

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Réhabilitation d'un site contaminé de la ville de Montréal par des approches de  
phytoremédiation

Par

Rosalie Lefebvre

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en sciences biologiques

Août 2007

© Rosalie Lefebvre, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Restauration d'un site contaminé de la ville de Montréal par des approches de  
phytoremédiation

Présenté par :  
Rosalie Lefebvre

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Brisson  
président-rapporteur

Michel Labrecque  
directeur de recherche

Marc St-Arnaud  
codirecteur

Mohamed Hijri  
membre du jury

## RÉSUMÉ

Afin de déterminer la capacité de phytoremédiation de deux espèces d'arbres à croissance rapide, le *Salix viminalis* (clone 5027) et le peuplier hybride NM5 (*Populus maximowiczii* X *Populus nigra*), et l'impact de leurs symbioses mycorhizienne avec le *Glomus intraradices*, des boutures de chaque espèce ont été plantées dans des pots contenant du sol contaminé (As, Cd, Cu, Pb, Zn), provenant d'un *brownfield* urbain. Comparé au peuplier hybride, le saule montrait des quantités plus élevées de chaque métal dans les feuilles, tiges et racines. À l'opposé, le peuplier produisait plus de biomasse. Cependant, aucune différence significative n'a été mesurée entre les plants mycorhizés et les plants non inoculés, que ce soit au niveau de la production de biomasse ou d'accumulation de métaux dans les tissus. Par la suite, la capacité de phytoremédiation de deux espèces d'arbres à croissance rapide, le *Salix viminalis*, clone 5027, et le peuplier hybride *Populus* × *generosa*, associées au champignon mycorhizien *Glomus intraradices* ou non inoculées, a été testée sur un *brownfield* urbain contaminé (Cr, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn). Le *P.* × *generosa* produisait plus de biomasse que le saule au niveau des feuilles et des tiges. De plus, les deux espèces produisaient plus de biomasse aérienne lorsque inoculées avec le *G. intraradices*. Le *S. viminalis* avait généralement une meilleure capacité d'accumulation des métaux dans ses parties aériennes. L'inoculation mycorhizienne diminuait l'absorption de Cd et de Cu dans les feuilles et tiges du peuplier, alors que c'était l'opposé chez le saule.

## MOTS-CLÉS

Phytoremédiation, *brownfield*, contamination, métaux lourds, *Salix viminalis*, peuplier hybride, symbiose mycorhizienne, *Glomus intraradices*.

## ABSTRACT

To assess the phytoextraction capacity of two woody species, *Salix viminalis*, clone 5027, and the hybrid poplar NM5 (*Populus maximowiczii* X *Populus nigra*), and the impact of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, cuttings were grown in pots using a soil contaminated with heavy metals (As, Cd, Cu, Pb, Zn), collected from an urban brownfield. In comparison to the hybrid poplar, *S. viminalis* showed higher concentrations for all analysed heavy metals in its leaves, stems and roots. Conversely, the poplar species produced more biomass. Both tree species grown on contaminated soil were colonized with *G. intraradices* at a suitable level. However, no statistical differences were observed in biomass production or heavy metal absorption between plants inoculated or non-inoculated with the mycorrhizal fungus. Secondly, phytoextraction and biomass production capacity of *Salix viminalis* (clone 5027) and *Populus* × *generosa* associated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* or non-inoculated were assessed. A field trial was performed in the same brownfield, contaminated with heavy metals (Cr, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn). The experimental design included the two tree species that were inoculated or non-inoculated with *G. intraradices*. *P.* × *generosa* produced more leaf and stem biomass than *S. viminalis*, and both species produced more biomass when inoculated with *G. intraradices*. *S. viminalis* generally takes up more heavy metals than *P.* × *generosa*, in both its leaves and stems. Moreover, mycorrhizal inoculation decreased Cd and Cu uptake in poplar leaves and stems, respectively, whereas it promoted Cu and Cd accumulation in *S. viminalis*.

## KEYWORDS

Phytoremediation, brownfield, contamination, heavy metals, *Salix viminalis*, hybrid poplar, mycorrhizal symbiosis, *Glomus intraradices*.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
MOTS-CLÉS.....	iii
ABSTRACT .....	iv
KEYWORDS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	x
REMERCIEMENTS .....	xiii
AVANT-PROPOS .....	xiv
Chapitre 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
1.1 CONTAMINATIONS.....	5
1.1.2 <i>Types et sources de contamination</i> .....	5
1.1.3 <i>Brownfields</i> .....	5
1.1.4 <i>Régulation des contaminants dans les sols</i> .....	6
1.2 RÉHABILITATION DES SITES CONTAMINÉS .....	8
1.2.1 <i>Techniques conventionnelles</i> .....	8
1.2.2 <i>Phytotechnologies</i> .....	8
1.2.2.1 <i>Rhizofiltration</i> .....	9
1.2.2.2 <i>Phytodégradation</i> .....	10
1.2.2.3 <i>Phytovolatilisation</i> .....	10
1.2.2.4 <i>Phytostabilisation</i> .....	10
1.3 PHYTOEXTRACTION DES MÉTAUX.....	11
1.3.1 <i>Spécificité des plantes hyperaccumulatrices</i> .....	12
1.3.2 <i>Espèces hyperaccumulatrices</i> .....	12
1.3.3 <i>Arbres à croissance rapide et phytoextraction</i> .....	16
1.4 UTILISATION DE BACTÉRIES ET CHAMPIGNONS EN BIOREMÉDIATION .....	17
1.5 PHYSIOLOGIE ET BIOCHIMIE DE LA PHYTOREMÉDIATION .....	21
1.5.1 <i>Biodisponibilité des éléments dans le sol</i> .....	21
1.5.2 <i>Mécanismes d'absorption</i> .....	22
1.5.3 <i>Protéines impliquées</i> .....	24
1.5.4 <i>Mécanismes présents chez les microorganismes</i> .....	25
1.5.5 <i>Composés chélateurs et de détoxification</i> .....	27
1.5.6 <i>Mécanismes de translocation</i> .....	29
1.5.7 <i>Stockage et volatilisation</i> .....	30

1.6 MÉTHODES D'ANALYSE DES INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES .....	31
1.6.1 <i>Méthodes basées sur l'ADN/ARN</i> .....	32
1.6.2 <i>Autres méthodes</i> .....	33
1.7 PROBLÉMATIQUE .....	34
1.7.1 <i>Approche expérimentale</i> .....	35
1.7.2 <i>Choix des espèces</i> .....	36
Chapitre 2. PHYTOEXTRACTION AND GROWTH CAPACITY OF THE WOODY SPECIES <i>SALIX VIMINALIS</i> AND THE HYBRID POPLAR NM5 ( <i>POPULUS MAXIMOWICZII</i> X <i>POPULUS NIGRA</i> ), IN ASSOCIATION WITH THE AMF <i>GLOMUS INTRARADICES</i> .....	37
2.1 ABSTRACT .....	38
2.1.1 <i>Keywords</i> .....	38
2.2 INTRODUCTION .....	39
2.3 MATERIAL AND METHODS .....	41
2.3.1 <i>Soil characteristics</i> .....	41
2.3.2 <i>Plant material, mycorrhizal inoculation and growth conditions</i> .....	42
2.3.3 <i>Experimental design</i> .....	42
2.3.4 <i>Sampling and sample analyses</i> .....	43
2.3.5 <i>Statistical analyses</i> .....	43
2.4 RESULTS .....	45
2.4.1 <i>Dry plant biomass</i> .....	45
2.4.2 <i>Heavy metal accumulation in tree tissues</i> .....	46
2.4.2.1 <i>Copper</i> .....	46
2.4.2.2 <i>Arsenic</i> .....	47
2.4.2.3 <i>Cadmium</i> .....	47
2.4.2.4 <i>Lead</i> .....	47
2.4.2.5 <i>Zinc</i> .....	47
2.4.3 <i>Mycorrhizal colonization</i> .....	49
2.5 DISCUSSION .....	51
2.5.1 <i>Biomass production</i> .....	51
2.5.2 <i>Heavy metals in plant tissues and soil</i> .....	52
2.5.3 <i>Mycorrhizal symbiosis effect</i> .....	54
2.6 CONCLUSION .....	55
2.7 ACKNOWLEDGMENTS .....	55
2.8 REFERENCES.....	56

Chapitre 3. PHYTOREMEDIATION OF A HEAVY-METAL CONTAMINATED URBAN BROWNFIELD IN A FIELD TRIAL USING THE WOODY SPECIES <i>SALIX VIMINALIS</i> AND THE HYBRID POPLAR <i>POPULUS × GENEROSA</i> , INOCULATED WITH <i>GLOMUS INTRARADICES</i> .....	60
3.1 ABSTRACT .....	61
3.1.1 <i>Keywords</i> .....	61
3.2 INTRODUCTION .....	62
3.3 MATERIALS AND METHODS .....	64
3.3.1 <i>Soil characteristics</i> .....	64
3.3.2 <i>Plant material, mycorrhizal inoculation and growth conditions</i> .....	64
3.3.3 <i>Experimental design</i> .....	65
3.3.4 <i>Sampling and sample analyses</i> .....	65
3.3.5 <i>Statistical analyses</i> .....	66
3.4 RESULTS .....	67
3.4.1 <i>Dry Biomass</i> .....	67
3.4.2 <i>Heavy metal accumulation in tree tissues</i> .....	68
3.4.2.1 <i>Copper</i> .....	68
3.4.2.2 <i>Cadmium</i> .....	68
3.4.2.3 <i>Zinc</i> .....	69
3.4.2.4 <i>Chromium, manganese, lead and nickel</i> .....	69
3.4.3 <i>Inoculation of <i>G. intraradices</i> in the field</i> .....	71
3.5 DISCUSSION .....	72
3.6 CONCLUSION .....	75
3.7 ACKNOWLEDGMENTS .....	75
3.8 REFERENCES .....	76
Chapitre 4. CONCLUSIONS GENERALES .....	80
4.1 CONCLUSIONS GENERALES .....	81
4.2 RÉFÉRENCES GÉNÉRALES .....	85



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Chapitre 1.</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	
1.1	Description des critères génériques concernant la présence de contaminants dans les sols du Québec (tiré de MENV, 1999).....	7
1.2	Critères de contamination de sol, en ppm (mg kg <sup>-1</sup> de matière sèche) pour différents métaux et métalloïdes présents dans les sols (tiré de MENV, 1999).....	7
<b>Chapitre 2.</b>	<b>PHYTOEXTRACTION AND GROWTH CAPACITY OF THE WOODY SPECIES <i>SALIX VIMINALIS</i> AND THE HYBRID POPLAR NM5 (<i>POPULUS MAXIMOWICZII</i> X <i>POPULUS NIGRA</i>), IN ASSOCIATION WITH THE AMF <i>GLOMUS INTRARADICES</i></b>	
2.1	Chemical properties and heavy metal contents of both soils (S1, contaminated; S2, uncontaminated control) used in the pot experiment. CEC, cation exchange capacity; OM, organic matter.....	53
2.2	Extracted concentration for Cu, Zn, As, Cd and Pb (µg g <sup>-1</sup> ) with CaCl <sub>2</sub> -CaSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> and EDTA reagent.....	53
2.3	Mean dry biomass of roots, stems and leaves (g), of the two species, the hybrid poplar and <i>Salix viminalis</i> , on contaminated (S1) and uncontaminated (S2) soil, with (M1) or without (M0) inoculation with <i>Glomus intraradices</i> .....	55
<b>Chapitre 3.</b>	<b>PHYTOREMEDIATION OF A HEAVY-METAL CONTAMINATED URBAN BROWNFIELD IN A FIELD TRIAL USING THE WOODY SPECIES <i>SALIX VIMINALIS</i> AND THE HYBRID POPLAR <i>POPULUS</i> X <i>GENEROSA</i>, INOCULATED WITH <i>GLOMUS INTRARADICES</i>.</b>	
3.1	Chemical properties and heavy metal contents of soil present in the contaminated site Allée des Tanneries.....	76
3.2	Mean stems and leaves dry biomass (g), of the two species, the hybrid poplar and <i>Salix viminalis</i> , soil, with (T1) or without (T0) inoculation with <i>Glomus intraradices</i> .....	77
3.3	Mycorrhization percentages (%) of the willow clone <i>Salix viminalis</i> and the hybrid poplar <i>Populus generosa</i> , without mycorrhization inoculation (T0) or with mycorrhization treatment (T1) with <i>G. intraradices</i> . Results between T0 and T1 do not differ at the classical statistical level of 5%.....	81

## LISTE DES FIGURES

<b>Chapitre 2.</b>	PHYTOEXTRACTION AND GROWTH CAPACITY OF THE WOODY SPECIES <i>SALIX VIMINALIS</i> AND THE HYBRID POPLAR NM5 ( <i>POPULUS MAXIMOWICZII</i> X <i>POPULUS NIGRA</i> ), IN ASSOCIATION WITH THE AMF <i>GLOMUS INTRARADICES</i>	
2.1	Concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of Cu, Cd, As, Pb and Zn in roots, stems and leaves tissues of the two woody species, grown on contaminated soil, with (black bars) or without (grey bars) inoculation with <i>G. intraradices</i> . Error bars indicates standard error of the mean. Mycorrhizal inoculation had no significant effect on heavy metal uptake. For each heavy metal presented and within each plant structure, means with a different letter were significantly different at $p < 0.05$ between species (roots: a, b) (stems: m, n) (leaves: x, y).....	57
2.2	Mycorrhizal colonization percentages (%) of the roots of willow species <i>Salix viminalis</i> and the poplar species hybrid NM5, on contaminated soil S1 (black bars) or uncontaminated soil S2 (grey bars).....	59
<b>Chapitre 3.</b>	PHYTOREMEDIATION OF A HEAVY-METAL CONTAMINATED URBAN BROWNFIELD IN A FIELD TRIAL USING THE WOODY SPECIES <i>SALIX VIMINALIS</i> AND THE HYBRID POPLAR <i>POPULUS</i> X <i>GENEROSA</i> , INOCULATED WITH <i>GLOMUS INTRARADICES</i> .	
3.1	Concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of Cu, Cd, Mn, Pb, Cr, Ni and Zn in stem and leave tissues of the two woody species, without (T0, grey bars) or with inoculation (T1, black bars) with <i>G. intraradices</i> .....	79

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AMF.....	arbuscular mycorrhizal fungus
Al.....	aluminium
As.....	arsenic
Ca.....	calcium
Cd.....	cadmium
CEC.....	capacité d'échange cationique
Cm.....	centimètre
Cr.....	chrome
Cu.....	cuiivre
g.....	gramme
K.....	potassium
kg.....	kilogramme
m.....	mètre
Mn.....	manganèse
MENV.....	ministère de l'Environnement du Québec
Mg.....	milligramme
Mg kg <sup>-1</sup> .....	milligramme par kilogramme
Min.....	minute
ml.....	millilitre
Ni.....	nickel
OM.....	organic matter
P.....	phosphore
Pb.....	plomb
Zn.....	zinc

À ceux qui ont crû en moi.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord messieurs Michel Labrecque et Marc St-Arnaud, qui m'ont confié ce projet. Ils sont su me guider, me conseiller et m'accompagner tout au long de cette démarche et m'ont permit non seulement d'acquérir les connaissances et compétences nécessaires, mais l'ont fait de la plus agréable des façons, en respectant mes idées, ma méthode de travail et mes caprices passagers. J'ai beaucoup apprécié la confiance qu'ils avaient en moi et la liberté qu'ils m'ont laissée. Ils m'ont facilité la vie à plus d'une reprise et ont contribué de cette manière à rendre mon passage à l'IRBV et l'Université de Montréal encore plus plaisants.

Je tiens aussi à remercier mon conjoint Frédérick, et mes amies Sarah-Amélie, Sophie et Mariannick, ainsi que les membres de ma famille, qui ont su être à mes côtés, autant dans les hauts que dans les bas. Merci spécial à Alexis qui m'a donné un énorme coup de main en révisant mes articles à un si court préavis.

Merci à Adela Voicu, Maud Fillion, Jean Teodorescu, de l'IRBV, pour l'aide apportée, tant sur le terrain qu'en laboratoire. Merci aussi à Stéphane Daigle pour les analyses statistiques (et tout ce qui s'y rattache) ainsi que pour sa patience et ses réponses à mes nombreuses questions. Je tiens à remercier Hélène Lalande, de l'université McGill, pour son assistance lors des analyses effectuées dans son laboratoire.

Finalement, je tiens à remercier les Amis du Jardin botanique de Montréal et le Fond vert municipal du gouvernement du Canada pour l'aide financière apportée, ainsi que Premier Tech Biotechnologies pour la contribution au niveau des mycorhizes.

**«J'ai des questions à toutes vos réponses.»**  
Woody ALLEN

**«Une erreur originale vaut mieux qu'une vérité banale.»**  
Fiodor DOSTOÏEVSKI

**«Certains ne deviennent jamais fous...  
Leurs vies doivent être bien ennuyeuses. »**  
Charles BUKOWSKI

## AVANT-PROPOS

Le présent mémoire a été rédigé par articles. Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 ont donc été écrits sous forme d'articles scientifiques. Le chapitre 2, qui constitue le premier article, est issu du fruit de longs mois de recherche. Tout au cours de ce processus, entamé dès l'été 2005, ma participation aux travaux de recherche, que ce soit en laboratoire, sur le terrain ou la recherche bibliographique, a été au premier plan. Mon directeur, Michel Labrecque, et mon co-directeur, Marc St-Arnaud, ont su me guider à travers ce processus complexe, sans toutefois m'imposer leurs vues, façon de faire ou idées. En tant que premier auteur, la compilation et l'analyse des données, en plus de l'écriture et de l'élaboration de ces documents me reviennent entièrement, avec le conseil de messieurs St-Arnaud et Labrecque, qui sont co-auteurs.

Le chapitre 3 constitue le deuxième article. En tant que premier auteur, mon apport est primordial autant au niveau technique (présence sur le terrain, mesures en laboratoire, etc.) que dans la recherche bibliographique et l'écriture. La compilation et l'analyse des données, en plus de l'écriture et de l'élaboration de ces documents me reviennent entièrement, avec les conseils de messieurs Labrecque et St-Arnaud, co-auteurs. De plus, le travail de Mme Adela Voicu a fait partie intégrante de ces expériences, ce qui en fait co-auteur du deuxième article.

# **Chapitre 1**

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'avènement de l'ère industrielle, survenue vers le milieu du 19<sup>ième</sup> siècle, a laissé dans son sillage moult sites abandonnés ayant subis les affres du progrès. En effet, nombre de terrains, dont l'usage était anciennement voué à des usines et autres manufactures, présentent aujourd'hui une contamination plus ou moins forte, héritage de pratiques désuètes, peu respectueuses de l'environnement. La plupart du temps disséminés à travers les villes, on dénote chez ces derniers la présence en quantité variable de divers contaminants, organiques ou inorganiques, pouvant exposer les êtres humains habitant en périphérie à un danger potentiel. La mise en application des lois relatives aux sols contaminés (MENV, 1999) passe la plupart du temps par des méthodes de décontamination conventionnelles, c'est-à-dire l'excavation et le remblais (Raskin et al., 1997). Le creusage et le déplacement de sol ne font que mouvoir le problème, qui restera entier pour les générations futures (Gohre and Paszkowski, 2006). Ces méthodes, en plus d'être coûteuses et destructrices, perturbent le sol et annihilent pratiquement la variété de microorganismes qui promulguent la croissance des plantes qui peuvent s'y développer.

La phytoremédiation, qui se base sur l'usage de plantes afin d'extraire les contaminants d'un milieu et d'atténuer le danger, s'est imposée comme la nouvelle voie en matière de décontamination au cours de la dernière décennie (Salt et al., 1998). Cette technique, relativement nouvelle, offre l'avantage d'être peu coûteuse, comparée aux moyens habituels. Si ce procédé alternatif se déroule sur un laps de temps plus long que les méthodes conventionnelles, il est résolument plus respectueux de l'environnement, cadrant ainsi avec des préoccupations contemporaines.

La dernière décennie a vu l'intérêt grandir face à la phytoremédiation. Plusieurs nouvelles espèces se sont vues joindre les rangs de celles utilisées pour cette technologie, soit par leur caractéristique d'hyperaccumulation ou par leur croissance rapide jumelée à leur tolérance aux métaux (Brooks et al., 1998). Ces plantes, communément désignées sous le nom d'hyperaccumulatrices, se sont adaptées à des sols naturellement riches en métaux lourds (Raskin et al., 1997). En effet, les plantes ont développé des mécanismes d'adaptation au cours de l'évolution, leur permettant de survivre dans des conditions extrêmes. L'accumulation des métaux dans les tissus dérive probablement d'un trait adaptatif, permettant ainsi à certaines

espèces d'occuper de nouvelles niches (Assuncao et al., 2003). Ce trait serait une extension de la tolérance aux métaux qu'ont certaines espèces, qui aurait pour sa part évolué indépendamment dans plusieurs genres, sous la pression exercée par l'herbivorie des insectes (Boyd and Moar, 1999). Il existe plusieurs centaines de plantes hyperaccumulatrices, qui stockent divers métaux (Yang et al., 2004). En plus de ces plantes hyperaccumulatrices, l'usage d'arbres à croissance rapide représente une voie de plus en plus empruntée, comme dans le cas de la présente étude. Non seulement ces derniers croissent rapidement, ils peuvent aussi s'établir sur des sols pauvres et perturbés (Maxted et al., 2007). Ces végétaux peuvent être utilisés de concert avec des microorganismes tels les champignons mycorhiziens, ectomycorhizes ou endomycorhizes, ou encore certaines bactéries. Par exemple, l'utilisation de mycorhizes arbusculaires dans l'amélioration de projets de phytoremédiation a aussi été démontrée, notamment avec des plantes hyperaccumulatrices (Heggo and Angle, 1990).

Bien que chaque aspect de la phytoremédiation n'ait pas été investigué au cours de cette étude, il est cependant important de connaître les mécanismes et réactions inhérents à ce processus complexe. D'ailleurs, le champ d'étude de la phytoremédiation est quasi illimité. Processus physiologiques, métaboliques, biochimiques des plantes et microorganismes qui sont en relation dans des milieux, contrôlés ou non, pouvant présenter des contaminations de nature différente. La revue de littérature subséquentement présentée, en guise de préambule au projet de recherche même, fait un survol des différents aspects théoriques reliés à ce dernier. Sont présentées aussi les diverses espèces utilisées en phytoremédiation, tant de plantes hyperaccumulatrices que d'arbres à croissance rapide, ainsi que de leurs associations avec divers microorganismes. De plus, il sera traité de certains processus physiologiques survenant au niveau des végétaux et de leurs symbiontes lors de la phytoremédiation et finalement, une énumération non exhaustive de certaines techniques utilisées afin de rendre compte de interactions plantes-microorganismes.

Le travail présenté dans ce mémoire fait état d'un projet de recherche portant sur la phytoremédiation. En effet, des arbres à croissance rapide, *Salix viminalis* clone 5027, le peuplier hybride NM5 (*Populus maximowiczii* x *Populus nigra*) et le peuplier hybride *Populus* x *generosa* ont été plantés sur un sol contaminé, provenant d'un *brownfield* de la ville de Montréal. De plus, ces derniers ont été inoculés avec le champignon mycorhizien arbusculaire

*Glomus intraradices*, afin de rendre compte de leurs interactions en sol contaminé, chose qui n'avait pas été rapportée, du moins avec des arbres à croissance rapide. Le chapitre 2 rend compte de la première phase (*ex situ*) qui s'est déroulée sous conditions contrôlées, où les arbres ont été cultivés en pots, dans un sol contaminé et non-contaminé et associés ou non au champignon mycorhizien. Le chapitre 3 fait part de la suite de l'expérience, qui a été faite au champ. Les différents arbres ont été plantés directement sur le site à l'étude, présentant une légère contamination, et ont été inoculés avec le même champignon mycorhizien, *G. intraradices*.

