bioavailable metal pool. The conceptual model developed by Gobran and Clegg (1996) to assess nutrient availability in the mineral soil:root system suggests that roots and their associated organisms maintain a higher level of macro- and micronutrient availability in the rhizosphere as compared to the bulk soil of forested mineral soils mainly through the release, transport and accumulation of reactive OM. Accordingly, the interaction of soil, roots and microorganisms creates a distinct soil environment characterized by enhanced moisture content, mineralization rates and exchange sites, all of which contribute to increasing the bioavailable nutrient pool in the rhizosphere. Other authors have also shown that the bioavailable trace metal fraction is usually higher in the rhizosphere compared to the bulk soil (Marschner and Römheld, 1996; Hinsinger, 1998; Marschner, 1998). For instance, Courchesne *et al.* (2001) found a higher content of BaCl_2 exchangeable metals (Al, Fe, Mn, Cu and Zn) in the rhizosphere of balsam fir (*Abies balsamea* L.) and black spruce (*Picea mariana* Mill.) as compared to the bulk soil, suggesting the existence of a higher bioavailable metal pool close to the roots and to the sites of elemental uptake by plants. From different experimental contexts, such as a rhizobox study (Chino *et al.*, 1999) and field study on salt cedar (*Tamarix gallica*) and bermudagrass (*Cynodon dactylon*) (Fenn and Assadian, 1999), a higher soluble Cu content has been reported in the rhizosphere as compared to the bulk soil. This enhanced elemental bioavailability in the rhizosphere was also observed for many nutrients such as Ca, K, Mg, Mn and is attributed to the presence of root exudates, organic substances, higher microorganism activity and to the proximity of microsites enriched in OM (Wang and Zabowski, 1998; Schöttelndreier and Falkengren-Grerup, 1999).

Contradictory findings have been reported in other studies where the rhizosphere is depicted as an environment depleted in bioavailable metal pools. Cherrey *et al.* (1999) found the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* cv. Aubisque) to be impoverished of extractable Cu (EDTA, DTPA or CaCl_2). Furthermore, Lorenz *et al.* (1997) reported lower concentrations of soluble Cd and Zn in the rhizosphere than in the bulk soil. In a comparison of the soil solution concentrations of Cd and Zn before and after the growth of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, Knight *et al.* (1997) observed a decrease in the total Cd and Zn concentrations in the soil solution of the rhizosphere, as well as in the free Cd^{2+} and Zn^{2+} concentrations.

The need to assess the speciation of trace metals and to estimate their bioavailability in the plant root environment is essential in order to establish the extent of trace metal contamination in soils and to address their potential adverse effects. Although the bioavailability of metals is best predicted by their liquid phase speciation, the assessment of the trace metal fractionation in the solid phase is nonetheless essential because the replenishment rate of metals in the soil solution is controlled by solid phase metals (Minnich *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 2001; Gummuluru *et al.*, 2002). For instance, Zhang *et al.* (2001) showed that Cu concentrations in plant parts correlated best with the “effective Cu concentration”, which was defined as the Cu concentration in the soil solution combined with an estimated concentration representing the amount of Cu transferred from the solid phase to the soil solution. McGrath *et al.* (1997) and Knight *et al.* (1997) also showed that 90 to 99 % of the total Zn taken up by *Thlaspi caerulescens* originated from the non-mobile fractions of the solid phase (the mobile fractions being described here as the soluble and exchangeable fractions) .

Most studies focusing on the differences in elemental speciation between the rhizosphere and the bulk soil have been performed under controlled conditions, either in the laboratory or in greenhouses. Moreover, the majority of these studies have focused on the speciation of macronutrients such as Ca, K and Mg and have used the rhizosphere and bulk soil of cultivated agricultural species. Very few studies have looked at the contrast in trace metal speciation between the rhizosphere and the associated bulk soil in forested ecosystems. This gap in knowledge may be due to the practical difficulties associated with the separation of soil components and with the collection of rhizosphere materials in the field. We believe it is essential to integrate the rhizosphere as a distinct biogeochemical compartment in field studies of forested ecosystems. Indeed, its crucial influence on the biochemical cycles of nutrients and trace metals is large compared to the small volume it occupies in soils. In this context, the specific objectives of this study are i) to contrast the solid phase fractionation of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) among the inner rhizosphere, the outer rhizosphere and the bulk components of forest mineral soils along a soil contamination gradient and ii) to determine Cu^{2+} activity in the liquid phase and establish the relationships with pH, dissolved organic carbon (DOC) and total dissolved Cu. The emphasis is put on easily extractable metal forms and on liquid phase speciation because readily dissolved metal complexes and free metal ions are assumed to represent most of the

potentially bioavailable metal fractions in soils. In addition, the use of a soil contamination gradient offers a working range of metal concentrations in soils to test whether the rhizosphere effect varies with the metal content of the soil.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. Study area

The study area is located in the Sudbury region, Ontario, Canada. This area is host to some of the largest Ni and Cu mine sites in the world. The exploitation of these metals began at the end of the 19th century and is still very active today. Thus, forests and soils of the Sudbury area have been impacted for over a century by smelting activities and their environmental consequences such as logging, fire and atmospheric emissions of gaseous and particulate pollutants (Freedman, 1978). Since the building of a 380 m smokestack in the seventies, levels of pollutants in the area surrounding Sudbury have been greatly reduced. This has progressively led to the recolonization of plant species such as birch trees where conditions permitted its growth (Freedman, 1978). This “superstack” has also caused the dispersion of emitted pollutants over a much larger region. For instance, less than 2% of the emitted sulfur and only 40% of Cu and Ni were deposited within a 60 km radius of the smelter, causing this area and that beyond to suffer from a regional acidity problem (Freedman and Hutchinson, 1980).

3.2.2. Experimental design, site description and sample collection

In order to have a gradient of soil contamination, we have selected three sites along the prevailing wind direction, that is from west to east. The sites are respectively located at 2.5, 15 and 43 km from the Falconbridge Cu-Ni smelter. Site 1, at 2.5 km, is located on a fluvial deposit. The vegetation is composed of planted white pines (*Pinus strobus* L.) with small and naturally regenerating white birch (*Betula papyrifera* Marsh.). Approximately 20 % of the canopy is occupied. Site 2, at 15 km, is located on a glacio-fluvial deposit. The mixed vegetation is composed of white pine, paper birch, trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.), red oak (*Quercus rubra* L.), red maple (*Acer rubrum* L.), balsam fir (*Abies balsamea* L.) and

white spruce (*Picea glauca* Moench.) and the canopy coverage is 100 %. Site 3, at 43 km, is located on a fluvial deposit and the vegetation is dominated by mixed balsam fir, paper birch, trembling aspen and white spruce with a canopy coverage of 100 %. All three sites have acidic, mild mesic soils designated as orthic humo-ferric podzols according to the Canadian System of Soil Classification (Soil Classification Working Group, 1998).

Rhizosphere and bulk soil samples were collected at each site. To assess field variability as well as to ensure the collection of sufficient quantities of rhizospheric material, the B horizon of 6, 4 and 3 white birch trees was sampled at sites 1, 2 and 3, respectively. The average age of the trees is 12, 30 and 15 years at sites 1, 2 and 3, respectively. Mineral horizons have been selected because the majority of the living fine roots in forested ecosystems are found in the subsurface horizons (Persson *et al.*, 1995). The rhizosphere and bulk soil acquisition is adapted from the method presented in Gobran and Clegg (1996). The separation of the rhizosphere from the bulk soil was performed on site, where the collected roots were gently shaken. The detached soil material was defined as the bulk soil. The roots were subsequently stored in sterile plastic bags and brought back to the laboratory, where the rhizosphere soil was further separated from the roots. All bulk soil samples were air dried and sieved within one week upon arrival in the laboratory while the root samples were stored at 4° C until further treatment. In order to further refine the gradient between the bulk soil and the rhizosphere, we divided the rhizosphere into two components; the outer and the inner rhizosphere. The outer rhizosphere corresponds to the soil component defined as the rhizosphere in Gobran and Clegg (1996), which is obtained by gently shaking the roots to recover all fallen rhizospheric soil particles. The inner rhizosphere rather corresponds to the component defined in Gobran and Clegg (1996) as the soil-root interface, which represents the soil still adhering to the shaken roots. This material is obtained by gently scrubbing off the remaining soil particles. Any remaining root material in the soil samples was retrieved using plastic tweezers. All bulk and rhizosphere soil samples were sieved to 0.5 mm with a stainless steel screen in order to homogenize the particle-size distribution of the different soil components.

3.2.3. Laboratory analyses

3.2.3.1. Chemical and physical soil properties

To characterize the mineral soil, selected chemical and physical analyses were performed on the bulk soil of one field replicate for each site. The pH and electrical conductivity (EC) of the bulk soil were respectively measured using a Fisher Scientific Accumet® pH meter-10 with a glass body electrode and a Radiometer CDM 83 conductivity meter. The pH was measured using 3 g of soil with 30 ml H₂O, while EC was measured using 5 g of soil with 10 ml H₂O. Cation exchange capacity (CEC) was determined after measuring the concentrations of Ca, Na, Mg, K, Fe, Al and Mn using 3 g of soil with 30 ml 0.1 M BaCl₂ (Hendershot and Duquette, 1986). Cation concentrations were measured with an atomic absorption spectrophotometer (AAS; Varian AA-1475). Organic carbon in the solid phase was measured by a K₂Cr₂O₇ titration with FeSO₄, according to the modified Walkley-Black method (Carter, 1993). The Fe, Al and Mn contents in Na-pyrophosphate, acid ammonium oxalate and dithionite-citrate (DC) extractions were measured in order to evaluate the accumulation of weathering products (Sheldrick, 1984). Analyses were performed by AAS. For the Na-pyrophosphate extraction, 0.3 g of soil was used with 30 ml of 0.1 M Na₄P₂O₇. The acid ammonium oxalate extraction was performed using 0.25 g of soil and 10 ml of 0.2 M (NH₄)₂C₂O₄·H₂O. As for the DC extraction, 0.5 g of soil with 25 ml of 0.68 M Na₃C₆H₅O₇·2H₂O and 0.4 g of Na₂S₂O₄ was used. The mineralogy of the clay-sized particles was determined by X-ray diffraction (XRD) after pre-treatment with dithionite-citrate-bicarbonate (DCB) to remove Fe and Al sesquioxides. Samples were saturated with K and Mg, mounted in preferential orientation and analysed following different treatments (K at room temperature, K heated to 300° C and 550° C, Mg at room temperature and Mg saturated with ethylene-glycol) (Brindley and Brown, 1980; Dixon and Weed, 1989). The mineral abundance of each sample was determined using an I/I_{QZ} ratio, where the integrated intensity of each mineral (I) is normalized to the intensity of the quartz peak (I_{QZ}) at $d = 0.426$ nm (Courchesne and Gobran, 1997). Proportions of sand, silt and clay in the bulk soil were estimated using the hydrometer technique after the addition of 5 g L⁻¹ Na-metaphosphate. The samples were pre-treated with DCB in order to remove all Fe oxides.

3.2.3.2. Solid phase trace metal fractionation

Three distinct extractions combined with an acid digestion were performed to operationally establish the fractionation of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in the solid phase of the bulk soil, the outer rhizosphere and the inner rhizosphere. The extractants used were H₂O, 0.1M BaCl₂ and 0.1M Na₄P₂O₇ while a HNO₃-HCl mixture was used for the acid digestion. These extractions yield a reliable estimation of the potential mobility and bioavailability of trace metals in the solid phase (Morgan and Stumm, 1991; Assadian and Fenn, 2001; Lasat, 2002). The H₂O extraction provides an estimation of the water-soluble metal species, while the BaCl₂ extraction informs on the exchangeable metal fraction of the solid phase. These two fractions are considered to include the most mobile chemical forms (Kabata-Pendias and Pendias, 1992) and will hereafter be referred to as the potentially available metal pool. The Na₄P₂O₇ (Napyrophosphate) extraction estimates the metal fraction associated with organic matter (OM). This fraction is not considered as readily available, as the OM usually forms stable complexes with metals (Løbersli *et al.*, 1991). The acid digestion dissolves most metal forms which, in this case, include the metals from the three previous fractions as well as residual chemical forms such as metals associated to amorphous and crystalline oxides. However, this acid digestion does not completely dissolve metals from the structures of primary minerals. Nevertheless, in this study the HNO₃-HCl digested metals will be considered to reflect the total-recoverable metal content of any soil component. Hence, the power of the various extractants used follows the order: HNO₃-HCl digestion > Na₄P₂O₇ > BaCl₂ > H₂O.

Based on the method used by Séguin *et al.* (2003), the H₂O extraction was performed using 3 g of soil with 30 ml of ultra-pure water (UP). The samples were placed on an end-over-end automatic shaker for two hours, and centrifuged for 10 minutes at 1500 g. The solution was filtered using 0.45 µm polyethersulfone (PES) Millipore Durapore® filters, and acidified with 2% Trace Metal Grade (TMG) HNO₃. Non-acidified aliquots of all H₂O extracts were set aside for the subsequent measurement of dissolved organic carbon (DOC), pH and pCu²⁺. All samples were analysed on an inductively coupled plasma – mass spectrometer (ICP-MS) to ensure optimal detection limits. Quality control was enforced by using both inner and outer laboratory controls, as well as spiked samples whose recovery rates varied between 90 % to 110 %. All soil samples were analysed in triplicates. The BaCl₂ extraction was performed as indicated previously. The triplicate samples were shaken for two

hours, centrifuged at 1500 g for 10 minutes, then filtered and acidified in the same way as the water extract. All trace metals were analyzed by ICP-MS, except for Zn which was measured on an AAS. For the Na-pyrophosphate extraction, the samples were shaken for 16 hours. At the end of this period, 0.5 ml of a 0.1 % Superfloc solution (Rotterdam, Netherlands) was added to maximize the centrifugation procedure (10 minutes at 1500 g). Samples were subsequently filtered and acidified as in the previous extractions, and analysed on an inductively coupled plasma – atomic emission spectrometer (ICP-AES). Triplicates were extracted for all bulk soil samples, whereas the outer and the inner rhizosphere samples were analysed in duplicates. For the acid digestion, the amount of soil used varied between 0.2 to 0.5 g, depending on the OM content. As such, 0.2 g of soil was used for the inner rhizosphere soil samples, while 0.5 g was needed for the bulk soil samples. These quantities were combined with 9 ml of HNO₃ and 2 ml of HCl. The acid digestion method was modified from the US-EPA SW3051-A method (1998). The digestion was performed in a CEM MDS-2000 microwave. Triplicates of all samples were digested at 100 PSI, with an average temperature of 155° C for 20 minutes. Afterwards, the digestion volume was adjusted to 40 ml with ultra-pure water (UP) and the samples were centrifuged for 10 minutes at 900 g. Solutions were slowly decanted to retain only the supernatant. Trace metal concentrations of all triplicates were measured on an AAS.

