

**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

Rôle des microorganismes sur la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère de sols forestiers

par  
Benoît Cloutier-Hurteau

Département de géographie  
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D)  
en géographie

Décembre, 2008

© Benoît Cloutier-Hurteau, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Rôle des microorganismes sur la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère de sols  
forestiers

présentée par :  
Benoît Cloutier-Hurteau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre J.H. Richard	: Président-rapporteur
François Courchesne	: Directeur de recherche
Sébastien Sauvé	: Codirecteur
Paul Comtois	: Membre du Jury
Benoît Jaillard	: Examineur externe
Roxanne Maranger	: Représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le  
3 décembre 2008

## SOMMAIRE

---

Le microenvironnement de la rhizosphère exerce une influence marquée sur la distribution des métaux dans les écosystèmes forestiers en régulant le prélèvement des métaux par les plantes. Jusqu'à ce jour, les études sur les métaux dans la rhizosphère ont permis une caractérisation exhaustive de leur distribution dans la phase solide du sol. Toutefois, très peu d'études se sont concentrées sur la spéciation des métaux dans la phase liquide du sol, bien qu'il s'agisse de la voie préférentielle de prélèvement des métaux par les plantes. Dans le même ordre d'idée, le rôle joué par les racines sur la biogéochimie des métaux dans la rhizosphère a été largement étudié, alors que l'action des microorganismes a été, comparativement, négligée.

Pour combler ces lacunes, la présente thèse de doctorat a pour objectifs : 1) de documenter la spéciation en phase liquide du cuivre (Cu), du zinc (Zn) et de l'aluminium (Al) dans la rhizosphère et la matrice de sols forestiers, 2) de quantifier l'influence des microorganismes sur la spéciation du Cu, Zn et Al dans ces sols et 3) d'identifier les variables et les mécanismes d'origine microbienne influençant la spéciation de ces métaux dans la rhizosphère. Afin d'atteindre ces objectifs, la rhizosphère et la matrice du sol ont été échantillonnées sur le terrain sous 18 peupliers faux-trembles (*Populus tremuloides* Michx) répartis également sur six sites présentant des propriétés de sol contrastées. Pour chacun de ces sols, des propriétés biologiques, chimiques ainsi que les formes labiles et biodisponibles de Cu, Zn et Al ont été mesurées, alors que la spéciation complète de ces métaux a été obtenue par modélisation.

La thèse est composée de deux chapitres recensant les principales connaissances disponibles dans la littérature sur le sujet, d'un chapitre décrivant l'approche méthodologique du projet et de quatre chapitres de résultats présentés sous forme d'articles. Le premier chapitre de résultats décrit l'approche utilisée pour modéliser la spéciation des métaux. Les trois autres articles présentent et discutent les résultats spécifiques permettant de répondre aux objectifs du projet. À ce sujet, les résultats de spéciation montrent que le Cu possède une spéciation en phase liquide dominée par les formes complexées à la matière organique dissoute, que le Zn est présent principalement

sous sa forme ionique libre ou complexée à la matière organique dissoute, alors que les complexes inorganiques dominent la spéciation de l'Al. De plus, la rhizosphère est systématiquement enrichie en formes biodisponibles de métaux comparativement à la matrice du sol, ce qui suggère que des mécanismes propres à ce microenvironnement favorisent l'émergence de formes métalliques assimilables par les organismes vivants. Dans ces circonstances, l'influence des microorganismes sur les formes biodisponibles des métaux a aussi été évaluée. Les résultats soulignent que les microorganismes exercent une influence significative sur les formes biodisponibles de métaux dans la rhizosphère et que cette influence est plus importante que dans la matrice du sol. Deux mécanismes d'origine microbienne semblent influencer sur la biodisponibilité des métaux dans la rhizosphère de cette étude. Le plus important de ces mécanismes est associé à l'assimilation de l'azote par les microorganismes. Par le biais de ce mécanisme, le pH de la rhizosphère est modifié ainsi que la spéciation des métaux dissous. Le deuxième mécanisme, soit la décomposition de la matière organique par les microorganismes, induit, quant à lui, une mobilisation des métaux retenus dans la matière organique du sol, notamment dans les racines mortes.

L'originalité de la thèse réside d'abord dans l'approche scientifique utilisée. En effet, très peu d'études portant sur la rhizosphère se sont concentrées sur les arbres et ont effectué un échantillonnage sur le terrain. Ce type d'étude permet de fournir des résultats qui sont en lien direct avec la réalité de terrain. De plus, les données présentées dans cette thèse sont uniques. En effet, rares sont les études qui ont produit une quantification aussi complète de la spéciation de métaux dans la rhizosphère ainsi que du rôle de l'activité microbienne sur la spéciation de ces métaux. Ces résultats permettent ainsi une meilleure compréhension des mécanismes régulant la spéciation des métaux dans la rhizosphère, notamment en clarifiant le rôle déterminant joué par les microorganismes. De cette façon, une évaluation plus précise des transferts de métaux du sol vers les plantes ainsi que des risques encourus par les plantes, les écosystèmes et les humains peuvent être effectuées.

Mots clés : cycle biogéochimique, sols forestiers, métaux traces, rhizosphère, pH, biomasse microbienne, polarographie, électrode spécifique, MINEQL+ 4.5, analyses statistiques multivariées.

## ABSTRACT

---

By controlling metal uptake by plants, the rhizosphere strongly influences the distribution of metals in forested ecosystems. Studies on the biogeochemistry of metals in the rhizosphere provided detailed accounts of the distribution of metals in the solid phase of this soil microenvironment. However, very few studies have investigated the speciation of metals in the soil solution despite the fact that it represents the preferential pathway of metal uptake by plants. Similarly, although the effects of roots on the biogeochemistry of metals in the rhizosphere have been extensively studied, the influence exerted by soil microorganisms has been comparatively neglected.