## 1.1 CONTAMINATIONS

### 1.1.2 *Types et sources de contamination*

Un sol est dit contaminé lorsque la présence d'une ou plusieurs substances a des effets néfastes sur l'environnement et les êtres vivants l'habitant (Salt et al., 1995). Les contaminants peuvent être divisés en deux grandes catégories, soit les polluants organiques et les polluants inorganiques. Les polluants organiques sont principalement d'origine anthropique, formés de molécules souvent étrangères aux organismes vivants (Smits, 2005). Parmi les principaux contaminants organiques, on retrouve les pesticides, les produits pétroliers, les solvants et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dont les sources sont diverses : industries, agriculture, déversements, usages domestiques (Smits, 2005). Les polluants inorganiques comprennent les métaux et métalloïdes (Cu, Pb, As, Cd, Zn, etc.). Ces derniers sont présents naturellement dans la croûte terrestre et l'atmosphère (Trenhaile, 1998). Plusieurs processus géomorphologiques, dont l'effritement excessif des minéraux et des ions métalliques des roches, le dépôt atmosphérique provenant des volcans en éruption et le transport de poussières continentales (Karthikeyan and Kulakow, 2003) contribuent à l'augmentation de leur concentration dans les sols. Malgré tout, la contamination due aux polluants inorganiques est généralement d'origine anthropique. L'agriculture, l'industrie minière et les activités militaires sont toutes des sources potentielles de contamination aux métaux. Au Québec les métaux lourds représentent la deuxième catégorie de polluants qui sont présents en plus grande partie dans les sols, après les dérivés du pétrole (Giasson and Jaouich, 1998)

### 1.1.3 *Brownfields*

Malgré la provenance naturelle, en quantité parfois élevée, de certains métaux dans les sols, les activités d'origine anthropique restent les principales responsables de la contamination inorganiques des sols. La présence d'éléments polluants ne doit pas dépasser certains critères établis (voir prochaine section). Lorsque que c'est le cas, il est nécessaire, aux yeux de la loi, de remédier à la situation. Alors que les terrains contaminés sont sous la responsabilité du propriétaire ou de l'acquéreur (CCME, 2006), plusieurs décident de laisser les choses en suspens au lieu de payer pour décontaminer ces lieux. En milieu urbain, on retrouve quantité d'anciens sites commerciaux et industriels qui sont abandonnés, inutilisés, et présentant une contamination

plus ou moins lourde (Greenberg, 2002). Ces terrains, qu'on appelle *brownfields*, sont en général délaissés, tant par les organisations municipales que par les promoteurs immobiliers, leur revalorisation n'étant pas jugée nécessaire ou majoritairement, trop coûteuse. Le couvert végétal présent en ces lieux est le plus souvent clairsemé ou pratiquement absent (Jennings et al., 2002). Moutt terrains contaminés sont ainsi présents à proximité des écoles, habitations, milieux de vie de plusieurs personnes. Ces terrains laissés à eux-mêmes s'apparentent à des boîtes noires où le sort final des substances dangereuses, par exemple, l'input dans l'environnement, restent hasardeux et complètement aléatoire (Greenberg, 2002).

#### 1.1.4 Régulation des contaminants dans les sols

Afin de prémunir la population contre les effets néfastes des polluants présents dans les sols, le gouvernement du Québec, par la voie du ministère de l'Environnement, a élaboré la *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés* (MENV, 1999). Le Conseil canadien de ministres de l'environnement (CCME), a pour sa part établi des critères, semblables, servant de guides pour les provinces. Ce système de classification des sols fait appel à des critères génériques (Tableau 1.1) pour apposer des balises afin de gérer la qualité des sols selon différents usages, soit agriculture, résidentiel, récréatif, commercial et industriel. Basés sur des études d'impact chez divers organismes, ces critères se doivent d'être respectés, selon l'usage du terrain. Si ce dernier est contaminé, il devrait en principe être remédié afin de satisfaire aux critères énoncés. Différents métaux et métalloïdes sont soumis à ces règles de protection des sols et leurs teneurs devraient être conformes à la loi (Tableau 1.2). Comme mentionné précédemment, la décontamination est la responsabilité du propriétaire du terrain.

Tableau 1.1 Description des critères généraux concernant la présence de contaminants dans les sols du Québec.

Critère	Énoncé
A	Teneurs de fond pour les paramètres inorganiques, agriculture.
B	Limite maximale acceptable pour des terrains à vocation résidentielle, récréative et institutionnelle. Sont également inclus les terrains à vocation commerciale situés dans un secteur résidentiel.
C	Limite maximale acceptable pour des terrains à vocation commerciale, non situés dans un secteur résidentiel, et pour des terrains à usage industriel.

Tableau 1.2 Critères de contamination de sol, en ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$  de matière sèche) pour différents métaux et métalloïdes présents dans les sols.

	A	B	C
Argent (Ag)	2	20	40
Arsenic (As)	6	30	50
Baryum (Ba)	200	500	2 000
Cadmium (Cd)	1,5	5	20
Cobalt (Co)	15	50	300
Chrome total (Cr)	85	250	800
Cuivre (Cu)	40	100	500
Étain (Sn)	5	50	300
Manganèse (Mn)	770	10003	22003
Mercure (Hg)	0,2	2	10
Molybdène (Mo)	2	10	40
Nickel (Ni)	50	100	500
Plomb (Pb)	50	500	1 000
Sélénium (Se)	1	3	10
Zinc (Zn)	110	500	1 500

## 1.2 RÉHABILITATION DES SITES CONTAMINÉS

### 1.2.1 *Techniques conventionnelles*

Afin de respecter les normes comprises dans la Loi sur les sols contaminés, un terrain dont la concentration en métaux excède les limites établies doit être décontaminé. Plusieurs méthodes sont utilisées pour assainir un lieu. Ces procédés pourraient être divisés en deux catégories : les techniques *ex situ*, qui regroupent les méthodes communément utilisées, et *in situ*, dont fait partie la phytoremédiation (Khan et al., 2000). Les techniques conventionnelles comportent le plus souvent l'excavation et le chargement du sol pollué à partir du terrain visé vers un site d'enfouissement. En plus de littéralement déplacer le problème, cette façon de faire présente d'autres risques pour l'environnement, soit pendant le transport même du sol contaminé, mais aussi après que l'on en ait disposé, alors que les polluants inorganiques peuvent migrer dans le sol et se répandre dans l'environnement (Khan et al., 2000; Pulford and Watson, 2003). De plus, les coûts opérationnels demeurent très élevés, pouvant atteindre jusqu'à 1 000 000\$ par acre (Dickinson, 2000; Robinson et al., 2003). L'immobilisation et l'extraction des contaminants inorganiques, par des moyens physico-chimiques sont, pour leur part, des méthodes coûteuses et qui sont plus appropriées pour des petites surfaces (Pulford and Watson, 2003). Le 'lavage' à l'acide du sol contaminé peut aussi être envisagé. Cependant, cette manière de faire détruit le sol, tant sa diversité biologique que son intégrité chimique sont compromises (Dickinson, 2000). De fait, les méthodes plutôt habituelles de décontamination du sol sont la plupart du temps onéreuses et rendent le sol impropre à la croissance en annihilant ses propriétés physico-chimiques et les organismes utiles à la croissance des plantes, tels les bactéries fixatrices d'azotes, les champignons mycorhiziens et autres vers de terre. Nonobstant le fait que ces techniques peuvent être réalisées en peu de temps, les coûts tant monétaires qu'écologiques font en sorte que d'autres options peuvent être envisagées.

### 1.2.2 *Phytotechnologies*

Plusieurs techniques de pointe ont été développées au cours des dernières années en misant sur la capacité qu'ont certains végétaux à emmagasiner des contaminants dans leurs tissus, particulièrement des métaux et métalloïdes. La phytoremédiation pourrait être définie comme étant l'usage des végétaux pour soustraire les contaminants présents dans

l'environnement (Raskin et al., 1997; Giasson and Jaouich, 1998; Tsao, 2003). Le principe général de la phytoremédiation repose sur la formation d'un continuum sol-plante-atmosphère, où une substance passe du sol aux racines, grâce à la pression exercée par le flux transpiratoire, pour être ensuite transloquée aux parties aériennes, le tout pouvant être récolté (Salt et al., 1998; Tsao, 2003). Ce moyen offre plusieurs avantages : les coûts d'opération sont minimes et les métaux récupérés peuvent être recyclés (Giasson and Jaouich, 1998), fournissant ainsi un bénéfice secondaire (Raskin et al., 1997; Ensley, 2000). De plus, cette solution non destructive peut être utilisée sur une longue période, permettant le nettoyage d'un site tout en respectant son intégrité écologique (Khan et al., 2000) et en fournissant un couvert végétal apprécié de la population en général (Blaylock and Huang, 2000; Smits, 2005). Certaines propriétés, essentielles pour que la décontamination soit effective, se doivent d'être présentes chez les végétaux utilisés : croissance rapide, production élevée de biomasse, réseau racinaire dense et niveau élevé de tolérance au stress (hydrique, carences nutritives, etc.) (Smits, 2005). Plusieurs mécanismes sous-tendent le concept de phytoremédiation, selon les propriétés physiologiques des végétaux.

#### 1.2.2.1 Rhizofiltration

Ce procédé mise sur la capacité qu'ont les racines de certaines plantes à pomper les métaux afin de filtrer des plans et des cours d'eau (Salt et al., 1998; Karthikeyan and Kulakow, 2003). On utilise les racines des végétaux afin d'absorber, concentrer et précipiter les métaux présents dans un effluent (Dushenkov et al., 1995; Dushenkov and Kapulnik, 2000). Plusieurs expériences ont été conduites avec des plantes aquatiques, semi-aquatiques et aussi du matériel végétal séché afin de trouver l'espèce optimale que serait intégrée à un système de purification (Raskin et al., 1997). De plus, des plantes terrestres, telles *Brassica juncea*, et des arbres, comme ceux du genre *Salix*, ont démontré de bonnes aptitudes pour ce procédé, grâce à leurs réseaux racinaire étendus et leur capacité à former de l'aérenchyme lorsque leur racines sont submergées (Dushenkov et al., 1995; Kuzovkina and Quigley, 2005).



### 1.2.2.2 Phytodégradation

La phytodégradation est plutôt applicable aux polluants organiques contenus dans les sols (Salt et al., 1998). La disposition des plantes à produire des enzymes ou des cofacteurs nécessaires à la dégradation de ces derniers est mise à contribution (Tsao, 2003). On pense que l'hydrolyse de ces contaminants se fait à l'intérieur même de la plante, mais il y a aussi possibilité qu'ils soient partiellement dégradés avant de pénétrer les racines, le mécanisme n'étant pas entièrement élucidé (Tsao, 2003). Par contre, on sait que lorsqu'un tel composé est absorbé par les racines, il est par la suite transféré aux parties aériennes où il est modifié enzymatiquement, conjugué à des agents chélateurs produits par la plante (dont la glutathione) pour être finalement stocké dans la paroi (Salt et al., 1998; Kuzovkina and Quigley, 2005).

### 1.2.2.3 Phytovolatilisation

La volatilisation des polluants dans l'atmosphère se fait via les plantes (Pulford and Watson, 2003). Parmi les contaminants organiques et inorganiques présents dans les sols, certains peuvent être sublimés dans l'atmosphère via les stomates alors qu'ils sont présents sous une forme dissoute dans le système transpiratoire (Tsao, 2003). Le processus d'absorption, de translocation et de transformation reste semblable à celui de la phytodégradation (Schnoor, 2000; Smits, 2005). Ce phénomène est dépendant des caractéristiques physiques des polluants et de la pression de vapeur dans le système de transport de la sève, laquelle est fonction de la constante des gaz de la Loi d'Henri (Tsao, 2003). À titre d'exemple, le sélénium et l'arsenic sont des métalloïdes dont les possibilités d'élimination par phytovolatilisation ont été démontrées (Schnoor, 2000).

### 1.2.2.4 Phytostabilisation

Cette méthode est dite passive, car il n'y a pas décontamination du site à proprement parler, mais bien une réduction marquée du danger que représentent les métaux polluants pour la santé humaine et l'environnement (Salt et al., 1998; Berti and Cunningham, 2000). En effet, la végétation implantée réduit la solubilité des métaux, les rendant ainsi moins susceptible de s'infiltrer et de migrer dans le sol, limitant l'interaction potentielle avec les organismes qui pourraient entrer en contact avec ceux-ci (Berti and Cunningham, 2000). De cette façon, les

racines des plantes, en formant une barrière physique, réduisent la biodisponibilité des polluants dans le sol. Elles préviennent aussi l'érosion, réduisent l'écoulement des contaminants qui sont dans la phase aqueuse du sol et favorisent l'adsorption des métaux aux racines, voire même leur séquestration par celles-ci (Rosselli et al., 2003). Les végétaux qu'on utilisera à cette fin devront être tolérants aux stress abiotiques (sols appauvris, présence de contaminants), ne devront pas (ou très peu) transloquer les éléments aux parties aériennes, posséder la capacité de croître rapidement, en plus d'un taux de transpiration élevé. Les espèces du genre *Salix* sont d'ailleurs utilisés à cette fin (Kuzovkina and Quigley, 2005).

### 1.3 PHYTOEXTRACTION DES MÉTAUX

Les racines permettent aux végétaux d'absorber eau, nutriments et oligo-éléments. Plusieurs mécanismes régissent ces processus. Afin d'absorber adéquatement les éléments minéraux majeurs (N, P, K, etc.) et micronutriments (Fe, Cu, etc.) essentiels à leur croissance, les racines des plantes ont développé des transporteurs membranaires spécifiques à ces éléments. Les éléments traces peuvent diffuser au travers de la paroi cellulaire, mais ce mécanisme est peu présent en sols pollués (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Certains végétaux sont prédisposés à emmagasiner des métaux et métalloïdes dans leurs tissus (McIntyre, 2003; Pulford and Watson, 2003). Cette capacité est mise à profit lors de la phytoextraction d'un sol contaminé aux métaux. Après avoir absorbé des ions métalliques (ex : Cd, Cu, Ni) par les racines, ceux-ci (probablement complexés à des acides organiques) sont transloqués vers les parties aériennes (Smits, 2005). En plus, des agents chélateurs, les phytochélatines, métallothionines et phytosidérophores, sont produits par les plantes afin de faciliter l'absorption, le transport et le stockage des ions dans la plante (Reeves and Baker, 2000). Les ions métalliques sont séquestrés dans diverses parties de l'individu : la vacuole (Kupper et al., 1999), la paroi ou même dans les trichomes (Salt et al., 1995; Pulford and Watson, 2003). Suite à l'accumulation de métaux dans les parties aériennes, on peut les récolter et en disposer comme de déchets dangereux ou encore les recycler (Giasson and Jaouich, 1998). Les mécanismes sous-jacents sont décrits plus en détail ultérieurement.

### 1.3.1 Spécificité des plantes hyperaccumulatrices

Les sols enrichis de métaux lourds, d'origine naturelle (sols métallifères) ou industrielle, peuvent supporter la croissance de plantes spécifiques, telles les métallobytes, ces dernières ayant effectivement une affinité pour les sols contenant des métaux (Boularbah et al., 2006). De par ce trait, elles sont potentiellement intéressantes dans des situations de phytoextraction et de phytostabilisation. Parfois, certaines de ces plantes hypertolérantes ont aussi la faculté d'accumuler de fortes concentrations de métaux dans leurs tissus (Raskin et al., 1997; Salt et al., 1998). Elles sont désignées sous le terme d'hyperaccumulatrices. La liste de plantes hyperaccumulatrices s'est considérablement allongée au cours des dernières années. On dénombre environ 450 espèces, faisant partie de 45 familles différentes de plantes (Assuncao et al., 2003; Yang et al., 2004). Moins de 0,2% des angiospermes sont des plantes hyperaccumulatrices de métaux (Assuncao et al., 2003). La liste comprend des plantes qui concentrent des métaux tels nickel, zinc, cadmium, plomb, cuivre, arsenic, cobalt et manganèse. La majorité des espèces hyperaccumulatrices absorbent du nickel : il y en aurait environ 317. Malgré le fait que ces espèces soient dispersées géographiquement, et appartiennent à différents genres et familles, les genres *Alyssum* et *Thlaspi*, de la famille des *Brassicaceae*, sont ceux où on retrouve le plus grand nombre d'hyperaccumulateurs de nickel. On en retrouve aussi dans les familles des *Euphorbiaceae*, *Violaceae*, *Cunoniaceae* (Assuncao et al., 2003).

### 1.3.2 Espèces hyperaccumulatrices

Afin d'être classifiée parmi les hyperaccumulatrices, certains critères de concentration de métaux lourds absorbés par les végétaux ont été établis, dépendamment du métal accumulé. En plus de transférer une quantité élevée de métaux lourds dans ses tissus aériens, une plante hyperaccumulatrice se doit d'avoir une concentration en métaux plus élevée dans les feuilles que dans les racines et le sol en plus de disposer d'un taux de transfert plus élevé que un (Srivastava et al., 2006). Une plante est définie comme hyperaccumulatrice de nickel (Ni) si la concentration dans ses feuilles dépasse 1000 mg Ni/kg de masse sèche (Boularbah et al., 2006). D'ailleurs, le terme hyperaccumulatrice a tout d'abord été accolé aux plantes qui pouvaient absorber de telles quantités de nickel. Cette valeur (1000 mg Ni/kg de masse sèche) n'a pas été choisie au hasard : le nickel est un oligoélément retrouvé dans les organes végétatifs de la plupart des plantes ; on en

retrouve habituellement entre 1-10 mg kg<sup>-1</sup> (Assuncao et al., 2003). Des signes de toxicité induite par un trop grande concentration en nickel sont parfois visibles en présence de concentrations situées entre 10-50 mg Ni/kg. Comme peu de plantes contiennent entre 300 et 1000 mg Ni/kg, on a retenu cette dernière valeur, afin de s'assurer d'une distinction entre les plantes tolérantes et les hyperaccumulatrices (Assuncao et al., 2003; Broadhurst et al., 2004). Il existe plusieurs espèces de plantes hyperaccumulatrices de nickel. Parmi elles se trouve le *Stackhousia tryonii* Bailey, originaire d'Australie, qui peut accumuler jusqu'à 40 000 mg Ni /kg dans ses tissus (Bhatia et al., 2005). L'aptitude présente chez cette plante jouerait un rôle dans sa régulation osmotique (Bhatia et al., 2005). Cependant, sa croissance lente et sa faible production de biomasse n'en font pas une espèce de choix pour des projets de phytoremédiation (Reeves, 2003). L'espèce *Hybanthus floribundus* est une autre hyperaccumulatrice de nickel originaire d'Australie, qui peut accumuler jusqu'à 14 000 mg Ni/kg (Bidwell et al., 2001). L'*Alyssum murale* a la capacité de concentrer et de compartimenter dans ses tissus foliaires principalement, des niveaux élevés de Ni, apparemment sans symptômes de phytotoxicité (Broadhurst et al., 2004). Dans le même genre, on retrouve aussi l'*Alyssum bertolonii* qui possède la même habileté (Mengoni et al., 2004).

Dans le cas du zinc, on retrouve moins d'espèces hyperaccumulatrices, soit environ 15 (Yang et al., 2004). On les voit fréquemment sur des sols calamines et serpentines, présentant une contamination multiple, par exemple au zinc, plomb et cadmium. Ces hyperaccumulateurs sont habituellement répandus dans les genres *Thlaspi* et *Arabidopsis*. La concentration foliaire seuil devrait excéder, pour une plante hyperaccumulatrice de zinc, 10 000 mg Zn/kg (Assuncao et al., 2003; Boularbah et al., 2006). Cela peut paraître élevé si on compare au nickel; il faut cependant se rappeler qu'une telle différence est principalement due au fait que le contenu en zinc dans les plantes est naturellement plus élevé, situé entre 20-500 mg/kg (Reeves, 2003). Toutefois, on remarque souvent des signes de toxicité chez la plante au-delà de 300 mg Zn/kg. Les espèces *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri* et *Sedum alfredii* sont toutes trois des hyperaccumulatrices de zinc (Huitson and Macnair, 2003; Perronnet et al., 2003; Sun et al., 2005). Le *Sedum alfredii* est une espèce dont la disposition envers le zinc a récemment été découverte. On retrouve jusqu'à 20 000 mg Zn/kg dans ses tissus lorsqu'elle croît dans une solution de 80 000 mg/kg de Zn, et ce, sans trace de toxicité (Kupper et al., 1999). Par ailleurs, il

est possible de retrouver plus de 20 000 mg Zn/kg dans les feuilles de l'*A. halleri* (Sun et al., 2005)

Pour leur part, les plantes hyperaccumulatrices de cobalt, cuivre, chrome et plomb contiennent, par définition, plus de 1000 mg/kg d'un de ces éléments en matière sèche. Le critère monte à 10 000 mg/kg (1%) pour le manganèse (Reeves, 2003). Le cadmium, contrairement à d'autres métaux lourds, n'est pas un élément essentiel ou bénéfique pour les plantes (Wei and Zhou, 2006). Une valeur de plus de 100 mg Cd/kg (0,01%) dans les feuilles est exceptionnelle et représente la valeur seuil qui définit une hyperaccumulatrice de cadmium. L'hyperaccumulatrice, *Thlaspi caerulescens*, une *Brassicaceae*, peut accumuler du Cd dans ses tissus jusqu'à 3000 mg Cd/kg (Boularbah et al., 2006). L'hyperaccumulation du Cd est un phénomène rare chez les plantes supérieures. Jusqu'à maintenant, seulement le *T. caerulescens* et l'*Arabidopsis halleri* avaient été classifiées comme telles (Yang et al., 2004). L'espèce *A. halleri* est une hyperaccumulatrice, *sensu stricto*. Cette plante, qui croît sur des sols naturellement riches en métaux du nord de la France, peut absorber plus de 100 mg Cd/kg. La crucifère *Rorippa globosa* a aussi une résistance élevée au Cd et l'accumule dans ses tissus aériens, soient les tiges, les feuilles et les fleurs. À maturité, les concentrations peuvent atteindre 150 mg Cd/kg (Wei and Zhou, 2006). Le *Sedum alfredii*, s'est nouvellement ajouté à la liste comme hyperaccumulatrice de cadmium (Yang et al., 2004).

L'arsenic est considéré comme un des éléments les plus toxiques, de par ses effets toxique, cancérigène et tératogène. L'utilisation d'arsenic dans plusieurs domaines, tels l'agriculture et l'industrie du bois d'œuvre ont facilité la contamination de plusieurs milieux, sols, nappes phréatiques (Srivastava et al., 2006). À ce jour, il existe peu de solutions économiquement viables pour venir à bout de la contamination des sols à l'arsenic. En Chine, la première fougère identifiée comme étant hyperaccumulatrice d'arsenic est le *Pteris vitata*, pouvant accumuler dans ses frondes jusqu'à 4360 mg As/kg et croissant dans un sol en contenant 184 mg kg<sup>-1</sup> (Wei and Chen, 2006). Depuis, on en a identifié plusieurs autres, dont les *Pteris biauurita*, *P. cretica*, *P. quadriaurita* et *P. ryukyuensis*. Généralement, les plantes hyperaccumulatrices d'arsenic ont l'habileté d'amasser des grandes quantités dans leurs tissus aériens, et ce, même dans un sol où les niveaux de la contamination sont bas. En plus du *Pteris*

*vitata*, découvert en Chine, il y a aussi le *Pityrogramma calomelanos*, trouvé en Thaïlande. Malgré le fait qu'on distingue plusieurs espèces du genre *Pteris* classées comme hyperaccumulatrices, ce ne sont pas toutes les espèces qui en sont (Srivastava et al., 2006). Le fait que ces représentantes de l'ordre des Pteridales puissent supporter des sols riches en arsenic laisse croire que ces plantes ont un mécanisme de détoxification de l'arsenic accumulé. Selon (Wei et al., 2006) le *Pteris vitata*, n'accumulerait pas d'autres éléments (Ca, Cu, K, Mg, Mn, S, Zn). Plusieurs études ont démontré que la réduction de l'arsenic, d'arsenate à arsenite, est un mécanisme important dans le phénomène d'hyperaccumulation (Zhang et al., 2002; Srivastava et al., 2006; Wei and Chen, 2006). Cependant, les processus de mobilisation du métal, d'absorption et séquestration, de transport dans le xylème, de « décharge » et distribution dans les tissus et de séquestration dans la plante, ne sont pas bien compris encore.

La polygonacée *Fagopyrum esculentum*, originaire d'Asie et cultivée de par le monde, est déjà reconnue comme plante accumulatrice d'aluminium (Tamura et al., 2005). Cette plante peut aussi concentrer jusqu'à 5000 mg kg<sup>-1</sup> de plomb dans ses tissus aériens. De plus, la présence d'une grande quantité de métaux dans le sol de ne semble pas inhiber la croissance de cette plante, la désignant ainsi comme une plante tolérante aux métaux lourds (Tamura et al., 2005). Par ailleurs, certains cultivars du *Brassica juncea*, la fougère *Athyrium yokoscense*, ainsi que la légumineuse *Sesbania drummondii* ont démontré des capacités d'hyperaccumulation du plomb (Vogel-Mikus et al., 2005). L'*Hemidesmus indicus* est une plante hyperaccumulatrice de plomb originaire de l'Inde. Une étude menée par (Sekhar et al., 2005) montre que cette plante peut enlever jusqu'à 65% du plomb présent dans un sol qui en contient 10 000 ppm.