3.2.3.3. *Liquid phase speciation of total dissolved Cu*

In order to fulfill the second objective of this study, DOC, pH and the activity of free Cu²⁺ ions (pCu²⁺) were measured in the liquid phase of all soil components. As previously mentioned, aliquots were taken from the non-acidified H₂O extracts to measure DOC concentrations, pH and pCu²⁺, and were subsequently analysed for Cu, here termed total water-soluble Cu. To optimize pCu²⁺ measurements, potassium nitrate was added to the water extracts in order to homogenize the ionic strength of the solutions and to obtain a final concentration of 0.01M KNO₃. The DOC concentrations were measured with a Shimadzu TOC analyser (Kyoto, Japan), while pH values were obtained with a Radiometer PHM 82. The pCu²⁺ measurements were conducted with an Orion 9629 *ionplus* Series™ cupric ion selective electrode (Cu-ISE) and a Fisher Scientific Accumet® 910 pH meter. The determination of pCu²⁺ values as well as the electrode calibration are based on a protocol developed by Sauvé

et al.(1995). Modifications to this method include the use of a magnetic stirrer that was placed in the water extract in order to speed up electrode equilibration time. Moreover, the calibration equations that were calculated for each day of analysis ($n = 7$) in order to convert voltage readings (mV) into pCu^{2+} values were all integrated into a single mean equation. The purpose of this integration was to reduce the effect of the daily fluctuations of the standards on the calibration equations. The external and the internal laboratory quality controls gave similar results whether we used the average or the daily calibration equations. At the end of each day, two standards used for electrode calibration were reanalyzed in order to evaluate the accuracy of readings and to identify any potential instrumental drift.

3.2.3.4. *Statistical analyses*

The non-parametric Friedman test was used to evaluate the significance of differences between the three soil components for a given site, metal, and extractant, as well as between sites for a given soil component. Non-parametric statistics were chosen because of the small number of samples available for the statistical analyses. Indeed, the sample numbers were not high enough to meet the normality assumption of parametric tests. The non-parametric Wilcoxon signed rank test was used to evaluate the significance of differences between the bulk soil and the inner rhizosphere only when the Friedman test failed to yield any significant differences between the three soil components. The significance level used for the Friedman and the Wilcoxon tests was $\alpha \leq 0.10$. Stepwise multiple linear regressions were performed with pCu^{2+} , pH, DOC and total water-soluble Cu. For this purpose, the data for DOC and total water-soluble Cu were log-transformed. The significance level used was $\alpha = 0.05$. All statistical analyses were performed using the SPSS 10.0 software for Windows.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1. Soil properties

The characteristics of the bulk soil, measured on one field replicate at each site, are presented in tables 3.1 and 3.2. The pH values of the bulk soil are more acidic at site 1, close to the smelter, and gradually increase towards site 3. The

Table 3.1. Chemical and physical properties of the bulk soil in the B horizon at the three sampling sites. Values in parentheses are standard deviations calculated from laboratory triplicates.

Site	pH	EC ^a $\mu\text{S cm}^{-1}$	CEC ^b cmol kg^{-1}	Org C ^c %	-----Fe ^d -----			-----Al-----			Sand %	Silt %	Clay %
					Na-pyro %	Oxal. %	DC %	Na-pyro %	Oxal. %	DC %			
1 (2.5 km)	4.84	65.1	0.66 (0.08)	0.97	0.13 (0.01)	0.42 (0.01)	0.58 (0.03)	0.21 (0.00)	0.55 (0.02)	0.47 (0.04)	64.6	30.0	5.4
2 (15 km)	4.88	43.4	1.25 (0.05)	1.61	0.31 (0.02)	0.57 (0.01)	0.73 (0.01)	0.37 (0.02)	0.69 (0.02)	0.77 (0.04)	47.5	43.5	9.0
3 (43 km)	5.26	52.4	1.24 (0.10)	2.12	0.27 (0.00)	0.62 (0.03)	1.01 (0.01)	0.42 (0.01)	1.05 (0.05)	1.05 (0.03)	42.9	44.1	13.0

^a EC = Electrical Conductivity.

^b CEC = Cation Exchange Capacity.

^c Org C = Organic Carbon in the solid phase.

^d Fe and Al contents (%) were determined using 0.1M Na₄P₂O₇ (Na-pyro), 0.2 M (NH₄)₂C₂O₄.H₂O (Oxal.) and 0.68M Na₃C₆H₅O₇.2H₂O with Na₂S₂O₄ (DC).

Table 3.2. Mineral abundance in the clay-sized particles of the B horizons at the three sites.

Sites	Quartz	Plagioclase	Chlorite	Mica	K-Feldspar	Amphibole	Mica-Vermiculite
1 (2.5 km)	+++ ^a	+++	++	++	++	+	tr
2 (15 km)	+++	+++	++	++	++	+	tr
3 (43 km)	+++	++	+++	++	+	+	tr

^a +++ : dominant; ++ : major; + : minor; tr : trace

deposition of atmospheric pollutants such as sulphur compounds is most probably responsible for the soil acidification observed close to the smelter. The EC and CEC values of the three sampling locations do not follow any specific trend although site 1 exhibits both the highest EC value and the lowest CEC. Soil organic C content increases with distance from the smelter, reflecting the increase in canopy density. The amounts of Fe and Al extracted by acid ammonium oxalate and DC also increase gradually from site 1 to site 3. The proportion of sand in the bulk soil decreases from site 1 to site 3 as the silt and the clay contents increase.

Table 3.2 presents the mineralogy of the clay-sized particles of the bulk soil at each sampling site. The ordination of the various minerals is based on their relative abundance with respect to quartz (I/I_{QZ}). The relative abundance of each mineral follows the order: Quartz \approx Plagioclase > Chlorite \approx Mica \approx K-Feldspar > Amphibole > Mica-Vermiculite. The mineralogical data underline the homogeneity of the clay-sized particles in the bulk soil component of the three sites. The similarity in trace metal concentrations in the acid extraction further emphasizes the homogeneity of the B horizons along the gradient as shown for total-recoverable Cd and Pb in figure 3.1.

3.3.2. Solid phase trace metal fractionation

3.3.2.1. Soil contamination gradient at Sudbury

Tables 3.3 and 3.4 show that metal concentrations are decreasing from site 1 to 3 for a number of metal-extractant combinations. This observation points towards the existence of a soil contamination gradient with metal concentrations in the B horizon decreasing with distance from the smelter. Figure 3.2 illustrates this gradient for water-soluble Cd, Cu and Ni concentrations. In these cases, the soil contamination gradient is significant for the three soil components, with the level of significance varying from $p \leq 0.10$ to $p \leq 0.05$ (table 3.4).

When all extractants are considered, the soil contamination gradient is most significant for Cu and Ni, the two dominant metals in the smelter emissions. In fact, almost all Cu fractions show a significant soil contamination gradient in each of the three components. As for Ni, the water-soluble and $BaCl_2$ exchangeable fractions from the three soil components exhibit a significant soil contamination gradient (table 3.4).

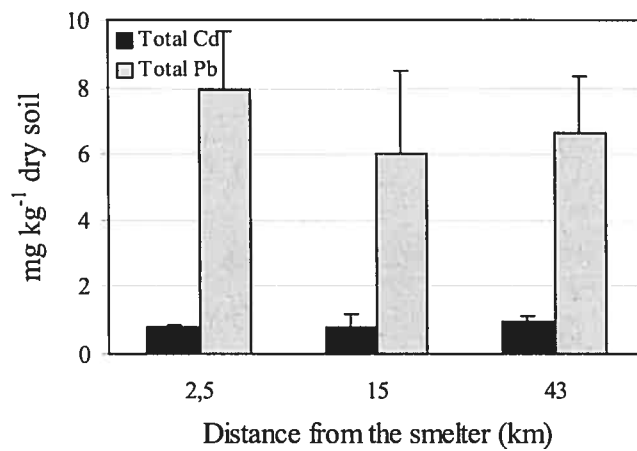


Figure 3.1. Concentrations of total-recoverable Cd and Pb (Total) in the bulk soil determined by HNO₃-HCl digestion at each sampling site. Mean values and standard deviations are calculated from the field and the laboratory replicates. The three sites did not show any significant differences in either total-recoverable Cd or Pb.

Table 3.3. Mean trace metal concentrations of field and laboratory replicates for the three soil components and at each site. Values in parentheses are standard deviations.

Extraction	Cd (mg kg ⁻¹)			Cu (mg kg ⁻¹)			Ni (mg kg ⁻¹)			Pb (mg kg ⁻¹)			Zn (mg kg ⁻¹)		
	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner
	rz ^a	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz	rz
Site 1 (2.5 km)															
H ₂ O (water-soluble)	0.011 (0.004)	0.024 (0.007)	0.028 (0.017)	** ^b 0.156 (0.102)	0.386 (0.132)	0.490 (0.174)	*** 1.34 (1.27)	1.47 (0.77)	2.01 (1.13)	** 0.003 (0.004)	0.008 (0.003)	0.003 (0.003)	0.180 (0.015)	0.219 (0.090)	0.251 (0.067)
BaCl ₂ (exchangeable)	0.058 (0.013)	0.136 (0.054)	0.187 (0.098)	** 0.750 (0.522)	2.59 (0.94)	2.49 (0.88)	*** 3.20 (3.66)	4.75 (2.79)	6.06 (4.88)	● 0.092 (0.049)	0.054 (0.018)	0.054 (0.024)	0.409 (0.189)	0.618 (0.229)	0.735 (0.317)
Na-pyro (organo-compl.)	0.861 (0.282)	1.41 (1.05)	1.09 (0.37)	** 11.39 (5.05)	25.73 (7.19)	25.71 (7.07)	*** 5.32 (3.81)	5.36 (1.87)	7.02 (4.07)	● 7.45 (2.11)	6.83 (2.03)	6.83 (2.03)	3.21 (2.02)	1.48 (0.78)	1.34 (0.63)
Acid (total-recoverable)	0.783 (0.086)	1.07 (0.23)	1.33 (0.39)	** 21.90 (7.51)	41.59 (9.26)	40.41 (10.54)	** 39.11 (14.85)	31.65 (5.65)	39.23 (11.91)	** 7.92 (1.74)	20.83 (3.59)	20.83 (3.59)	22.96 (6.48)	23.02 (9.56)	23.67 (7.82)
Site 2 (15 km)															
H ₂ O (water-soluble)	0.004 (0.003)	0.005 (0.003)	0.007 (0.004)	** 0.024 (0.013)	0.061 (0.025)	0.075 (0.035)	● 0.585 (0.332)	0.929 (0.483)	1.24 (0.63)	** 0.008 (0.003)	0.007 (0.002)	0.004 (0.001)	0.112 (0.043)	0.142 (0.054)	0.181 (0.073)
BaCl ₂ (exchangeable)	0.046 -	0.059 -	0.075 (0.018)	0.056 (0.033)	0.115 (0.090)	0.160 (0.099)	● 2.14 (0.574)	5.25 (1.15)	6.09 (1.45)	** 0.049 (0.005)	0.064 (0.013)	0.085 (0.023)	0.330 (0.084)	1.00 (0.18)	1.16 (0.06)
Na-pyro (organo-compl.)	1.12 (0.15)	1.66 (0.25)	1.56 (0.31)	** 1.79 (0.74)	3.26 (1.58)	3.55 (1.76)	** 3.37 (0.80)	5.02 (2.01)	4.75 (1.74)	** 9.09 (1.56)	10.42 (0.86)	9.97 (1.19)	2.65 (2.15)	1.39 (0.78)	0.627 (0.504)
Acid (total-recoverable)	0.769 (0.403)	1.29 (0.209)	0.888 (0.220)	5.47 (1.06)	9.52 -	8.70 (2.87)	24.30 (3.89)	28.46 (5.81)	25.45 (5.32)	** 6.04 (2.44)	18.19 (6.02)	20.05 (2.31)	18.25 (2.61)	21.61 (3.03)	20.36 (3.49)
Site 3 (43 km)															
H ₂ O (water-soluble)	0.001 (0.0001)	0.004 (0.001)	0.003 (0.002)	0.013 (0.010)	0.058 (0.024)	0.062 (0.036)	* 0.073 (0.020)	0.201 (0.030)	0.244 (0.031)	** 0.009 (0.003)	0.009 (0.003)	0.007 (0.002)	0.062 (0.029)	0.227 (0.049)	0.205 (0.050)
BaCl ₂ (exchangeable)	0.050 (0.009)	0.091 (0.023)	0.101 (0.009)	0.008 (0.005)	0.061 (0.006)	0.075 (0.057)	* 0.583 (0.102)	2.32 (0.47)	2.26 (0.61)	* 0.022 (0.012)	0.066 (0.013)	0.066 (0.007)	1.01 (0.51)	3.25 (1.34)	3.19 (1.98)
Na-pyro (organo-compl.)	1.01 (0.35)	1.71 (0.61)	1.54 (0.70)	1.42 (0.04)	3.24 (0.86)	2.90 (0.47)	* 1.88 (0.17)	3.22 (0.25)	2.28 (0.52)	* 8.66 (1.64)	9.74 (2.48)	8.62 (2.50)	3.12 (2.17)	5.73 (3.71)	4.16 (3.02)
Acid (total-recoverable)	0.973 (0.171)	0.780 (0.344)	1.03 (0.04)	13.79 (5.29)	19.59 (1.74)	10.94 (4.86)	33.08 (8.49)	38.93 (6.04)	33.29 (5.04)	* 6.64 (1.67)	33.54 (5.17)	33.29 (3.02)	34.84 (7.17)	33.28 (10.73)	32.43 (7.51)

^a rz = rhizosphere. ^b Results of the Friedman test, where * = $p \leq 0.10$; ** = $p \leq 0.05$; *** = $p \leq 0.01$. The results of the test illustrate the significant differences found between the metal concentrations of the bulk soil, the outer rhizosphere and the inner rhizosphere for each extraction and sampling site. ^c Results of the Wilcoxon signed rank test, performed only following a negative Friedman test, where ● = $p \leq 0.10$ and ●● = $p \leq 0.05$. The results illustrate the significant differences found between the metal concentrations of the bulk soil and the inner rhizosphere for each extraction and sampling site.

Table 3.4. Differences^a in metal concentrations^b between the three sampling sites for a given soil component and extraction.

	Cd		Cu		Ni		Pb		Zn		Cu ²⁺					
	Bulk	Outer	Inner	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	IZ	
Extraction	IZ															
H ₂ O			**	*	*	*	**	**	*	*	*	*	*	*	**	**
BaCl ₂			**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Na-pyro			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Acid			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

^a Results of the Friedman test, where * = $p \leq 0.10$; ** = $p \leq 0.05$.

^b The values used in the Friedman test are means of the field and laboratory replicates.

^c *, ** = metal concentrations follow the gradient: site 1 > site 2 > site 3.

^d *, **, * = metal concentrations either follow the gradient: site 3 > site 2 > site 1, or do not show an apparent gradient.