To address this gap in knowledge, the objectives of this thesis were defined as to 1) document the liquid-phase speciation of copper (Cu), zinc (Zn) and aluminum (Al) in the rhizosphere and bulk forest soils, 2) quantify the influence of microorganisms on the speciation of Cu, Zn and Al in these soils and 3) identify the microbial variables and processes controlling the speciation of these metals in the rhizosphere. To achieve these objectives, rhizosphere and bulk soils were sampled under 18 trembling aspen trees (*Populus tremuloides* Michx) equally distributed at six field sites presenting contrasted soil properties. On each soil sample, biological and chemical properties as well as the labile and bioavailable Cu, Zn and Al were measured whereas geochemical modelling was used to speciate each metal studied.

The thesis is composed of two chapters reviewing the latest knowledge published on this topic, of one chapter describing the methodology used for this work and of four result chapters presented as research papers. The first article describes the modelling approach used to compute the speciation of metals. The following three papers present and discuss the results of this research. The speciation results revealed that Cu is largely present in organically-complexed forms, that the speciation of Zn is dominated by the free-ion form or by organic complexes while Al is mostly found as inorganic complexes. The speciation data further revealed that the rhizosphere was systematically enriched in bioavailable metal species as compared to bulk soil. This suggested that the processes acting in the rhizosphere promoted the formation of bioavailable metal species.

Moreover, links between microbial variables and metals were also studied and indicated that the rhizospheric microorganisms exerted a significant influence on the distribution of bioavailable metals species and that this influence was larger in rhizosphere than in the bulk soil. Two microbially-driven processes were proposed to explain their influence on the bioavailability of metals in the rhizosphere. The most important microbial process was the pH change induced by the assimilation of nitrogen. This process strongly impacted on the pH of the rhizosphere and, thus, on the speciation of metals. The second process was the microbially-induced decay of soil organic matter, in particular of dead roots, through which the metals sequestered in the soil organic matter of the rhizosphere were mobilized.

The original contributions of this thesis are two-fold. First, its focus on tree roots and field sampling gave us a unique opportunity to study the rhizosphere under relevant, meaningful and representative conditions. Secondly, the data produced during this study are unique. Indeed, very few studies have documented the speciation of dissolved metals in the rhizosphere as precisely as we did. Similarly, the influence exerted by microorganisms on metal speciation in this microenvironment was demonstrated here for one of the first time. Acquiring these key informations significantly improved our understanding of the processes controlling the speciation of metals in the rhizosphere, especially by emphasizing the crucial role played by microorganisms in this microenvironment. These informations are helpful to estimate precisely the metal uptake by plants and to assess the ecological and human risk associated to the transfer of metals from soil to the vegetation.

Keywords: biogeochemical cycle, forest soils, trace metals, rhizosphere, pH, microbial biomass, differential pulse anodic stripping voltammetry, ion-selective electrode, MINEQL+ 4.5, multivariate statistical analyses.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES</b> .....	<b>XIX</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XX</b>
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>1</b>
1.1 MISE EN CONTEXTE .....	1
1.2 STRUCTURE DE LA THÈSE .....	3
<b>CHAPITRE 2. LA BIOGÉOCHIMIE DES MÉTAUX DANS LES ÉCOSYSTÈMES FORESTIERS</b> .....	<b>6</b>
2.1 PRINCIPALES DÉFINITIONS .....	6
2.2 PROBLÈMES ENVIRONNEMENTAUX ASSOCIÉS AUX MÉTAUX .....	8
2.3 DISTRIBUTION DES MÉTAUX DANS LES ÉCOSYSTÈMES FORESTIERS .....	9
2.4 MÉCANISMES RÉGULATEURS DE LA CONCENTRATION ET DE LA SPÉCIATION DES MÉTAUX DANS LA SOLUTION DE SOL .....	11
2.4.1 <i>Définitions</i> .....	11
2.4.2 <i>Mécanismes internes à la solution</i> .....	14
2.4.2.1 Effet du pH.....	14
2.4.2.2 Effet de la matière organique dissoute.....	14
2.4.2.3 Effet de compétition entre les cations pour les anions.....	16
2.4.3 <i>Mécanismes d'équilibre entre les phases solide et liquide du sol</i> .....	17
2.4.3.1 Effet de l'adsorption-désorption .....	17
2.4.3.2 Effet de la précipitation-dissolution .....	18
2.4.3.3 Effet des réactions d'oxydoréduction.....	20
2.4.3.4 Prédiction des concentrations totales de métaux dans la solution de sol à l'aide des réactions d'équilibre entre les phases solide et liquide du sol.....	21
2.4.4 <i>Apports extérieurs de métaux</i> .....	22
2.4.5 <i>Mécanismes d'équilibre entre les phases liquide et gazeuse du sol</i> .....	22
2.4.6 <i>Effet des microorganismes sur les métaux</i> .....	23
2.4.6.1 Principaux microorganismes présents dans les sols.....	23
2.4.6.2 Influence des microorganismes sur les métaux.....	27
2.4.7 <i>Effet de la végétation arborescente et du cycle sol-plante sur les métaux</i> .....	33
<b>CHAPITRE 3. LA RHIZOSPHERE</b> .....	<b>34</b>
3.1 DÉFINITION ET DÉLIMITATION SPATIALE ET TEMPORELLE .....	34
3.2 PROPRIÉTÉS DE LA RHIZOSPHERE.....	35
3.2.1 <i>Propriétés physiques</i> .....	36
3.2.2 <i>Propriétés biologiques</i> .....	37