La plupart des études menées sur la phytoremédiation ont été conduites en milieu hydroponique ou dans des pots, peu de recherches ayant été faites au champ (Broadhurst et al., 2004; Yang et al., 2004; Bhatia et al., 2005). Comme mentionné précédemment, l'espèce *Thlaspi caerulescens* a été utilisée plus souvent qu'à son tour dans ce type de recherches (Assuncao et al., 2003; Perronnet et al., 2003; Boularbah et al., 2006). Les expériences au champ ont démontré sa capacité à accumuler des métaux, dépendamment de plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, la concentration en métaux dans le sol, la partie qui est disponible pour la plante, la biomasse produite, et bien sûr, l'espèce hyperaccumulatrice utilisée en fonction de la contamination

(McGrath et al., 2006). Si ces facteurs peuvent être contrôlés (dans une certaine mesure) et que des moyens compensatoires peuvent être mis en œuvre afin de pallier aux lacunes rencontrées au champ, on peut s'attendre à une optimisation du processus phytoremédiatoire. D'ailleurs, Salt *et al* (1998) discriminent ce qu'ils appellent la phytoremédiation dite « continue » de la phytoremédiation « induite ». La phytoremédiation continue s'effectuerait à plus long terme, avec des plantes hyperaccumulatrices. Celle qui est induite se produirait en un plus court laps de temps, grâce à l'ajout d'agents chélateurs (Salt et al., 1998). L'ajout de substances mobilisant les métaux est une option qui ne semble pas s'avérer concluante dans tous les cas. En effet, dans un essai au champ, avec le *T. caerulescens*, McGrath et al (2006) ont conclu que l'ajout d'agents chélateurs, tels EDTA, acide citrique et autres n'augmentait pas la concentration de métaux (Zn et Cd) dans les tissus, tout en diminuant sa biomasse aérienne. D'autre parts, plusieurs autres expériences combinant l'EDTA et des plantes hyperaccumulatrices ont connu des résultats encourageants, où la quantité de métaux était décuplée dans les tissus aériens des plantes testées (Khan et al., 2000).

### 1.3.3 Arbres à croissance rapide et phytoextraction

De par leur plasticité phénotypique, certains arbres à croissance rapide, notamment ceux de la famille des Salicacées, ont la capacité de s'adapter à des milieux aux conditions de croissance difficiles (Rosselli et al., 2003). Par exemple, certaines espèces des genres *Salix* et *Populus* ont démontré leur tolérance face aux sols inondés ou saturés en eau et au manque d'oxygène dans la zone racinaire (Kuzovkina and Quigley, 2005). De plus, différentes espèces de saules seraient tolérantes à l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone et méthane, à la sécheresse et une salinité modérée (Kuzovkina and Quigley, 2005). Ces arbres peuvent effectivement coloniser les sites contaminés, qui sont généralement peu propices à l'établissement d'un couvert végétal arborescent ou arbustif. Des spécimens de ces deux genres ont de plus démontré des capacités de phytoextraction des métaux (Dickinson and Pulford, 2005). Par exemple, il a été démontré que *Salix viminalis* peut accumuler du cuivre, du plomb et du cadmium dans ses parties aériennes et racinaires (Labrecque et al., 1995; Dickinson, 2000; Rosselli et al., 2003). Pour sa part, le *S. dasyclados* peut emmagasiner jusqu'à 591 mg Zn kg<sup>-1</sup> dans ses tiges et 2882 mg Zn kg<sup>-1</sup> dans ses feuilles (Meers et al., 2007). Des espèces du genre *Populus* (*deltoides*, *alba* et certains hybrides) accumulent, pour leur part, du zinc, du cuivre et de

l'arsenic dans leurs tissus (Mertens et al., 2004; Rockwood et al., 2004; Sebastiani et al., 2004; Laureysens et al., 2005). Les taux d'accumulation sont généralement plus faibles que ceux des plantes hyperaccumulatrices, caractéristique qui est compensée par la croissance rapide et la production de biomasse élevée (Pulford and Watson, 2003; Rosselli et al., 2003). Les saules en particulier ont une productivité et un taux de croissance supérieurs, même à un stade précoce dans la saison de croissance. Sous certaines conditions climatiques, ils ont la plus haute capacité de conversion des radiations solaires en énergie chimique parmi les espèces ligneuses (Christersson, 2006). Par ailleurs, ils présentent un taux d'évapotranspiration élevé, ce qui les fait agir comme des pompes, grâce à la pression négative exercée par l'atmosphère, et qui permet d'emmagasiner les métaux qui se déplacent dans le sol grâce au mouvement de l'eau interstitielle (Rockwood et al., 2004; Mirck et al., 2005). De plus, leur système racinaire est vaste, la majorité des racines fines se situant dans l'horizon 40-45 cm du sol, et croît de façon continue du mois de mai à octobre (Rytter and Ericsson, 1993). Certaines espèces peuvent se reproduire végétativement, par exemple, une branche tombant par terre peut prendre racine et se développer. Ces arbres tolèrent bien la coupe, souvent de mise lors d'un projet de phytoextraction, afin de ne pas remettre en circulation dans l'environnement les métaux lourds extraits: leur repousse est vigoureuse à partir des tronçons coupés (Perttu and Kowalik, 1997).

#### 1.4 UTILISATION DE BACTÉRIES ET CHAMPIGNONS EN BIOREMÉDIATION

Les bactéries et les champignons sont omniprésents dans l'environnement d'une plante, état de fait perdurant depuis l'avènement des angiospermes, et même antérieurement à cette période. De ce voisinage a découlé la formation de liens symbiotiques avec certains de ces organismes qui secondent les plantes et les aident à survivre lorsque les conditions ne sont pas optimales. En guise d'échange, la plante exsude environ 20% du carbone assimilé, utilisé par les microorganismes présents dans la rhizosphère. Ce pourcentage varie selon l'âge de la plante et son statut nutritionnel (Chaudhry et al., 2005). Un sol fortement enrichi en métaux ne représente pas un milieu de croissance idéal. Ainsi, les plantes mycorhizées ou sous l'influence de rhizobactéries, auront souvent une meilleure croissance, et par extension, pourront accumuler plus de polluants dans leurs tissus. De ce fait, l'absorption de métaux par les plantes peut être



influencée par les microorganismes présents dans les sols qui sont intimement liés aux racines de la plante afin de former la rhizosphère (Citterio et al., 2005). De plus, les microorganismes mêmes, qu'ils s'agissent de champignons, levures, bactéries ou algues, peuvent accumuler des métaux lourds à partir de leur milieu, tant que les concentrations ne soient pas trop élevées, causant ainsi des dommages (Leyval et al., 1997; Zhou, 1999). Des mycorhizes ont été identifiées sur des plantes croissant en sols contaminés aux métaux lourds, indiquant que ces champignons ont développé une résistance aux métaux et qu'ils peuvent jouer un rôle dans le processus de phytoremédiation (Khan et al., 2000; Gaur and Adholeya, 2004). D'ailleurs, la tolérance varie selon le génotype : des études effectuées avec les *Glomus etunicatum* et *G. intraradices* montraient que ce dernier était plus résistant lorsque croissant dans un milieu contenant du Zn, Pb et Cd (Gohre and Paszkowski, 2006).

Les champignons mycorhiziens les plus répandus sont des Glomeromycota : les champignons mycorhiziens arbusculaires (MA), formant une symbiose avec 80% des espèces végétales (Smith and Read, 1997; Raven et al., 1998). Leurs hyphes pénètrent les racines et forment des arbuscules à l'intérieur des cellules (Smith and Read, 1997). On retrouve aussi les ectomycorhizes, qui forment un manchon autour de la racine. Un important bénéfice (puisqu'il a été suggéré qu'en milieu naturel, la résistance accrue aux organismes pathogènes pourrait être plus importante) des mycorhizes pour la plante hôte est de favoriser l'accès à l'eau et aux éléments nutritifs, en particulier le P, en augmentant la surface d'absorption racinaire et le volume de sol prospecté grâce aux hyphes extra-matricielle explorant la rhizosphère (Smith and Read, 1997; Gaur and Adholeya, 2004; Gohre and Paszkowski, 2006). Les mycorhizes peuvent aussi assister les plantes à s'établir en milieux où les conditions sont plus difficiles (Gaur and Adholeya, 2004). En fait, certaines espèces de champignons ectomycorhiziens, les *Amanita muscaria* et *Hebeloma crustuliniforme*, se révèlent tolérantes au cadmium et au mercure lorsque cultivées en sol contaminé (Leyval et al., 1997). Dans le cas d'une espèce de champignon mycorhizien arbusculaire, le *Glomus mosseae*, on a démontré que ses spores avaient la capacité de germer dans un milieu où était présent du cadmium (Leyval et al., 1997). La présence d'une symbiose mycorhizienne conférerait un avantage aux plantes croissant sur des sols contaminés aux métaux lourds (Khan et al., 2000). Aussi, plusieurs champignons MA tolérant aux métaux ont été isolés à partir de sols pollués.

Par ailleurs, les interactions entre les champignons mycorhiziens et les plantes ne sont pas homogènes, surtout en sols contaminés. Plusieurs facteurs influencent l'issue de la relation symbiotique mycorhizienne : les espèces impliquées, tant les champignons mycorhiziens que l'espèce végétale, ainsi que la nature du sol (Gohre and Paszkowski, 2006). Les mycorhizes arbusculaires atténueraient l'effet toxique des métaux en les retenant dans leur structure fongique, empêchant ainsi la translocation des métaux vers la plante (Joner and Leyval, 2003). D'autres suggèrent qu'ils seraient actifs dans le processus d'absorption des métaux, augmentant de cette façon les concentrations en métaux dans les plantes colonisées (Citterio et al., 2005; Gohre and Paszkowski, 2006). Les ectomycorhizes agiraient de même, en augmentant l'absorption de métaux chez les plantes (Smith and Read, 1997). Dans la littérature, on retrouve cependant aussi plusieurs cas contraires. Par exemple, chez la *Glycine max L.* inoculée avec des champignons MA, on constate que l'absorption de métaux (Zn, Cd et Mn) dans les parties aériennes diminue, en condition de sols fortement contaminés. Mais, dans des sols peu et modérément contaminés aux métaux lourds, c'est le contraire qui se produit : la concentration foliaire augmente (Heggo and Angle, 1990). Avec le *Cannabis sativa L.*, cultivé dans des sols contaminés aux métaux lourds (Cd, Cr et Ni), on remarque que malgré l'effet d'une biomasse et d'une croissance plus faible en fonction du degré de mycorhization (avec le *Glomus mosseae*), les plants mycorhizés accumulent sensiblement plus de nickel (Citterio et al., 2005). Lorsque cultivé en présence de Ni et de Cu, le champignon ectomycorhizien *Scleroderma flavidum* associé au *Betula sp.* contribuerait à réduire la concentration en nickel dans les tiges, mais sans affecter la concentration en cuivre (Leyval et al., 1997). D'autre part, la fougère hyperaccumulatrice *Pteris vitata*, lorsque mycorhizée avec les *Glomus mosseae* et *G. intraradices*, et placée dans un sol contenant de l'uranium et de l'arsenic, accusait une baisse de croissance, probablement due au transfert trop élevé de carbone vers le champignon mycorhizien, par rapport aux gains en éléments nutritifs, et sans augmenter l'accumulation d'arsenic dans les frondes. La quantité d'uranium se trouvait cependant plus élevée dans les plantes mycorhizées (Chen et al., 2006). Cependant, Liu et al. (2005) ont plutôt trouvé, avec les mêmes espèces, que la colonisation des racines du *P. vitata* avec le *G. mosseae* augmentait plutôt la biomasse aérienne sans influencer le contenu en arsenic des frondes. Dans le cas d'ectomycorhizes, on voit aussi divers scénarios. Par exemple, Sell et al. (2005) ont inoculé des peupliers (*Populus canadensis*) et des saules (*Salix viminalis*) avec trois espèces différentes de

champignons ectomycorhiziens, soit les *Hebeloma crustuliniforme*, *Paxillus involutus* et *Pisolithus tinctorius*, dans un sol contaminé au Cd. Parmi les associations possibles, c'est seulement avec le *P. canadensis* mycorhizé par le *P. involutus* qu'on a noté une augmentation de l'absorption de Cd. Au contraire, chez le *S. viminalis* colonisé par le *P. tinctorius*, on a remarqué une diminution du transfert de Cd vers les racines. Aucun autre effet n'a été remarqué sur la production de biomasse ou l'accumulation de métaux chez ces deux espèces d'arbres à croissance rapide.

Pour leur part, l'utilisation de rhizobactéries telles des bactéries solubilisatrices de potassium et de phosphates, et des bactéries fixatrices d'azote jumelées à des plantes pourrait contribuer à l'amélioration de l'extraction des métaux et de la croissance des plantes (Khan, 2005). D'ailleurs, Wu et al. (2006) ont démontré que l'ajout de telles bactéries au *Brassica juncea* augmentait la biomasse, sans qu'il y n'y ait d'impact significatif sur les contenus en métaux (Zn, Pb, Cu, Cd) dans les tissus. Compte tenu que le potentiel d'hyperaccumulation est déjà présent, l'augmentation de biomasse représente un gain substantiel.

L'application des propriétés fondamentales des hyphes de champignons, telle la faculté à adsorber les métaux à leur surface grâce à la chitine, est une nouvelle voie en bioremédiation (Zhou, 1999; Joner et al., 2000). En ce sens, l'utilisation de matériel fongique «non-vivant», c'est-à-dire du matériel inerte, afin d'adsorber des métaux est une technologie en plein développement (Zhou, 1999). Cette façon de procéder permet de supprimer les opérations de maintenance et de nutrition et diminue la crainte face aux toxines métaboliques potentiellement rejetées par certains champignons. De plus, ce matériel inerte se conserve très longtemps sans répercussion sur son efficacité (Zhou, 1999). Les champignons MA ne peuvent être cultivés sans être associées à une plante hôte (Leyval et al., 1997). L'examen de matériel inerte permet donc d'examiner les propriétés intrinsèques du champignon, en altérant l'effet de l'hôte. D'ailleurs, plusieurs espèces de *Glomus* ont démontré une bonne capacité d'adsorption de Cd et Zn. En effet, lorsque le mycélium était mis dans une solution contenant ces métaux, ces derniers s'adsorbaient passivement à la surface (Joner et al., 2000). Ce principe de biosorption microbienne peut être mis en place afin de traiter des effluents contaminés (Joner et al., 2000). Des recherches sur le *Rhizopus arrhizus* ont démontré le rôle du chitosan et de la chitine,

présents dans la paroi cellulaire, dans l'adsorption de Zn (Zhou, 1999) L'utilisation de bactéries résistantes au mercure (MRB) en bioremédiation permettrait de détoxifier des milieux des divers polluants qui s'y trouvent. En effet, le *Pseudomonas aeruginosa* a affirmé sa capacité à accumuler du Cd dans sa biomasse, en plus de dégrader des BPC (De et al., 2006).

## 1.5 PHYSIOLOGIE ET BIOCHIMIE DE LA PHYTOREMÉDIATION

Le terme phytoremédiation est plutôt large et englobe plusieurs processus, dépendant de facteurs multiples. Tout débute dans le substrat, sol ou autre, où le contaminant, organique ou inorganique, sera absorbé par la plante, dégradé sur place ou transloqué vers les parties aériennes et ensuite stocké et compartimenté. Cet énoncé tout à fait simpliste comporte en réalité une multitude d'étapes impliquant une kyrielle de réactions qui sont de nature physiques, physiologiques et chimiques.

### 1.5.1 Biodisponibilité des éléments dans le sol

Divers stades mènent à l'absorption d'une substance par une plante. La biodisponibilité des molécules ciblées est un facteur clé qui déterminera la réussite de l'entreprise, tant pour l'absorption de nutriments, métaux lourds ou contaminants organiques (Chaudhry et al., 2005). Plusieurs paramètres physico-chimiques déterminent la disponibilité des minéraux, éléments traces et contaminants dans le sol. Parmi ceux-ci, on retrouve le pH, le potentiel redox, la texture du sol, la quantité et qualité de la matière organique présente, la température, la composition minérale et le régime hydraulique (Kabata-Pendias, 2004). Conséquemment, on retrouvera des ions dans les différentes phases du sol, soit adsorbés aux particules minérales (indisponibles) ou en solution (disponibles). Les plantes ont développé au cours de l'évolution des mécanismes leur permettant de libérer les ions adsorbés aux particules du sol afin de se sustenter (Smits, 2005). Ainsi, les racines exsudent plusieurs composés nécessaires à la nutrition minérale. Il existe trois stimuli environnementaux qui déclencheront la libération de ces composés : l'anoxie, l'exposition des racines à des cations toxiques et les carences minérales (Ryan et al., 2001). Plus précisément, une déficience en P déclencherà l'exsudation d'acides organiques, une carence en Fe ou en Zn induira la production de phytosidérophores (composés chélatant les métaux,

principalement le Fe) et une déficience en K peut conduire à l'exsudation d'acides aminés et d'acides organiques. D'ailleurs, ces substances sont de natures très diverses : composés phénoliques, flavonoïdes, nucléotides, sucres, acides aminés, enzymes et acides organiques (Chaudhry et al., 2005; Smits, 2005). Les acides organiques libérés par la plante et présents dans le sol existeront principalement sous forme d'anions : citrate, oxalate, malate, acétate, etc. (Chaudhry et al., 2005). Ces derniers augmentent la disponibilité des nutriments en chélatant les constituants inorganiques du sol, comme le fer, le calcium et l'aluminium, qui se lient normalement au phosphore. Selon Mattina et al. (2003), les acides organiques agiraient autant sur la mobilité des polluants organiques et inorganiques, en altérant la constitution du sol, les rendant disponibles pour la plante. Ainsi, les acides citrique et malique, augmenteraient la solubilité du Cu, Zn et Cd présents dans le sol. Les métaux lourds seront absorbés sous forme d'ions libres ou sous forme complexées (Kabata-Pendias, 2004). Les plantes exsuderont aussi des protons, c'est-à-dire des ions  $H^+$ , afin d'acidifier le milieu et rendre les métaux biodisponibles. Ce procédé est rendu possible grâce à la présence de  $H^+$ -ATPase et de pompes à  $H^+$  dans la membrane plasmique des racines (Yang et al., 2005). Les microorganismes, bactéries et champignons mycorhiziens, présents dans la rhizosphère auraient aussi un rôle à jouer dans ce processus, en rendant biodisponibles plusieurs ions métaux grâce à la catalyse de transformations redox subies par ces molécules dans le sol (Yang et al., 2005).

### 1.5.2 Mécanismes d'absorption

Les racines des plantes sont pourvues de divers mécanismes qui leurs permettent d'absorber les nutriments et oligo-éléments, présents dans la solution du sol. L'eau et les minéraux en solution seront pompés par les poils absorbant situés sur la partie plus jeune de la racine et où deux voies sont possibles : symplastique et apoplastique. Dans la voie apoplastique, les éléments, prélevés sous forme cationique, sont en quasi équilibre avec la solution du sol et sont transportés vers l'endoderme. Contenus dans l'espace extra-cellulaire, les molécules ne peuvent pénétrer la stèle et rejoindre le xylème, à cause de la bande de Caspari, une bande de subérine entourant les cellules de l'endoderme. Le transport symplastique diffère, car les solutés se déplacent directement dans le cytoplasme des cellules et les plasmodesmes les reliant. Ainsi, les minéraux prenant cette voie éviteront la bande de Caspari et atteindront la stèle, avant d'être chargés dans le xylème (Taiz and Zeiger, 1998). Le *T. caeruleus* a une plus grande capacité à

absorber du Zn par la voie symplastique et par conséquent peut transférer un volume élevé de ce métal vers ses parties aériennes (Lasat et al., 1998). La nature des molécules constituant les substances polluantes détermineront leur voie d'absorption. Les ions et cations métalliques, dont plusieurs sont des oligo-éléments essentiels aux plantes, pénétreront la racine par des protéines canaux, des protéines de transport (diffusion facilitée) et des pompes énergétiques (contre le gradient de concentration). Les cations infiltrent les cellules racinaires par les protéines canaux, grâce au gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur, créé par les pompes ATPase de la membrane et qui éjectent des ions  $H^+$  dans le milieu externe. Les anions sont pour leur part introduits dans les cellules grâce aux protéines de transport membranaires, spécifiques à certains ions, et qui agissent par symport. Les métaux entrent dans la racine de cette façon (Taiz and Zeiger, 1998). Cependant, lorsque le sol est fortement contaminé, la plante peut absorber des métaux en excès par des transporteurs non-spécifiques. De plus, les métaux qui ne sont pas essentiels peuvent pénétrer la racine par diffusion passive ou par des transporteurs membranaires non-spécifiques (Gohre and Paszkowski, 2006). Il est reconnu qu'une carence en Fe provoque une augmentation d'absorption d'autres métaux (Clemens, 2001). Ils peuvent aussi être absorbés par inadvertance : par exemple l'arsenate et le sélénate sont confondus avec le phosphate et le sulfate par leurs transporteurs respectifs, leur permettant ainsi de s'introduire dans les cellules racinaires (Smits, 2005). Le nombre de transporteurs présents sur les racines influencerait sur la quantité de métaux absorbés : la membrane plasmique des cellules racines et des tiges contiendrait plus de protéines de transport de  $Zn^{2+}$  chez le *T. caerulescens*, ce qui expliquerait en partie sa capacité d'hyperaccumulation (Pence et al., 2000). Les champignons mycorhiziens possèdent aussi des transporteurs spécifiques et une partie des contaminants sont donc absorbés par ceux-ci et vraisemblablement transférés ensuite à la plante hôte.

D'autre part, les contaminants d'origine organique (BPC, HAP, etc.) sont habituellement créés par l'être humain, constituants donc des substances étrangères à la plante (Smits, 2005). Par conséquent, il n'y a pas de récepteurs spécifiques sur les racines qui assurent l'absorption de ce type de polluant. Ils diffusent donc à travers la membrane. Leur hydrophobicité plus ou moins élevée, selon la substance, déterminera leur mode d'absorption (Chaudhry et al., 2005). Une hydrophobicité moyenne, déterminée par la valeur de  $\text{Log } K_{ow}$ , (coefficient de distribution octanol : eau), permettra aux molécules de pénétrer la racine grâce au transport passif à travers la

bicouche de phospholipides constituant la membrane cellulaire (Taiz and Zeiger, 1998; Smits, 2005). Si le contaminant organique a une hydrophilicité élevée, il ne peut passer la membrane ; s'il est trop hydrophobe, les molécules ne peuvent passer de la paroi au milieu intracellulaire (Smits, 2005).

### 1.5.3 Protéines impliquées

Plusieurs protéines de transport présentes dans les plantes sont mises à contribution dans le cas où ces ions sont absorbés et transférés dans divers organes de la plante. Ces protéines font parties de diverses familles qui sont spécifiques au transport des métaux. Parmi celles-ci, on retrouve la famille de protéine de type *CPx heavy metal ATPase* qui est généralement impliquée dans les mécanismes d'homéostasie et de tolérance envers les métaux, tant essentiels que ceux qui sont potentiellement toxiques (Yang et al., 2005). Plus précisément, elles serviraient au transport des ions Cu, Zn, Cd et Pb à travers les membranes plasmiques. Elles seraient situées dans les membranes plasmiques, afin de débarrasser le cytoplasme des ions toxiques, ou dans les membranes intracellulaires des divers organites (Golgi, vacuoles, réticulum endoplasmique, chloroplaste) afin de compartimenter et séquestrer les métaux lourds (Yang et al., 2005; Colangelo and Guerinot, 2006).

La famille de protéines *NRamp (Natural Resistance Associated Macrophage Protein)* serait impliquée dans le transport des ions métalliques divalents dont le Cd (Clemens, 2001; Hall and Williams, 2003). Elle est présente chez une vaste gamme d'organismes et, chez les végétaux, ces protéines de transport contribueraient au stockage du Fe dans la vacuole (Colangelo and Guerinot, 2006).

La famille CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) serait efficace pour l'efflux de cations ( $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  principalement), soit hors du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, ou vers la compartimentation de ces cations dans d'autres organites, comme la vacuole (Clemens, 2001; Yang et al., 2005). Les domaines transmembranaires faisant partie de cette famille contiennent effectivement des systèmes antiports. L'expression du gène codant pour cette protéine engendre chez le *Thlaspi goesingense*, une hyperaccumulatrice de Zn et Ni, l'augmentation de la résistance aux métaux (Colangelo and Guerinot, 2006).

D'autre part, on retrouve la famille de protéines ZIP (*ZRT, IRT-like Proteins*), qui serait présente chez plusieurs espèces hyperaccumulatrices (Colangelo and Guerinot, 2006); Hall et Williams, 2003). Plusieurs « membres de cette famille » sont en effet reconnus pour le transport de cations (Zn, Fe, Mn, Cd) dans le cytoplasme (Yang et al., 2005). Chez le *T. caerulescens*, on retrouverait des protéines de cette famille en nombre élevé, permettant ainsi l'hyperaccumulation de Zn et de Cd (Colangelo and Guerinot, 2006). Ce nombre est plus élevé dans les racines et les feuilles, permettant ainsi une phytoextraction efficace (Pence et al., 2000).