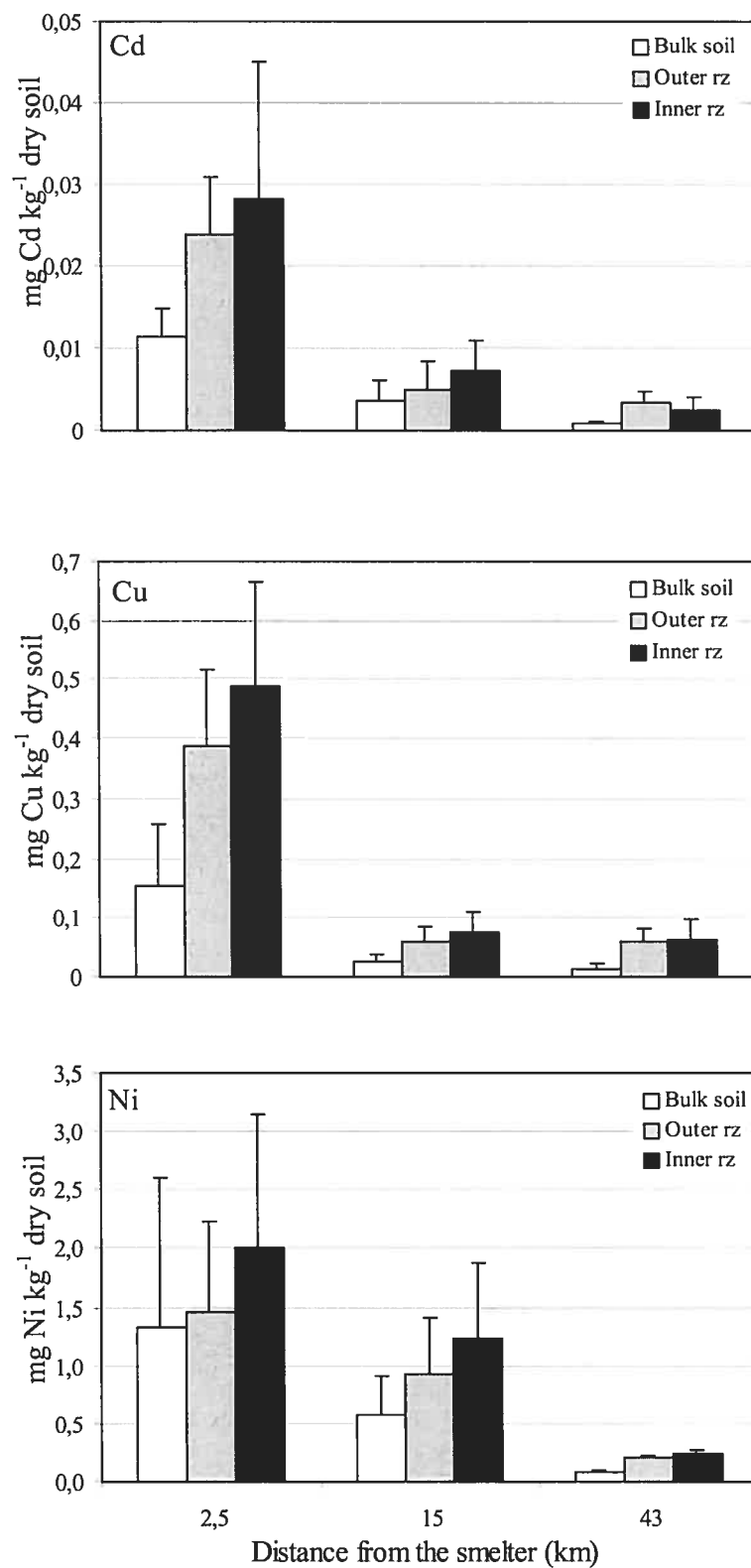


Figure 3.2. Concentrations of water-soluble Cd, Cu and Ni in the three soil components at each site. Values and standard deviations are means of the field and laboratory replicates.

Although decreasing metal concentrations with distance from the smelter are observed in a number of cases, some exceptions occur where a reversed concentration gradient exists. For example, the BaCl_2 exchangeable Zn concentrations in the outer and the inner rhizosphere are higher at site 3 while the lowest concentrations are found at site 1, close to the smelter. Other significant inverted concentration gradients occur in the outer rhizosphere for the organo-complexed Cd fraction and for the total-recoverable Pb fraction (table 3.4).

The decreasing soil concentrations observed with distance from the smelter is in agreement with results from other studies performed in the Sudbury area. For instance, Freedman (1978) measured Cu, Ni and Zn concentrations in organic horizons (L, F and Ah) at various distances from the Coppercliff smelter and found higher total Cu and Ni concentrations at sites closer to the smelter. Moreover, a strong positive spatial correlation existed between Cu and Ni ($r = 0.91$, $p \leq 0.001$), highlighting the fact that these two metals shared the same origin. Other studies also show that Cu and Ni concentrations are higher in the vicinity of the Sudbury smelters (Dudka *et al.*, 1995; Ontario Ministry of the Environment, 2001). Near Rouyn-Noranda, another smelting area in Eastern Canada, Dumontet *et al.* (1992) observed that Cd, Cu, Ni, Pb and Zn concentrations in mineral soils decreased with increasing distance from a Cu-Zn smelter. Although the surface litter was the most contaminated soil horizon, the 0-15 cm mineral soil also appeared contaminated by these trace metals. Séguin *et al.* (2003) measured water-soluble trace metal concentrations along a soil contamination gradient near the same Cu-Zn smelter in Rouyn-Noranda. The spatial distribution of the metals analysed (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) did not follow a specific trend with respect to metal contamination in soils. Séguin *et al.* (2003) explain the absence of a trend by the fact that their samples were collected in the mineral soil, a region of the soil profile that is often too deep to be affected by metal contamination, notably in clayey soils (Kabala and Singh, 2001; Ontario Ministry of the Environment, 2001). The absence of a contamination gradient observed for metals like Cd and Pb in the mineral horizons of our study might be explained similarly, as these metals are not known to be emitted in substantial amounts by the smelters of the Sudbury area (Freedman, 1978; Ontario Ministry of the Environment, 2001). Freedman (1978) also found that the total Zn concentrations in organic horizons slightly increased towards forest sites at greater distances from the smelter, which is concordant with our results. He suggested that the depleted total Zn concentrations at

sites close to the smelter could be due, among other factors, to the competitive replacement of Zn by Cu or Ni at cation exchange sites in the litter, and/or to the higher leaching rates measured in sites receiving higher levels of acidic precipitations.

3.3.2.2. Soil component gradient

Regardless of the statistical significance of the differences, the outer rhizosphere (25 cases) and the inner rhizosphere materials (29 cases) contain metal concentrations that are, in 90 % of all cases (five metals x four extracts x three sites), systematically higher than the levels found in the bulk soil. Moreover, the six cases out of 60 that have higher metal concentrations in the bulk soil than in either the outer or the inner rhizosphere concern Pb and Zn. These exceptions are mostly associated to the BaCl₂ exchangeable and the organo-complexed fractions for Pb and Zn. However, among these six exceptions, the only cases showing a significantly higher metal content in the bulk soil than in the inner rhizosphere originate from site 1.

Absolute concentrations

The Friedman test revealed a majority of situations in which the three soil components have significantly different metal concentrations, regardless of the extraction and the sampling location. In fact, 40 cases out of 60 show a statistically significant soil component differentiation with respect to metal concentrations, whether these concentrations are higher in the bulk soil, in the outer rhizosphere or in the inner rhizosphere. The trace metals associated with the largest number of significant soil component differentiation follow the order Cu > Zn > Pb > Cd > Ni.

The four Cd extracts in the three soil components are significantly different at site 1, close to the smelter where the Cd concentrations are the highest (table 3.3). The only significantly different Cd concentrations at site 2 are for the water-soluble and organo-complexed fractions, whereas only the organo-complexed Cd differs at site 3. In all cases Cd concentrations are higher in the rhizosphere.

On the other hand, Cu concentrations are statistically significant for almost every Cu extract and sampling location (table 3.3). The acid digestions performed at sites 2 and 3 are the only extracts which do not yield a significant difference. The outer or the inner rhizosphere nonetheless contain higher Cu concentrations than the bulk soil, in every extract and sampling location.

With the exception of the water-soluble Ni fraction, the soil components at site 1 are not significantly different based on Ni concentrations (table 3.3). This absence of significant differences for most Ni extracts at site 1 could be explained by the high heterogeneity of Ni concentrations between the field replicates. At site 2, the water-soluble, BaCl₂ exchangeable and organo-complexed Ni fractions are statistically different between the soil components ($p \leq 0.05$), while the differentiation of the soil components is only significant for the water-soluble and BaCl₂ exchangeable Ni fractions at site 3. The total-recoverable Ni concentrations in the three soil components are very homogenous and do not follow a specific soil component trend.

Despite the few situations where their concentrations are higher in the bulk soil, Pb and Zn generally follow the soil component differentiation observed for the other trace metals (table 3.3). Lead is the only trace metal for which significantly different total-recoverable concentrations are observed at all sites, where the total-recoverable Pb concentrations in the rhizosphere are largely superior to the levels found in the bulk soil. In the case of Zn, its water-soluble and BaCl₂ exchangeable fractions at all sites are statistically different in the three soil components. One of the two rhizosphere components systematically contains the highest Zn concentrations. However, the significance level of this differentiation gradually decreases along the sampling transect (from $p \leq 0.01$ at site 1 to $p \leq 0.10$ at site 3).

Enrichment ratios

Table 3.5 presents the average inner rhizosphere / bulk soil metal concentrations (mg kg^{-1}) ratios for each trace metal, chemical fraction and sampling location. For all sites and most metals (with the exception of Pb), the water-soluble and BaCl₂ exchangeable metal fractions show the greatest rhizosphere enrichment factors. Indeed, although higher absolute organo-complexed and total-recoverable metal concentrations are measured, the rhizosphere enrichment factor for these metal fractions is not as high as the enrichment factor of the more potentially available pools (water-soluble and BaCl₂ exchangeable fractions). In addition, Cu shows the highest rhizosphere enrichment ratios in water-soluble, BaCl₂ exchangeable and organo-complexed fractions, at all sites (table 3.5). However, these high Cu enrichment ratios all have very high standard deviations values (from 50 % to 100 %).

Table 3.5. Average Inner rhizosphere / Bulk soil ratios^a for trace metal concentrations.

Extraction	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
----- Site 1 (2.5 km) -----					
H ₂ O	2.5 (1.5)	5.2 (4.3)	2.2 (1.1)	2.3 (2.7)	1.5 (0.4)
BaCl ₂	3.9 (1.8)	6.5 (6.3)	3.4 (2.5)	0.8 (0.2)	1.9 (0.8)
Na-pyro	1.3 (0.1)	3.1 (2.2)	1.5 (0.8)	0.9 (0.1)	0.5 (0.4)
Acid	1.7 (0.4)	2.2 (1.2)	1.0 (0.2)	2.8 (0.9)	1.0 (0.1)
----- Site 2 (15 km) -----					
H ₂ O	2.2 (0.5)	3.6 (1.6)	2.2 (0.7)	0.7 (0.4)	1.6 (0.2)
BaCl ₂	2.2	4.7 (4.6)	2.9 (0.3)	1.7 (0.3)	3.7 (0.7)
Na-pyro	1.4 (0.2)	2.1 (0.7)	1.4 (0.3)	1.1 (0.1)	0.7 (1.2)
Acid	1.6 (1.2)	1.6 (0.6)	1.1 (0.3)	3.8 (1.6)	1.1 (0.1)
----- Site 3 (43 km) -----					
H ₂ O	3.0 (1.5)	5.9 (2.7)	3.6 (1.2)	0.7 (0.2)	3.6 (1.5)
BaCl ₂	2.0 (0.2)	14.2 (14.9)	3.9 (1.1)	2.3	3.1 (0.7)
Na-pyro	1.5 (0.3)	2.0 (0.3)	1.2 (0.2)	1.0 (0.1)	1.3 (0.7)
Acid	1.1 (0.2)	0.8 (0.3)	1.1 (0.5)	5.2 (1.3)	0.9 (0.1)

^a Inner rhizosphere metal concentration (mg kg⁻¹) / Bulk soil metal concentration (mg kg⁻¹). Values in parentheses are standard deviations of the field replicates.

Because they help evaluate the effect of soil contamination on the magnitude of the soil component differentiation (the rhizosphere effect), these enrichment ratios could constitute useful indicators of the soil response to environmental stresses. As such, the enrichment ratio values of the two main pollutants in the Sudbury area, Cu and Ni, evolve in a different way along the contamination gradient (table 3.5). For instance, no clear increase or decrease in the Ni enrichment ratios is discernable along the sampling transect, regardless of the chemical fraction. Indeed, the rhizosphere enrichment factor is higher for the water-soluble and BaCl₂ exchangeable Ni fractions as compared to the organo-complexed and total-recoverable fractions, but these ratios are similar at all sites and, moreover, the field variability of this rhizosphere enrichment is small. The rhizosphere enrichment ratios of all Cd fractions are also rather similar at all sites. On the other hand, the Cu, Pb and Zn rhizosphere enrichment ratios show larger fluctuations along the transect. For instance, the enrichment ratios of the BaCl₂ exchangeable Cu, Pb and Zn fractions increase along the contamination gradient. The Cu ratios show great field variability, however, which could exaggerate this trend. On the other hand, the enrichment ratios of total-recoverable Cu show a decreasing trend along the soil contamination gradient, while the total-recoverable Pb ratios increase from site 1 to site 3.

The existence of higher levels of metal pools in the rhizosphere has been reported in other studies of the rhizospheric environment. For instance, in a study on soil component differentiation under trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) along a soil contamination gradient, Séguin *et al.* (2003) showed that water-soluble Cd, Cu, Ni, Pb and Zn concentrations were higher in the inner rhizosphere and decreased towards the outer rhizosphere and the bulk soil. In addition, the rhizosphere enrichment in soluble metal species was confirmed at every sampling site, irrespective of the level of soil contamination. In a study on uncontaminated forest soils, Courchesne *et al.* (2001) found higher BaCl₂ exchangeable contents of Al, Fe, Mn, Cu and Zn in the rhizosphere than in the bulk soil. In a greenhouse experiment, using a rhizobox with planted wheat (*Triticum aestivum* L.), Wang *et al.* (2002) showed that the Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn bioavailable pools (combining soluble, exchangeable and carbonate bound metals) followed the order: near rhizosphere > near bulk soil > rhizosphere > bulk soil. In this study, the near rhizosphere, the near bulk soil and the bulk soil zones respectively correspond to subzones progressively distanced and separated from the rhizosphere by a nylon cloth.