3.2.3 Propriétés chimiques.....	40
3.2.3.1 pH.....	40
3.2.3.2 Conditions oxydoréductrices.....	42
3.2.3.3 Matière organique.....	42
3.2.3.4 Composition chimique de la rhizosphère en macroéléments et en métaux traces.....	44
3.3 MÉCANISMES RÉGULANT LA SPÉCIATION DES MÉTAUX DANS LA RHIZOSPHÈRE.....	47
3.3.1 Mécanismes édaphiques : rôle des propriétés des sols.....	47
3.3.2 Mécanismes racinaires.....	49
3.3.3 Mécanismes microbiens.....	52
<b>CHAPITRE 4. OBJECTIFS DE RECHERCHE ET APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE .....</b>	<b>56</b>
4.1 PRINCIPAUX ENJEUX DE L'ÉTUDE DE LA SPÉCIATION DES MÉTAUX DANS LA RHIZOSPHÈRE DE SOLS FORESTIERS .....	56
4.2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	58
4.3 STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE.....	61
4.4 SITES D'ÉTUDES .....	62
4.4.1 Campagne d'échantillonnage de Rouyn-Noranda.....	62
4.4.2 Campagne d'échantillonnage en Montérégie.....	65
4.5 ÉCHANTILLONNAGE DES COMPARTIMENTS DU SOL.....	66
4.6 ANALYSES DE LABORATOIRE.....	68
4.6.1 Propriétés biologiques des sols.....	69
4.6.1.1 Mesures de la biomasse microbienne.....	71
4.6.1.2 Mesures de l'activité enzymatique.....	72
4.6.2 Propriétés physico-chimiques des sols.....	74
4.6.2.1 Propriétés de la phase solide des sols.....	74
4.6.2.2 Propriétés de la phase liquide des sols .....	75
4.6.2.2.1 Analyses des propriétés chimiques majeures.....	76
4.6.2.2.2 Analyses des métaux .....	77
4.6.2.2.3 Modélisation géochimique de la spéciation du Cu, Zn et Al .....	80
4.6.3 Propriété chimique de la végétation .....	82
4.7 TRAITEMENTS STATISTIQUES SUR LES DONNÉES.....	82
4.7.1 Pré-traitements statistiques.....	82
4.7.2 Différences entre les régions d'échantillonnages et les compartiments biogéochimiques du sol.....	84
4.7.3 Évaluation de l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux .....	85
<b>PARAGRAPHES DE LIAISON A.....</b>	<b>88</b>
<b>ACCORD DES COAUTEURS .....</b>	<b>89</b>
<b>CHAPITRE 5. COMPARING WHAM 6 AND MINEQL+ 4.5 FOR THE CHEMICAL SPECIATION OF <math>\text{Cu}^{2+}</math> IN THE RHIZOSPHERE OF FOREST SOILS.....</b>	<b>90</b>
5.1 INTRODUCTION.....	90
5.2 EXPERIMENTAL SECTION .....	91
5.2.1 Sampling and Analyses .....	91

5.2.2	<i>Data Input in Speciation Models</i> .....	92
5.2.3	<i>Comparison of Modelling and Parameters Settings</i> .....	94
5.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	96
5.3.1	<i>Properties of Water Extracts</i> .....	96
5.3.2	<i>Estimation of Cu<sup>2+</sup> Activity using MINEQL+ 4.5</i> .....	100
5.3.3	<i>Estimation of Cu<sup>2+</sup> Activity using WHAM 6</i> .....	100
5.3.4	<i>Comparison of the Modelling between MINEQL+ 4.5 and WHAM 6</i> .....	103
5.4	SUPPLEMENTARY DATA.....	105
5.4.1	<i>Supplementary data 1</i> .....	105
5.4.2	<i>Supplementary data 2</i> .....	106
5.4.3	<i>Supplementary data 3</i> .....	107
	<b>PARAGRAPHERS DE LIAISON B</b> .....	<b>108</b>
	<b>ACCORD DES COAUTEURS</b> .....	<b>109</b>
	<b>CHAPITRE 6. INFLUENCE OF MICROORGANISMS ON CU SPECIATION IN THE RHIZOSPHERE OF FOREST SOILS</b> .....	<b>110</b>
6.1	INTRODUCTION.....	110
6.2	MATERIALS AND METHODS.....	112
6.2.1	<i>Field sites</i> .....	112
6.2.2	<i>Sampling of soil components</i> .....	114
6.2.3	<i>Physical properties of the bulk soil materials</i> .....	114
6.2.4	<i>Microbial analyses</i> .....	115
6.2.5	<i>Chemical analyses</i> .....	116
6.2.6	<i>Geochemical modelling of Cu speciation</i> .....	117
6.2.7	<i>Statistical analyses</i> .....	118
6.3	RESULTS.....	120
6.3.1	<i>Microbial and chemical data</i> .....	120
6.3.2	<i>Cu speciation</i> .....	124
6.3.3	<i>Influence of chemical and microbial variables on Cu<sub>WS</sub> and Cu<sup>2+</sup></i> .....	127
6.4	DISCUSSION.....	131
6.4.1	<i>Microbial and chemical data</i> .....	131
6.4.2	<i>Cu speciation in the rhizosphere of forest soils</i> .....	132
6.4.3	<i>Influence of rhizospheric microorganisms on Cu<sub>WS</sub> and Cu<sup>2+</sup> in forest soils</i> .....	133
6.5	CONCLUSIONS.....	136
6.6	SUPPLEMENTARY DATA.....	138
6.6.1	<i>Supplementary data 1</i> .....	138
6.6.2	<i>Supplementary data 2: Methodological details on microbial analyses</i> .....	138
6.6.2.1	<i>TMBC and TMBN measured by fumigation-extraction technique (Voroney et al., 2008)</i> .....	138
6.6.2.2	<i>AMBC measured by substrate-induced respiration (Anderson and Domsch, 1978)</i> .....	139
6.6.2.3	<i>Urease measured colorimetrically (Kandeler and Gerber, 1988)</i> .....	139
6.6.2.4	<i>Dehydrogenase measured colorimetrically (Tabatabai, 1994)</i> .....	140
6.6.3	<i>Supplementary data 3: Methodological details on chemical analyses</i> .....	141
6.6.3.1	<i>Measurement of Cu<sup>2+</sup> activity (Rachou et al., 2007)</i> .....	141
6.6.3.2	<i>Measurement of Cu<sub>TR</sub> (US EPA, 1998)</i> .....	141