La superfamille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) est impliquée dans plusieurs fonctions, dont le transport des métaux conjugués au glutathion dans la vacuole, en particulier le Cd. En général, elles agissent en tant que pompes à protons, grâce à l'hydrolyse de divers substrats (Hall and Williams, 2003).

#### 1.5.4 Mécanismes présents chez les microorganismes

Comme discuté dans la première section, les organismes présents dans la rhizosphère peuvent améliorer les projets de phytoremédiation de diverses façons. Plusieurs mécanismes entrent alors en jeu dans une multitude de procédés afin de réduire l'effet néfaste que peuvent avoir les métaux. Deux processus semblent prévaloir chez les champignons mycorrhiziens exposés aux métaux. En premier lieu se trouve la tolérance, où la synthèse de ligands tels des métallothionéines et des polyphosphates qui permettent la chélation ou la compartimentation intracellulaire dans le mycélium. Par exemple, les champignons ectomycorhiziens ont la capacité d'augmenter la solubilité des métaux par extrusion de protons ou exsudation d'acides organiques. Chez les champignons MA, l'hyphe extra-radiculaire accumulerait et les arbuscules transloqueraient les métaux aux racines, causant parfois une accumulation spécifique de métaux dans les tissus racinaires colonisés par un champignon MA (Leyval et al., 1997; Gohre and Paszkowski, 2006). En deuxième lieu, on retrouve l'évitement, où la formation de complexes permet aux métaux de rester en-dehors de la cellule (Leyval et al., 1997). D'ailleurs, les champignons mycorrhiziens arbusculaires peuvent contribuer à la stabilisation des métaux dans les sols, en sécrétant divers composés qui les précipitent en granules de polyphosphates. De plus, les métaux peuvent être adsorbés sur les parois du champignon, grâce à la chitine, ou chélatés dans le champignon même (Gohre and Paszkowski, 2006). Afin de rendre les ions métalliques



indisponibles, le champignon MA peut sécréter de la glomaline, une glycoprotéine insoluble qui lie les ions aux particules de sol. Les racines des plantes et les hyphes des champignons mycorhiziens peuvent interagir grâce aux phytohormones, telles l'auxine AIA, ou acide 3-indole acétique (Sell et al., 2005). Malgré tout, les mécanismes régissant les interactions plantes–champignons mycorhiziens en milieu contaminé restent nébuleuses et plusieurs points restent à élucider.

Les bactéries aussi peuvent contribuer à l'accumulation de métaux lourds chez les plantes. Par exemple, chez le *B. juncea*, l'inoculation avec des bactéries stimulerait les transporteurs de sulfates présents sur les racines, facilitant ainsi l'absorption de sélénates, qui sont absorbés par ces transporteurs à cause de leur similarité chimique (de Souza et al., 1999). Les polluants organiques sont soumis à la dégradation grâce aux microorganismes présents dans la rhizosphère entourant certaines plantes. La transformation microbienne de ces composés situés à proximité des racines d'une plante permet de réduire leur toxicité (Chaudhry et al., 2005). Pour ce faire, certaines bactéries exsudent des biosurfactants, comme les rhamnolipides, qui facilitent la dégradation ou l'absorption des molécules organiques, en les rendant plus solubles (Smits, 2005). Parfois, ce sont les exsudats ou lysats des plantes, incluant des composés lipophiles, qui feront la promotion de la croissance de rhizobactéries, qui à leur tour pourront dégrader des contaminants, tels les BPC et PAH, présent dans la rhizosphère. De plus, l'effet concerté des enzymes d'origines végétales et bactériennes (ou mycorhiziennes) peut affecter la solubilité d'un composé organique, et par extension, sa disponibilité (Smits, 2005). Par exemple, la décomposition des racines du *Morus rubra* libère des flavones qui stimuleront la croissance des bactéries dégradant les BPC, les *Burkholderia* sp. En plus de fournir un substrat de croissance pour les bactéries, la dégradation des racines fournit de l'oxygène, essentielle à l'activité des enzymes dioxygénases et monooxygénases, qui catalysent la première étape dans la dégradation aérobiques des contaminants aromatiques (Leigh et al., 2002). En effet, la libération de composés carbonés augmente la densité microbienne. Par la suite, les composés secondaires libérés par les racines peuvent induire certains gènes microbiens impliqués dans la dégradation de composés organiques, ou agir en tant que co-métabolites afin de faciliter la dégradation par les microorganismes (Smits, 2005). Cette habileté suggère que les microorganismes ont différentes voies enzymatiques qui agissent de façon séquentielle et en synergie. Plusieurs bactéries ont la

capacité d'utiliser les HAP de faible et moyen poids moléculaire comme source de carbone. La dégradation de HAP de poids moléculaire élevé se fait par co-oxydation, grâce aux plantes qui fournissent une première source d'énergie, plus facilement dégradable (Chaudhry et al., 2005).

#### 1.5.5 *Composés chélateurs et de détoxification*

Après avoir pénétré la racine, les contaminants peuvent être chélatés dans la racine même, dégradés ou redirigés vers d'autres parties de la plante. Les composés organiques peuvent être transformés ou dégradés dès leur entrée dans les racines. Leur dégradation peut survenir aussi directement dans le milieu, grâce aux enzymes et leurs co-facteurs exsudés par les racines et qui les transforment sur place. Les enzymes clé dans ce processus sont les déhalogénases, peroxydases, nitroréductases, nitrilases et phosphatases. Chacune agit sur un type de composé. Par exemple, les peroxidases transforment les composés phénoliques tandis que les déhalogénases ont comme site d'action les composés chlorés (Susarla et al., 2002).

Pour leur part, les contaminants inorganiques ne peuvent être dégradés et sont obligatoirement stabilisés ou stockés dans diverses parties de la plante (Smits, 2005). Comme mentionné précédemment, certains métaux sont essentiels à la vie, car ils participent à des réactions biologiques importantes. Par exemple, le zinc sous forme  $Zn^{2+}$  sert de cofacteur pour plusieurs enzymes et le cuivre est un composant vital dans les réactions de transfert d'électron, notamment celles impliquant des protéines telles les plastocyanines (Clemens, 2001). Un excès en métaux peut cependant causer des dommages oxydatifs, qui peuvent conduire à une peroxydation des lipides membranaires et la perte d'intégrité de la membrane (Freeman et al., 2004). Dans le but de réguler l'excès en métaux dans les cellules, il existe des sites de liaisons à haute affinité envers les métaux, afin de les empêcher de se lier à des groupes fonctionnels ayant un rôle important (Clemens, 2006). Ces composés chélateurs seront présents dès l'entrée des ions métaux dans la racine et joueront un rôle jusqu'à leur compartimentation dans les parties aériennes. Le glutathion, les phytochélatines, les métallothionéines, les chaperones et certains acides organiques et aminés sont les principaux responsables du transport et de l'accumulation des métaux chez les plantes.

Le glutathion (GSH) est un anti-oxydant présent dans les cellules, qui est formé d'acide glutamique, cystéine et de glycine (Clemens, 2006). C'est le thiol le plus abondant dans les cellules chez la plupart des organismes, et il est impliqué de plusieurs façons dans la réponse physiologique aux métaux (Sun et al., 2005). D'abord, cet anti-oxydant joue un rôle lors dans la défense contre les radicaux formés par le stress lors de l'exposition aux métaux. Deuxièmement, le GSH est probablement un chélateur d'ions métalliques, localisé dans le cytosol et réduit les métaux sous une forme moins toxique. De plus, ce serait le précurseur des phytochélatines (Sun et al., 2005). Chez le *Thlapsi goesingense*, on retrouve des niveaux élevés de glutathion, permettant ainsi de conférer une résistance au stress oxydatif (Freeman et al., 2004). Avec le *Sedum alfredii*, le GSH servirait de chélateur de Zn lors de son transport, accumulation et détoxification. Les enzymes glutathion réductase et catalase sont aussi impliquées dans cette réponse (Freeman et al., 2004).

L'accumulation de phytochélatines (PC) dans les cellules sera déclenchée par l'exposition à divers ions (Clemens, 2006). Ces dernières sont formées des acides aminés Glu et Cys, sont riches en molécules de soufre et leur formation découle du glutathion. Par conséquent, il y aura une baisse de GSH au fur et à mesure que se formeront les PC (Pál et al., 2006). En effet, ce ne sont pas des protéines constitutives, elles seront générées seulement lorsque la plante est mise en contact avec des métaux (Freeman et al., 2004). Les PC peuvent être présentes dans diverses parties de la plante, aussi bien dans les cellules des racines que des parties aériennes, où elles serviront de ligands afin de séquestrer les ions (Salt et al., 2002). Le lien direct entre hyperaccumulation et production de phytochélatines n'est pas démontré. En effet, les phytochélatines semblent jouer un rôle, en se liant aux ions  $Cd^{2+}$ , dans l'adsorption du Cd dans les racines du *B. juncea* lorsque ce dernier se trouve en concentration suffisamment élevée (0,6 ug/mL) (Salt et al., 1995). Cependant, ce rôle ne semble pas s'appliquer à toutes les plantes hyperaccumulatrices. Chez le *T. caerulescens*, les phytochélatines ne seraient pas présentes lors d'hyperaccumulation de Cd et de Zn (Freeman et al., 2004). Le même phénomène se produit chez le *Sedum alfredii* en réponse à un sol contaminé au Pb et Zn (Sun et al., 2005). Phénomène semblable chez le *Salix viminalis*, qui est tolérant aux métaux : pas de phytochélatines détectées lors de son exposition au Cd (Landberg and Greger, 2004).

Lorsqu'ils sont dans la cellule, les ions métalliques doivent être chélatés afin de limiter leur effet potentiellement dangereux sur la cellule, à cause de leur réactivité et leur faible solubilité. Ces derniers sont liés par des chélateurs et des chaperones. Les chélateurs servent à la détoxification des métaux en tamponnant la concentration en métaux du cytosol. Les chaperones délivreront les ions métaux aux organelles et aux protéines qui requièrent de tels ions (Clemens, 2001). Les chaperones sont essentielles afin de fournir des atomes de Cu à certaines protéines qui en requièrent. Elles peuvent être en compétition avec d'autres chélateurs et processus de séquestration du Cu à de faibles taux cytosoliques d'ions libres Cu. Après être entré dans le cytosol, les ions métalliques doivent être séquestrés ou compartimentés. Rester dans ce milieu causerait des torts à la cellule et pourraient compromettre certains processus essentiels, tel la respiration. Des complexes sont alors formés, liant les molécules énumérées précédemment, et pénètrent ainsi dans la vacuole.

Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines, qui se lient au Cu, Zn et Cd (Hall, 2002). Ils joueraient un rôle dans la détoxification du Cu, le tamponnement du Zn dans le cytosol et seraient impliquées dans l'exsudation des métaux par les trichomes (Clemens, 2001). Leur fonction n'est cependant pas totalement comprise : ces protéines pourraient aussi agir en tant qu'anti-oxydant ou dans la réparation de la membrane plasmique (Hall, 2002).

Les acides organiques et aminés, tel citrate, malate, oxalate et histidine ont été impliqués dans diverses réactions telles la tolérance à différents métaux, transport du métal par le xylème et séquestration dans la vacuole (Clemens, 2001). Par exemple, chez le *T. caerulea*, 70% du Zn dans les racines est associé à l'histidine, tandis que 16%, 38% et 9% du Zn dans les tiges est associé avec l'histidine, l'oxalate et le citrate, respectivement (Sun et al., 2005). Le zinc et le nickel se lient préférentiellement avec des ligands riches en O et N, comme l'acide aminé libre histidine (Salt et al., 2002).

### 1.5.6 Mécanismes de translocation

Les composés décrits précédemment sont présents lors du transport des métaux vers les parties aériennes. Par exemple, chez le *T. caerulea*, on retrouve un niveau élevé d'acide

acétique dans la sève brute, lors d'exposition au Zn. Malgré le fait que l'acétate est un faible ligand du Zn, sa présence contribuerait à maintenir l'équilibre anions-cations en réponse aux niveaux élevés de  $Zn^{2+}$  (Lasat et al., 1998). La translocation du Cd par la sève brute semble être indépendante de la production de phytochélatines dans les racines qui ne joueraient pas de rôle direct dans le transport du Cd vers les parties aériennes (Salt et al., 1995). Chez les *B. juncea* et *T. caerulescens*, la sève contient une quantité constante de Cd, lorsque exposé à des quantités élevées (Salt et al., 1995). Le *T. caerulescens* accumulerait d'ailleurs le Cd dans ses tiges, préférentiellement aux feuilles (Salt et al., 1995). Le transport de la sève brute, contenant les minéraux et autres ions, permet leur stockage dans les parties aériennes. Grâce à l'évapotranspiration, une pression négative est créée, permettant ainsi la montée par le xylème de la sève brute, contenant eau et solutés, comme des métaux ou autres polluants (Taiz and Zeiger, 1998).

#### 1.5.7 Stockage et volatilisation

Il existe des mécanismes généraux qui gèrent le stockage des métaux dans la plante : la distribution de ces molécules dans les tissus de l'apoplaste, tel les trichomes et la paroi cellulaire, la chélation des métaux par des ligands, suivi de leur séquestration dans la vacuole (Yang et al., 2005). Par contre, la compartimentation diffère selon le type de métal et l'espèce végétale. Par ailleurs, la paroi cellulaire semble jouer un rôle prépondérant dans la compartimentation de métaux chez certaines plantes hyperaccumulatrices de Zn, Ni et Cd. En effet, entre 60 et 70% de Ni et Zn accumulés se retrouvent dans l'apoplaste de la paroi cellulaire. Selon Salt et al (1995), le cadmium s'accumulerait préférentiellement dans les jeunes feuilles, chez les *B. juncea* et *T. caerulescens*. Le taux d'accumulation serait constant avec la quantité en solution, mais atteindrait son maximum après un certain laps de temps. Les trichomes sont un lieu de stockage du Cd, pouvant en contenir jusqu'à 40 fois plus que dans les feuilles, chez le *B. juncea*. D'autre part, les cellules de l'épiderme sont le point de chute du Ni, notamment chez les *Alyssum lesbiacum* et *Alyssum bertolonii*, et peu de Ni semble se loger dans les cellules du mésophylle et des faisceaux vasculaires (Broadhurst et al., 2004). Le pédicule et le compartiment basal des trichomes chez diverses espèces d'*Alyssum* contiennent aussi de fortes quantités de Ni (Broadhurst et al., 2004). La vacuole reste cependant l'organite où semblent s'accumuler les métaux. Le faible pH de cet organelle favorise le couplage des métaux avec les acides

organiques. Le cadmium, par exemple, est lié à des ligands, glutathion ou phytochélatines, dans le cytoplasme. Il pénètre ensuite dans la vacuole grâce à une ATPase spécifique. Cela peut aussi être par un système antiport Cd/H, où les ions  $\text{Cd}^{2+}$  sont transportés dans la vacuole, où ils seront ensuite liés et séquestrés par des phytochélatines (Salt et al., 2002). Au lieu de stocker les molécules des contaminants dans les diverses parties énumérées précédemment, la plante peut aussi les volatiliser, c'est-à-dire libérer les libérer dans l'atmosphère sous forme de gaz. Le sélénium, par exemple, est assimilé sous forme inorganique, transformé en sélénométhionine et ensuite méthylé en diméthylsélénide, composé volatile (Smits, 2005). Le tout est transporté dans l'air, loin du site contaminé, à des endroits susceptibles d'avoir de faibles taux de Se dans le sol (de Souza et al., 1999).

#### 1.6 MÉTHODES D'ANALYSE DES INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES

Les interactions plantes-microorganismes sont d'une importance capitale pour la survie des espèces impliquées. Les bienfaits apportés par les microorganismes aux plantes ont su modeler leur capacité d'adaptation au fil du temps, surtout en milieux perturbés, d'où l'intérêt de leur utilisation en phytoremédiation. De ce fait, une plus grande compréhension de ces interactions se révèle d'un avantage considérable. En effet, l'inoculation de végétaux avec des bactéries ou champignons mycorhiziens n'est pas toujours garante d'une union sans problème. Il faut s'assurer que les symbiontes introduits auront la capacité de compétitionner avec ceux déjà présents (Widada et al., 2002). Les microorganismes indigènes, déjà adaptés au sol et à sa contamination, peuvent outrepasser ceux que l'on a inoculés, et amortir leurs effets (Tesar et al., 2002). Il est donc intéressant d'identifier les microorganismes déjà présents sur un tel site et de modeler leurs interactions. Le développement de nouvelles techniques d'analyses, comme celles basées sur l'ADN, l'ARN, les méthodes biochimiques et autres, jettent maintenant une lumière sur les mécanismes, jusqu'ici inconnus, régissant ces liens. Grâce à ces connaissances, il serait possible de sélectionner des organismes tolérants à des polluants spécifiques, tant bactéries que champignons mycorhiziens, qui agiraient de concert avec les plantes afin de dépolluer un site (Carlot et al., 2002).

### 1.6.1 Méthodes basées sur l'ADN/ARN

Certains gènes spécifiques de bactéries ou de champignons mycorhiziens peuvent être isolés à partir de la rhizosphère de plantes (hyperaccumulatrices ou non) poussant en milieu contaminé. L'avantage de ces méthodes, dites moléculaires, est qu'elles permettent d'étudier les communautés microbiennes sans avoir à les cultiver préalablement sur un milieu. Par contre, ces méthodes pourraient causer des changements artificiels dans la communauté microbienne. Les bactéries et champignons mycorhiziens sont ainsi prélevés et analysés directement, préservant leurs statut métabolique (Widada et al., 2002). Par ailleurs, la technique de culture et de comptage des microorganismes, sur un plat d'agar, par exemple, peut être utilisée pour apprécier le nombre de microorganismes présents dans le milieu. Cependant, on estime que seulement 10% des espèces de microorganismes sont cultivables, donc on se retrouve avec une appréciation faussée par rapport à la réalité (Lynch, 2002).

Il est possible d'identifier les bactéries présentes dans la rhizosphère d'une plante grâce au gène codant pour l'ARNr 16S. En effet, ce gène est présent chez toutes les bactéries, ce qui en fait une cible universelle (Patel, 2001). De plus, sa fonction est constante, il y a donc peu de changements de séquences du gène codant pour l'ARN ribosomal. Donc, les souches bactériennes partageant au moins 97,5% des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S sont très probablement de la même espèce (Patel, 2001). Pour en arriver là, plusieurs étapes s'imposent. On peut tout d'abord faire croître et isoler les bactéries d'intérêt. Ensuite, il faut extraire l'ADN et amplifier le gène ciblé par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). On peut aussi extraire l'ADN directement du sol sans cultiver au préalable les organismes microbiens. Dans ce procédé, la *Taq* polymérase, dérivant de la bactérie thermostable *Thermus aquaticus*, catalyse la croissance d'une chaîne à partir d'amorces d'ADN (Griffiths et al., 2002). Ensuite, les produits de ces réactions peuvent être analysés par électrophorèse (Patel, 2001). Cette méthode consiste à séparer des molécules d'ADN sur un gel, soit dans un champ électrique ou encore les faisant migrer dans des conditions dénaturantes, DGGE, où le gel contient un réactif à base d'urée et de formamide (Griffiths et al., 2002; Widada et al., 2002). Finalement, suite au séquençage des fragments d'ADN amplifiés, la comparaison de la séquence inconnue ainsi obtenue avec celles d'une banque de données permet d'identifier le taxon (Patel, 2001). Ainsi, Carlot et al. (2002) ont pu déterminer quelles bactéries se trouvaient dans l'entourage de

plusieurs espèces des *Brassica*, *Trifolium* et *Chenopodium album*, prélevées à partir d'un site contaminé au Cd, grâce au gène 16S de l'ADNr. Tesar et al. (2002) ont été capables d'associer des clones du *Populus nigra* avec les bactéries présentes sur un sol contaminé aux hydrocarbures, afin que ces deux espèces agissent de concert dans la dégradation de ces polluants. La méthode d'amplification peut être aussi utilisée afin d'identifier des champignons mycorhiziens (Widada et al., 2002; Yergeau et al., 2006).

### 1.6.2 Autres méthodes

Les techniques moléculaires sont précises mais exigent beaucoup de temps et de ressources financières. La méthode de coloration des racines et de comptage des structures mycorhiziennes demeure appropriée (Vierheilig et al., 2005). Il existe plusieurs techniques qui permettent de colorer les racines pour ainsi visualiser les structures de mycorhizes. Le retrait du cytoplasme des cellules de la racine, grâce à des produits chimiques tels le KOH, et la coloration avec du vinaigre et des colorants, reste une méthode très utilisée pour observer les diverses structures du champignon dans la racine (Vierheilig et al., 2005).

Diverses méthodes d'imagerie peuvent être utilisées afin de rendre compte des relations plantes microbes (Heath, 2000). La microscopie en temps réel permet d'enregistrer en temps réel des processus cellulaires. Il y a aussi la microscopie fluorescente, où on capte les longueurs d'ondes émises par les composantes de la cellule. Ces dernières peuvent être d'origine naturelle ou par l'ajout d'un fluorochrome. Pour sa part, le microscope confocal à balayage laser permet de réaliser des reconstructions tridimensionnelles plus précises, pouvant rendre compte du contenu cellulaire (Heath, 2000).

La technique utilisant les isotopes stables implique l'ajout d'un composé carboné muni d'un isotope stable, comme le  $^{13}\text{C}$  ou  $^{13}\text{CO}_2$ , à une plante qui l'incorporera dans ses photoassimilats, qui seront ensuite exsudés par les racines. Par la suite, les microorganismes peuvent absorber et assimiler ces composés (Prosser et al., 2006). Ils se retrouveront ainsi dans l'ARN, qui peut être séparé entre ARN « lourd » (où le  $^{13}\text{C}$  a été incorporé) et « léger ». Les microorganismes peuvent donc ensuite être identifiés grâce à l'analyse de cet ARN (Prosser et al., 2006).



La phytoremédiation est un moyen de décontamination envers lequel l'intérêt n'a cessé d'augmenter depuis la dernière décennie (Raskin et al., 1997; Chaudhry et al., 2005; Wang et al., 2006). La décontamination des sites pollués, grâce à la synergie existant entre plantes et micro-organismes, représente une technologie adéquate pour le monde de demain, où les considérations écologiques seront de premier ordre chez les pouvoirs décisionnels (du moins, espérons-le). Bien sûr, la phytoremédiation n'est pas l'eldorado, ni la panacée qui éliminera tout polluant de la surface de la planète. Le facteur temps, car ces projets se déroulent généralement sur plusieurs années, reste le bémol le plus important (Salt et al., 1998) Cependant, l'avancement des connaissances, tant au niveau physiologique, biochimique ou génomique, permettra d'améliorer les techniques existantes et autorisera l'exploitation des diverses habiletés des plantes et de leurs symbiontes agissant de concert. Ainsi, la trinité formée de la plante, des microorganismes et du sol, sera mieux comprise et exploitée (Lynch, 2002). De plus, l'avancement du génie génétique peut aussi contribuer à améliorer les projets de phytoremédiation en identifiant les gènes clés, permettant d'élucider les questions qui restent en suspens quant à certains processus inconnus.

## 1.7 PROBLÉMATIQUE

Comme décrit précédemment, l'impact négatif de l'être humain sur son environnement est visible à plusieurs niveaux de par l'ubiquité de la pollution. La contamination des sols aux métaux lourds fait partie de cet héritage laissé par l'industrialisation et l'urbanisation. Afin de contrer les méfaits causés par ces polluants présents dans les sols, des politiques ont été élaborées, après études de risques et d'impacts (MENV, 1999). Les solutions proposées pour atteindre les objectifs fixés par la Loi sur les sols, tels l'excavation et le remblaiement des terrains contaminés, sont trop souvent coûteuses et destructives (Raskin et al., 1997). Pour pallier à ces techniques conventionnelles, il est possible de mettre à profit la capacité qu'ont certains végétaux d'accumuler les métaux dans leurs tissus (Smits, 2005). Ces plantes, généralement désignées sous le nom d'hyperaccumulatrices, se sont adaptées à des sols naturellement riches en métaux lourds (Raskin et al., 1997).