Other studies focused on the rhizosphere enrichment in nutrients. As such, Gobran and Clegg (1996) showed that in soils of a Norway spruce stand (*Picea abies* (L.) Karst.), soluble and exchangeable cations Ca, Mg, Na and K increased following the order: bulk < rhizosphere < soil-root interface. In a field study comparing soil metal concentrations under five different herb species, Schöttelndreier and Falkengren-Grerup (1999) showed higher concentrations of BaCl₂ exchangeable K, Mg, Mn and Ca in the rhizosphere compared to the bulk soil. In agricultural soils, Chung and Zasoski (1994) showed significant enhancement of K and Al extracted with acid ammonium oxalate in the rhizosphere as compared to the bulk soil. A number of factors contribute to the enrichment of bioavailable metal pools in the rhizosphere. As such, root exudates, mainly comprised of organic and amino acids, have been shown to increase the solubility of metals and nutrients in the rhizosphere (Mench and Martin, 1991; Jones and Darrah, 1994; Wenzel *et al.*, 2003). The preferential accumulation of OM close to roots generates a higher number of cation exchange sites, and can thus enhance the exchangeable metal pool of the rhizosphere (Arocena *et al.*, 1999; Schöttelndreier and Falkengren-Grerup, 1999). The lower pH of the rhizosphere can also increase the solubility of metals and nutrients. For example, the increased extractability (1 M NH₄NO₃) of mobile Zn in the rhizosphere has been attributed to the acidification of this environment (McGrath *et al.*, 1997).

However, some studies found opposite results, where the rhizosphere was found to be depleted in metals and nutrients as compared to the bulk soil (Dieffenbach *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1997; Göttlein *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). In a pot experiment, Lorenz *et al.* (1997) showed that the growth of radish (*Raphanus sativus* cv. 'Crystal Ball') depleted the rhizosphere of water-soluble K, Ca, Mg, P, Mn, Cd and Zn, suggesting that the elemental uptake by plants was an important factor contributing to the depletion of elements near the roots. Dieffenbach *et al.* (1997) also showed a decrease in K and Mg concentrations in the soil solution near root tips and elongation zones of Norway spruce. The replenishment capacity of nutrients and trace metals by mass flow and diffusion in the soil solution is the main factor explaining the differing results found in the rhizosphere (Jungk, 1996).

3.3.2.3. Metal fractionation

The chemical fractionation of each metal is presented for the inner rhizosphere and the bulk soil in figure 3.3. As the extraction values in this figure are

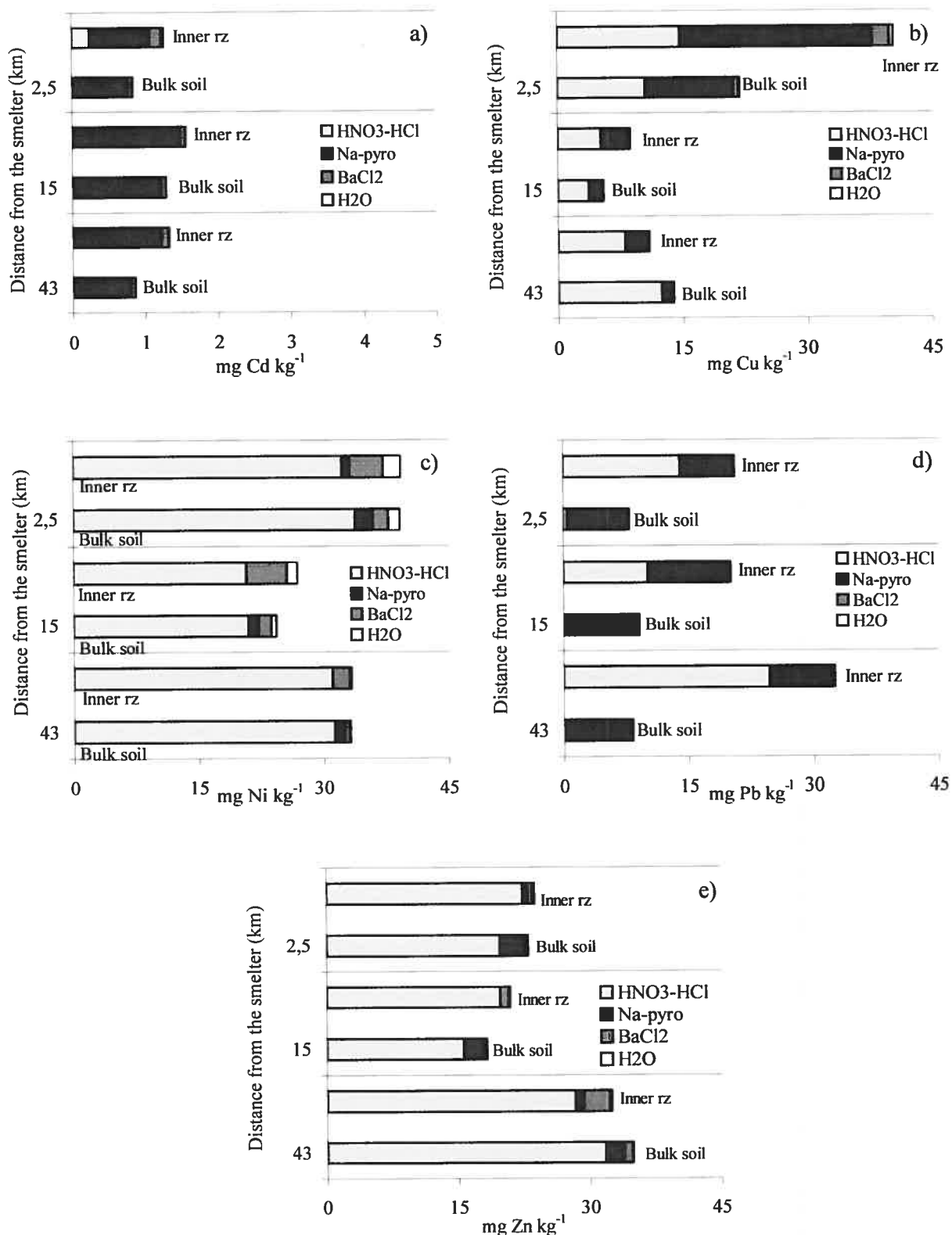


Figure 3.3. Trace metal fractionation for a) Cd, b) Cu, c) Ni, d) Pb and e) Zn in the bulk soil and the inner rhizosphere at each sampling site. The values for each fraction were determined by differencing, where the BaCl₂ exchangeable fraction (BaCl₂) = BaCl₂ – H₂O; the organo-complexed fraction (Na-pyro) = Na-pyro – BaCl₂ – H₂O; the residual fraction (HNO₃-HCl) = HNO₃-HCl – Na-pyro – BaCl₂ – H₂O.

determined by differencing, the total-recoverable metal fraction will hereafter be referred to as the residual fraction. In most cases, the organo-complexed and the residual fractions are the two dominant chemical fractions for the bulk soil and the inner rhizosphere. The water-soluble and BaCl_2 exchangeable metal fractions represent only a very small percentage of the total-recoverable metal fraction, a fraction that is however almost systematically superior in the inner rhizosphere than in the bulk soil. In the bulk soil, the average proportion of water-soluble and BaCl_2 exchangeable metal forms is around 3 %, with the highest proportion of this potentially available metal pool being 8.8 % for Ni at site 2 and the lowest ones being less than 1 % for Pb and Cu at most sites. In the inner rhizosphere, the proportion of total-recoverable metal present as water-soluble or BaCl_2 exchangeable forms averages 7 % and fluctuates wildly from 23.9 % for Ni at site 2 and 0.2 % for Pb at site 3.

These results are consistent with other studies showing that the soluble and exchangeable metal fractions represent only a small fraction of the total metal content in soils. In the bulk soil of contaminated soils, Tao *et al.* (2003) have shown that the MgCl_2 exchangeable Cu fraction represented only 0.5 % of the total Cu content, while Cu associated with OM and/or sulfides were the dominant fractions at 47 % of total Cu. Moreover, in a soil profile study on contaminated sites, Kabala and Singh (2001) showed that the subsurface horizons of contaminated soils contained less than 10 % of Cu, Pb and Zn in the mobile fraction, which comprised the water and exchangeable metal fractions. However, the contribution of the mobile fraction was higher in the surface horizons of the sites that were located closer to a smelter.

The cumulative proportion of water-soluble and BaCl_2 exchangeable metals also varies along the contamination gradient. Indeed, higher proportions of water-soluble and BaCl_2 exchangeable forms are found for most metals at site 1, closer to the smelter, and these percentages decrease towards site 3. For instance, this potentially available Cu pool at site 1 represents 3.4 % and 6.2 % in the bulk soil and the inner rhizosphere, respectively (figure 3.3b). It gradually decreases down to 0.06 % and 0.7 %, respectively, at site 3. This could be related to the more acidic conditions found at site 1 (table 3.1), which would favor the dissolution of Cu and its retention on the exchange complex. The only exception to this decreasing trend is Zn (Fig. 3.3e). This observation concords with previous results showing a significant

increase in the water-soluble and BaCl_2 exchangeable absolute Zn concentrations from site 1 to site 3.

Lead is mostly present in the organo-complexed and residual fractions and its potentially available metal pool represents less than 1.2 % in both soil components and at all sites (figure 3.3d). This reflects the well recognised affinity of Pb for OM (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Wang and Benoit, 1996). The potentially soluble and exchangeable Pb forms would therefore rapidly be complexed by OM, either in the dissolved or solid states. Cadmium is mainly present in the organo-complexed fraction, and its potentially available pool is less than 7 % in the bulk soil and 14 % in the inner rhizosphere, at all sites (figure 3.3a). Copper is also largely bound into organic complexes, especially at site 1 where it comprises over 50 % of all Cu fractions in both soil components (figure 3.3b). Nickel, however, shows a greater proportion of BaCl_2 exchangeable forms than of organo-complexes in the inner rhizosphere, as its affinity with OM is less than that of Cu or Pb (Vaughan *et al.*, 1993) (figure 3.3c). In the case of Zn, the fractionation in the bulk soil as well as in the inner rhizosphere is dominated by the residual chemical form (figure 3.3e).

3.3.3. Liquid phase Cu speciation

3.3.3.1. Cu^{2+} activity

The data from the analyses conducted on the liquid phase are summarized in table 3.6. The results of the Friedman test, performed to evaluate the influence of soil contamination level on Cu^{2+} activities, are presented in table 3.4. In all soil components, the Cu^{2+} activities are significantly influenced by the level of soil contamination, with the absolute Cu^{2+} activities decreasing with distance from the smelter (table 3.6 and figure 3.4a). As shown in table 3.6 and figure 3.4a, a significant soil component difference ($p \leq 0.10$) is found only at site 3, where the bulk soil holds the highest mean free Cu^{2+} activities while the lowest amounts are measured in the outer rhizosphere. Thus, unlike the results presented for Cu in the solid phase, the inner rhizosphere is not the soil component where the highest Cu^{2+} activities are found. In fact, no general trend emerges for free Cu^{2+} activities between the three soil components (figure 3.4a).

Average inner rhizosphere / bulk soil ratios of Cu^{2+} concentrations (mg kg^{-1}) were calculated for each site. The field replicates at site 1 give an average ratio of 1.3.

Table 3.6. The pCu^{2+} value, Cu^{2+} and total H_2O soluble Cu concentrations, pH and DOC values measured in the three soil components at various distances from the smelter. Values in parentheses are standard deviations of laboratory triplicates.

Site	pCu^{2+}			Cu^{2+} ($\mu g\ kg^{-1}$)			Cu (H_2O) ($mg\ kg^{-1}$)			pH			DOC ($mg\ L^{-1}$)					
	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner	Bulk	Outer	Inner			
	Rz ^a	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz			
----- Site 1 (2.5 km) -----																		
1-A	7.26 (0.35)	7.20	7.47	35.1 (42.3)	40.4	21.3	0.05 (0.01)	0.33 (0.13)	0.52 (0.13)	***	5.05 (0.1)	4.85	4.68	***	7.07 (0.19)	26.63 (1.00)	29.00 (1.17)	
1-B	7.59	7.33	7.23	16.2	29.4	37.2	0.12 (0.03)	0.37 (0.02)	0.62	4.82	4.71	4.62		9.31 (0.30)	34.08	51.53		
1-C	7.25	7.45	7.40	35.9	22.4	25.0	0.25 (0.03)	0.32 (0.01)	0.41 (0.01)	4.81	5.15	4.78		5.52 (0.29)	20.07 (0.44)	24.22 (0.58)		
1-D	6.91 (0.26)	6.99	7.09	77.5 (41.2)	65.3	51.5	0.29 (0.02)	0.60 (0.02)	0.71	4.71 (0.02)	4.75	4.65		6.58 (0.43)	17.38 (0.33)	20.80		
1-E	7.47	7.66	7.33	21.4	13.8	29.3	0.18 (0.05)	0.22 (0.03)	0.21 (0.03)	4.94	4.92	4.82		6.99 (0.12)	14.47 (0.11)	17.42 (0.32)		
1-F	7.61 (0.28)	7.22	7.31	15.6 (8.8)	37.8	30.8	0.04 (0.01)	0.48 (0.03)	0.46 (0.01)	4.79	4.79	4.68		8.52 (0.08)	18.56 (0.11)	20.92 (0.38)		
----- Site 2 (15 km) -----																		
2-A	8.39	7.59	8.26	2.6	16.4	3.5	0.01 (0.01)	0.05 (0.01)	0.05 (0.01)	● ^c	4.95	4.99	4.88		13.31 (0.11)	35.12 (0.54)	45.47 (0.54)	
2-B	7.80	7.87	7.93	10.1	8.6	7.4	0.03 (0.002)	0.09 (0.01)	0.12 (0.03)	4.73	4.81	4.68		12.79 (0.21)	30.04 (0.29)	39.40 (0.69)		
2-C	7.87	7.85	8.05	8.6	9.0	5.7	0.04 (0.32)	0.04 (0.003)	0.05 (0.01)	4.90	4.85	4.72		21.11 (0.34)	35.52 (0.79)	47.81 (0.33)		
2-D	8.01	7.73	8.27	6.2	11.7	3.4	0.02 (0.004)	0.06 (0.01)	0.08 (0.01)	4.96	5.05	5.00		12.30 (0.33)	47.89 (0.47)	51.40 (1.37)		
----- Site 3 (43 km) -----																		
3-A	8.06	8.82	8.48	5.6	1.0	2.1	* ^b	0.02 (0.004)	0.06 (0.03)	0.07 (0.03)	*	5.27	5.25	5.08	**	17.62 (0.64)	31.95 (0.73)	38.02 (0.73)
3-B	7.89	8.78	8.08	8.2	1.1	5.3	0.004 (0.004)	0.03 (0.01)	0.03 (0.003)	5.14	5.03	5.01		13.33 (0.17)	34.40 (0.60)	40.84 (1.04)		
3-C	8.74	9.21	9.40	1.2	0.4	0.3	0.01 (0.001)	0.08 (0.02)	0.10 (0.02)	5.42	5.31	5.26		20.52 (0.48)	57.85 (1.40)	84.89 (1.43)		

^a rz = rhizosphere.

^b Results of the Friedman test, where * = $p \leq 0.10$; ** = $p \leq 0.05$; *** = $p \leq 0.01$. The results illustrate the significant differences found between the three soil components at each sampling site.

^c Result of the Wilcoxon signed rank test, where ● = $p \leq 0.10$. This result illustrates the significant difference found between the $Cu(H_2O)$ concentrations of the bulk soil and of the inner rhizosphere at site 2.