6.6.3.3 Measurement of Cu sequestered in root tissues (Jones Jr and Case, 1990)	141
6.6.4 <i>Supplementary data 4: Methodological details on RDA</i>	142
6.6.5 <i>Supplementary data 5: Discrimination the variability of the database between sampling areas and soil components</i>	142
<b>PARAGRAPHE DE LIAISON C</b>	<b>145</b>
<b>ACCORD DES COAUTEURS</b>	<b>146</b>
<b>CHAPITRE 7. ON ZN SPECIATION IN THE RHIZOSPHERE OF FOREST SOILS: THE IMPACT OF MICROBIAL ACTIVITY</b>	<b>147</b>
7.1 INTRODUCTION	147
7.2 MATERIALS AND METHODS	149
7.2.1 <i>Field sites</i>	149
7.2.2 <i>Sampling of soil components</i>	150
7.2.3 <i>Microbial analyses</i>	150
7.2.4 <i>Chemical analyses</i>	151
7.2.5 <i>Geochemical modelling of Zn speciation</i>	153
7.2.6 <i>Statistical analyses</i>	154
7.3 RESULTS	155
7.3.1 <i>Microbial and chemical variables</i>	155
7.3.2 <i>Zn speciation</i>	156
7.3.3 <i>Influence of chemical and microbial variables on <math>Zn_{WS}</math> and <math>Zn_{DPASV}</math></i>	163
7.4 DISCUSSION	167
7.4.1 <i>Zn speciation in the rhizosphere of forest soils</i>	167
7.4.2 <i>Influence of rhizospheric microorganisms on <math>Zn_{WS}</math> and <math>Zn_{DPASV}</math> in forest soils</i>	169
7.5 CONCLUSIONS	171
7.6 SUPPLEMENTARY DATA	172
7.6.1 <i>Supplementary data 1</i>	172
<b>PARAGRAPHE DE LIAISON D</b>	<b>173</b>
<b>ACCORD DES COAUTEURS</b>	<b>174</b>
<b>CHAPITRE 8. INTERACTIONS BETWEEN ALUMINUM SPECIATION AND MICROBIAL ACTIVITY IN THE RHIZOSPHERE OF FOREST SOILS</b>	<b>175</b>
8.1 INTRODUCTION	175
8.2 MATERIALS AND METHODS	177
8.2.1 <i>Field sites</i>	177
8.2.2 <i>Sampling of soil components</i>	178
8.2.3 <i>Microbial analyses</i>	178
8.2.4 <i>Chemical analyses</i>	179
8.2.5 <i>Geochemical modelling of Al speciation</i>	181
8.2.6 <i>Statistical analyses</i>	181
8.3 RESULTS	187
8.3.1 <i>Microbial and chemical variables</i>	187
8.3.2 <i>Al speciation in forest soils</i>	187

8.3.3 <i>Influence of chemical and microbial variables on <math>Al_{ws}</math> and <math>Al_{labile}</math> concentrations</i> .....	191
8.4 DISCUSSION.....	193
8.4.1 <i>Al speciation in the rhizosphere of forest soils</i> .....	193
8.4.2 <i>Influence of microbial and chemical variables on <math>Al_{ws}</math> and <math>Al_{labile}</math> concentrations in rhizospheric forest soils</i> .....	196
8.5 CONCLUSIONS .....	198
<b>CHAPITRE 9. PRINCIPALES CONCLUSIONS .....</b>	<b>200</b>
9.1 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS ET COMPARAISON ENTRE LES MÉTAUX.....	200
9.2 ORIGINALITÉ DE LA THÈSE .....	207
9.3 LIMITE DE L'ÉTUDE .....	210
9.4 PERSPECTIVES FUTURES .....	213
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>215</b>
<b>ANNEXE A - AUTORISATION DE RÉDIGER LA THÈSE SOUS FORME D'ARTICLES.....</b>	<b>235</b>
<b>ANNEXE B - PERMISSIONS DES ÉDITEURS.....</b>	<b>237</b>

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 2.1.</b>	Classifications des métaux en fonction de leur abondance naturelle dans les sols (Essington, 2004; Helmke, 2000; Schwab, 2000).....	6
<b>Tableau 2.2.</b>	Bilan biogéochimique de différents métaux dans des bassins-versants forestiers.....	10
<b>Tableau 2.3.</b>	Principaux microorganismes présents dans les sols (Gobat <i>et al.</i> , 1998; Paul et Clark, 1996; Prescott <i>et al.</i> , 1995).....	25
<b>Tableau 2.4.</b>	Modes de nutrition utilisés par les microorganismes pour assimiler l'énergie, le carbone ainsi que l'hydrogène et les électrons (Deneux-Mustin <i>et al.</i> , 2003; Prescott <i>et al.</i> , 1995).....	27
<b>Tableau 2.5.</b>	Mécanismes d'origines microbiens influençant la mobilité et la spéciation des métaux.....	28
<b>Tableau 3.1.</b>	Synthèse des différences observées entre la rhizosphère et la matrice du sol.....	36
<b>Tableau 3.2.</b>	Caractérisation générale des rhizodépôts présentes dans la rhizosphère.....	43
<b>Tableau 4.1.</b>	Caractérisation du comportement biogéochimique des trois métaux à l'étude.....	59
<b>Tableau 4.2.</b>	Ensemble des données recueillies sur les rhizosphères et les matrices du sol.....	69
<b>Tableau 4.3.</b>	Scénarios estimant la composition chimique du WSOC (%) pour les différents échantillons de sols de ce projet. ....	81
<b>Tableau 4.4.</b>	Analyses statistiques effectuées dans le cadre du projet de recherche.....	83
<b>Tableau 4.5.</b>	Matrices de données utilisées pour effectuer les partitions de variance et les analyses canoniques de redondance (RDA). ....	86
<b>Tableau 5.1.</b>	Scenarios, estimated from the literature, used to represent the composition of dissolved organic substances in the different types of soil samples.....	93
<b>Tableau 5.2.</b>	Conditional association constants between metals and organic ligands used in the speciation models to calculate Cu speciation. ....	95
<b>Tableau 5.3.</b>	Chemical variables and concentrations of dissolved metals in water extracts for the bulk (B) and the rhizosphere (R) soils of the six sampling sites.....	97
<b>Tableau 5.4.</b>	Cations and anions concentrations in the water extracts of the bulk (B) and the rhizosphere (R) soils of the six sampling sites. ....	98
<b>Tableau 5.5.</b>	Free-ion Cu activity measured by ion-selective electrode and Cu speciation calculated by MINEQL+ 4.5 and WHAM 6.....	99
<b>Tableau 6.1.</b>	Texture and mineralogy of one soil sampled from each site. ....	113
<b>Tableau 6.2.</b>	Microbial properties of the bulk and the rhizosphere (R) soils for each tree sampled. ....	121
<b>Tableau 6.3.</b>	pH values and cations concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils for each tree sampled. ....	122