En misant sur des techniques de phytoremédiation, qui s'appuient sur la capacité qu'ont les végétaux à stabiliser, volatiliser ou accumuler les métaux lourds, on peut s'attendre à des coûts moindres et à la préservation et l'embellissement général du site, appréciés de la population en général (Smits, 2005). Des arbres à croissance rapide, tels ceux des genres *Salix* et *Populus*, ont démontré des capacités intéressantes pour la phytoremédiation de lieux contaminés (Pulford and Watson, 2003; Laureysens et al., 2005). L'utilisation de champignons mycorhiziens arbusculaires dans l'amélioration de projets de phytoremédiation a aussi été démontrée, notamment avec des espèces de *Salix* et *Populus*, en combinaison avec des champignons ectomycorhiziens (Sell et al., 2005; Baum et al., 2006). Cependant, la combinaison de champignons mycorhiziens arbusculaires et d'arbres à croissance rapide est une avenue relativement peu explorée qui mérite que l'on s'y attarde. En fait, à notre connaissance, cette combinaison n'a fait état de cette symbiose.

Dans un premier temps, l'intérêt de cette étude était de rendre compte de la capacité de phytoremédiation de trois génotypes d'arbres à croissance rapide, ainsi que de leur production de biomasse, en sol perturbé et contaminé. De plus, l'apport d'une symbiose mycorhizienne arbusculaire, tant au niveau de la production de biomasse que d'accumulation des métaux lourds, était aussi à investiguer.

### 1.7.1 Approche expérimentale

Le terrain visé par le projet de phytoremédiation, qui est situé dans l'arrondissement Sud-Ouest de la ville de Montréal, est communément désigné sous le nom d'Allée des Tanneries, dont les coordonnées sont : N 45° 28' 314" W 073° 35' 708". Cet emplacement, situé entre un chemin de fer et des habitations, est au croisement de plusieurs autoroutes. La contamination présente dans le sol est principalement de type inorganique. Par ailleurs, cette expérience s'est déroulée sur deux phases. En premier lieu, une expérience en pot, avec comme témoin un sol non-contaminé, a été conduite sur les terrains du Jardin botanique de Montréal, lors de la phase *in situ*. En plus de comparer la performance des arbres en différents sols, leurs réponses à l'inoculation avec *G. intraradices* a aussi été vérifiée. Par après, une expérience a été menée sur le *brownfield* de la ville de Montréal, nommé précédemment. Les deux types d'arbres ont été plantés directement en terre, et inoculés ou non avec le champignon mycorhizien.

### 1.7.2 *Choix des espèces*

Pour l'intérêt qu'ils suscitent en phytoremédiation, trois génotypes d'arbres à croissance rapide ont été choisis pour les deux phases de l'expérience. Lors de la phase *ex situ*, les deux génotypes d'arbres choisis étaient le *Salix viminalis* clone 5027 et le peuplier hybride NM5 (*Populus maximowiczii* x *Populus nigra*). Pour la phase *in situ*, les deux génotypes étaient le *Salix viminalis* clone 5027 et le peuplier hybride *Populus* × *generosa*. Le choix de l'espèce de champignon mycorhizien arbusculaire s'est arrêté sur le *Glomus intraradices* Schenck et Smith, provenant d'une formulation commerciale (MYKE®, Premier Tech Biotechnologies). Cette espèce qui est omniprésente dans les sols, colonise agressivement les plantes (Smith and Read, 1997), permettant ainsi un plus grand succès de colonisation, surtout en sol contaminé.

## **Chapitre 2**

**Phytoextraction and growth capacity of the woody species  
*Salix viminalis* and the hybrid poplar NM5 (*Populus  
maximowiczii* X *Populus nigra*), in association with the AMF  
*Glomus intraradices*.**

ROSALIE LEFEBVRE, MARC ST-ARNAUD ET MICHEL LABRECQUE

## 2.1 ABSTRACT

To assess the phytoextraction capacity of two woody genotypes (*Salix viminalis*, clone 5027, and hybrid poplar NM5 *Populus maximowiczii* X *Populus nigra*) inoculated or not with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, were grown in pots using a soil contaminated with heavy metals (As, Cd, Cu, Pb, Zn), collected from an urban brownfield to assess their phytoextraction capacity. The experimental design included two types of soils, the two tree genotypes and two inoculation treatments (with the arbuscular mycorrhizal fungus). In comparison to the hybrid poplar, *S. viminalis* showed higher concentrations for all analysed heavy metals in its leaves, stems and roots. Conversely, the poplar species produced more biomass. Both tree species grown in contaminated soil were colonized with *G. intraradices* at an appreciable level (64.7% of colonization for *Populus*, 19.3% for *S. viminalis*). While mycorrhizal inoculation had no significant effect on biomass production or heavy metal absorption, non-inoculated trees showed lower mycorrhizal colonization (50% for *Populus*, 3% for *S. viminalis*).

### 2.1.1 Keywords

Phytoremediation, brownfield, heavy metals, *Salix viminalis*, hybrid poplar, *Glomus intraradices*

## 2.2 INTRODUCTION

Soil pollution is amongst the greatest of environmental concerns. This issue has arisen from the vast quantity of contaminated land sites formerly used for industrial activities. This over-industrialization has led to the contamination of the soil by many types of pollutants. These so-called “brownfields” represent a complex issue for urban managers. Because of the low economic value of these sites, many of these areas have not been claimed for ownership or development, resulting in a lack of knowledge or research concerning the level of pollutants laden within these soils (Greenberg, 2002).

Generally, soil contamination arises from a variety of factors, but it is mainly divided into two groups, organic and inorganic. Organic pollution consists of man-made substances, like HAP, pesticides, petroleum by-products, and their presence in soils stems from various sources: spills, agriculture, industry (Smits, 2005). Inorganic pollutants mainly consist of heavy and trace metals, like copper (Cu), zinc (Zn), lead (Pb) and arsenic (As). These are naturally present in soils and their excess quantities often originate from sources such as agriculture, mining, military activities, etc. (Trenhaile, 1998). Being non-degradable, they threaten human and environmental health, and therefore their quantities must be limited in soils (Licht and Isebrands, 2005). It is of especially great concern due to the potential contaminants input in the food web *via* plants and animals. Thus, the government of the province of Québec has established the Soil Protection and Rehabilitation of Contaminated Sites Policy, which sets threshold values for many types of contaminants, including heavy metals (MENV, 1999).

Site decontamination can be performed in diverse ways: excavation, dumping, acid treatments, and extraction of the pollutants. Such methods are usually costly (up to \$1 000 000 per acre) and are not environment friendly (Raskin et al., 1997). They annihilate soil structure and chemical balance, and obliterate bacterial and fungal life, naturally present in soils (Salt et al., 1998). In view of these drawbacks, phytotechnologies, such as phytoremediation, constitute an avenue which can be taken in order to reduce the contaminants and, at the same time, restore the ecological integrity of these sites.

Phytoremediation is the use of plants to extract contaminants or render them harmless (Salt et al., 1995). This technology uses the soil-plant-air continuum where ions are first extracted and then translocated onto the aerial parts, where they can be harvested (Raskin et al., 1997). Many plants can accumulate heavy metals, but not all are suitable for phytoremediation. The use of hyperaccumulator plants, which can extract up to 5% of their dry biomass of heavy metal, is well established (Vogel-Mikus et al., 2005). For example, some species, like *Thlaspi caerulescens* and *Brassica juncea* accumulate up to 3000  $\mu\text{g g}^{-1}$  of Cd in their aerial tissues (Boularbah et al., 2006). However, notwithstanding the fact that those species can accumulate high concentrations of ions, the overall biomass yield is not very high, making the process slow. As a result of this, it can take decades to clean up a site. Because of the aforementioned issues, fast growing trees such as those from the genus *Salix* and *Populus* are promising as an alternative to hyperaccumulators (Pulford and Watson, 2003; Meers et al., 2007). These trees accumulate heavy metals in their tissues and can grow significant amounts of biomass in a shorter amount of time (Labrecque et al., 1995; Perttu and Kowalik, 1997). As phreatophytes, they can extend their roots to remote parts of the soil and thereby act as pumps to extract heavy metal ions and accumulate them into their tissues (Mirck et al., 2005). Because of their phenotypic plasticity, they are able to establish themselves in harsh conditions, such as brownfields (Rosselli et al., 2003). Many species, such as *Salix viminalis*, have been shown to accumulate Cu, Cd and Zn in their leaves (Hammer et al., 2003; Labrecque and Teodorescu, 2005; Maxted et al., 2007). Short-rotation coppice, using *Populus* and *Salix* species, has been evaluated to decontaminate soils (French et al., 2006).

However, because of their various degrees of contamination, sites like brownfields do not represent a suitable place for the establishment of vegetation. The low organic content associated with the high level of compaction makes these sites difficult for plant colonization. Therefore, the improvement of the rhizosphere surrounding the trees can lead to better growth conditions. Thus, the use of fungal symbiosis can contribute to phytoremediation projects by increasing access to limited nutrients and water (Heggo and Angle, 1990; Davies et al., 2001; Citterio et al., 2005). Arbuscular mycorrhizal fungus have also been successfully used with different hyperaccumulator plants to increase metal tolerance and accumulation (Gaur and Adholeya, 2004). Although they have been scarcely used with fast growing trees, ectomycorrhizal fungi

were shown to enhance the uptake of Cd and Zn in *Salix x dasyclados* and *Populus canadensis* tissues (Sell et al., 2005; Baum et al., 2006).

To our knowledge, the association of fast growing trees with AMF has been scarcely examined in phytoremediation. In a brownfield soil contaminated with various heavy metals, this study aims to evaluate the phytoextraction capacity of the woody species *Salix viminalis*, clone 5027, and the hybrid poplar NM5 (*Populus maximowiczii* X *Populus nigra*) in interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*.

## 2.3 MATERIAL AND METHODS

### 2.3.1 Soil characteristics

A contaminated soil (S1), showing moderate to high heavy metal contamination, was collected from a brownfield located in downtown Montreal, Québec (N 45 38 314 W 073 35 708). This site is called “Allée des Tanneries”, which means literally The Tanneries Alley. As its name implies, the area has a long industrial history, and *ergo*, has been a contaminated site for many years. The control soil (S2) was a regular uncontaminated sandy loam top soil of comparable texture, collected from a field within the Montreal Botanical Garden. Both soils were manually homogenised and large particles were removed prior to filling the pots. A composite sample of both the contaminated and uncontaminated soils were dried at 70°C, and sieved (< 2mm) before determination of pH, cation contents, cation exchange capacity (CEC), organic matter content (OM %), and concentrations of heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, As). Soil available P, K, Ca, Mg, Mn, and Al were extracted with the Mehlich III solution (1:10 soil/solution) after shaking for 5 min. at 130 rpm (Tran and Simard, 1993), and analyzed colorimetrically within 2 h on a Lachat Quick-Chem flow injection autoanalyser. Heavy metals (As, Cd, Cu, Pb and Zn) were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) after acid digestion (HNO<sub>3</sub>) (Varian Ultramass 800, Varian, Australia). A succession of extractions was conducted to assess the partition of heavy metal ions in the different soil phases. The column leaching with artificial soil solution, using CaCl<sub>2</sub>-CaSO<sub>4</sub>, was used to determine the ions in solution; the extraction with 0.01 M CaCl<sub>2</sub> was used to establish the proportion of ions readily



available and the extraction of trace elements with 0.05 M EDTA was used to assess the quantity of potentially available heavy metal ions (Hendershot et al., In Press).

### 2.3.2 Plant material, mycorrhizal inoculation and growth conditions

Cuttings of two fast growing woody plants, the willow clone *Salix viminalis* (clone 5027) and the hybrid poplar NM5 (*Populus maximowiczii* X *Populus nigra*) were obtained from the Natural Resources Ministry of Québec. The mycorrhizal inoculum was a commercial formulation (MYKE®, Premier Tech Biotechnologies) containing the fungal species *Glomus intraradices* Schenck and Smith. In inoculated treatments, each 30 cm wide pot was filled with approximately 5 liters of soil in which 150 ml of inoculum, containing about 500 spores, were thoroughly mixed, while non-inoculated control pots received only soil. Soils were not sterilised prior to inoculation to assess the effect of mycorrhizal inoculation in the presence of indigenous microflora. Cuttings of approximately 30 cm long were planted and pots were placed in direct sunlight, and were irrigated as needed. No fertilization was provided and the plants were grown for 18 weeks. The study was conducted outdoors under full sun on the site of the Montreal Botanical Garden and took place from June to September 2005.

### 2.3.3 Experimental design

The experimental design was a split-split plot with eight blocks. The two types of soil (contaminated and non-contaminated) were randomized first. Two woody species (willow, poplar) were randomized in the first level subplots, and two mycorrhizal inoculation treatments (inoculated, non inoculated) were randomized in the second level subplots, resulting in a total of eight treatments with one replicate per block, while the whole experiment was repeated, for a total of 128 pots. Overall, we had 2 soil treatments X 2 species X 2 inoculation treatments X 2 replicates X 8 blocks.

#### 2.3.4 *Sampling and sample analyses*

Plants were harvested at the end of September. Leaves, stems and roots were collected separately and oven dried at 70°C for 48 hours before dry biomass measurements. Before drying, the roots were gently cleaned with tap water. Half the root system was then cut in 3 cm pieces, mixed together in water, and a 10 g subsample was weighted, cleared in KOH, and stained with black ink to assess mycorrhizal colonization (Vierheilg et al., 1998). Percentage of root length bearing mycorrhizal structures was measured using the grid-line intersect method at 20-50X magnification (Giovannetti and Mosse, 1980). Eight composite samples of each different tissues (leaves, stems and roots) per experimental treatment were obtained by mixing together individual samples from each replicate per block, and were digested in HNO<sub>3</sub> (trace metals grade) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ultrapure), using the closed-vessel microwave-assisted digestion technique (Araujo et al., 2002). Heavy metal concentrations (Cu, Cd, Zn, Pb, As) in the tissues were determined as described above. Soil pH was basic in the control (pH 8.0) and neutral in the contaminated soil (pH 7.1). Differences also occurred in the mineral composition of the soils (P, K, Mg, Ca) -the non-contaminated soil being richer- as well as in the CEC. Nevertheless, the organic matter content was much higher in the contaminated soil (27.1%) than in the control (4.9%) (Table 2.1). Heavy metal analysis showed that the contaminated soil contained five heavy metals: As (37 ppm), Cu (200 ppm), Cd (0.7 ppm), Zn (190 ppm) and Pb (720 ppm). Except for Cd, these concentrations all exceed the maximum threshold set for residential, recreational and institutional soils according to the Quebec government standards (MENV, 1998). For the control soil, only Cu and Zn were detected at low levels, below this threshold, thus qualifying it as uncontaminated soil (Table 2.1). The extractions executed on the contaminated soil showed that heavy metal ions previously found in the soil were all still present in the soil solution. (Table 2.2).

#### 2.3.5 *Statistical analyses*

Data for plant growth, mycorrhizal colonization, soil and plant nutrient concentrations, and heavy metal content were analysed by ANOVA for main effects and interaction effects using the GLM procedure of SAS (release 9.1, SAS institute Inc., Cary, NC). Prior to statistical

analysis, the variable “mycorrhization percentage” was subjected to rank transformation to satisfy normal distribution of residuals and homogeneity of variance assumptions.

Table 2.1 Chemical properties and heavy metal contents of both soils (S1, contaminated; S2, uncontaminated control) used in the pot experiment. CEC, cation exchange capacity; OM, organic matter

Parameter	S1	S2
pH	7.1	8
P tot (mg kg <sup>-1</sup> )	35	176
K tot (mg kg <sup>-1</sup> )	202	883
Mg tot (mg kg <sup>-1</sup> )	258	645
Ca tot (mg kg <sup>-1</sup> )	5680	8010
CEC (cmol(+)kg <sup>-1</sup> )	14.3	21.3
OM (%)	27.1	4.9
As (mg kg <sup>-1</sup> )	37	ND
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	200	11
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0.7	ND
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	720	ND
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	190	29

Table 2.2 Extracted concentration for Cu, Zn, As, Cd and Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) with CaCl<sub>2</sub>-CaSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> and EDTA reagents in the contaminated soil S1.

	Cu	Zn	As	Cd	Pb
in solution (CaCl <sub>2</sub> -CaSO <sub>4</sub> )	0.057	0.019	0.002	0.019	0.006
readily available (CaCl <sub>2</sub> )	0.166	0.118	0.006	0.003	0.012
potentially available (EDTA)	64.0	28.7	0.4	0.2	265.8

## 2.4 RESULTS

### 2.4.1 *Dry plant biomass*

*Populus* hybrid NM5 produced significantly more dry leaf biomass than the willow species, regardless of into which soil it was grown (Table 2.3). Trees from both species grown in uncontaminated soil had significantly higher leaf biomass production than the ones grown in the contaminated soil. *S. viminalis* generated significantly more stem biomass than *Populus* hybrid NM5. For both tree genotypes, shoot biomass was nearly significantly twice as abundant on the control soil when compared to the contaminated version. There was no effect of *G. intraradices* inoculation on leaf and stem biomass accumulation in both soils. The willow species had significantly more root dry mass than the poplar species in the uncontaminated soil, while there was no difference in root dry mass between the species in contaminated soil. Also, for the willow, roots were twice as abundant in uncontaminated soil compared to the contaminated soil. The poplar species also had significantly more root dry mass, but the difference was lower than in the willow species. *S. viminalis* also produced more root biomass than above ground biomass in all treatments (Table 2.3). The poplar species produced similar amounts of root and leaf biomass. On a dry biomass basis, both species performed significantly better for the production of leaves, stems and roots in the uncontaminated soil. There was no effect of *G. intraradices* inoculation on leaf, twig and root biomass accumulation in both soils for either tree genotypes.

Table 2.3 Mean dry biomass of roots, stems and leaves (g), of the two species, the hybrid poplar and *Salix viminalis*, on contaminated (S1) and uncontaminated (S2) soil, with (M1) or without (M0) inoculation with *Glomus intraradices*.

Species	Type of soil	AM inoculation <sup>1</sup>	Roots (g) <sup>2</sup>	Stems (g) <sup>3</sup>	Leaves (g) <sup>3</sup>
Populus hybrid	S1	M1	18,93a,v	11,68m,t	17,85p,w
		M0	20,04a,v	11,37m,t	17,69p,w
	S2	M1	22,73b,x	17,57m,u	22,16p,z
		M0	23,94b,x	18,72m,u	23,24p,z
<i>Salix viminalis</i>	S1	M1	21,94c,v	14,70 n,t	7,07q,w
		M0	30,67c,v	18,16 n,t	7,98q,w
	S2	M1	48,52d,y	25,70 n,u	10,76q,z
		M0	48,60d,y	26,68 n,u	11,17q,z

<sup>1</sup> There was no effect of mycorrhizal inoculation on roots, stems and leaves biomass.

<sup>2</sup> As there was a significant interaction between species and type of soil, comparisons of mean root dry weight between species was done within soil types while comparison between soils types were done within species. Means followed with a different letter were significantly different at  $p < 0.05$  between soil types (Populus: a, b; Salix: c, d) or species (S1: v, w; S2: x, y).

<sup>3</sup> Within stems or leaves, means with a different letter were significantly different at  $p < 0.05$  between soil types (stems: t, u; leaves: w, z) or species (stems: m, n; leaves: p, q).

## 2.4.2 Heavy metal accumulation in tree tissues

### 2.4.2.1 Copper

*S. viminalis* showed significantly higher Cu concentrations in its leaves, stems and roots than the hybrid poplar (Figure 2.1). The difference was small for stems, but nonetheless significant. In leaves, the willow accumulated up to twice the Cu concentration in comparison to the poplar (mean  $13,5 \mu\text{g g}^{-1}$  for *Salix* and  $5,2 \mu\text{g g}^{-1}$  for *Populus*). The highest level was found in willow roots, followed by poplar roots. A slight but not significant Cu increase was observed in poplar and willow tissues when inoculated with *G. intraradices* compared to the non-inoculated plants.

#### 2.4.2.2 Arsenic

As is mostly accumulated in roots of both species at similar concentration levels. Concentrations in leaves are therefore significantly different and higher in willow leaves (Figure 2.1). Mycorrhizal inoculation produced some apparent but non-significant differences in As accumulation for both tree genotypes. For example, while the poplar twig content was 17 times higher in the non-inoculated treatment compared to the plants inoculated with *G. intraradices*, the difference was non-significant ( $P=0.215$ ).

#### 2.4.2.3 Cadmium

All willow tissues had higher Cd contents than poplar tissues. The greatest difference occurred in the roots and stems where the contents were 3 to 5 times higher in the willow than those measured in the poplar (Figure 2.1). There was no effect of *G. intraradices* inoculation.

#### 2.4.2.4 Lead

Overall, *S. viminalis* Pb content was higher than the poplar content for roots and leaves, but not for stems (Figure 2.1). Mycorrhizal inoculation produced a relatively higher accumulation in the poplar ( $73,6 \mu\text{g g}^{-1}$  versus  $41,79 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and lower accumulation in the willow ( $67,9 \mu\text{g g}^{-1}$  versus  $114,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ), but these differences were not statistically significant.

#### 2.4.2.5 Zinc

*S. viminalis* had a significantly higher Zn uptake in each part compared to the poplar (Figure 2.1). The willow accumulated up to  $458 \mu\text{g g}^{-1}$  Zn in its leaves. Although the mycorrhizal-inoculated plants had a higher content in all parts and for both species, the differences were not statistically significant.

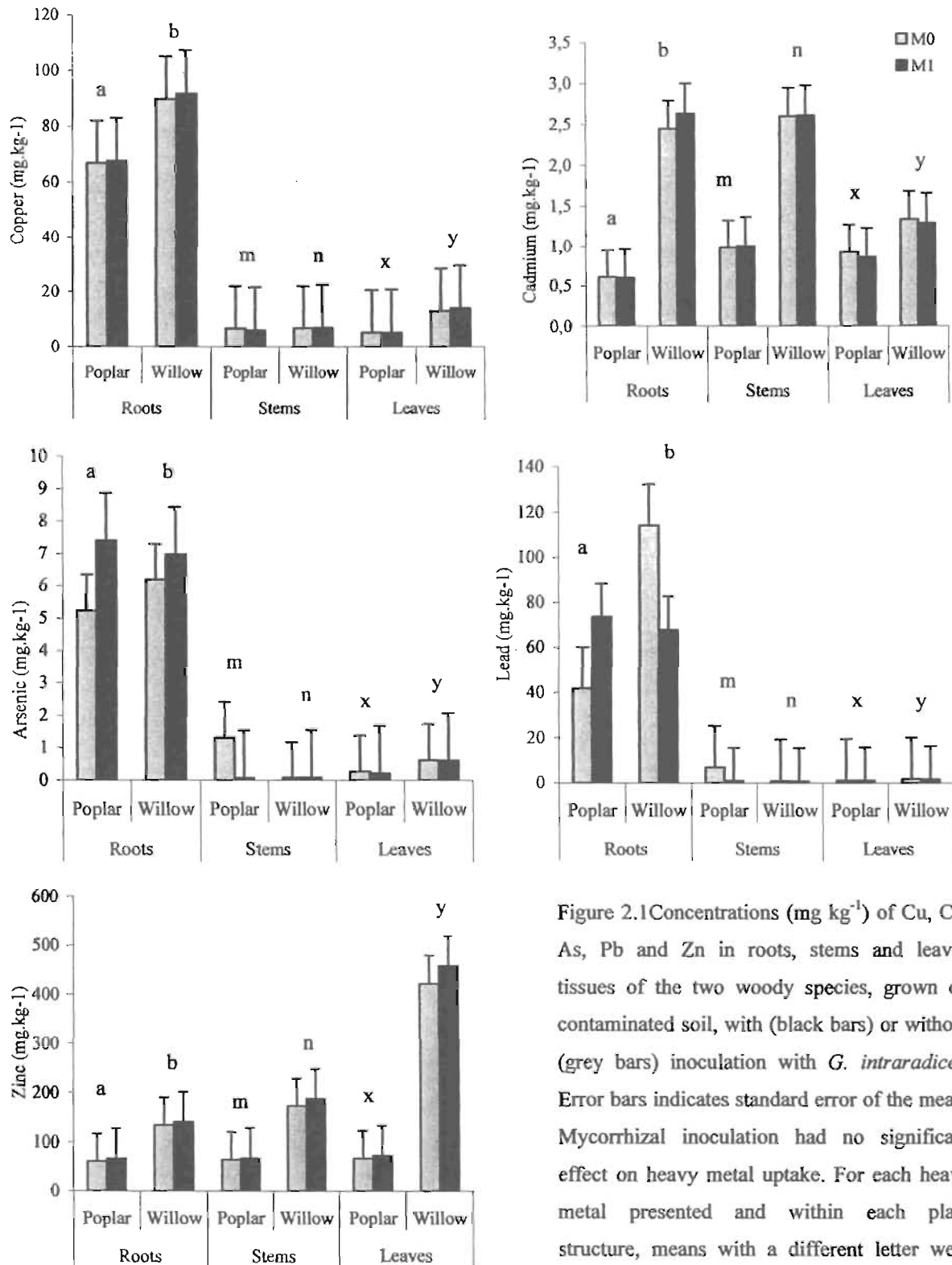


Figure 2.1 Concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) of Cu, Cd, As, Pb and Zn in roots, stems and leaves tissues of the two woody species, grown on contaminated soil, with (black bars) or without (grey bars) inoculation with *G. intraradices*. Error bars indicates standard error of the mean. Mycorrhizal inoculation had no significant effect on heavy metal uptake. For each heavy metal presented and within each plant structure, means with a different letter were significantly different at  $p < 0.05$  between species (roots: a, b) (stems: m, n) (leaves: x,y).