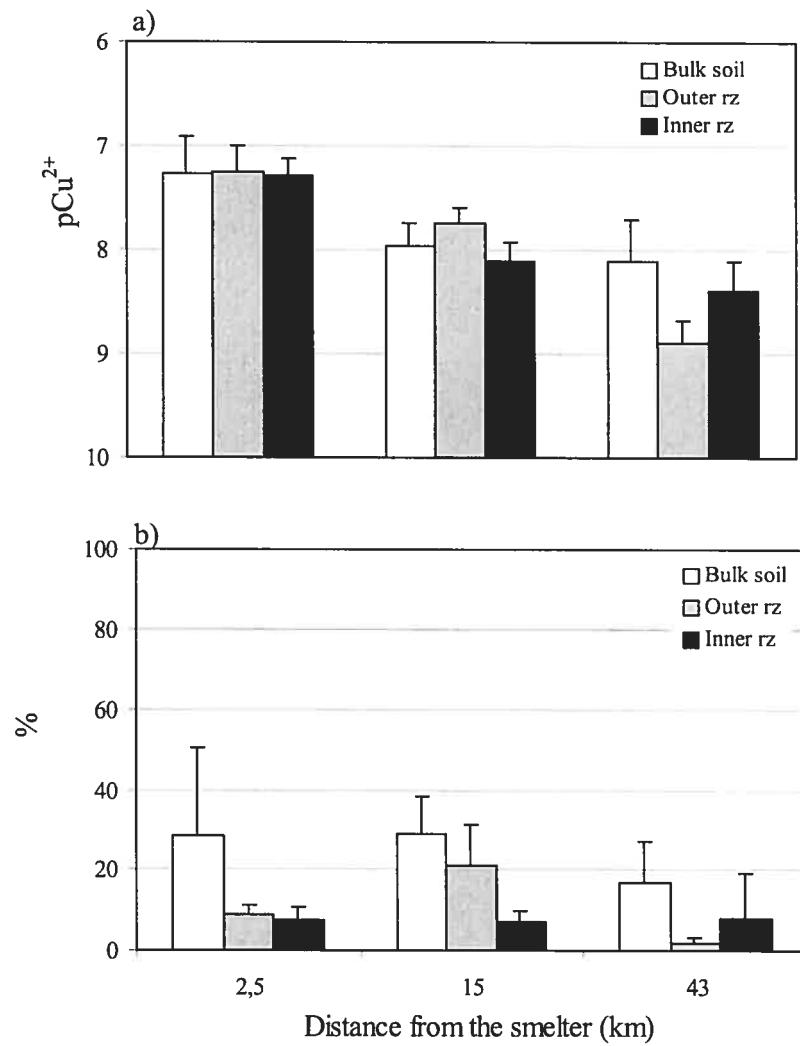


Figure 3.4 a) Cu^{2+} activities and b) percentage of water-soluble Cu ($\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})$) present as Cu^{2+} in the three soil components along a soil contamination gradient. Values and standard deviations are means of the field and laboratory replicates.

This mean ratio decreases to 0.8 at site 2 and down to 0.4 at site 3. Therefore, the relative Cu^{2+} content of the inner rhizosphere varies with distance from the smelter, an observation that is probably associated with the increasing OM content in the rhizosphere and the decreasing Cu concentration.

The fraction of water-soluble Cu that is present in the free Cu^{2+} ion form (% Cu) is shown in figure 3.4b. At all sites, this fraction is systematically higher in the bulk soil than in the outer or the inner rhizosphere, with 28.6%, 29.2% and 16.9% of the water-soluble Cu in the bulk soil being present in the ionic form at sites 1, 2 and 3, respectively. At site 1, the percentage of water-soluble Cu occurring as Cu^{2+} is three to four times higher in the bulk soil than in the associated outer and inner rhizosphere respectively. At sites 2 and 3, this percentage of the bulk soil fraction is two to 10 times higher than in the inner or the outer rhizosphere. These values illustrate well the complexity of assessing metal bioavailability in soils. In the water extracts, the inner rhizosphere tends to hold the highest Cu concentrations and this could be related, among other factors, to its slightly more acidic pH. However, Cu^{2+} activities do not follow this trend as the inner rhizosphere values are never the highest measured. Moreover, the free Cu^{2+} activities are not well contrasted between the three soil components (figure 3.4a). In the inner rhizosphere, the lower Cu^{2+} activities could be explained by the large amounts of dissolved organic substances near the roots. Indeed, these dissolved organic substances can bind with dissolved Cu to form soluble organic-metal complexes. Very few studies have contrasted the free metal activities in the rhizosphere and the bulk soil, whether it is in a forested, agricultural or laboratory environment. A study comparing the ionic activities of Cd and Zn in the rhizosphere of radish and bulk soil of contaminated soils showed that the bulk soil proportionally contained more free Cd^{2+} and Zn^{2+} ions (Lorenz *et al.*, 1997). The lower activities of Cd^{2+} and Zn^{2+} in the rhizosphere were attributed to higher DOC contents in this environment, which induced the complexation of the free ions by organic substances.

3.3.3.2. Dissolved Organic Carbon (DOC) concentrations

The DOC concentrations in the water extracts are presented for all sampling sites in table 3.6 and figure 3.5a. For a given soil component, the DOC concentration increases from site 1 to site 3 (figure 3.5a), but this trend is significant only for the bulk soil ($p \leq 0.10$). This apparent DOC enrichment along the sampling transect

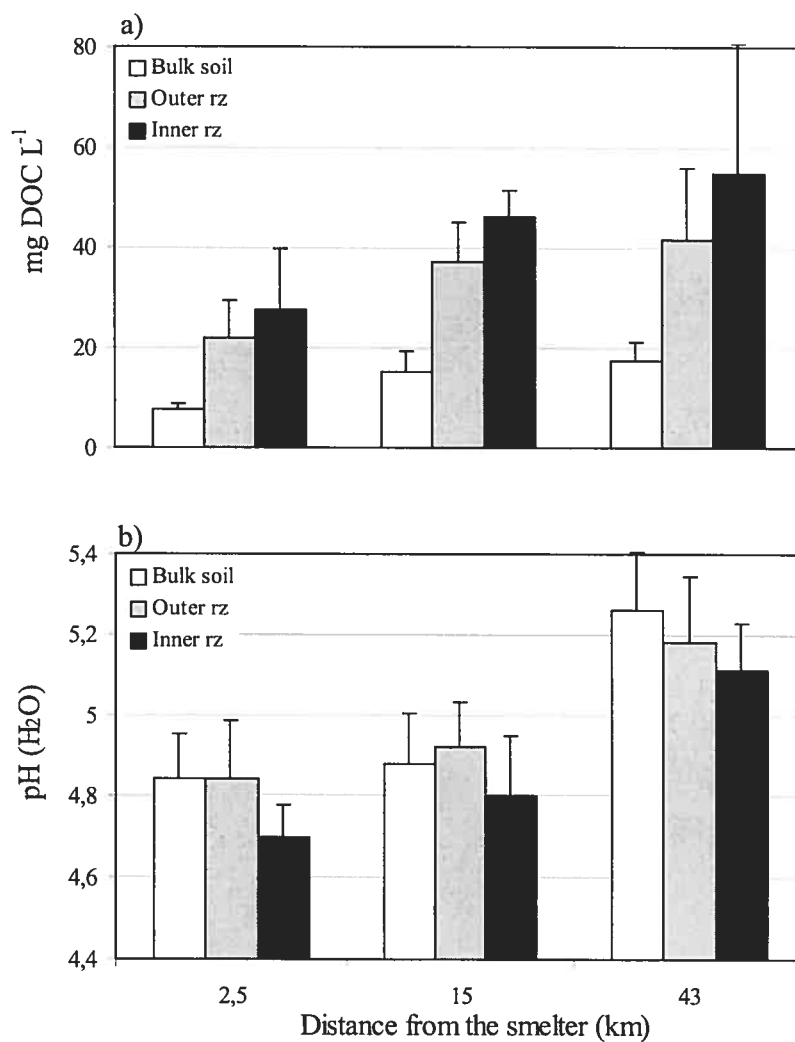


Figure 3.5. Values of a) dissolved organic carbon (DOC) in the water extract and b) pH (H₂O) in the three soil components along a soil contamination gradient. Values and standard deviations are means of the field and laboratory replicates.

relates well to the enhancement observed for soil organic carbon content (table 3.1) as shown by the positive correlations between these two variables ($r^2 = 0.67$, $p = 0.001$; $r^2 = 0.61$, $p = 0.002$; $r^2 = 0.75$, $p = 0.0001$ in the bulk soil, the outer rhizosphere and the inner rhizosphere, respectively). Again, the increased vegetation density might explain the enhancement in both solid and dissolved organic carbon along the transect.

The DOC concentrations are also systematically higher in the inner rhizosphere while the lowest values are found in the bulk soil at all sites (figure 3.5a). This differentiation of soil components based on DOC concentrations is statistically significant at all sampling sites (table 3.6). The average inner rhizosphere / bulk soil ratios for DOC concentrations are rather similar at the three sites, with values of 3.7 at site 1, 3.2 at site 2 and 3.1 at site 3.

The enhancement of DOC levels in the rhizosphere has long been recognized in the literature (Bowen and Rovira, 1991; Marschner and Romheld, 1996; Hinsinger, 1998), and our results are in agreement with other studies on forested ecosystems that have shown the existence of higher DOC concentrations in the soil solution of the rhizosphere compared to the bulk soil (Gobran and Clegg, 1996; Wang and Zabowski, 1998; Courchesne *et al.*, 2001; Séguin *et al.*, 2003). This increase in DOC can be attributed to the proximity of roots, to exudates, as well as to the decomposition products of roots and of their associated fungi and microorganisms (Vaughan *et al.*, 1993; Gobran *et al.*, 1998; Arocena *et al.*, 1999). The higher solubilisation rate of OM can also be due to lower rhizosphere pH.

The affinity of Cu for solid and dissolved OM is well known (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Acidic forest soils provide an environment in which Cu can readily be associated with OM in a complex or chelate form. This affinity induces a strong Cu retention in the presence of a high soil organic carbon content, which, in turn, can diminish the bioavailable Cu pool by leaving a lower dissolved Cu content and a small percentage of free Cu^{2+} (Løbersli *et al.*, 1991; Sauvé *et al.*, 1995). As such, the Cu-organic chelates often represent the dominant Cu form in solution (Sanders, 1982; Kabata-Pendias and Pendias, 1992). For example, studies focusing on the speciation of Cu in the soil solution showed that over 80 % of total dissolved Cu is complexed with organic substances (Dudley *et al.* 1987; Sauvé *et al.* 1997; Al-Wabel *et al.*, 2002; Gummuluru *et al.* 2002).

The fact that Cu^{2+} activity is similar in all soil components (figure 3.4a) suggests that the ability of dissolved organic matter to complex Cu is of similar magnitude in the rhizosphere and the bulk soil. To verify this hypothesis, the water-soluble Cu / DOC molar ratio ($\text{Cu (H}_2\text{O)} (\mu\text{mol kg}^{-1}) / \text{DOC} (\mu\text{mol kg}^{-1}) * 10^6$) was calculated. The purpose of this molar ratio is to test whether the amounts of water-soluble Cu normalized with respect to DOC concentrations differ between the three soil components. The ratios measured at site 1 are 450 and 370 for the bulk soil and the inner rhizosphere, respectively, while they range from 30 to 32 at site 2 and from 14 to 22 at site 3. The decrease of the water-soluble Cu / DOC molar ratios along the sampling transect follows the decrease observed in water-soluble Cu concentrations combined with the concomitant DOC increase from site 1 to site 3. In turn, the similarity of the water-soluble Cu / DOC molar ratios between the soil components at a given distance suggests that the metal complexation capacity of the dissolved OM is of a relatively similar magnitude in the rhizosphere and in the bulk soil and, thus, that the free Cu^{2+} form should be similar if pH is equivalent.

It has been mentioned that the free ionic metal form is often the best predictor of bioavailability and toxicity to plants. However, some studies have shown that dissolved metal-DOC complexes can also effectively correlate with bioavailability to plants, as they can enhance metal concentrations in plant shoots and/or roots. The free metal ion would therefore not be the only chemical fraction readily adsorbed and translocated into plants. For instance, in a pot experiment, Antoniadis and Alloway (2002) found that DOC amendments in soils increased the amount of CaCl_2 extractable Cd, Ni and Zn, as well as enhancing the assimilation of these trace metals by ryegrass (*Lolium perenne* L.). Nigam *et al.* (2001) also found increased Cd assimilation by plants when combined with higher organic acid concentrations. These authors also mention that Cd^{2+} translocation in plants is probably limited because of the rapid adsorption of this cation onto roots cell walls. Cd-organic ligands complexes would thus present greater bioavailability, and a more efficient transport into plant shoots. Other authors conclude that organic acids play an important role in preventing trace metal assimilation by complexation and chelation mechanisms (Manthey *et al.*, 1994). Some plant mechanisms such as metal sequestration by phytochelation or adsorption onto cell parts such as vacuoles could also prevent metal uptake (Ross and Kaye, 1994). In a culture experiment, Shenker *et al.* (2001) found that Cd bound to

organic complexes was only slightly assimilated by plants, as Cd^{2+} assimilation seemed to be favored.

3.3.3.3. pH values

The solution pH is a key variable for the speciation of Cu. Table 3.6 and figure 3.5b present pH values measured in the three soil components. For each soil component, the pH values are lower at site 1 closer to the smelter, and gradually increase towards site 3. This pH gradient along the sampling transect is statistically significant for all three soil components ($p \leq 0.10$). In most sampling sites, the inner rhizosphere is the soil component where the average pH is the more acidic whereas the bulk soil has the highest pH values. The pH values of the three soil components are statistically different at sites 1 ($p \leq 0.01$) and 3 ($p \leq 0.10$).

The acidification of the rhizosphere has been reported in a range of studies, from pot experiments to field investigations (Marschner, 1986; Smith and Pooley, 1989; Courchesne *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). The acidification is considered to be mainly induced by the response of roots to ionic charge imbalances in the soil solution (Nye, 1986; Haynes, 1990). This imbalance is caused by the preferential uptake of cations or anions, as selected by plant roots. The acidification of the soil solution therefore results from a release of H^+ by roots in response to an ionic charge imbalance caused by the preferential uptake of cations such as NH_4^+ . Other factors like the exudation of organic substances by roots, as well as CO_2 enhancement by microorganism respiration are also known to contribute to the acidification of the rhizosphere.

The solution pH plays a key role in controlling the solubility of OM, the solubilisation or precipitation of metals and the liquid phase speciation of metals. In general, metal solubility and desorption increase at lower soil pH values (Lindsay, 1979). Accordingly, Wang and Benoit (1996) showed that the desorption and solubilisation of Pb^{2+} occurred in soils with low pH values ($\text{pH} < 4$). Vulkan *et al.* (2000) showed that the Cu^{2+} fraction of dissolved Cu varied between 0.02 and 96%, and that the percentage was strongly dependent on pH values. The highest percentages of Cu^{2+} were found in acidic soils, where pH was below 5.5 and where dissolved Cu content was high. Sauv e *et al.* (1995) further illustrated the determinant influence of pH on the free Cu^{2+} activity in low Cu soils that had high Cu^{2+} concentrations nonetheless because of their severe acidity.