<b>Tableau 6.4.</b>	Solid-phase and water-soluble organic matter and anions <sup>a</sup> concentration in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils for each tree sampled. ....	123
<b>Tableau 6.5.</b>	Measured ( $Cu_{TR}$ , $Cu_{WS}$ and $Cu^{2+}$ ) and modelled (Cu-inorg and Cu-org) Cu variables in water extracts for the bulk and the rhizosphere (R) soils of each tree sampled. ....	125
<b>Tableau 6.6.</b>	Total Cu concentration in the root tissues of each tree sampled.....	136
<b>Tableau 6.7.</b>	Mean properties of trembling aspen ( <i>Populus tremuloides</i> Michx) trees sampled at each site. Standard deviation values are in parentheses.....	138
<b>Tableau 6.8.</b>	Statistical informations <sup>a</sup> and standardized coefficients obtained from the discriminant analysis that differentiate objects as a function of sampling areas and soil components.....	144
<b>Tableau 7.1.</b>	Mean microbial properties of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	157
<b>Tableau 7.2.</b>	Mean pH values and the concentrations of cations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	158
<b>Tableau 7.3.</b>	Mean solid-phase and water-soluble organic carbon and the concentrations of anions <sup>a</sup> in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	159
<b>Tableau 7.4.</b>	Mean measured ( $Zn_{TR}$ , $Zn_{WS}$ and $Zn_{DPASV}$ ) and modeled ( $Zn^{2+}$ , Zn-inorg and Zn-org) Zn variables in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	160
<b>Tableau 7.5.</b>	Mean total Zn concentration in the root tissues of each tree sampled. ...	170
<b>Tableau 8.1.</b>	Mean microbial properties of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	184
<b>Tableau 8.2.</b>	Mean pH values and cations concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	185
<b>Tableau 8.3.</b>	Mean solid-phase and water-soluble organic carbon, and anions <sup>a</sup> concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	186
<b>Tableau 8.4.</b>	Mean measured ( $Al_{TR}$ , $Al_{WS}$ and $Al_{labile}$ ) and modeled ( $Al^{3+}$ , Al-inorg and Al-org) Al concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.....	189
<b>Tableau 9.1.</b>	Moyennes des résultats de spéciation obtenus pour le Cu, Zn et Al.....	201

## LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1.** Modèle conceptuel théorique du cycle biogéochimique des métaux en milieux forestiers et du cycle sol-plante (flèches rouges) (Fleury, 2007; Likens et Bormann, 1995).....7
- Figure 2.2.** Effet des métaux essentiels et non-essentiels sur l'activité biologique des organismes vivants dans les sols (modifié de McGrath (2002))......8
- Figure 2.3.** Modèle conceptuel décrivant les termes « fractionnement » et « spéciation » ainsi que les mécanismes et les propriétés des sols régulant la spéciation des métaux (modifié de Sauvé (2002)). .....12
- Figure 2.4.** Facteurs internes et externes au sol régulant la spéciation des métaux dans la solution de sol (modifié de Lindsay (1979)). .....13
- Figure 2.5.** Rôle du pH sur la spéciation du Cu. La zone hachurée correspond à la concentration des formes complexées de Cu, alors que les lignes représentent, d'une part, la concentration totale dissoute et, d'autre part, la concentration de la forme ionique libre. La tendance observée dans cette figure entre le pH et la spéciation du Cu est universelle et peut-être appliquée à tous les métaux (modifié de McBride (1994))......15
- Figure 2.6.** Relation existant entre la spéciation de l'Al en solution et les minéraux secondaires pouvant être formés par précipitation (modifié de McBride (1994))......19
- Figure 2.7.** Principaux mécanismes microbiens favorisant la mobilisation des métaux dans les sols (modifié de Deneux-Mustin *et al.* (2003)). .....31
- Figure 3.1.** Schéma conceptuel de la rhizosphère (adapté de Lynch (1990)).....34
- Figure 3.2.** Différences entre la rhizosphère et la matrice du sol pour la biomasse microbienne C et le taux de minéralisation N sous diverses essences d'arbres contenant des mycorhizes arbusculaires (MA) ou des ectomycorhizes (ECM). Les comparaisons entre les compartiments du sol sont établies à partir de la proportion de la différence entre la rhizosphère et la matrice du sol pour une propriété donnée. Les différences significatives sont indiquées par \* ( $p < 0.1$ ), \*\* ( $p < 0.05$ ) et \*\*\* ( $p < 0.001$ ). Les essences d'arbres représentées sont, respectivement, le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia* L.; RP), l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.; AS), le frêne blanc (*Fraxinus americana* L.; FA), l'épinette de Norvège (*Picea abies* L. Karst; PA), le chêne rouge (*Quercus rubra* L.; QR) et le pin rouge (*Pinus resinosa* Ait.; PR) (modifié de Phillips et Fahey (2006)).....38
- Figure 3.3.** Différences de compositions des communautés microbiennes entre la rhizosphère du maïs (*Zea mays* L., cv. Jumbo) et la matrice du sol (Kandeler *et al.*, 2002). Les profils des communautés microbiennes ont été obtenus à partir des bandes d'ADNr 16S analysées par la technique d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE). Les différences de composition des communautés microbiennes entre la rhizosphère et la matrice du sol sont visibles en comparant la position et l'intensité des bandes entre les deux compartiments du sol. ....39