### 2.4.3 Mycorrhizal colonization

Whether the poplar grew in contaminated or uncontaminated soil and was inoculated with *Glomus intraradices* or not, it showed consistently and significantly higher percentages of root mycorrhizal colonization than the willow. Inoculating the soil resulted in a significantly higher root length bearing mycorrhizal colonization for both species in both types of soil. For the willow, soil inoculation raised the percentage of root colonization from 2.66% to 19.25% in contaminated soil and from 0.98% to 25.44% in uncontaminated soil (Figure 2.2). For the poplar, inoculation with *G. intraradices* led to a significantly higher percentage of root length colonized, but only when grown on contaminated soil. The willows inoculated with the *Glomus intraradices* inoculum had a significantly higher percentage of root colonization in uncontaminated soil than in contaminated soil. Conversely, the willows without the inoculum had a higher percentage of root colonization in contaminated soil than in uncontaminated soil.



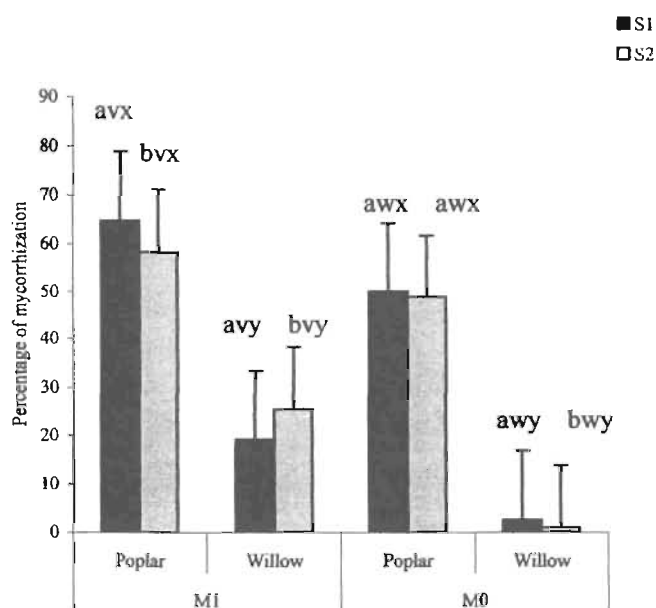


Figure 2.2 Mycorrhizal colonization percentages (%) of the roots of willow species *Salix viminalis* and the poplar species hybrid NM5, on contaminated soil S1 (black bars) or uncontaminated soil S2 (grey bars). There was significant interactions between species and mycorrhizal inoculation, species and soil type and soil type and mycorrhizal inoculation treatments. Therefore, the effect of each treatment on root mycorrhizal colonization were compared within each level of the other treatments. Within mycorrhizal inoculation treatment and species, means with a different letter were significantly different at  $p < 0.05$  between soil types (a, b) ; within species and soil type, means with a different letter were significantly different inoculation treatment (v, w); within inoculation treatment and soil type, means with a different letter were significantly different between species (x, y). Error bars indicates standard error.

## 2.5 DISCUSSION

The phytoremediation potential of a plant species depends on its biomass production in contaminated soil and on its ability to accumulate contaminants within its tissues. Both *S. viminalis* and hybrid poplar NM5 were here shown to have high potential for use in phytoremediation. Specifically, *S. viminalis* tissues acquired high heavy metal concentrations when grown in contaminated soil and the hybrid poplar was characterized by an especially high leaf biomass production. While soil inoculation with *Glomus intraradices* had not been shown to significantly enhance the extraction capacity and plant growth parameters, it has demonstrated that the tree genotypes used in this experiment could benefit from mycorrhizal inoculation in contaminated and uncontaminated soil. In fact, root length harboring mycorrhizal structures were increased in inoculated trees even if an indigenous mycorrhizal inoculum was already present in the soil as shown by the root colonization measured in the non-inoculated treatments.

### 2.5.1 Biomass production

Biomass production is an important criterion for phytoremediation projects since the more above ground biomass is produced, the more heavy metals are extracted. Because of this, fast growing trees are considered a good alternative to hyperaccumulator plants with lower biomass yield, even when their ions uptake rates are inferior (Laureysens et al., 2005). The use of contaminated soil can have adverse or beneficial effects on growth, depending on such factors as organic matter contents, pH or soil structure. Sebastiani et al. (2004) previously found that amending poplars with industrial waste contaminated with heavy metals accentuates growth and biomass production.

In this experiment, we observed that biomass production was lower in the contaminated brownfield soil, but it did not affect its vitality. Moreover, we found no mortality in any of the 128 trees grown in either the contaminated or uncontaminated soil. The high percentage of organic matter may have compensated for the presence of contaminants, and decreased their adverse effects. According to our data, the difference observed between the biomass production on both types of soils seemed minor for the poplar species. Then, the contamination with heavy

metals could have affected this species less than *S. viminalis*. Conversely, we could also link this difference to the lower response of the poplar species towards the higher percentage of organic matter present in the contaminated soil. As the uncontaminated soil had a higher nutrient content, this could help explain improved growth in this type of soil.

Previous studies have demonstrated the biomass production capacity of both *Populus* and *Salix* genus (Laureysens et al., 2004) and our data confirm these observations for the hybrid poplar NM5 and *S. viminalis*. Among the willow species grown in short rotation and intensive culture in the province of Québec, *S. viminalis* has been one of the most suitable and more productive (Labrecque and Teodorescu, 2005). Taking this into consideration, both species thus seem suitable for phytoextraction projects. The willow species did produce more root biomass than above ground biomass, but while it may represent a disadvantage for phytoextraction, it can be of benefit for phytostabilisation. In fact, high root biomass can prevent the movement of contaminants in the soil (Kuzovkina and Quigley, 2005). Heavy metal sequestration in roots prevents their release in nature, via the food chain. The goal of phytoremediation, to remove a contaminant or to render it harmless, is therefore attained.

### 2.5.2 Heavy metals in plant tissues and soil

Both tree species had Cu contents in their shoots and leaves that were equal to the normal concentrations found in plants (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). The concentrations found in roots were superior, which shows the low mobility of this element and the difficulty of its translocation towards aerial plant parts. The situation was similar for Pb and, to a lesser extent, As; ion concentrations were normal in leaves and stems, but were very high in roots, up to 100 times the normal level for Pb. This can be attributed to the fact that this heavy metal is not mobile, neither in soil nor in plants (Nolan et al., 2003). Overall Cd contents in the two species were quite low, yet in the willow leaves and stems, it was almost four times the concentration in the soil, which was almost below detection levels ( $0.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ). This is somewhat unexpected since Cd is not an essential plant nutrient and *S. viminalis* is known to be a good Cd accumulator (Dimitriou et al., 2006; Wei and Zhou, 2006). The same phenomenon occurred with As; although the concentration in its roots reached the maximum natural threshold (Kabata-Pendias and

Pendias, 2001), the concentrations in aboveground tissues, especially in the willow leaves, were much higher. We noticed that the hybrid poplar accumulated almost the same amount of Zn in its roots, stems and leaves, while the willow accumulated much higher amounts of Zn in its leaves, more than twice the concentration found in the contaminated soil. For every heavy metal analysed, the willow species demonstrated a higher accumulation. Notwithstanding the fact that As, Cu and Pb ions concentrations reached high levels in certain parts of both the willow and poplar species, these levels were much lower than those reported for hyperaccumulator specialized plants (Salt et al., 1998; Assuncao et al., 2003; Tamura et al., 2005).

Heavy metal content in soils vary depending on many different factors, such as soil structure, composition, pH and the percentage of organic matter. Brownfields represent contaminated land where such components are unpredictable and heterogeneous. Standard soil analysis, such as the acid digestion technique, determines the total contents of metal ions in soils, but different extractions are able to indicate the state of those ions (Hendershot et al., In Press). In fact, the heavy and trace metal ions found in the fractions “in solution” (i.e. in the soil solution) and “readily available” (slightly adsorbed to the soil elements) are considered the most easily obtainable by plants, and *de facto*, the most likely to be incorporated in the food chain (Quevauviller, 1998). The ions found in the fraction “potentially available” are completely adsorbed into the soil particles and are not available whatsoever to the plants (Quevauviller, 1998). In our study, Cu would be the most likely to be extracted by both the poplar and the willow species, with the highest value of  $0.2 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ , which is a total of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{CaCl}_2\text{-CaSO}_4$  extractions (Table 2.2). For Zn, there should be  $0.137 \mu\text{g g}^{-1}$  Zn readily available in the soil for the trees (Table 2.2), but we found up to  $458.2 \mu\text{g g}^{-1}$  in the willow leaves. In contrast to Meers et al. (2005), it does not appear that there is a direct link between the extraction results and the uptake by plants. Other factors such as chelates, organic acids and protons exudates by root and soil conditions seem to promote the uptake of ions (Mattina et al., 2003; Chaudhry et al., 2005). The soil conditions, such as a neutral pH and a high percentage of organic matter, can shift the proportion of free ions in solution and favour uptake by the plants.

### 2.5.3 Mycorrhizal symbiosis effect

To our knowledge, the interaction between fast growing woody species, like *Salix viminalis* and the hybrid poplar NM5, and an arbuscular mycorrhizal fungus, like *Glomus intraradices* has hardly been studied in the context of bioremediation until now. In fact, little has been investigated about the relationship between these factors, whether discussing the intensity of root colonization or its effect on plant growth. The examination of the percentage of mycorrhizal root colonization showed that both species were colonized with *Glomus intraradices* at an appreciable level in both types of soils, especially in the contaminated soil, and was far more effective in the willow than in both soils. It is important to note that an indigenous microflora, including arbuscular mycorrhizal fungi, grew in both soils. Thus, even if mycorrhizal fungi can be naturally present in contaminated soils where plants are grown, these results demonstrate that *G. intraradices* from a commercial inoculum is competitive and can increase the root colonization intensity, especially in the willow.

Two strategies have been described to assess the behaviour of this symbiosis in a heavy metal contamination context. The mycorrhizal symbiosis can either prevent the ions to be taken up by the plant or it can enhance its uptake by the plant (Leyval et al., 1997; Gohre and Paszkowski, 2006). First, it can prevent the absorption of ions by sequestering them into the hyphae. Second, it can transfer heavy metal ions to the plant, and raise their availability by exuding organic acids and other chelates (Khan, 2005; Audet and Charest, 2007). We found that growth parameters and heavy metal accumulation in plant tissues were not significantly increased in plants inoculated with the mycorrhizal fungus *G. intraradices* as compared with the non-inoculated plants. This was the case throughout our observations, with the exception of the increased intensity of mycorrhizal colonization compared with that which was attained by the indigenous AMF. Even though root colonization intensity does not generally correlate with the level of a physiological effect on a woody species (VanderHeijden, 2001), we cannot, in this experiment, describe the particular effect of the AM fungus on the woody species. Since the plants were grown in pots, the roots were not in need of the help provided by the AM fungi which reaches for unavailable water and nutrients.

## 2.6 CONCLUSION

The use of fast growing woody species in phytoremediation projects seems to be justified because of their high biomass productivity and heavy metal accumulation. Both species used have their advantages: the poplar species has a better above-ground tissue yield, while the willow species is more capable of accumulating larger amounts of ions, especially Cd, Cu and Zn. Their association with arbuscular mycorrhizal fungus, such as *Glomus intraradices*, has proved to be possible in contaminated soils. More studies are necessary in order to assess their potential to increase plant growth and enhance the uptake of heavy metals ions, or at the very least, to stabilize them in order to prevent further leaching into the soil. Further exploration using outside stands are needed in order to assess the phytoextraction capacity of fast growing trees and interactions with AMF in a naturally contaminated environment.

## 2.7 ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by The Green Municipal Funds program and the Friends of the Montreal Botanical Garden. We gratefully acknowledge Stéphane Daigle for statistical analyses, Hélène Lalande and Sébastien Sauvé for heavy metal analysis and Traian Ion Teodorescu for his help in the development of the experimental design.

## 2.8 REFERENCES

- Assuncao, A. G. L., Schat, H. Aarts, M. G. M., 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 159(2), 351-360.
- Araujo, G. C. L., Gonzalez, M. H., Ferreira, A. G., Nogueira, A. R. A. Nobrega, J. A., 2002. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57(12), 2121.
- Audet, P. Charest, C., 2007. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 147, 609-614.
- Baum, C., Hryniewicz, K., Leinweber, P. Meißner, R., 2006. Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix × dasyclados*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169(4), 516-522.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Abouddrar, W., Ouhammou, A. Morel, J. L., 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* 63(5), 811.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. Joner, E. J., 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental science and pollution research international* 12(1), 34 - 48.
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S. Berta, G., 2005. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Canabis sativa* L. *Chemosphere* 59, 21-29.
- Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N. Grossi, J. A. S., 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* 158 777-786.
- Dimitriou, I., Eriksson, J., Adler, A., Aronsson, P. Verwijst, T., 2006. Fate of heavy metals after application of sewage sludge and wood-ash mixtures to short-rotation willow coppice. *Environmental Pollution* 142(1), 160-169.
- French, C. J., Dickinson, N. M. Putwain, P. D., 2006. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141(3), 387.
- Gaur, A. Adholeya, A., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86(4), 528-534.

- Giovannetti, M. Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots *New Phytologist* 84(3), 489-500.
- Gohre, V. Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223(6), 1115-1122.
- Greenberg, M., 2002. Should housing be built on former brownfield sites? *American Journal of Public Health* 92(5), 703-705.
- Hammer, D., Kayser, A., Keller, C., 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil use and management* 19, 187-192.
- Heggo, A. Angle, J. S., 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biol. Biochem.* 22(6), 865-869.
- Hendershot, W.H., Lalande, H., Reyes, D., MacDonald, D. Trace Elements in Soils. In Carter MR, ed, *Soil Sampling and Methods of Analysis for Canadian Society of Soil Science*. Lewis, Boca Raton, FL, USA. IN PRESS
- Kabata-Pendias, A., Pendias H., 2001. Trace elements in soils and plants, third edition. CRC Press, Boca Raton.
- Khan, A. G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4), 355.
- Kuzovkina, Y. A. Quigley, M. F., 2005. Willows beyond wetland: uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution* 162, 183-204.
- Labrecque, M., Teodorescu, T. I. Daigle, S., 1995. Effect of wastewater sludge on growth and heavy metal bioaccumulation of two *Salix* species. *Plant and Soil* 171, 303-316.
- Labrecque, M. Teodorescu, T. I., 2005. Field performance and biomass production of 12 willow and poplar clones in short-rotation coppice in southern Quebec (Canada). *Biomass and Bioenergy* 29(1), 1-9.
- Laureysens, I., Bogaert, J., Blust, R. Ceulemans, R., 2004. Biomass production of 17 poplar clones in a short-rotation coppice culture on a waste disposal site and its relation to soil characteristics. *Forest Ecology and Management* 187(2-3), 295.
- Laureysens, I., DeTemmerman, L., Hastira, T., VanGyselc, M. Ceulemans, R., 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133, 541-551.



- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7(3), 139.
- Licht, L. A. Isebrands, J. G., 2005. Linking phytoremediated pollutant removal to biomass economic opportunities. *Biomass and Bioenergy* 28(2), 203-218.
- Mattina, M. I., Lannucci-Berger, W., Musante, C. White, J. C., 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution* 124(3), 375.
- Maxted, A., Black, C., West, H., Crout, N., McGrath, S. Young, S., 2007. Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant and Soil* 290(1), 157-172.
- MENV., 1999. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Nouvelle édition. Ministère de l'Environnement du Québec.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M. J., Samson, D. Tack, F. M. G., 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 58(8), 1011.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J. Tack, F. M. G., 2007. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 60(1), 57.
- Mirck, J., J.G.Isebrandsb, Verwijsta, T. Ledin, S., 2005. Development of short-rotation willow coppice systems for environmental purposes in Sweden. *Biomass and Bioenergy* 28, 219–228.
- Nolan, A. L., Lombi, E. McLaughlin, M. J., 2003. Metal Bioaccumulation and Toxicity in Soils; Why Bother with Speciation? *Australian Journal of Chemistry* 56(3), 77-91.
- Perttu, K. L. Kowalik, P. J., 1997. *Salix* vegetation filters for purification of water and soils. *Biomass and Bioenergy* 12(1), 9–19.
- Pulford, I. D. Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* 29, 529-540.
- Quevauviller, P., 1998. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 17(5), 289-298.
- Raskin, I., Smith, R. D. Salt, D. E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Plant biotechnology* 8, 221-226.
- Rosselli, W., Keller, C. Boschi, K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil* 256, 265–272.

- Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J. Raskin, I., 1995. Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Salt, D. E., Smith, R. D. Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology* 49, 643-668.
- Sebastiani, L., Scebba, F. Tognetti, R., 2004. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* X *maximowiczii*) and I-214 (*P. Xeuramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52, 79-88.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R. Brunner, I., 2005. Contribution of Ectomycorrhizal Fungi to Cadmium Uptake of Poplars and Willows from a Heavily Polluted Soil. *Plant and Soil* 277(1 - 2), 245.
- Smits, E. P., 2005. Phytoremediation. *Annual Revue of Plant Biology* 56, 15-39.
- Tamura, H., Honda, M., Sato, T. Kamachi, H., 2005. Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Plant Research* 118(5), 355.
- Tran, T. S. Simard, R. R., 1993. Mehlich III-extractable elements. Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science. , 43-49.
- Trenhaile, A. S., 1998. *Geomorphology: a Canadian perspective*. Oxford University Press, Don Mills.
- VanderHeijden, E. W., 2001. Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza* 10, 185–193.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. Piche, Y., 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12), 5004-5007.
- Vogel-Mikus, K., Drobne, D. Regvar, M., 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution* 133, 233–242.
- Wei, S. Zhou, Q.-X., 2006. Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils by *Rorippa globosa* Using Two-Phase Planting (5 pp). *Environmental Science and Pollution Research* 13(3), 151.

## **Chapitre 3**

**Phytoremediation of a heavy-metal contaminated urban brownfield in a field trial using the woody species *Salix viminalis* and the hybrid poplar *Populus × generosa*, inoculated with *Glomus intraradices*.**

ROSALIE LEFEBVRE, MARC ST-ARNAUD, ADELA VOICU ET MICHEL LABRECQUE

### 3.1 ABSTRACT

Phytoextraction and biomass production capacity of the two woody species *Salix viminalis* (clone 5027) and *Populus × generosa*, in association with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, were assessed. A field trial was performed on an urban brownfield, contaminated with heavy metals (Cr, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn). The experimental design included the two tree species with or without inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus. The hybrid poplar produced more leaves and stem biomass than the willow, while both taxa were favoured by the inoculation with *G. intraradices*, producing more biomass when associated *in situ* with the inoculated arbuscular mycorrhizal fungus. *S. viminalis* had generally a higher heavy metal concentration, for both leaves and stems. However, the mycorrhizal inoculation reduced Cd and Cu uptake in poplar leaves and stems. Root length bearing mycorrhizal structures was not significantly different between trees inoculated with *G. intraradices* and control trees not inoculated but colonized by the AMF naturally present in the soil. Nonetheless, mycorrhizal inoculation in the field promotes significant differences in tree biomass accumulation and heavy metal accumulation.

#### 3.1.1 Keywords

Phytoremediation, brownfield, heavy metals, *Salix viminalis*, hybrid poplar, *Glomus intraradices*

### 3.2 INTRODUCTION

Soil decontamination represents a challenge for concerned authorities. Typically employed methods of decontamination such as excavation and dumping, simply transport the problem to another location, leaving the fate of the contaminants in the soil unknown. Application of acids or soil chemical treatments can reduce contaminants, such as heavy metals, but leave behind a damaged soil structure and eradicate microbial life, crucial to the establishment and development of vegetation. Such methods are generally expensive (up to \$1 000 000 per acre) and are not environmentally friendly (Salt et al., 1998). As a result, phytoremediation, where the plants remove, sequester or stabilise contaminants, is a technique which is becoming more widely used (Salt et al., 1995). It not only offers a vegetation cover, but also provides a passive method of decontaminating the soil which is less costly than the other techniques described above (Singh et al., 2003). The cost-benefit balance is a major issue in remediation projects and is a particularly prevalent issue in the decontamination of abandoned sites (Kaufman et al., 2005). These so-called brownfield are mostly former industrial sites, often with multiple forms of contamination and poor or absent vegetative caps (Jennings et al., 2002). Therefore, phytoremediation techniques seem to be suitable, not only because they can reduce the risks associated with contaminants, but also because they provide several environmental benefits following the establishment of a green cover.

Phytoremediation is the use of plants to extract contaminants or render them harmless (Salt et al., 1995). This technology uses the soil-plant-air continuum, where ions are first extracted and then translocated onto the aerial parts, where it can be harvested (Raskin et al., 1997). Many plants can accumulate heavy metals, but not all are suitable for phytoremediation. The use of hyperaccumulator plants, which can extract up to 5% of their dry biomass of heavy metal, is well established, but they generally have low yield (Kumar et al., 1995; Raskin et al., 1997). Fast growing trees are utilized in phytoremediation projects because of their growth capacity in harsh condition and their large biomass production (Rosselli et al., 2003; Smits, 2005; Dimitriou et al., 2006). As phreatophytes, they can extend their roots to remote parts of the soil and thereby act as pumps to extract heavy metals ions into their tissues or even prevent the movement of the ions in the soil (Mirck et al., 2005). For example, large stands of *Populus* and

*Salix* species are used in soils that contain sewage sludge (Pulford and Watson, 2003; Rockwood et al., 2004). Moreover, short-rotation coppice, using *Populus* and *Salix* species, has been tested to decontaminate soils (French et al., 2006). Their ability to accumulate heavy metals, such as Cu, As, and Cr has been demonstrated repeatedly in the research (Meers et al., 2007; Qin et al., 2007). For example, *Salix viminalis* can accumulate Cu, Cd and Zn in its leaves (Hammer et al., 2003). Because of their phenotypic plasticity, they are able to establish themselves in harsh conditions, such as brownfields (Laureysens et al., 2005).

Nevertheless, brownfields do not represent the ideal location for the establishment of a green cover because of their various degrees of perturbation and contamination. Therefore, the improvement of the rhizosphere surrounding the trees can lead to better growth conditions. Thus, the use of beneficial fungal symbioses can contribute to phytoremediation projects by increasing availability of limited nutrients and water to the plant (Heggo and Angle, 1990; Davies et al., 2001; Citterio et al., 2005). Arbuscular mycorrhizal fungi have been successfully used with different hyperaccumulator plants to increase metal tolerance and accumulation (Gaur and Adholeya, 2004). Although they have been scarcely used with fast growing trees, ectomycorrhizal fungi were shown to enhance the uptake of Cd and Zn in *Salix x dasyclados* and *Populus canadensis* tissues (Sell et al., 2005; Baum et al., 2006).

Mycorrhizal symbiosis can either avoid ion absorption or it can enhance its uptake by plants (Leyval et al., 1997; Gohre and Paszkowski, 2006). First, it can prevent the absorption of ions by exuding a compound, such as the insoluble glycoprotein glomalin, that binds ions to the soil particles. Second, it can raise the ions availability in the soil by emitting organic acids and other chelates and therefore transferring heavy metal ions to the plant. For example, AMF can synthesize metallothionein, a compound that chelates ions in the mycelium, before its translocation to the plant roots (Khan, 2005; Audet and Charest, 2007).

To the best of our knowledge, there is very little existing literature concerning the association between fast growing trees and arbuscular mycorrhizal fungus. A pot experiment conducted by Lefebvre et al. (In preparation), using soil from the same location showed the potential of these species to absorb large amounts of heavy metals, making them highly receptive

to arbuscular mycorrhizal colonization in contaminated soil. This study aims to evaluate the phytoextraction and growth capacity of the woody species *Salix viminalis*, clone 5027, and the hybrid poplar *Populus × generosa* in interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in a brownfield contaminated with heavy metals (As, Cd, Cu, Pb and Zn).