3.3.3.4. Multiple regression analyses

Simple linear regressions were first performed for every soil component in order to assess the individual associations between pH, DOC, water-soluble Cu and total-recoverable Cu, on the one hand, and Cu^{2+} activity in soils, on the other hand. Table 3.7 presents the results of this analysis. Note that DOC, water-soluble Cu and total-recoverable Cu concentrations were log-transformed in order to obtain a linear relation with pCu^{2+} values.

The four variables tested individually show strong relationships with pCu^{2+} in every soil component. Indeed, the regression coefficients of the four variables are all statistically significant, with significance levels varying from $p = 0.06$ to $p = 0.0001$ (table 3.7). In the rhizosphere, pH appears as the key variable in the prediction of pCu^{2+} as it alone can account for up to 59 % and 76 % of the pCu^{2+} variation in the outer and the inner rhizosphere, respectively. In the bulk soil, where DOC is the main variable (71 %), pH appears less important (46 %) but is nonetheless significant ($p = 0.011$). Whether in the bulk soil, the outer rhizosphere or the inner rhizosphere, water-soluble Cu systematically yields higher r^2 values than total-recoverable Cu. Since water-soluble and total-recoverable Cu are strongly correlated, both cannot be integrated into the same multiple regression analysis. The higher r^2 of water-soluble Cu in the three soil components justifies its use together with pH and DOC.

The data from the three sampling sites are integrated in figure 3.6 to illustrate the relationships between pCu^{2+} and pH and DOC concentrations. Regardless of the soil component, the combination of low pH and DOC concentration yields the highest Cu^{2+} activity values. Conversely, high pH and DOC concentrations are associated with lower Cu^{2+} activities. Figure 3.6 also shows the differentiation of the rhizosphere and bulk components with respect to DOC concentrations.

The best fit multiple linear regressions of pCu^{2+} as a function of pH, DOC and water-soluble Cu are presented for each soil component in table 3.8. The variables used in the analysis vary with the soil component. The regression equation yielding the highest significance level in the bulk soil only incorporates DOC, as this variable alone explains up to 71 % of the pCu^{2+} variation. Although integrating water-soluble Cu and pH in this regression model can increase the r^2 to 0.793, these variables did not contribute to the prediction of pCu^{2+} since their respective regression coefficients were not significant. In the outer rhizosphere however, pH and water-soluble Cu

Table 3.7. Regression coefficients (r^2) and level of significance (p) of pCu^{2+} values against pH in H_2O , \log_{10} dissolved organic carbon in H_2O (DOC), \log_{10} Cu dissolved in H_2O (Cu (H_2O)) and \log_{10} total-recoverable soil Cu (Total Cu).

pCu^{2+} against :	Bulk soil (n = 13)		Outer rz (n = 13)		Inner rz (n = 13)	
	r^2	p	r^2	p	r^2	p
pH (H_2O)	0.460	(0.011)	0.585	(0.002)	0.761	(0.0001)
\log_{10} DOC ^a	0.707	(0.0003)	0.374	(0.026)	0.634	(0.001)
\log_{10} Cu (H_2O) ^a	0.605	(0.002)	0.493	(0.007)	0.520	(0.005)
\log_{10} Total Cu ^a	0.350	(0.033)	0.415	(0.061)	0.506	(0.006)

^a \log_{10} DOC values are in $mg L^{-1}$, and \log_{10} Cu (H_2O) and \log_{10} Total Cu are in $mg kg^{-1}$.

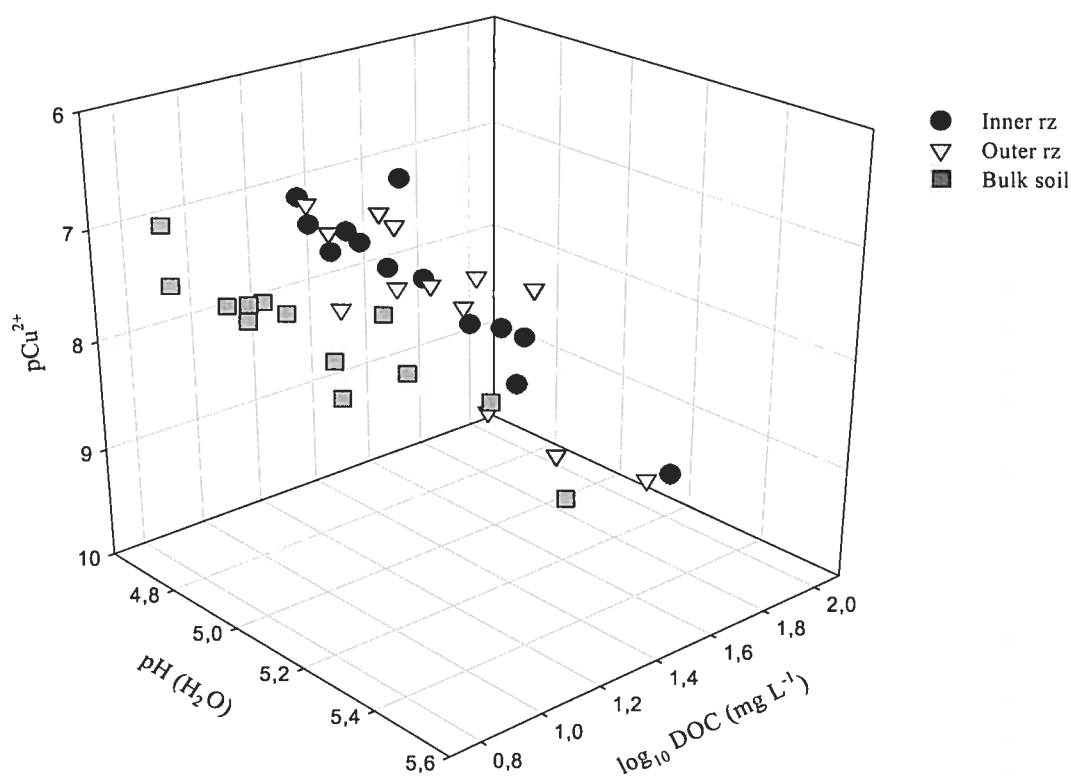


Figure 3.6. pCu^{2+} as a function of \log_{10} dissolved organic carbon (DOC) in H_2O extract and $pH(H_2O)$.

Table 3.8. Best fit multiple linear regressions of pCu^{2+} values against pH in H_2O , \log_{10} dissolved organic carbon in H_2O (DOC) and \log_{10} Cu dissolved in H_2O (Cu (H_2O)).

	Constant	Variables	r^2
<i>Bulk soil</i>			n = 13
pCu^{2+}	$= 5.537 \pm 0.438^{\text{a}}$ (0.0000001) ^b	$+ 2.141 \pm 0.416 \log_{10} \text{DOC}^{\text{c}}$ (0.0003)	0.707 (0.0003)
<i>Outer rz</i>			n = 13
pCu^{2+}	$= -2.744 \pm 3.239$ (ns)	$+ 2.012 \pm 0.675 \text{pH} - 0.671 \pm 0.287 \log_{10} \text{Cu}(\text{H}_2\text{O})^{\text{c}}$ (0.014) (0.042)	0.731 (0.001)
<i>Inner rz</i>			n = 13
pCu^{2+}	$= -4.377 \pm 1.629$ (0.023)	$+ 2.053 \pm 0.389 \text{pH} + 1.491 \pm 0.389 \log_{10} \text{DOC}$ (0.0004) (0.003)	0.903 (0.00001)

^a \pm values represent standard errors.

^b Values in parentheses are the p values (level of significance) for each variable, and ns = non significant.

^c \log_{10} DOC are in mg L^{-1} and \log_{10} Cu (H_2O) are in mg kg^{-1} .

together account for over 73 % of the pCu^{2+} variation. The integration of DOC does not improve the predictive capacity in a significant way ($r^2 = 0.74$, $p = 0.586$ for DOC). The combination of pH and DOC is used in the regression equation for the inner rhizosphere. These two variables significantly explain as much as 90 % of the pCu^{2+} variation. The addition of water-soluble Cu to this equation does not significantly increase the model's prediction capacity ($r^2 = 0.913$, $p = 0.355$ for water-soluble Cu). The relatively small contribution of water-soluble Cu in the pCu^{2+} regression equations is not surprising considering that this variable is itself largely controlled by pH and DOC. The strong influence of these two variables overrules any impact of water-soluble Cu on Cu^{2+} concentrations.

Studies in which multiple regression analyses were performed for pCu^{2+} predictions show contrasting results (McBride *et al.*, 1997; Sauvé *et al.*, 1997; Vulkan *et al.*, 2000). In most cases, the same variables (pH, DOC and soluble or total soil metal content) are used, although their regression coefficients and significance levels vary. For instance, Sauvé *et al.* (1997) found that 85 % of the pCu^{2+} variation in a wide variety of soils could be explained by incorporating total Cu and pH in a regression model. McBride *et al.* (1997) showed that pCu^{2+} was best predicted using a regression equation that incorporated pH, OM and total Cu in soil samples from long-contaminated sites. In a series of soils with varying degrees of Cu contamination, Vulkan *et al.* (2000) found that Cu^{2+} activity was best controlled by pH and total Cu ($r^2 = 0.89$, $p < 0.001$) and, to a lesser extent, by DOC. In diverse unamended soils, Yin *et al.* (2002) calculated distribution coefficients for free Cu^{2+} between soil organic matter and solution ($K_{d-Cu^{2+}}$) and showed that free Cu^{2+} could be predicted based on three variables: total metal concentration, soil organic matter (SOM) content and pH.

3.4. CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

The results of this study allow for an assessment of trace metal bioavailability with respect to the level of soil contamination as well as to the soil component differentiation in forested ecosystems. The potentially available pools (water-soluble and $BaCl_2$ exchangeable fractions) of Cd, Cu and Ni, measured along the sampling transect reflect, in most cases, the level of soil contamination induced by atmospheric emissions. In general, the potentially available Cd, Cu, and Ni pools, irrespective of

the soil component, followed the gradient: site 1 > site 2 > site 3. The water-soluble and BaCl₂ exchangeable Pb fractions measured at the three sites did not reflect a clear soil contamination trend, and the BaCl₂ exchangeable Zn concentrations showed an inverted trend, where the highest concentrations were found at site 3.

The degree of differentiation between the metal concentrations of the bulk soil, the outer rhizosphere and the inner rhizosphere varied depending on the trace metal and the chemical fraction. In most cases, either the outer rhizosphere or the inner rhizosphere contained the highest metal concentrations and were significantly different from the concentrations found in the bulk soil. Only a minority of cases, not all statistically significant, occurred where the Pb and Zn concentrations were higher in the bulk soil than in the outer or the inner rhizosphere. Irrespective of the trace metal, the water-soluble and BaCl₂ exchangeable chemical fractions were more significantly differentiated between the three soil components as compared to the organo-complexed or total-recoverable metal fractions. In addition, the level of soil contamination seemed to influence the extent of the soil component differentiation, as the concentrations of metals like Cd and Cu were more contrasted among the bulk soil, the outer and the inner rhizosphere at site 1, closer to the smelter. The water-soluble and BaCl₂ exchangeable fractions of most metals (except Pb) were the metal pools in which the greatest rhizosphere enrichment ratios (inner rhizosphere / bulk soil metal concentrations) were found. In addition, the rhizosphere enrichment ratio of this potentially available fraction was greater for Cu than any other metal, at all sites.

The metal concentrations of the four extractions varied with the trace metal, the soil component and the distance from the smelter. Nonetheless, for all metals and sampling sites, the potentially available metal pool always represented a very small fraction of the total-recoverable metal content in the bulk soil (3 %) and the inner rhizosphere (7 %), a fraction that was systematically higher in the rhizosphere. Accordingly, the organo-complexed and the residual pools were the dominant metal fractions for Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in the bulk soil and the rhizosphere.

The speciation of Cu in the liquid phase and the measurement of associated variables (pH and DOC) also highlighted the effect of soil contamination and the uniqueness of each soil component in some cases. The soil contamination gradient was reflected in the decreasing activities of pCu²⁺ from site 1 to site 3 in the bulk soil, the outer and the inner rhizosphere. Except for a small but significant difference in

the $p\text{Cu}^{2+}$ values of the three soil components at site 3, no other differentiation of the soil components with respect to free Cu^{2+} activity was found. However, the inner rhizosphere / bulk soil ratio of Cu^{2+} concentrations, although very small, was found to decrease from 1.3 at site 1 to 0.4 at site 3. The bulk soil, the outer and the inner rhizosphere contained similar amounts of water-soluble Cu when these values were normalized with respect to DOC concentrations (water-soluble Cu / DOC molar ratio), which could explain the similar Cu^{2+} activities of the three soil components. This further indicates that the apparent complexation power of OM probably has the same magnitude in the bulk soil and in the rhizosphere. DOC and pH were significantly different in each soil component at most sites, with the inner rhizosphere being systematically more acidic and having a higher DOC content than the bulk soil. The pH, DOC and water-soluble Cu all showed a very strong relationship with $p\text{Cu}^{2+}$ individually, but they were not all significant when integrated into a multiple regression analysis ($p \leq 0.05$). As such, the $p\text{Cu}^{2+}$ was best predicted by DOC in the bulk soil ($r^2 = 0.707$), by pH and water-soluble Cu in the outer rhizosphere ($r^2 = 0.731$) and by pH and DOC in the inner rhizosphere ($r^2 = 0.903$).

Although the separation of these three soil components was operationally defined, the results show that the bulk soil and the inner rhizosphere clearly differ with respect to metal enrichment and bioavailability. Considering the rhizosphere as a distinct environment is crucial for studies focusing on metal bioavailability in soils. Indeed, the results of this study establish the fact that the metal pools of the bulk soil do not correspond to the actual levels of potential metal availability found at the soil:root interface and, thus, do not accurately reflect the environment in which plant roots evolve and assimilate nutrients and contaminants. An approach that integrates the rhizosphere needs to be developed to estimate the exposure to and the uptake of trace metals by the soil biota and by higher plants. Accordingly, the soil properties and mechanisms underlying the contrasting results found between the rhizosphere and the bulk components of forested soils now need to be validated using field or greenhouse experiments and analytical tools that are specifically designed to operate at the spatial scale of the rhizospheric environment.

4. CONCLUSION

Les mécanismes impliqués dans la spéciation des métaux traces et leur biodisponibilité subséquente sont multiples et complexes. De plus, ils varient en intensité dans le sol en fonction de la proximité des racines. La compréhension du fractionnement des formes chimiques des métaux est essentielle afin d'évaluer la biodisponibilité et le potentiel toxique des métaux puisque la concentration totale ne reflète généralement pas fidèlement le niveau d'exposition des plantes aux formes disponibles des métaux. De plus, la rhizosphère est un milieu pédologique privilégié afin d'effectuer le fractionnement des métaux et l'évaluation de leur biodisponibilité puisque ce microenvironnement est situé à l'interface sol:plante et permet d'étudier de manière plus réaliste les conditions physiques, chimiques et biologiques auxquelles les plantes et leurs racines sont exposées.