<b>Figure 3.4.</b>	Principaux mécanismes d'origine racinaire influençant la concentration et la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère (modifié de Hinsinger <i>et al.</i> (2005)).	50
<b>Figure 4.1.</b>	Organisation de l'information recueillie et présentée dans cette thèse en fonction du corpus théorique décrivant les mécanismes rhizosphériques influençant la spéciation des métaux. L'information recueillie se distribue dans les différents chapitres de la thèse indiqués dans cette figure par les cercles rouges.	61
<b>Figure 4.2.</b>	Localisation des sites d'échantillonnage de la région de Rouyn-Noranda.	63
<b>Figure 4.3.</b>	Localisation des sites d'échantillonnage de la région de la Montérégie.	64
<b>Figure 4.4.</b>	Peupliers faux-trembles sélectionnés (A) et déracinés (B) afin d'échantillonner la rhizosphère (site de St-Hubert et Rouyn-Noranda, respectivement).	67
<b>Figure 4.5.</b>	Racine de peuplier faux-tremble et le sol rhizosphérique associé (site de Rouyn-Noranda).	68
<b>Figure 4.6.</b>	Effet d'inhibition de l'absorbance du TPF par le Cu dissous.	74
<b>Figure 4.7.</b>	Dispositif utilisé et principe général de mesure des concentrations de Zn réactifs sur un voltamètre VoltaLab50 par <i>differential pulse anodic stripping voltammetry</i> (DPASV).	79
<b>Figure 4.8.</b>	Partition de la variance théorique d'une matrice réponse (Legendre et Legendre, 1998). Les portions A à C quantifient l'effet exclusif des groupes de variables explicatives sur la matrice réponse, alors que les portions D à G réfèrent aux effets combinés des groupes de variables explicatives. La portion H quantifie, quant à elle, la variance inexpliquée.	86
<b>Figure 5.1.</b>	Comparison of $\text{Cu}^{2+}$ activities measured with an ion-selective electrode (ISE) with $\text{Cu}^{2+}$ activities modelled by MINEQL+ 4.5 (root mean square residual (RMSR) = 0.37). For modelling purposes, four distinct scenarios were used to estimate the DOC composition and to calculate Cu speciation (see Table 5.1 for details on scenarios).	101
<b>Figure 5.2.</b>	Comparison of $\text{Cu}^{2+}$ activities measured with an ion-selective electrode (ISE) with $\text{Cu}^{2+}$ activities modelled by WHAM 6 (root mean square residual (RMSR) = 1.74). For modelling purposes, four distinct scenarios were used to estimate the DOC composition and to calculate Cu speciation (see Table 5.1 for details on scenarios).	102
<b>Figure 5.3.</b>	pH dependency of the competition between Al and Cu for binding sites on humic substances and, its incidence on the Cu speciation calculated by WHAM 6.	105
<b>Figure 5.4.</b>	Sensitivity analysis conducted with WHAM 6 on the influence of acetate on the prediction of $\text{Cu}^{2+}$ activities. The Cu speciation was calculated using different proportions of inert DOC. The calculated $\text{Cu}^{2+}$ activities were then compared with those measured by ion-selective electrode using the root mean square residual (RMSR).	106
<b>Figure 5.5.</b>	Comparison between $\text{Cu}^{2+}$ activities measured with an ion-selective electrode (ISE) and $\text{Cu}^{2+}$ activities modelled by MINEQL+ 4.5 (root mean square residual (RMSR) = 0.48). Before modelling, the reactions between cations and hydroxide anion in MINEQL+ 4.5 were harmonized with those	



- of WHAM 6. For modelling purposes, four distinct scenarios were used to estimate DOC composition and to calculate Cu speciation (see Table 5.1 of the manuscript for details on scenarios). ..... 107
- Figure 6.1.** Percentage of total water-soluble Cu ( $Cu_{WS}$ ) present as free Cu ion ( $Cu^{2+}$ ) plotted as a function of solution pH. .... 124
- Figure 6.2.** Mean cumulative fractions of total water-soluble Cu in the bulk (A) and rhizosphere (B) soils at each sampling site. For details on codes for Cu species, reader is referred to Table 6.5. .... 126
- Figure 6.3.** Venn diagram of the partition of the variation of  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  for the two soil components. The rectangles represent the total variance of Cu variables while each circle is associated to a given group of explaining variables. The adjusted  $r^2$  (expressed in %) of the variance of Cu variables for each surface of the Venn diagram are presented and are obtained from equations described in Legendre and Legendre (1998). Intersections between circles represent a fraction of the variance of Cu variables jointly explained by different groups of variables whereas residuals refer to the unexplained variance. .... 128
- Figure 6.4.** Redundancy analysis ordination biplot of rhizospheric samples describing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Cu variables. Full arrows refer to response variables, dotted arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Cu variables and grey arrow represents explanatory variable not compiled in the RDA analysis. The combination of all canonical axes was statistically significant ( $p < 0.01$ ). For details on variables codes, reader is referred to Tables 6.2 to 6.5. .... 129
- Figure 6.5.** Redundancy analysis ordination biplots of bulk and rhizospheric samples describing the influence of microbial and chemical variables on the distribution of Cu variables, without the sampling sites influence, for Rouyn-Noranda (A) and Monteregian (B) areas. Full arrows refer to response variables, dotted arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Cu variables and grey arrows represent collinear explanatory variables not compiled in the RDA analyses. The combination of all canonical axes was statistically significant ( $p < 0.05$ ). For details on variables codes, reader is referred to Tables 6.2 to 6.5. .... 130
- Figure 6.6.** Inhibition of TPF absorbance by Cu. The test followed the methodology of Chander and Brookes (1991) and the inhibition is normalized to the control solution which contained no Cu concentration. According to the Mann-Whitney test, no statistical differences in TPF absorbance were observed between the control solution without Cu and the solution containing up to  $0.5 \text{ mg Cu L}^{-1}$  ( $p > 0.10$ ). .... 140
- Figure 6.7.** Results of the discriminant analysis performed to differentiate the sampling areas (Rouyn-Noranda - RN vs Montérégie - MTG) and the soil components (bulk vs rhizosphere). Each discriminant axis explained a significant portion of the variance of the database ( $p < 0.01$ ). An *a posteriori* classification indicated that more than 91 % of the objects were