### 3.3 MATERIALS AND METHODS

#### 3.3.1 *Soil characteristics*

The field experiment took place on a brownfield location in downtown Montreal, in the province of Quebec, Canada. This site, called “Allée des Tanneries”, which means literally The Tanneries Alley, has a long industrial history, and *ergo*, has been a contaminated site for a long time. Before planting, the soil was ploughed to a 30 cm depth. Soil samples were harvested at the 0-40 cm horizon, and a composite sample was dried at 70°C, and sieved (< 2mm) for soil analysis, cation contents, cation exchange capacity (CEC), organic matter content (OM %), and concentrations of heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, Mn, Cr, Ni). Soil available P, K, Ca, Mg, Mn, and Al were extracted with the Mehlich III solution (1:10 soil:solution) after shaking for 5 min. at 130 rpm (Tran and Simard, 1993), and analyzed colorimetrically within 2 h on a Lachat Quick-Chem flow injection autoanalyser. Heavy metals were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) after HNO<sub>3</sub> digestion (Varian Ultramass 800, Varian, Australia). The soil was a sandy loam with a slightly basic pH (pH 7.7). Mineral composition of the soil (P, K, Mg, Ca, Al), as well as the CEC, was in the normal range. Nevertheless, the organic matter content was in a relatively normal range (Table 3.1). Heavy metal analyses showed that the soil contained seven heavy metals: Cu, Cd, Zn, Pb, Cr, Ni and Mn. Any of them exceeded the maximum threshold set for residential soils according to the Quebec government standards (MENV, 1998).

#### 3.3.2 *Plant material, mycorrhizal inoculation and growth conditions*

Cuttings of two fast growing woody plants, the willow clone *Salix viminalis* (5027) and the poplar hybrid *Populus × generosa*, were used in this study. The mycorrhizal inoculum was a commercial formulation (MYKE®, Premier Tech Biotechnologies) containing the fungal species

*Glomus intraradices* Schenck and Smith. In each inoculated plot, approximately 1620 ml of inoculum, containing about 500 spores  $100 \text{ ml}^{-1}$ , were thoroughly mixed with the soil on the first 5 cm depth, while control plots received nothing. Long cuttings (100 cm) from both taxa were planted in direct sunlight. There was 10 cuttings per 2 meters long plot, each spaced at 20 cm and with a density of  $3.3 \text{ tree/m}^2$ . No fertilization was provided and the plants were grown for 19 weeks, from May to September 2006. Plants were irrigated seven times during the season to avoid causing severe water stress which could have affected the development of the plants and inadvertently influenced the results of the study. The study was a field trial, conducted outdoors on the site of the Allée des Tanneries, and took place from May to September 2006.

### 3.3.3 *Experimental design*

The experimental design was a split plot with six blocks, which included two woody species (one willow clone and one hybrid poplar) and two mycorrhizal inoculation treatments (inoculated, non inoculated), resulting in a total of four treatments (ten trees/plot, one replicate/block), for a total of 240 trees (10 trees x 2 species x 2 treatments x 6 blocks).

### 3.3.4 *Sampling and sample analyses*

Plants were harvested in mid-September. Two trees, per treatment combination and per block were collected at random, for a total of 48 analysed trees. Leaves and stems were separated and oven dried at  $70^\circ\text{C}$  for 48 hours before dry biomass measurements. In order to assess the percentage of mycorrhizal root colonization, a root composite sample was taken from 6 trees per block, in 6 blocks, for a total of 36 samples. Before drying, the roots were gently cleaned with tap water. They were then cut in 3 cm pieces, mixed with water, and a 5 g subsample was weighted, cleared in KOH, and stained with black ink to assess mycorrhizal colonization (Vierheilig et al., 1998). Percentage of root length bearing mycorrhizal structures was measured using the grid-line intersect method at 20-50X magnification (Giovannetti and Mosse, 1980). The leave and stem samples were digested in  $\text{HNO}_3$  (trace metals grade), using the block digestion technique (Parkinson and Allen, 1975). Heavy metal concentrations (Cu, Cd, Zn, Pb,



Mn, Cr, Ni) in the tissues were determined with inductively coupled plasma-mass spectroscopy ICP-MS analysis (Varian 820-MS, Varian, Australia).

### 3.3.5 Statistical analyses

Data for plant growth, mycorrhizal colonization, soil and plant nutrient concentrations, and heavy metal content were analysed by ANOVA for main effects and interaction effects using the GLM procedure of SAS (release 9.1, SAS institute Inc., Cary, NC). Prior to statistical analysis, five variables, leaf Cd concentration and stem Cr, Mn, Ni and Pb concentration, were subjected to rank transformation to satisfy normal distribution of residuals and homogeneity of variance assumptions.

Table 3.1 Chemical properties and heavy metal contents of soil present in the contaminated site Allée des Tanneries.

pH	7.75
P (Mehlich III) (kg ha <sup>-1</sup> )	109
K (Mehlich III)(kg ha <sup>-1</sup> )	608,5
Mg (Mehlich III)(kg ha <sup>-1</sup> )	413
Ca (Mehlich III)(kg ha <sup>-1</sup> )	11850
Al (Mehlich III)(kg ha <sup>-1</sup> )	629,5
CEC	28.7
Organic matter (%)	4.95
Clay (%)	20
Loam (%)	23.5
Sand (%)	56.5
Soil texture	Sandy loam
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	153
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	30.7
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	traces
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	24.6
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	54.5
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	184.3
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0.7

### 3.4 RESULTS

#### 3.4.1 Dry Biomass

Dry biomass data showed that *Populus* × *generosa* produced significantly more dry leaves biomass than the willow species (Table 3.2). The hybrid poplar also generated significantly more stem biomass than *S. viminalis*. In fact, *P.* × *generosa* has almost twice the biomass of *S. viminalis*. For instance, for both species, the trees inoculated with *G. intraradices* had significantly higher leaf and twig biomass than the non-inoculated trees.

Table 3.2 Mean stems and leaves dry biomass (g), of the two species, the hybrid poplar and *Salix viminalis*, soil, with (T1) or without (T0) inoculation with *Glomus intraradices*.

		Leaves	Stems
<i>P. x generosa</i>	T0	109 a,m	203 f, x
	T1	125 a,n	214 f, y
<i>S. viminalis</i>	T0	54.1 b,m	117 g, x
	T1	63.6 b,n	144 g, y

Within columns, means with a different letter were significantly different at  $p < 0.05$  between species (leaves: a, b; stems: f, g) or between inoculation treatment (leaves: m, n; stems: x, y). Leaves and stems were not compared to each other.

### 3.4.2 Heavy metal accumulation in tree tissues

All seven heavy metals were found in each parts of both trees used in the experiment, with difference between species and mycorrhizal inoculation treatments.

#### 3.4.2.1 Copper

Stems of non-inoculated plants of *Populus X generosa* showed a significantly higher Cu concentration compared to those of inoculated plants. In comparison to the hybrid poplar, *S. viminalis* showed significantly higher Cu concentrations in leaves (9.33 mg Cu kg<sup>-1</sup> for the poplar against 13.6 mg Cu kg<sup>-1</sup> for the willow). In the stems, the non-inoculated *P. × generosa* colonized only by the indigenous AM inoculum showed a significantly higher Cu concentration than those not inoculated with *G. intraradices* (5.61 mg Cu kg<sup>-1</sup> versus 4.63 mg Cu kg<sup>-1</sup>). There was a significant interaction between the species and inoculation effects for the stem biomass. Nevertheless, the overall content of copper was significantly higher in the willow stems than those of the poplar, for both inoculated (7.73 mg Cu kg<sup>-1</sup> opposed to 4.63 mg Cu kg<sup>-1</sup>) and non-inoculated treatments (7.86 mg Cu kg<sup>-1</sup> and 5.61 mg Cu kg<sup>-1</sup>) (Figure 3.1).

#### 3.4.2.2 Cadmium

Non-inoculated *P. generosa* had significantly higher Cd content in its leaves than the ones inoculated with the mycorrhizal fungus, but the differences were slight: 1.67 mg Cd kg<sup>-1</sup> without inoculation and 1.16 mg Cd kg<sup>-1</sup> with inoculation. However, the inoculated *S. viminalis* had significantly higher Cd concentrations (2.29 mg Cd kg<sup>-1</sup>) in its leaves than the inoculated *P. × generosa* (1.16 mg Cd kg<sup>-1</sup>). We observed higher Cd concentrations in the willow leaves, as well as a significant interaction of the species and mycorrhizal inoculation effects on leaf biomass. In the willow stems, Cd concentration was significantly higher (1.55 mg Cd kg<sup>-1</sup>) than that measured in the hybrid poplar (0.91 mg Cd kg<sup>-1</sup>). Mycorrhizal inoculation had no effect on the Cd concentration in the willow and poplar stems in comparison to the non-inoculated colonized trees (Figure 3.1).

#### 3.4.2.3 Zinc

*S. viminalis* had a significantly higher Zn concentration in both leaves and stems compared to *P. × generosa* (Figure 3.1). The willow clone accumulated up to 325.1 mg Zn kg<sup>-1</sup> in its leaves, which is almost twice the quantity found in the poplar leaves (124.1 mg Zn kg<sup>-1</sup>). There was no effect of *G. intraradices* inoculation on Zn uptake for both species compared with trees colonized strictly by the indigenous AM inoculum.

#### 3.4.2.4 Chromium, manganese, lead and nickel

Chromium, manganese and nickel concentrations were significantly higher in *S. viminalis* tissues, in both leaves and stems (Figure 1). There was no effect of *G. intraradices* inoculation. Overall, *S. viminalis* Pb concentration was higher than poplar concentration in leaves, but not in stems (Figure 3.1).

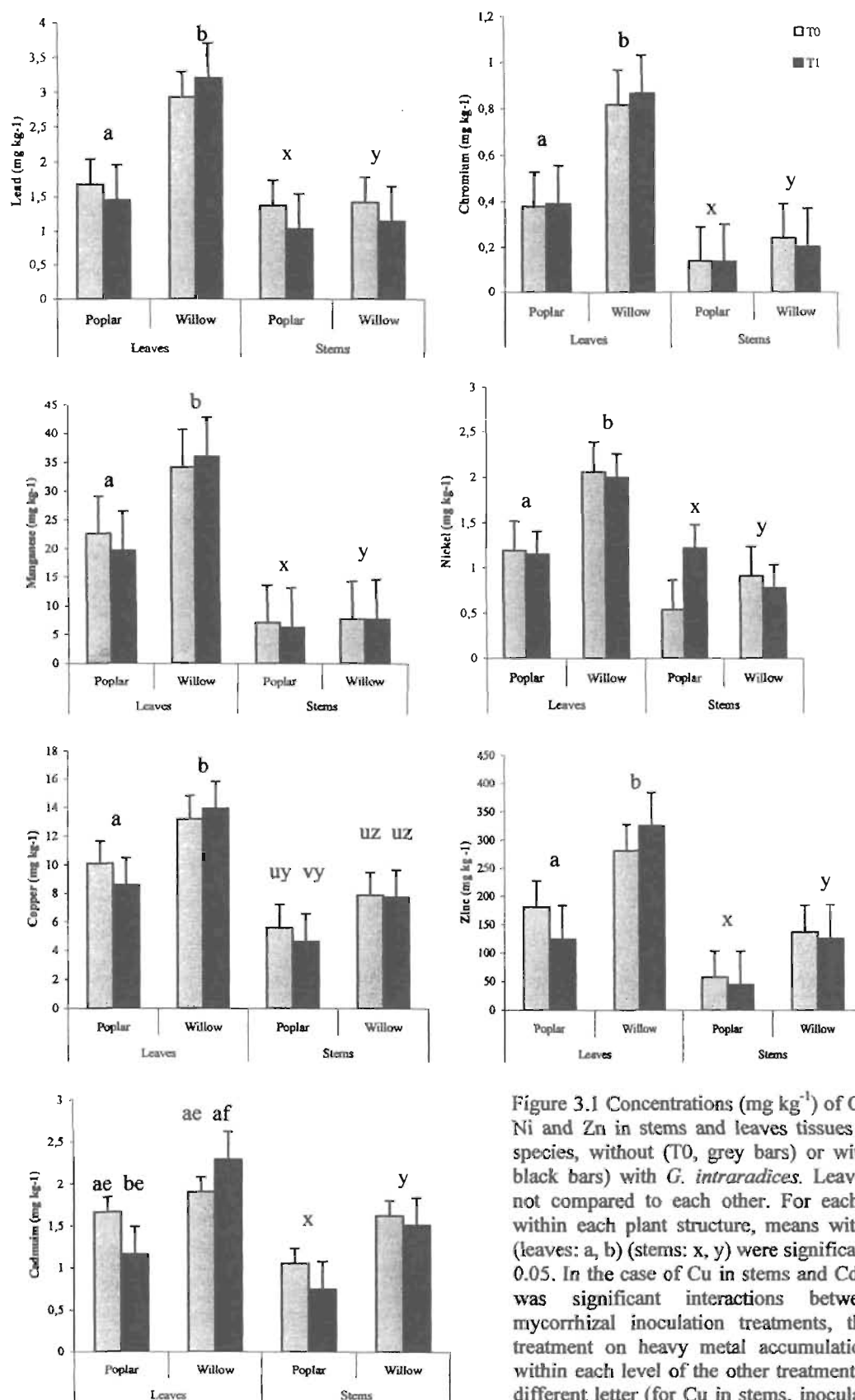


Figure 3.1 Concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) of Cu, Cd, Mn, Pb, Cr, Ni and Zn in stems and leaves tissues of the two woody species, without (T0, grey bars) or with inoculation (T1, black bars) with *G. intraradices*. Leaves and stems were not compared to each other. For each heavy metal and within each plant structure, means with a different letter (leaves: a, b) (stems: x, y) were significantly different at  $p < 0.05$ . In the case of Cu in stems and Cd in leaves, as there was significant interactions between species and mycorrhizal inoculation treatments, the effect of each treatment on heavy metal accumulation were compared within each level of the other treatment, and means with a different letter (for Cu in stems, inoculation: u, v; species: y, z; for Cd in leaves, inoculation: a, b; species: e, f) were significantly different at  $p < 0.05$ . Error bars indicates standard error of the mean.

### 3.4.3 Inoculation of *G. intraradices* in the field

Both tree species were colonized at different levels. The hybrid poplar showed 42% of root length harbouring mycorrhizal structures in non-inoculated treatments. Conversely, inoculated hybrid poplar showed 58.5% of their root length with mycorrhizal structures. Besides, the willow species reached a maximum of 5.72% of root length colonized when inoculated with *G. intraradices*, and 3.35% when colonized only with the indigenous AMF present in the soil. Mycorrhizal colonization percentage was significantly different between species. Overall, *G. intraradices* inoculation induces slightly higher colonization levels in each species (P=0.087) (Table 3.3).

Table 3.3 Mycorrhization percentages (%) of the willow clone *Salix viminalis* and the hybrid poplar *Populus generosa*, without mycorrhization inoculation (T0) or with mycorrhization treatment (T1) with *G. intraradices*. Results between T0 and T1 do not differ at the classical statistical level of 5%.

	T0	T1
<i>P. x generosa</i>	42.0 a	58.5 a
<i>S. viminalis</i>	3.35 a	5.72 a

Columns with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

### 3.5 DISCUSSION

Fast growing trees have established their relevance in phytoremediation projects in the past. The taxa used in this field experiment, a clone of *S. viminalis* and an hybrid poplar *P. × generosa*, demonstrated a capacity to establish and grow in a brownfield contaminated with heavy metals. Not only did both species produce relatively high quantities of aboveground biomass under these conditions, but they were also efficient in their uptake of significant amounts of heavy metals in their aerial tissues. This was particularly the case for the willow species. Furthermore, the inoculation with the mycorrhizal fungus *G. intraradices* significantly promoted the growth of both species compared to trees colonized with the indigenous AMF present on the site. The inoculations also had significant effects on the Cd and Cu uptake, reducing the concentrations in leaves and stem, depending on the species.

Since trees from the family Salicaceae are known to develop lots of biomass in a short period of time, they present an interesting alternative to hyperaccumulator plants, which can accumulate high amounts of ions in their tissues but have a lower yield (Vandecasteele et al., 2005; Christersson, 2006). In this study, we found that the hybrid poplar produced more aboveground biomass (both leaves and stems) than the willow clone *S. viminalis*. This supports previous findings, including a pot experiment conducted with soil from the same brownfield used in the present experiment (Lefebvre et al., In preparation). Despite the fact that the soil was compacted and contaminated with heavy metals, the biomass yield was quite high, as both species had stems that reached up to 250 cm (data not shown).

Since the interactions between plants and mycorrhizal fungi are not homogenous, particularly in contaminated soils, results are often trivial and are caused by many factors, such as the species and soil type used in the experiment (Gohre and Paszkowski, 2006). For example, the use of *Glomus mossae* with the fern *Pteris vitata*, grown on As contaminated soil, led to an increase of biomass production without influencing the As ions uptake (Liu et al., 2005). Elsewhere, the inoculation of the hybrid *Salix × dasyclados* with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* led to an increase of stem and root biomass (Baum et al., 2006). In the present experiment, inoculation with *G. intraradices* in the field enclosing indigenous AMF had a

positive effect on both *P. × generosa* and *S. viminalis* biomass production. Thus, inoculation of the trees with a commercial formulation containing an AM species known to be ubiquitous in soils and very aggressive, could overcome the indigenous flora already present on the site. Although we did not identify the species present in the roots, many types of species were likely present in the soil where this experiment was set.

Diverse species have different abilities to absorb heavy metals. This depends not only on the species, but also on the type of elements present in the soil. Here, we found that the willow clone was more efficient than the hybrid poplar for the heavy metal accumulation in its leaves and stems, with some exception. In the case of Zn, Cr, Ni, Mn and Pb, we observed a species effect only in cases where *S. viminalis* accumulates significantly more ions than *P. × generosa*. Zinc intake reaches the highest amount for both species, with the maximum in the willow leaves. This element is easily taken up by those species but results obtained in this experiment did not exceed from the range normally seen (Pulford and Watson, 2003; Rosselli et al., 2003; Sebastiani et al., 2004; Maxted et al., 2007).

In the soil utilized for our study, we found around 30 mg Cr kg<sup>-1</sup> and the concentrations in leaves and stems did not exceed 1 mg Cr kg<sup>-1</sup>. Sebastiani et al. (2004) found similar values with a poplar species grown in soil amended with industrial waste which contained significantly more chromium, confirming the low mobility and transfer to plants of this element. Moreover, Davies et al. (2001) found that *Helianthus annuus* inoculated with *G. intraradices* has an improved Cr uptake when grown in low or high Cr concentration, reaching up to 170 mg Cr kg<sup>-1</sup> in leaf tissue. As has been discussed, this was not the case in our study since the mycorrhizal inoculation had no effect on the uptake of this ion.

Similar uptake patterns occurred with Ni. Concentrations found in tissues did not surpass 2 mg Ni kg<sup>-1</sup> whereas concentration in the soil was around 25 mg Ni kg<sup>-1</sup>. The natural threshold limit, which varies between 1-10 mg Ni kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias and Pendias, 2001), was thus not exceeded. This is relatively low compared to hyperaccumulator plants that can absorb concentrations up to 1000 mg Ni kg<sup>-1</sup> (Assuncao et al., 2003; Bhatia et al., 2005).



The Mn transfer appeared to be operating efficiently. The concentrations found in the soil were below detectable limits, while the levels found in the willow leaves reached up to 34 mg Mn kg<sup>-1</sup>. Although these amounts do not exceed the natural concentrations normally reported in plants, the transfer rates to the aboveground parts of the trees seem effective (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Lead concentrations in both poplar and willow aerial tissues demonstrated the low mobility of the element in the plant. While there was no significant difference between the Pb uptake in the stems of *S. viminalis* and *P. × generosa*, there was twice the level in the willow leaves, which was significantly higher, but still around 3 mg Pb kg<sup>-1</sup>. In a pot experiment conducted previously with soil from this site (Lefebvre et al., In preparation), comparable results were found. This study demonstrated that Pb concentration in root tissues was very high compared to those found in stems and leaves.

As described earlier, the Cd absorption was restrained in poplar leaves by inoculation with the mycorrhizal fungus *G. intraradices*. This treatment had no significant effect on the willow leaves. Concentration in willow leaves was higher and not influenced by the presence or lack thereof, of the inoculum. However, Sell et al. (2005) reported that *S. viminalis* associated with the ectomycorrhizal fungus *P. tinctorius* lowered Cd uptake. Notwithstanding this fact, it would be imprudent to classify this association as non-beneficial from a strict phytoextraction point of view. The Cd response variation toward *G. intraradices* was rather slight. Moreover, *S. viminalis* had twice the amounts of Cd than *P. x generosa* in its leaves only when inoculated with *G. intraradices*. This situation was also observed for Cu accumulation in the poplar leaves, where the concentrations were lower in the stem of inoculated poplars than in the non-inoculated trees. Conditions were similar with Cu concentration in willow stems, where the willow species accumulated significantly higher amounts than the poplar species, with and without inoculation. Those changes in Cd and Cu absorption were statistically significant, but can barely be considered as practically different. The discrepancy between inoculation and non-inoculation treatments was not significantly superior, and was in the order of a few mg kg<sup>-1</sup>. Two theories are generally accepted concerning the mycorrhizal symbiosis effect on plant heavy metal uptake, avoidance or promotion (Gaur and Adholeya, 2004; Gohre and Paszkowski, 2006; Audet and

Charest, 2007), both of which were observed in this study. Furthermore, the overall biomass production, which was improved with the mycorrhizal fungus inoculation, largely compensated for the few  $\text{mg kg}^{-1}$  copper and cadmium loss.

Even though the percent of root length colonized between the inoculated and non-inoculated treatments were not different at the level of 5%, the inoculation unequivocally increased the tree biomass and, to a lesser extent, modified the heavy metal uptake. This parameter, however, is generally not correlated with the level of physiological effect on the woody species. It is also not capable of being correlated to the final colonization intensity, both with respect to the speed and time in the growth season colonization (van der Heijen, 2001). Despite its relatively small negative influence on Cd and Cu accumulation in poplar leaves and stems, the mycorrhizal inoculation had a positive effect on both species' growth

### 3.6 CONCLUSION

Several previous studies reported the efficiency of fast growing species, such as poplars and willows, in phytoremediation projects. This study, similar to a previous pot experiment (Lefebvre et al., in preparation), observed their high biomass productivity and heavy metal accumulation. Their association with *Glomus intraradices* has proved not only to be possible in contaminated soil, but also capable of enhancing biomass, and consequently heavy metal content. Further exploration on outside stands are in progress to establish the phytoextraction capacity of these fast growing trees over several years and their impact with *Glomus intraradices*.

### 3.7 ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by The Green Municipal Funds program and the Friends of the Montreal Botanical Garden. We gratefully acknowledge Stéphane Daigle for statistical analysis; Hélène Lalande for heavy metal analysis and Traian Ion Teodorescu for his help to the development of the experimental design.

## 3.8 REFERENCES

- Assuncao, A. G. L., Schat, H. Aarts, M. G. M., 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 159(2), 351-360.
- Audet, P. Charest, C., 2007. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution* 147(3), 609-614.
- Baum, C., Hryniewicz, K., Leinweber, P. Meißner, R., 2006. Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix × dasyclados*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169(4), 516-522.
- Bhatia, N., Baker, A., Walsh, K. Midmore, D., 2005. A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta* 223(1), 134.
- Christersson, L., 2006. Biomass production of intensively grown poplars in the southernmost part of Sweden: Observations of characters, traits and growth potential. *Biomass and Bioenergy* 30(6), 497-508.
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S. Berta, G., 2005. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Canabis sativa* L. *Chemosphere* 59, 21-29.
- Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N. Grossi, J. A. S., 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* 158 777-786.
- Dimitriou, I., Eriksson, J., Adler, A., Aronsson, P. Verwijst, T., 2006. Fate of heavy metals after application of sewage sludge and wood-ash mixtures to short-rotation willow coppice. *Environmental Pollution* 142(1), 160-169.
- French, C. J., Dickinson, N. M. Putwain, P. D., 2006. Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environmental Pollution* 141(3), 387.
- Gaur, A. Adholeya, A., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86(4), 528-534.
- Giovannetti, M. Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots *New Phytologist* 84(3), 489-500.
- Gohre, V. Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223(6), 1115.