L'échantillonnage dans trois sites différents a permis de cerner l'impact de la contamination des sols sur le fractionnement des métaux traces en phase solide de même que sur la spéciation de Cu en phase liquide. Nos résultats révèlent que le niveau de contamination des sols est détecté surtout pour les formes solubles dans l'eau et échangeables de Cd, Cu et Ni. En général, les concentrations de ces fractions potentiellement disponibles de Cd, Cu et Ni diminuent selon l'ordre: site 1 > site 2 > site 3, et ce dans la matrice de sol, la rhizosphère externe et la rhizosphère interne. Ce gradient de concentrations reflète ainsi la contamination des sols induite par les émissions atmosphériques de ces éléments. Les concentrations des formes solubles et échangeables de Pb dans les trois composantes de sol ne suivent toutefois pas clairement ce gradient de contamination dans les trois sites d'échantillonnage, alors que les concentrations de Zn échangeable dans la matrice et la rhizosphère reflètent plutôt un gradient inversé, où les concentrations les plus élevées sont mesurées au site 3. Des ratios d'enrichissement (concentrations de la rhizosphère interne / matrice de sol) ont été utilisés afin d'évaluer l'influence du niveau de contamination des sols sur la magnitude de la différenciation des composantes de sol (l'effet rhizosphère). Toutefois, ces ratios n'ont pas révélé de tendance claire puisque l'évolution des ratios de chaque élément du site 1 jusqu'au site 3 était différente. Par exemple, dans le cas de Ni, les facteurs d'enrichissement de la rhizosphère étaient relativement stables du

site 1 au site 3, alors que les facteurs d'enrichissement de Cu variaient de manière plus prononcée et affichaient de forts écarts-types.

Les résultats de cette recherche ont permis de confirmer l'unicité de la rhizosphère en ce qui a trait au fractionnement des métaux traces en phase solide et à son contenu en métaux potentiellement disponibles pour les plantes. En effet, pour la majorité des métaux traces et des extractions, la rhizosphère (externe ou interne) affichait des concentrations en métaux significativement supérieures à celles retrouvées dans la matrice de sol, et ce dans les trois sites d'échantillonnage. La matrice de sol ne contenait des concentrations supérieures à celles retrouvées dans la rhizosphère que dans une minorité des cas (10 %), et ce pour Pb et Zn seulement. Les fractions solubles dans l'eau et échangeables (BaCl_2) sont les fractions dans lesquelles, peu importe le métal, un nombre plus important de différences significatives entre la rhizosphère et la matrice a été relevé. De plus, ces deux fractions potentiellement disponibles pour les plantes sont celles dans lesquelles (à l'exception de Pb) le ratio d'enrichissement de la rhizosphère (concentrations de la rhizosphère interne / matrice de sol) était le plus élevé. La fraction potentiellement disponible des métaux ne représente qu'un faible pourcentage du contenu total en métaux dans la matrice (3 %) et dans la rhizosphère interne (7 %), mais ce pourcentage est tout de même systématiquement supérieur dans la rhizosphère que dans la matrice.

Ainsi, l'enrichissement de la rhizosphère en métaux traces comparativement à la matrice de sol est surtout significatif pour les fractions chimiques potentiellement disponibles pour les plantes, soit les formes solubles dans l'eau et les formes échangeables. De plus, cet enrichissement de la rhizosphère demeure visible dans les trois sites d'échantillonnage, peu importe le niveau de contamination des sols, quoique certains métaux, tels Cd et Cu, affichent un nombre plus élevé de différences significatives entre la rhizosphère et la matrice au site 1, près de la source de contamination. Cet enrichissement de la rhizosphère en fractions facilement disponibles peut s'expliquer par l'influence de plusieurs caractéristiques propres à la rhizosphère, notamment par le pH légèrement plus acide de cet environnement, qui induit une dissolution plus importante des minéraux, de même que par le contenu supérieur en carbone et matière organique, qui offre de nombreux sites d'échanges sur lesquels les métaux peuvent être retenus.

Cet enrichissement en métaux traces dans la rhizosphère concorde avec des résultats précédents faisant également mention de concentrations supérieures pour les fractions solubles et échangeables de divers métaux dans cet environnement. Dans ce contexte, il est d'autant plus important de considérer la rhizosphère comme un compartiment au même titre que la matrice de sol puisque l'enrichissement observé dans ce milieu concerne surtout les fractions chimiques potentiellement disponibles pour les plantes. En somme, nos résultats montrent que les études portant entre autres sur les cycles biogéochimiques des métaux dans les écosystèmes et sur la toxicité et les risques d'assimilation des métaux par le biota ont tout intérêt à investiguer l'interface sol:plante afin de s'assurer d'une représentation optimale du fractionnement des métaux dans le sol avec lequel les plantes sont en contact.

Une autre contribution importante de cette étude provient des résultats sur la spéciation de Cu^{2+} en solution dans la rhizosphère et la matrice de sol. L'activité de Cu^{2+} en solution, contrairement aux fractions solubles et échangeables de Cu, ne présente peu ou pas de différence significative entre la rhizosphère et la matrice de sol dans les trois sites d'échantillonnage. L'utilisation d'un ratio molaire (concentrations molaires de Cu soluble dans l'eau / DOC) révèle que les concentrations de Cu soluble dans l'eau sont relativement semblables dans les trois composantes de sol lorsqu'elles sont normalisées par rapport aux concentrations de DOC. Ceci pourrait expliquer les activités similaires de Cu^{2+} dans les trois composantes de sol de chacun des sites d'échantillonnage. Ainsi, le mécanisme de complexation par la matière organique agirait avec une intensité proportionnellement comparable dans la rhizosphère et la matrice de sol.

Aucune des études en milieu naturel recensées ne fait état de résultats portant sur la distinction entre la rhizosphère et la matrice de sol en ce qui a trait à la forme ionique libre des métaux. Cependant, dans des conditions de croissance contrôlées, une seule étude, portant sur la forme ionique libre de Cd et Zn, a été recensée et celle-ci indiquait que la rhizosphère de radis était appauvrie en Cd^{2+} et Zn^{2+} comparativement à la matrice. Cet appauvrissement était attribué au contenu élevé en DOC dans la rhizosphère et à son grand pouvoir de complexation (Lorenz *et al.*, 1997). L'effet de la matière organique et sa capacité à complexer les métaux ont également été soulignés dans notre interprétation sur les contenus en Cu^{2+} de la rhizosphère et de la matrice de sol. Toutefois, il est important de mentionner que l'activité ionique en solution est aussi reliée à d'autres variables tels le pH et le

contenu total et dissous des métaux dans le sol, comme l'ont démontré les résultats des régressions multiples effectuées dans la rhizosphère et la matrice des différents sites d'échantillonnage. De plus, malgré les contenus relativement semblables en Cu^{2+} dans la rhizosphère et la matrice de sol, la contribution de chacune des variables nommées précédemment sur la prédiction de Cu^{2+} varie selon la composante de sol.

L'explication de ces résultats contrastés mériterait certainement d'être approfondie afin de vérifier l'effet de la rhizosphère et de ses caractéristiques sur la détermination du contenu en Cu^{2+} . Il serait également intéressant de poursuivre les recherches sur la spéciation d'autres métaux traces sous la forme ionique libre dans la rhizosphère de milieux naturels afin de valider les rares connaissances à ce sujet. Ceci pourrait également permettre de dégager les caractéristiques communes à la spéciation des métaux traces de celles propres à chacun des éléments.

Qu'elles soient entreprises en milieu naturel ou en laboratoire, les prochaines recherches portant sur la spéciation des métaux traces dans la rhizosphère devraient intégrer des méthodes d'analyse qui soient développées de manière à tenir compte de l'échelle spatiale propre à la rhizosphère. Par exemple, des instruments de mesure spécifiquement conçus pour prélever la solution de sol *in situ*, tels des microlysimètres à tension, pourraient être utilisés afin d'optimiser les résultats des études sur la spéciation des métaux traces dans la rhizosphère. De la même façon, l'utilisation de microsondes permettant d'établir le contenu élémentaire, et même la forme chimique, des matériaux à l'échelle micrométrique serait pertinente dans le cadre d'études sur la rhizosphère.

5. RÉFÉRENCES

Adamo, P., W.J. McHardy, and A.C. Edwards. 1998. SEM observations in the back-scattered mode of the soil-root zone of *Brassica napus* (cv. Rafal) plants grown at a range of soil pH values. *Geoderma* 85: 357-370.

Al-Wabel, M.A., D.M. Heil, D.G. Westfall, and K.A. Barbarick. 2002. Solution chemistry influence on metal mobility in biosolids-amended soils. *J. Environ. Qual.* 31: 1157-1165.

Antoniadis, V., and B.J. Alloway. 2002. The role of dissolved organic carbon in the mobility of Cd, Ni and Zn in sewage sludge-amended soils. *Environ. Poll.* 117: 515-521.

April, R., and D. Keller. 1990. Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States. *Biogeochem.* 9: 1-18.

Arocena, J.M., and K.R. Glowa. 2000. Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. *For. Ecol. Manag.* 133: 61-70.

Arocena, J.M., K.R. Glowa, H.B. Massicotte, and L. Lavkulich. 1999. Chemical and mineral composition of ectomycorrhizosphere soils of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in the Ae horizon of a Luvisol. *Can. J. Soil Sci.* 79: 25-35.

Assadian, N., and L.B. Fenn. 2001. Rhizosphere chemical changes enhance heavy metal absorption by plants growing in calcareous soils. In: G.R. Gobran, W.W. Wenzel, and E. Lombi (Eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 43-60.

Bowen, G.D., and A.D. Rovira. 1991. The Rhizosphere. The Hidden Half of the Hidden Half. In: Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi (Eds.), *Plant Roots : The Hidden Half*. Marcel Dekker, New York, pp. 641-669.

Braun, M., A. Dieffenbach, and E. Matzner. 2001. Soil solution chemistry in the rhizosphere of beech (*Fagus sylvatica* L.) roots as influenced by ammonium supply. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 271-277.

Brindley, G.W., and G. Brown. 1980. *Crystal Structures of Clay Minerals and their X-ray Identification*. Mineralogical Society, London, UK.

Cabrera, D., S.D. Young, and D.L. Rowell. 1988. The toxicity of cadmium to barley plants as affected by complex formation with humic acid. *Plant Soil* 105: 195-204.

Carignan, R. 2002. Introduction à l'Écotoxicologie. Notes de cours - BIO 3893. Département des Sciences Biologiques, Faculté des Arts et des Sciences, Université de Montréal.

Carter, M.R. 1993. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Cherrey, A., V. Chaignon, and P. Hinsinger. 1999. Bioavailability of copper in the rhizosphere of rape and ryegrass cropped in vineyard soils. In: W.W. Wenzel, D.C. Adriano, B. Alloway, H.E. Doner, C. Keller, N.W. Lepp, M. Mench, R. Naidu, and G.M. Pierzynski (Eds.), *Proceedings of Extended Abstracts, 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, pp. 196-197.

Chino, M., S. Goto, R. Youssef, Y. Miah, and C. De Long. 1999. Behavior of micronutrients in the rhizosphere. In: W.W. Wenzel, D.C. Adriano, B. Alloway, H.E. Doner, C. Keller, N.W. Lepp, M. Mench, R. Naidu, and G.M. Pierzynski (Eds.), *Proceedings of Extended Abstracts, 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, pp. 180-181.

Chung, J.-B., and R.J. Zasoski. 1994. Ammonium-potassium and ammonium-calcium exchange equilibria in bulk and rhizosphere soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 1368-1375.

Cieśliński, G., K.C.J. Van Rees, A.M. Szmigielska, G.S.R. Krishnamurti, and P.M. Huang. 1998. Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant Soil* 203: 109-117.

Courchesne, F., and G.R. Gobran. 1997. Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61: 1245-1249.

Courchesne, F., V. Séguin, and A. Dufresne. 2001. Solid phase fractionation of metals in the rhizosphere of forest soils. In: G.R. Gobran, W.W. Wenzel, and E. Lombi (Eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189-206.

Dieffenbach, A., A. Göttlein, and E. Matzner. 1997. *In situ* soil solution chemistry in an acid forest soil as influenced by growing roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant Soil* 192: 57-61.

Dixon, J.B., and S.B. Weed. 1989. *Minerals in Soil Environments*. Second edition. Book Series # 1, Soil Science Society of America, Madison, WI.

Dormaar, J.F. 1988. Effect of plant roots on chemical and biochemical properties of surrounding discrete soil zones. *Can. J. Soil Sci.* 68: 233-242.

Dudka, S., R. Ponce-Hernandez, and T.C. Hutchinson. 1995. Current level of total element concentrations in the surface layer of Sudbury's soils. *Sci. Total Environ.* 162: 161-171.

Dudley, L.M., B.L. McNeal, and J.E. Baham. 1987. Characterization of soluble organic compounds and complexation of copper, nickel, and zinc in extracts of sludge-amended soils. *J. Environ. Qual.* 16: 341-348.

Dumontet, S., H. Dinel, and P.E.N. Lévesque. 1992. The distribution of pollutant heavy metals and their effect on soil respiration and acid phosphatase activity in mineral soils of the Rouyn-Noranda region, Québec. *Sci. Total Environ.* 121: 231-245.

El-Shatnawi, M.K.J., and I.M. Makhadmeh. 2001. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. *J. Agron. Crop Sci.* 187: 1-9.

Fenn, L.B., and N. Assadian. 1999. Can rhizosphere chemical changes enhance heavy metal absorption by plants growing in calcareous soil? In: W.W. Wenzel, D.C. Adriano, B. Alloway, H.E. Doner, C. Keller, N.W. Lepp, M. Mench, R. Naidu, and G.M. Pierzynski (Eds.), *Proceedings of Extended Abstracts, 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, pp. 154-155.

Freedman, W. 1978. Effects of smelter pollution near Sudbury, Ontario, Canada, on surrounding forested ecosystems. Ph.D. Thesis, University of Toronto, Canada.

Freedman, W., and T.C. Hutchinson. 1980. Pollutant inputs from the atmosphere and accumulation in soils and vegetation near a nickel-copper smelter at Sudbury, Ontario, Canada. *Can. J. Bot.* 58: 108-132.

George, E., V. Römheld, and H. Marschner. 1994. Contribution of mycorrhizal fungi to micronutrient uptake by plants. In: J.A. Manthey, D.E. Crowley, and D.G. Luster (Eds.), *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93-109.

Gobat, J.-M., M. Aragno, and W. Matthey. 1998. *Le Sol Vivant*. 14- Collection Gérer l'Environnement. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, CH.

Gobran, G.R., and S. Clegg. 1996. A conceptual model for nutrient availability in the mineral soil-root system. *Can. J. Soil Sci.* 76: 125-131.

Gobran, G.R., S. Clegg, and F. Courchesne. 1998. Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeochem.* 42: 107-120.