- successfully classified by the discriminant functions calculated during the analysis..... 143
- Figure 7.1.** Fraction of total water-soluble Zn ( $Zn_{WS}$ ) present as electrochemically-labile Zn ( $Zn_{DPASV}$ ) plotted as a function of solution pH. The  $Zn_{DPASV}$  was measured using differential pulse anodic stripping voltammetry. Objects are discriminated according to sampling areas and soil components (B = bulk soil and R = rhizosphere soil). See the materials and methods section for sites codes..... 161
- Figure 7.2.** Mean cumulative fractions of total water-soluble Zn in the bulk (A) and rhizosphere (B) at each sampling sites. Refer to Table 7.4 for codes of Zn species..... 162
- Figure 7.3.** Venn diagram of the partition of the variation of  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$  for the two soil components. The rectangles represent the total variance of Zn variables while each circle is associated to a given group of explaining variables. The adjusted  $r^2$  (expressed in %) of the variance of Zn variables for each surface of the Venn diagram are presented and were obtained from equations described in Legendre and Legendre (1998). Zones defined by the intersection between circles represent a fraction of the variance of Zn that is jointly explained by different groups of variables whereas residuals refer to the unexplained variance of Zn variables..... 164
- Figure 7.4.** Redundancy analysis ordination biplot of rhizospheric samples representing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Zn variables. Full black arrows refer to response variables, black dotted arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Zn and grey dotted arrows represent collinear explanatory variables not compiled in the RDA analysis. The combination of all canonical axes explained 94 % of the adjusted variance of Zn variables and was statistically significant ( $p < 0.01$ ). See Tables 7.1 to 7.4 for variables codes..... 165
- Figure 7.5.** Redundancy analysis ordination biplots of rhizospheric samples representing the links between microbial, chemical and the distribution of Zn variables while controlling for the influence of spatial variables. Full black arrows refer to response variables, dotted black arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Zn and grey dotted arrows represent collinear microbial explanatory variables and chemical variable not compiled in the RDA analyses. The combination of all canonical axes explained 19 % of the adjusted variance of Zn variables and was statistically significant ( $p < 0.05$ ). See Tables 7.1, 7.2 and 7.4 for variables codes..... 166
- Figure 7.6.** Comparison of the electrochemically-labile concentration of Zn ( $Zn_{DPASV}$ ) measured by differential pulse anodic stripping voltammetry with the sum of  $Zn^{2+}$  and of the inorganic complexes of Zn (Zn-inorg) modeled by MINEQL+ 4.5. For modeling purposes, readers are referred to section 7.2.5..... 172
- Figure 8.1.** Fraction of total water-soluble Al ( $Al_{WS}$ ) present as labile Al ( $Al_{labile}$ ) plotted as a function of solution pH. The  $Al_{labile}$  was measured by the 15-s

- reaction with 8-hydroxyquinoline technique at a pH of 5.0. Objects are discriminated according to sampling areas (RN = Rouyn-Noranda and MTG = Monteregian) and soil components (B = bulk soil and R = rhizosphere soil). .....188
- Figure 8.2.** Mean cumulative fractions of total water-soluble Al in the bulk (A) and rhizosphere (B) at each sampling sites in the Rouyn-Noranda (RN) and Monteregian (MTG) areas. Refer to Table 8.4 for codes of Al species....190
- Figure 8.3.** Venn diagram of the partition of the variation of  $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$  for the two soil components. The rectangles represent the total variance of Al variables and each circle is associated to a given group of explaining variables. The adjusted  $r^2$  (expressed in %) of the variance of Al variables for each surface of the Venn diagram are presented and were obtained from equations described in Legendre and Legendre (1998). Zones defined by the intersection between circles represent a fraction of the variance of Al that is jointly explained by different groups of variables whereas the residuals refer to the unexplained variance of Al variables. ....191
- Figure 8.4.** Redundancy analysis ordination biplot of rhizospheric samples representing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Al variables. Full black arrows refer to response variables, dashed black arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Al response variables and dashed grey arrows represent collinear explanatory variables not compiled in the RDA analysis. The combination of all canonical axes explained 44 % of the adjusted variance of Al variables and was statistically significant ( $p < 0.01$ ). See Tables 8.1, 8.2 and 8.4 for variable codes. ....192
- Figure 8.5.** Comparison of the labile Al measured by the 15-s reaction of 8-hydroxyquinoline with Al species modeled by MINEQL+ 4.5. Two scenarios were used to represent the modeled species. The first summed  $Al^{3+}$ , Al-OH, Al-SO<sub>4</sub> and Al-acetate complexes (A), while the second scenario integrated only  $Al^{3+}$ , Al-SO<sub>4</sub> and Al-acetate complexes (B). For details on modeling, readers are referred to section 8.2.5.....195
- Figure 9.1.** Pourcentage d'explication de la distribution des concentrations en Cu ( $Cu_{WS}$  et  $Cu^{2+}$ ), Zn ( $Zn_{WS}$  et  $Zn_{DPASV}$ ) et Al ( $Al_{WS}$  et  $Al_{labile}$ ) dans les deux compartiments du sol. L'effet total des variables microbiennes (A) et l'effet total des variables chimiques excluant l'effet conjoint avec les variables microbiennes (B) sont présentés dans cette figure.....204
- Figure 9.2.** Modèle conceptuel représentant les deux mécanismes microbiens (flèches bleues et rouges) et les principaux mécanismes chimiques (flèches noires) identifiés dans cette étude et qui influencent la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère du peuplier faux-tremble. ....206