- Hammer, D., Kayser, A. Keller, C., 2003. Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil use and management* 19, 187-192.
- Heggo, A. Angle, J. S., 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil biology & biochemistry* 22(6), 865-869.
- Jennings, A. A., Cox, A. N., Hise, S. J. Petersen, E. J., 2002. Heavy metal contamination in the brownfield soils of Cleveland. *Soil and Sediment Contamination* 11(5), 719 - 750.
- Kabata-Pendias, A. Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants, third ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kaufman, M., Rogers, D. Murray, K., 2005. An empirical model for estimating remediation costs at contaminated sites. *Water, Air, & Soil Pollution* 167(1), 365-386.
- Khan, A. G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4), 355.
- Kumar, P. B. A. N., Dushenkov, V., Motto, H. Raskin, I., 1995. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology* 29(5), 1232 - 1238.
- Labrecque, M. Teodorescu, T. I., 2005. Field performance and biomass production of 12 willow and poplar clones in short-rotation coppice in southern Quebec (Canada). *Biomass and Bioenergy* 29(1), 1-9.
- Laureysens, I., DeTemmerman, L., Hastira, T., VanGysel, M. Ceulemans, R., 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133, 541-551.
- Lefebvre, R., St-Arnaud, M. Labrecque, M., In preparation. Phytoextraction and growth capacity of the woody species *Salix viminalis* and the hybrid poplar NM5 (*Populus maximowiczii* X *Populus nigra*), in association with the AMF *Glomus intraradices*.
- Leyval, C., Turnau, K. Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Liu, Y., Zhu, Y. G., Chen, B. D., Christie, P. Li, X. L., 2005. Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Mycorrhiza* 15, 187-192.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J. Tack, F. M. G., 2007. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 60(1), 57.

- Maxted, A., Black, C., West, H., Crout, N., McGrath, S. Young, S., 2007. Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant and Soil* 290(1), 157-172.
- Mirck, J., J.G.Isebrands, Verwijsta, T. Ledin, S., 2005. Development of short-rotation willow coppice systems for environmental purposes in Sweden. *Biomass and Bioenergy* 28, 219–228.
- Parkinson, J. A. Allen, S. E., 1975. A wet oxidation procedure suitable for the determination of nitrogen and mineral nutrients in biological material. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6(1), 1-11.
- Pulford, I. D. Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* 29, 529-540.
- Qin, R. J., Hirano, Y. Brunner, I., 2007. Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. *Tree Physiology* 27(2), 313-320.
- Raskin, I., Smith, R. D. Salt, D. E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Plant biotechnology* 8, 221-226.
- Rockwood, D. L., Naidu, C. V., Carter, D. R., Rahmani, M., Spriggs, T. A., Lin, C., Alker, G. R., Isebrands, J. G. Segrest, S. A., 2004. Short-rotation woody crops and phytoremediation: Opportunities for agroforestry? *Agroforestry Systems* 61, 51-63.
- Rosselli, W., Keller, C. Boschi, K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil* 256, 265–272.
- Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J. Raskin, I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Salt, D. E., Smith, R. D. Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology* 49, 643-668.
- Sebastiani, L., Scebba, F. Tognetti, R., 2004. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* X *maximowiczii*) and I-214 (*P. Xeuramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52, 79-88.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R. Brunner, I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and Soil* 277(1 - 2), 245.
- Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. Jain, R. K., 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(5 - 6), 405.

- Tran, T. S. Simard, R. R., 1993. Mehlich III-extractable elements. Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science. , 43-49.
- Vandecasteele, B., Meers, E., Vervaeke, P., Vos, B. d., Quataert, P. Tack, F. M. G., 2005. Growth and trace metal accumulation of two *Salix* clones on ediment-derivedsoils with increasing contamination levels. Chemosphere 58, 995-1002.
- VanderHeijden, E. W., 2001. Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. Mycorrhiza 10, 185–193.
- Vierheilig, H., Schweiger, P. Brundrett, M., 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. Physiologia Plantarum 4, 393-404.

## **Chapitre 4**

### **Conclusions générales**

#### 4.1 CONCLUSIONS GENERALES

Bien que la phytoremédiation soit une technique de plus en plus étudiée, plusieurs zones d'ombre restent, dues à la complexité et à la hiérarchie des processus qui interviennent dans cette méthode. Lors de mon projet de maîtrise, j'ai pu avoir une idée des processus en cours et des enjeux environnementaux compris dans de tels desseins, tout en mettant en valeur la richesse et la complexité de processus jusqu'ici peu étudiés, par exemple, certaines caractéristiques d'espèces, ainsi que les liens les unissant à des organismes de la rhizosphère. Ce projet a permis de jeter une lumière nouvelle non seulement sur l'établissement de végétaux, notamment par des arbres à croissance rapide, sur un sol perturbé et contaminé, mais a aussi rendu compte de l'effet de leur association mycorhizienne arbusculaire, chose qui n'avait pas été faite, du moins en condition de phytoremédiation, d'où l'innovation apportée par ce projet.

La première phase, qui s'est déroulée en pot, impliquait du sol provenant d'un *brownfield* contaminé aux métaux lourds (Cd, Pb, Cu, As, Zn) de la Ville de Montréal. Le sol, qui n'avait pas été stérilisé, était composé d'un mélange hétérogène d'éléments, qui étaient quantifiés après échantillonnage et non ajoutés en concentration égale et connue. Ce premier point se distingue de bien des études, où les métaux lourds sont additionnés à des substrats homogènes. De plus, la non-stérilisation du sol nous a permis de rendre compte de la présence d'une flore microbienne indigène. Les deux espèces d'arbres à croissance rapide utilisées, soit le *Salix viminalis* clone 5027 et le peuplier hybride NM5 (*Populus maximowiczii* X *Populus nigra*), ont démontré chacune leurs forces et leurs faiblesses. L'espèce de saule accumulait les métaux en plus grande quantité, comme le Zn qui pouvait atteindre des concentrations de 458 mg Zn kg<sup>-1</sup> dans les feuilles et de 187 mg Zn kg<sup>-1</sup> dans les tiges. Dans le cas du peuplier, on retrouvait des concentrations approximatives de 70 mg Zn kg<sup>-1</sup>, dans les feuilles et les tiges. En plus d'avoir extrait du Zn en quantité appréciable, le *S. viminalis* avait aussi un bon potentiel d'accumulation du Cd dans ses parties aériennes. En effet, même si les concentrations semblent dérisoires dans les feuilles (1,9 mg Cd kg<sup>-1</sup>) et dans les tiges (2,6 mg Cd kg<sup>-1</sup>), il apparaît que le taux de bioconcentration est élevé (3,7 environ), compte tenu que le Cd dans le sol était à un niveau non détectable. Dans le cas de la production de biomasse, c'est plutôt le peuplier hybride qui s'est démarqué. En effet, les masses des feuilles et de tiges pouvaient atteindre jusqu'à 23 et 18 g



respectivement. De plus, cette espèce a semblé moins affectée par la contamination que le *S. viminalis*, les différences entre les deux traitements étant moins grandes. Lors de la phase *ex situ*, les deux espèces d'arbres à croissance rapide ont donc montré des qualités nécessaires dans une optique de phytoremédiation.

L'inoculation des deux espèces d'arbres avec le *Glomus intraradices* a permis de savoir si l'établissement d'une symbiose mycorhizienne en sol contaminé et perturbé était possible. Le sol contenu dans les pots ne fut pas stérilisé, afin d'évaluer la compétitivité de l'espèce inoculée par rapport à la microflore indigène. Les pourcentages de structures mycorhiziennes mesurées sur les racines étaient satisfaisants, compte tenu de la nature du sol. En sol contaminé, sur les racines de peuplier, on retrouvait jusqu'à 65% de colonisation mycorhizienne, après inoculation, tandis que sans inoculation, la flore indigène colonisait 50% du réseau racinaire. Dans les cas du *S. viminalis* inoculé, on trouvait 19% de colonisation mycorhizienne en sol contaminé, alors que sans l'ajout du *G. intraradices*, il y avait présence de structures mycorhiziennes arbusculaires que sur 3% du réseau racinaire. Peu ou pas d'information sur l'établissement d'une colonisation mycorhizienne arbusculaire auprès d'arbres à croissance rapide croissant en un sol contaminé n'était à ce jour disponible. Cette expérience nous donne un bref aperçu des possibilités envers ce type de relations. Bien que les résultats aient été satisfaisants au niveau des pourcentages de colonisation mycorhizienne, il n'y a pas eu de différence significative entre les plants inoculés et ceux colonisés par la microflore mycorhizienne indigène, que ce soit au niveau de la production de biomasse ou de l'accumulation de métaux.

Afin d'étudier l'établissement de végétation supérieure, représentée par les arbres à croissance rapide, sur un site contaminé et perturbé, ces derniers ont été plantés directement sur le site, et inoculés avec un champignon mycorhizien dont l'inoculum est disponible commercialement. En effet, la deuxième phase du projet de recherche s'est déroulée en milieu urbain, sur un site contaminé aux métaux lourds (Cr, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn). Cette initiative a permis de vérifier la capacité de croissance et d'accumulation de métaux des deux espèces *Salix viminalis* clone 5027 et *Populus × generosa*, inoculées avec le *Glomus intraradices*. Non seulement ces arbres se sont bien implantés mais ils ont très bien réussi à croître malgré les conditions difficiles de croissance, leurs tailles atteignant jusqu'à 200 cm après une saison de

croissance seulement. La production de biomasse différait entre les espèces de la même façon que lors de la phase *ex situ*, c'est-à-dire que le peuplier produisait plus de biomasse foliaire et de tiges que l'espèce de saule. La différence majeure résidait dans le fait que l'inoculation avec le *G. intraradices* a promu la production de biomasse chez les espèces traitées. En effet, les arbres où le *G. intraradices* avait été inoculé produisaient plus de biomasse que ceux qui n'avaient pas reçu l'inoculum. Cet effet, provenant d'une association mycorhizienne arbusculaire jumelée à des arbres à croissance rapide, n'avait pas été rapporté dans la littérature jusqu'à présent, d'où l'intérêt de ce point, surtout en situation de phytoremédiation. En effet, plus la production de biomasse augmente, plus de métaux peuvent être accumulés dans les tissus produits.

L'accumulation de métaux différait aussi entre les espèces. Sans surprise, le *S. viminalis* accumulait plus de métaux dans ses tissus aériens que le *P. × generosa*, dans les feuilles et les tiges. Cependant, cette différence était visible au niveau du Cd dans les feuilles seulement chez les arbres inoculés. L'inoculation mycorhizienne a cependant eu un effet certain : les peupliers non inoculés avaient plus de Cu dans leur tiges et plus de Cd dans leurs feuilles que les inoculés, les différences étant cependant marginales. Ces dissimilitudes entre les traitements inoculés et non inoculés sont significatives, mais sont difficilement qualifiables comme étant différentes de façon pratique. En effet, comme quelques microgrammes séparent les deux traitements, on ne peut parler d'un effet négatif. La production de biomasse augmentée par l'association arbre-champignon mycorhizien compense grandement pour cette différence.

Comme démontré au cours de ce mémoire, la phytoremédiation englobe plusieurs processus complexes. La réalisation de mon projet de maîtrise a permis de jeter un regard neuf sur certains aspects de la phytoremédiation jusqu'ici moins explorés, malgré la quantité de recherches se faisant sur le sujet. De plus, l'implantation d'un couvert végétal sur un *brownfield* de la ville de Montréal reste, à mon sens, une réalisation concrète, une trace tangible de cette étude et un pas dans la bonne direction quant à la restauration de sites dégradés.

**“O, pardon me, thou bleeding piece of earth,  
That I am meek and gentle with these butchers!”**

**William SHAKESPEARE**

## 4.2 RÉFÉRENCES GÉNÉRALES

- Assuncao, A. G. L., Schat, H. Aarts, M. G. M., 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 159(2), 351-360.
- Baum, C., Hryniewicz, K., Leinweber, P. Meißner, R., 2006. Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix* × *dasyclados*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169(4), 516-522.
- Berti, W. R. Cunningham, S., 2000. Phytostabilization of metals, in: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York-Toronto, pp. 71-88.
- Bhatia, N., Baker, A., Walsh, K. Midmore, D., 2005. A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta* 223(1), 134.
- Bidwell, S. D., Pederick, J. W., Sommer-Knudsen, J. Woodrow, I. E., 2001. Micropropagation of the nickel hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (Family Violaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(1), 89.
- Blaylock, M. J. Huang, J. W., 2000. Phytoextraction of metals, in: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York-Toronto, pp. 53-70.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Abouddrar, W., Ouhammou, A. Morel, J. L., 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* 63(5), 811.
- Boyd, R. S. Moar, W. J., 1999. The defensive function of Ni in plants: response of the polyphagous herbivore *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to hyperaccumulator and accumulator species of *Streptanthus* (Brassicaceae). *Oecologia* 118(2), 218.
- Broadhurst, C. L., Chaney, R. L., Angle, J. S., Erbe, E. F. Mangel, T. K., 2004. Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Plant and Soil* 265(1 - 2), 225.
- Brooks, R. R., Chambers, M. F., Nicks, L. J. Robinson, B. H., 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science* 3(9), 359.
- Carlot, M., Giacomini, A. Casella, S., 2002. Aspects of Plant-Microbe Interactions in Heavy Metal Polluted Soil. *Acta Biotechnologica* 22(1-2), 13-20.
- CCME, 2006. Proposition de principe sur la responsabilité à l'égard des lieux contaminés. Conseil canadien des ministres de l'environnement, Ottawa.

- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. Joner, E. J., 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental science and pollution research international* 12(1), 34 - 48.
- Chen, B. D., Zhu, Y. G. Smith, F. A., 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) from a uranium mining-impacted soil. *Chemosphere* 62(9), 1464.
- Christersson, L., 2006. Biomass production of intensively grown poplars in the southernmost part of Sweden: Observations of characters, traits and growth potential. *Biomass and Bioenergy* 30(6), 497-508.
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S. Berta, G., 2005. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Canabis sativa* L. *Chemosphere* 59, 21-29.
- Clemens, S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212(4), 475.
- Clemens, S., 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology* 163(3), 319.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88(11), 1707.
- Colangelo, E. P. Guerinot, M. L., 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9(3), 322.
- De, J., Sarkar, A. Ramaiah, N., 2006. Bioremediation of toxic substances by mercury resistant marine bacteria. *Ecotoxicology* 15(4), 385.
- de Souza, M. P., Chu, D., Zhao, M., Zayed, A. M., Ruzin, S. E., Schichnes, D. Terry, N., 1999. Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by indian mustard. *Plant Physiology* 119(2), 565-574.
- Dickinson, N. M., 2000. Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere* 41, 259-263.
- Dickinson, N. M. Pulford, I. D., 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International* 31, 609-613.
- Dushenkov, S. Kapulnik, Y., 2000. Phytofiltration of metals, in: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York-Toronto, pp. 89-106.

- Dushenkov, V., Kumar, P. N., Motto, H. Raskin, I., 1995. Rhiofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology* 29, 1239-1245.
- Ensley, B. D., 2000. Rationale for use of phytoremediation, in: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York-Toronto pp. 3-11.
- Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J. Salt, D. E., 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16(8), 2176-2191.
- Gaur, A. Adholeya, A., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86(4), 528-534.
- Giasson, P. Jaouich, A., 1998. La phytorestauration des sols contaminés au Québec. *Vecteur environnement* 31(4), 40-53.
- Gohre, V. Paszkowski, U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223(6), 1115.
- Greenberg, M., 2002. Should housing be built on former brownfield sites? *American Journal of Public Health* 92(5), 703-705.
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S., Gelbart, W. M., Lewontin, R. C., Miller, J. H. Suzuki, D. T., 2002. *Introduction à l'analyse génétique*, 3th eds De Boeck Université, Paris-Bruxelles.
- Hall, J. L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53(366), 1-11.
- Hall, J. L. Williams, L. E., 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 54(393), 2601-2613.
- Heath, M. C., 2000. Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interactions. *Annual review of phytopathology* 38, 443-465.
- Heggo, A. Angle, J. S., 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil biology & biochemistry* 22(6), 865-869.
- Huitson, S. B. Macnair, M. R., 2003. Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytologist* 159(2), 453-459.
- Jennings, A. A., Cox, A. N., Hise, S. J. Petersen, E. J., 2002. Heavy metal contamination in the brownfield soils of Cleveland. *Soil and Sediment Contamination* 11(5), 719 - 750.
- Joner, E. J., Aarle, I. M. v. Vosatka, M., 2000. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil* 226, 199-210.

- Joner, E. J. Leyval, C., 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science & Technology* 37, 2371-2375.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfert of trace elements - an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A. Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants, third ed. CRC Press, Boca Raton.
- Karthikeyan, R. Kulakow, P. A., 2003. Soil plant microbe interactions in phytoremediation, in: D. T. Tsao (Eds), *Phytoremediation*. Springer-Verlag, Berlin-New York, pp. 51-74.
- Khan, A. G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4), 355.
- Khan, A. G., Kuek, C., Chaudhry, T. M., Khoo, C. S. Hayes, W. J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41, 197-207.
- Kupper, H., Zhao, F. J. McGrath, S. P., 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 119, 305-311.
- Kuzovkina, Y. A. Quigley, M. F., 2005. Willows beyond wetland: uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution* 162, 183-204.
- Labrecque, M., Teodorescu, T. I. Daigle, S., 1995. Effect of wastewater sludge on growth and heavy metal bioaccumulation of two *Salix* species. *Plant and Soil* 171, 303-316.
- Landberg, T. Greger, M., 2004. No phytochelatin (PC2 and PC3) detected in *Salix viminalis*. *Physiologia Plantarum* 121, 481-487.
- Lasat, M. M., Baker, A. J. M. Kochian, L. V., 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 118(3), 875-883.
- Laureysens, I., DeTemmermanb, L., Hastira, T., VanGyselc, M. Ceulemans, R., 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133, 541-551.
- Leigh, M. B., Fletcher, J. S., Fu, X. Schmitz, J. M., 2002. Root turnover: An important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environmental Science & Technology* 36(7), 1579 - 1583.

- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
- Liu, Y., Zhu, Y. G., Chen, B. D., Christie, P. Li, X. L., 2005. Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Mycorrhiza* 15, 187-192.
- Lynch, J. M., 2002. Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. *Biodegradation* 13(1), 21-27.
- Mattina, M. I., Lannucci-Berger, W., Musante, C. White, J. C., 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution* 124(3), 375.
- Maxted, A., Black, C., West, H., Crout, N., McGrath, S. Young, S., 2007. Phytoextraction of cadmium and zinc by *Salix* from soil historically amended with sewage sludge. *Plant and Soil* 290(1), 157-172.
- McGrath, S. P., Lombi, E., Gray, C. W., Caille, N., Dunham, S. J. Zhao, F. J., 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution* 141(1), 115.
- McIntyre, T., 2003. Phytoremediation of heavy metals from soils, in: D. T. Tsao (Eds), *Phytoremediation* Springer-Verlag, Berlin-New York, pp. 97-123.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J. Tack, F. M. G., 2007. Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 60(1), 57.
- Mengoni, A., Grassi, E., Barzanti, R., Biondi, E. G., Gonnelli, C., Kim, C. K. Bazzicalupo, M., 2004. Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology* 48(2), 209.
- MENV, 1999. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, Nouvelle édition. Ministère de l'environnement du Québec, Québec.
- Mertens, J., Vervaeke, P., DeSchrijver, A. Luyssaert, S., 2004. Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of the Total Environment* 326, 209-215.
- Mirck, J., J.G.Isebrands, Verwijsta, T. Ledin, S., 2005. Development of short-rotation willow coppice systems for environmental purposes in Sweden. *Biomass and Bioenergy* 28, 219-228.



- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. Szalai, G., 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169(2), 239-246.
- Patel, J. B., 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis* 6(4), 313.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L. D., Lasat, M. M., Garvin, D. F., Eide, D. Kochian, L. V., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *PNAS* 97(9), 4956-4960.
- Perronnet, K., Schwartz, C. Morel, J. L., 2003. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil. *Plant and Soil* 249(1), 19.
- Perttu, K. L. Kowalik, P. J., 1997. *Salix* vegetation filters for purification of water and soils. *Biomass and Bioenergy* 12(1), 9–19.
- Prosser, J. I., Rangel-Castro, J. I. Killham, K., 2006. Studying plant-microbe interactions using stable isotope technologies. *Current Opinion in Biotechnology* 17(1), 98.
- Pulford, I. D. Watson, C., 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* 29, 529-540.
- Raskin, I., Smith, R. D. Salt, D. E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Plant biotechnology* 8, 221-226.
- Raven, P. H., Evert, R. F. Eichhorn, S. E., 1998. *Biologie végétale*. De Boeck Université, Paris-Bruxelles.
- Reeves, R. D., 2003. Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil* 249(1), 57.
- Reeves, R. D. Baker, A. J. M., 2000. Metal-accumulating plants, in: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York-Toronto, pp. 193-229.
- Robinson, B., Fernández, J.-E., Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J. M., Green, S. Clothier, B., 2003. Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant and Soil* 249(1), 117-125.
- Rockwood, D. L., Naidu, C. V., Carter, D. R., Rahmani, M., Spriggs, T. A., Lin, C., Alker, G. R., Isebrands, J. G. Segrest, S. A., 2004. Short-rotation woody crops and phytoremediation: Opportunities for agroforestry? *Agroforestry Systems* 61, 51-63.
- Rosselli, W., Keller, C. Boschi, K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil* 256, 265–272.

- Ryan, P. R., Delhaize, E. Jones, D. L., 2001. Function and mechanism of organic anion exsudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1), 527-560.
- Rytter, L. Ericsson, T., 1993. Leaf nutrient analysis in *Salix Viminalis* (L.) energy forest stands growing on agricultural land. *Angenommen*, 349-356.
- Salt, D. E., Prince, R. C. Pickering, I. J., 2002. Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy. *Microchemical Journal* 71(2-3), 255.
- Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J. Raskin, I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Salt, D. E., Smith, R. D. Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology* 49, 643-668.
- Schnoor, J. L., 2000. Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees, in: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York-Toronto, pp. 133-150.
- Sebastiani, L., Scebba, F. Tognetti, R., 2004. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides X maximowiczii*) and I-214 (*P. Xeuramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52, 79-88.
- Sekhar, K., C., Kamala, C. T., Chary, N. S., Balaram, V. Garcia, G., 2005. Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* 58(4), 507.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R. Brunner, I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and Soil* 277(1-2), 245.
- Smith, S. E. Read, D. J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- Smits, E. P., 2005. Phytoremediation. *Annual Revue of Plant Biology* 56, 15-39.
- Srivastava, M., Ma, L. Q. Santos, J. A. G., 2006. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Science of The Total Environment* 364(1-3), 24.
- Sun, Q., Ye, Z. H., Wang, X. R. Wong, M. H., 2005. Increase of glutathione in mine population of *Sedum alfredii*: A Zn hyperaccumulator and Pb accumulator. *Phytochemistry* 66(21), 2549.
- Susarla, S., Medina, V. F. McCutcheon, S. C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18(5), 647.

- Taiz, P. Zeiger, E., 1998. Plant physiology. Sinauer Associates, Sunderland Mass.
- Tamura, H., Honda, M., Sato, T. Kamachi, H., 2005. Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Journal of Plant Research 118(5), 355.
- Tesar, M., Reichenauer, T. G. Sessitsch, A., 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. Soil Biology and Biochemistry 34(12), 1883.
- Trenhaile, A. S., 1998. Geomorphology: a Canadian perspective. Oxford University Press, Don Mills.
- Tsao, D. T., 2003. Overview of phytotechnologies, in: D. T. Tsao (Eds), Phytoremediation Springer-Verlag, Berlin-New York, pp. 1-50.
- Vierheilig, H., Schweiger, P. Brundrett, M., 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. Physiologia Plantarum 4, 393-404.
- Vogel-Mikus, K., Drobne, D. Regvar, M., 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. Environmental Pollution 133, 233-242.
- Wang, A. S., Angle, J. S., Chaney, R. L., Delorme, T. A. Reeves, R. D., 2006. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. Plant & Soil 281(1-2), 325-337.
- Wei, C. Y. Chen, T.-B., 2006. Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation. Chemosphere 63(6), 1048.
- Wei, C. Y., Sun, X., Wang, C. Wang, W. Y., 2006. Factors influencing arsenic accumulation by *Pteris vittata*: A comparative field study at two sites. Environmental Pollution 141(3), 488.
- Wei, S. Zhou, Q.-X., 2006. Phytoremediation of cadmium-contaminated soils by *Rorippa globosa* using two-phase planting (5 pp). Environmental Science and Pollution Research 13(3), 151.
- Widada, J., Nojiri, H. Omori, T., 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology 60, 45-59.
- Wu, S. C., Cheung, K. C., Luo, Y. M. Wong, M. H., 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. Environmental Pollution 140(1), 124.

- Yang, X., Feng, Y., He, Z. Stoffella, P. J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4), 339.
- Yang, X. E., Long, X. X., Ye, H. B., He, Z. L., Calvert, D. V. Stoffella, P. J., 2004. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant and Soil* 259(1 - 2), 181.
- Yergeau, E., Vujanovic, V., St-Arnaud, M. 2006. Changes in communities of Fusarium and arbuscular-mycorrhizal fungi as related to different asparagus cultural factors. *Microbial Ecology* 52, 104-113.
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C. Q. Ma, L., 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *The Science of the total environment* 300, 167-177.
- Zhou, J. L., 1999. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 51, 686-693.