Gobran, G.R., S. Clegg, and F. Courchesne. 1999. The rhizosphere and trace element acquisition in soils. In: H.M. Selim, and I.K. Iskandar (Eds.), *Fate and Transport of Heavy Metals in the Vadose Zone*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 225-250.

Göttlein, A., A. Heim, and E. Matzner. 1999. Mobilization of aluminium in the rhizosphere soil solution of growing tree roots in an acidic soil. *Plant Soil* 211: 41-49.

Grayston, S.J., D. Vaughn, and D. Jones. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *App. Soil Ecol.* 5: 29-56.

Gummuluru, S., R. Krishnamurti, and R. Naidu. 2002. Solid-solution speciation and phytoavailability of copper and zinc in soils. *Environ. Sci. Technol.* 36(12): 2645-2651.

Hayes, K.F., and S.J. Traina. 1998. Metal ion speciation and its significance in ecosystem health. In: P.M. Huang, D.C. Adriano, T.J. Logan, and R.T. Checkai (Eds.), *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. SSSA Special Publication 52, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 45-84.

Haynes, R.J. 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance : A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil* 126: 247-264.

Hendershot, W.H., and M. Duquette. 1986. A simple barium chloride method for determining Cation Exchange Capacity and exchangeable cations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 605-608.

Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arb Dtsch. Landwirt Ges.* 98: 59-78.

Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* 64: 225-265.

Hinsinger, P., and B. Jaillard. 1993. Root-induced release of interlayer potassium and vermiculitization of phlogopite as related to potassium depletion in the rhizosphere of ryegrass. *J. Soil Sci.* 44: 525-534.

Hinsinger, P., J.E. Dufey, and B. Jaillard. 1991. Biological weathering of micas in the rhizosphere as related to potassium absorption by plant roots. In: B.L. McMichael, and H. Persson (Eds.), *Plant Roots and their Environment*. Elsevier, B.V., pp. 98-105.

Hinsinger, P., B. Jaillard, and J. Dufey. 1992. Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of rye grass. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 977-982.

Hinsinger, P., F. Elsass, B. Jaillard, and M. Robert. 1993. Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. *J. Soil Sci.* 44: 535-545.

Huang, J.W., J. Chen, W.R. Berti, and S.D. Cunningham. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31: 800-805.

Jaillard, B., L. Ruiz, and J.C. Arvieu. 1996. pH mapping in transparent gel using color indicator videodensitometry. *Plant Soil* 183: 85-95.

Joner, E.J., R. Briones, and C. Leyval. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226: 227-234.

Jones, D.L., and D.S. Brassington. 1998. Sorption of organic acids in acid soils and its implications in the rhizosphere. *Eur. J. Soil Sci.* 49: 447-455.

Jones, D.L., and P.R. Darrah. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil* 166: 247-257.

Jungk, A.O. 1996. Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. In: Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi (Eds.), *Plant Roots : The Hidden Half*. Second edition. Marcel Dekker, New York, pp. 529-556.

Jongmans, A.G., N. van Breeman, U. Lundstrom, P.A.W. van Hees, R.D. Finlay, M. Srinivasan, T. Unestam, R. Giesler, P.-A. Melkerud, and M. Olsson. 1997. Rock-eating fungi. *Nature* 389: 682-683.

Kabala, C., and B.R. Singh. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *J. Environ. Qual.* 30: 485-492.

Kabata-Pendias, A., and H. Pendias. 1992. *Trace Elements in Soils and Plants*. Second edition. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kirlew, P.W., and D.R. Bouldin. 1987. Chemical properties of the rhizosphere in an acid subsoil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 128-132.

Knight, B., F.J. Zhao, S.P. McGrath, and Z.G. Shen. 1997. Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentrations and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil* 197: 71-78.

Kodama, H., S. Nelson, A.F. Yang, and N. Kohyama, N. 1994. Mineralogy of rhizospheric and non-rhizospheric soils in corn fields. *Clays Clay Min.* 42: 755-763.

Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31: 109-120.

Laurie, S.H., and J.A. Manthey. 1994. The chemistry and role of metal ion chelation in plant uptake processes. In: J.A. Manthey, D.E. Crowley, and D.G. Luster (Eds.), *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 165-182.

Laurie, S.H., N.P. Tancock, S.P. McGrath, and J.R. Sanders. 1991. Influence of complexation on the uptake by plants of iron, manganese, copper and zinc. I. Effect of EDTA in a multi-metal and computer simulation study. *J. Exp. Bot.* 42: 509-514.

Lawrence, S.G., and M.H. Holoka. 1987. Effects of low concentrations of cadmium on the crustacean zooplankton community of an artificially acidified lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (suppl. 1): 163-172.

Leyval, C., and J. Berthelin. 1991. Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of pine. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55: 1009-1016.

Leyval, C., and S.J. Joner. 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In: G.R. Gobran, W.W., Wenzel, and E. Lombi (Eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 165-185.

Lindsay, W.L. 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley & Sons, New York.

Løbersli, E., E. Gjengedal, and E. Steinnes. 1991. Impact of soil acidification on the mobility of metals in the soil-plant system. In: J.-P. Vernet (Ed.), *Heavy Metals in the Environment*. Elsevier, New York, pp. 37-53.

Lombi, E., W.W. Wenzel, G. Gobran, and D.C. Adriano. 2001. Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. In: G.R. Gobran, W.W., Wenzel, and E. Lombi (Eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3-24.

Lorenz, S.E., R.E. Hamon, P.E. Holm, H.C. Domingues, E.M. Sequeira, T.H. Christensen, and S.P. McGrath. 1997. Cadmium and zinc in plants and soil solutions from contaminated soils. *Plant Soil* 189: 21-31.

Lynch, J.M. 1990. *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons, New York.

Manthey, J.A., D.G. Luster, and D.E. Crowley. 1994. Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere: An introduction. In: J.A. Manthey, D.E. Crowley,

and D.G. Luster (Eds.), *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-9.

Marschner, H. 1986. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.

Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Second edition. Academic Press, London.

Marschner, H. 1998. Soil-root interface: Biological and biochemical processes. In: P.M. Huang, D.C. Adriano, T.J. Logan, and R.T. Checkai (Eds.), *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. SSSA Special Publication 52, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 191-231.

Marschner, H., and B. Dell. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159: 89-102.

Marschner, H., and V. Römheld. 1996. Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In: Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi (Eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*. Second edition. Marcel Dekker, New York, pp. 557-579.

McBride, M.B. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press, New York.

McBride, M.B., S. Sauvé, and W.H. Hendershot. 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *Eur. J. Soil Sci.* 48: 337-346.

McGrath, S.P., Z.G. Shen, and F.J. Zhao. 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil* 188: 153-159.

McLaughlin, M.J., E. Smolders, and R. Merckx. 1998. Soil-root interface: Physicochemical processes. In: P.M. Huang, D.C. Adriano, T.J. Logan, and R.T.

Checkai (Eds.), Soil Chemistry and Ecosystem Health. SSSA Special Publication 52, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 233-277.

Mench, M., and E. Martin. 1991. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates by *Zea mays* L., *Nicotina tabacum* L., and *Nicotina rustica* L. *Plant Soil* 132: 187-196.

Minnich, M.M., M.B. McBride, and R.L. Chaney. 1987. Copper activity in soil solution: II. Relation to copper accumulation in young snapbeans. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51: 573-578.

Mojallali, H., and S.B. Weed. 1978. Weathering of micas by mycorrhizal soybean plants. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 367-372.

Morgan, J.J., and W. Stumm. 1991. Chemical processes in the environment, relevance of chemical speciation. In: E. Merian (Ed.), *Metals and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis, and Biological Relevance*. VCH Publisher, New York, pp. 67-103.

Nardi, S., E. Sessi, D. Pizzeghello, A. Sturaro, R. Rella, and G. Parvoli. 2002. Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere* 46: 1075-1081.

Newman, E.I., and A. Watson. 1977. Microbial abundance in the rhizosphere : A computer model. *Plant Soil* 48: 17-56.

Nigam, R., S. Srivastava, S. Prakash, and M.M. Srivastava. 2001. Cadmium mobilisation and plant availability – The impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant Soil* 230: 107-113.

Nolan, A.L., E. Lombi, and M.J. McLaughlin. 2003. Metal bioaccumulation and toxicity in soils – Why bother with speciation? *Aust. J. Chem.* 56: 77-91.

Nye, P.H. 1986. Acid-base changes in the rhizosphere. In: B. Tinker, and A. Lauchli (Eds.), *Adv. Plant Nutr.*, Vol. 2, Praeger, New York, pp. 129-153.

Ontario Ministry of the Environment. 2001. Metals in soil and vegetation in the Sudbury area (Survey 2000 and additional historic data). Prepared by: L.Morra, R. Jones, G. Crawford, and D. McLaughlin, Ontario Ministry of the Environment, Canada.

Perry, D.A., R. Molina, and M.P. Amaranthus. 1987. Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation : Current knowledge and research needs. *Can. J. For. Res.* 17: 929-940.

Persson, H., Y. Von Fricks, and H. Majdi. 1995. Root distribution in a Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) stand subjected to drought and ammonium sulfate application. *Plant Soil* 168-169: 161-165.

Petersen, W., and M. Böttger. 1991. Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. *Plant Soil* 132: 159-163.

Pierzynski, G.M., J.T. Sims, and G.F. Vance. 2000. *Soils and Environmental Quality*. Second edition. CRC Press, Boca Raton, FL.

Römheld, V. 1986. pH changes in the rhizosphere of various crop plants in relation to the supply of plant nutrients. *Potash Review* 6-12: pp.1-8.

Ross, S.M., and K.J. Kaye. 1994. The meaning of metal toxicity in soil-plant systems. In: S.M. Ross (Ed.), *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. John Wiley & Sons, Chichester/New York, pp. 27-61.

Rovira, A.D., R.C. Foster, and J.K. Martin. 1979. Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: J.L. Harley, and R.S. Russell (Eds.), *The Root-Soil Interface*. Academic Press, London, pp. 1-4.

Salt, D.E., M. Blaylock, P.B.A.N. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet, and I. Raskin. 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnol.* 13: 468-475.

Sanders, J.R. 1982. The effects of pH upon the copper and cupric ion concentrations in soil solutions. *J. Soil Sci.* 33: 679-689.

Sauvé, S., M.B. McBride, and W.H. Hendershot. 1995. Ion-selective electrode measurements of copper (II) activity in contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 373-379.

Sauvé, S., N. Cook, W.H. Hendershot, and M.B. McBride. 1996. Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environ. Poll.* 94(2): 153-157.

Sauvé, S., M.B. McBride, W.A. Norvell, and W.H. Hendershot. 1997. Copper solubility and speciation of *in situ* contaminated soils: Effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Poll.* 100: 133-149.

Schöttelndreier, M., and U. Falkengren-Grerup. 1999. Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity. *Plant Soil* 209: 297-309.

Séguin, V., C. Gagnon, and F. Courchesne. *In press* 2003. Changes in water extractable metals, pH and organic carbon concentrations at the soil-root interface of forested soils. *Plant Soil*.

Sharma, A.K., P.C. Srivastava, and B.N. Johri. 1994. Contribution of VA mycorrhiza to zinc uptake in plants. In: J.A. Manthey, D.E. Crowley, and D.G. Luster (Eds.), *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 111-123.

Sheldrick, B.H. 1984. *Analytical Methods Manual 1984*. Land Resource Research Institute, Contribution 84-30, Agriculture Canada, Ottawa.

Shenker, M., T.W.-M. Fan, and D.E. Crowley. 2001. Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *J. Environ. Qual.* 30: 2091-2098.

Smith, W.H., and A.S. Pooley. 1989. Red spruce rhizosphere dynamics: Spatial distribution of aluminum and zinc in the near-root soil zone. *For. Sci.* 35(4): 1114-1124.

Soil Classification Working Group. 1998. *The Canadian System of Soil Classification*. Agriculture and Agri-food Canada, Ottawa, Canada.

Sposito, G. 1989. *The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, New York.

Tao, S., Y.J. Chen, F.L. Xu, J. Cao, and B.G. Li. 2003. Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environ. Poll.* 122: 447-454.

Uren, N.C., and H.M. Reisenauer. 1988. The role of nutrient exudates in nutrient acquisition. *Adv. Plant Nutr.* 3: 79-114.

US-Environmental Protection Agency (EPA). 1998. *Microwave Assisted Acid Digestion for Sediments and Soil*. SW 3051-A, Washington, DC.

Vaughan, D., D.G. Lumsdon, and D.J. Linehan. 1993. Influence of dissolved organic matter on the bio-availability and toxicity of metals in soils and aquatic systems. *Chem. Ecol.* 8: 185-201.

Vulkan, R., F.-J. Zhao, V. Barbosa-Jefferson, S. Preston, G.I. Paton, E. Tipping, and S.P. McGrath. 2000. Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 34: 5115-5121.

Wang, E.X., and G. Benoit. 1996. Mechanisms controlling the mobility of lead in the spodosols of a northern hardwood forest ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 30: 2211-2219.

Wang, X., and D. Zabowski. 1998. Nutrient composition of Douglas-fir rhizosphere and bulk soil solutions. *Plant Soil* 200: 13-20.

Wang, Z., A. Göttlein, and G. Bartonek. 2001. Effects of growing roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.) on rhizosphere soil solution chemistry. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 35-41.

Wang, Z., X. Shan, and S. Zhang. 2002. Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils. *Chemosphere* 46: 1163-1171.

Weng, L., E.J.M. Temminghoff, and W.H. Van Riemsdijk. 2001. Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique. *Eur. J. Soil Sci.* 52: 629-637.

Wenzel, W.W., M. Bunkowski, M. Puschenreiter, and O. Horak. 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ. Poll.* 123: 131-138.

Whipps, J.M., and J.M. Lynch. 1986. The influence of the rhizosphere on crop productivity. *Adv. Microb. Ecol.* 9: 187-244.

Wilkins, D.A. 1991. The influence of sheathing (ecto) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agric. Ecos. Environ.* 35: 145-260.

Yin, Y., C.A. Impellitteri, S.-J. You, and H. E. Allen. 2002. The importance of organic matter distribution and extract soil:solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *Sci. Total Environ.* 287: 107-119.

Zhang, H., F.-J. Zhao, B. Sun, W. Davison, and S.P. McGrath. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. Technol.* 35: 2602-2607.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification

Pascale Legrand

M.Sc. Géographie

2. Description du chapitre

Titre

Speciation and bioavailability of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in the rhizosphere of contaminated soils

Auteurs

Pascale Legrand, Marie-Claude Turmel, Sébastien Sauvé et François Courchesne

Cet article, rédigé sous invitation, constitue un des chapitres d'un livre intitulé "Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere" publié aux éditions Elsevier, sous la supervision de P.M. Huang et G.R. Gobran (éditeurs délégués). Le chapitre a été soumis pour publication.

3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Pascale Legrand inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Spéciation et biodisponibilité de métaux traces (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) dans la rhizosphère de sols contaminés".

Marie-Claude Turmel

Coauteur

Signature

Date

10 décembre 2003

Sébastien Sauvé

Coauteur

Signature

Date

2 novembre 03

François Courchesne

Coauteur

Signature

Date

9 déc 2003