## LISTE DES SYMBOLES

---

$\alpha$	niveau de signification statistique
AMBC	biomasse microbienne active de carbone ( <i>active microbial biomass of carbon</i> )
ASM	<i>American Society for Microbiology</i>
DOC	carbone organique dissous ( <i>dissolved organic matter</i> )
DPASV	<i>differential pulse anodic stripping voltammetry</i>
ICP-AES	spectrométrie d'émission atomique au plasma ( <i>inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i> )
ICP-MS	spectrométrie de masse au plasma ( <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
Milli-Q	eau déionisée ( <i>deionized water</i> )
MOD	matière organique dissoute
MO	matière organique
MTG	région de la Montérégie
p	probabilité
$r^2$	coefficient de détermination ( <i>coefficient of determination</i> )
RDA	analyse de redondance ( <i>redundancy analysis</i> )
RN	région de Rouyn-Noranda
SPOC	<i>solid phase organic carbon</i>
TMBC	Biomasse microbienne totale de carbone ( <i>total microbial biomass of carbon</i> )
TMBN	Biomasse microbienne totale d'azote ( <i>total microbial biomass of nitrogen</i> )
WSOC	<i>water-soluble organic carbon</i>

## REMERCIEMENTS

---

François, mille fois merci pour ton aide, ta patience, ton professionnalisme, ta rigueur et ton dévouement. Je considère que ton travail de supervision a été héroïque puisque tu n'as jamais arrêté de m'encourager, de me faire réfléchir et de me transmettre des connaissances. J'espère que nos parcours se croiseront de nouveau et que des collaborations de recherche naîtront de ces rencontres.

Un immense merci à Marie-Claude Turmel pour toute l'aide que tu m'as apportée durant cette aventure. Tu es sans contredit la personne que j'ai le plus dérangée durant mon passage dans ce laboratoire. Je te remercie, en premier lieu, pour ton écoute, mais aussi pour ton aide, ta patience, ton efficacité, ton pragmatisme et ton dévouement.

Un très gros merci à Sébastien Sauvé pour ton aide et tes judicieux conseils durant l'ensemble de ce travail. L'aventure de la co-direction aura été, pour moi, bénéfique, très utile et très appréciée.

Je m'en voudrais de passer sous silence les nombreux étudiants que j'ai côtoyés durant ces années et qui m'ont aidé. En particulier, l'ensemble des étudiants qui ont fait du local 225 un lieu d'étude si agréable. Un merci tout spécial à Julie Turgeon, Isabelle Anka-Thibaudeau, Nathalie Gingras, Julien Rachou et à l'ensemble de mes amis qui m'ont épaulé durant cette aventure.

Mes derniers remerciements sont pour ceux que j'aime le plus. Esther, Richard et Maxime, je vous remercie pour votre appui inconditionnel, vos encouragements constants et votre soutien. Je tiens à partager ce moment de joie tout particulièrement avec vous. J'aimerais prendre les dernières lignes qu'il me reste pour remercier mon amoureuse, Corinne, d'illuminer ma vie, de m'avoir donné la force de terminer cette thèse et d'être tout simplement à mes côtés. Je suis très enthousiaste et heureux de vivre ce moment avec toi et je souhaite que notre parcours soit jalonné de nombreux moments de bonheur comparable à celui-là.

# CHAPITRE 1. Introduction générale

---

## 1.1 Mise en contexte

Depuis une trentaine d'années, une augmentation des rejets anthropiques de métaux dans l'environnement est observée (Nriagu, 1989), ce qui se traduit par un enrichissement des sols en métaux. Cette tendance provoque l'émergence de problèmes environnementaux liés aux métaux dans les écosystèmes, qui se manifestent principalement par des cas de toxicité chez les plantes et les microorganismes (Kabata-Pendias, 2001; Sauvé *et al.*, 1998b). En ce qui concerne les végétaux, ces effets toxiques sont le résultat de transferts trop importants de métaux du sol vers les plantes. En plus d'affecter l'état de santé des plantes, ces problèmes de toxicité peuvent avoir une incidence sur les humains, lors de l'absorption de plantes comestibles, et sur la pérennité des écosystèmes. Or, ces transferts se produisent principalement dans la zone de sol entourant les racines que l'on nomme la rhizosphère. L'étude du comportement biogéochimique des métaux dans la rhizosphère devient donc essentielle afin d'évaluer les risques encourus par les plantes et les écosystèmes souffrant d'excédent de métaux (Courchesne *et al.*, 2008).

La rhizosphère se différencie du reste du sol, nommé matrice du sol, par ces propriétés qui sont influencées à la fois par les particules de sol ainsi que par l'action des racines et des microorganismes. En raison de ces conditions, on constate que l'intensité des réactions biogéochimiques se produisant dans la rhizosphère est significativement supérieure à ce que l'on retrouve dans le reste du sol (Hinsinger *et al.*, 2006; Phillips et Fahey, 2006; McClain *et al.*, 2003). Ce microenvironnement exerce donc une influence beaucoup plus importante sur les cycles biogéochimiques que son volume ne le laisse présager. Les recherches actuelles portant sur la rhizosphère ont encore très peu documenté la biogéochimie des métaux dans ce microenvironnement. Les principales études ont observé un enrichissement des métaux dans la phase solide de la rhizosphère comparativement à la matrice du sol. Au niveau de la phase liquide du sol, qui représente la principale voie de transfert des métaux du sol aux plantes, les principaux résultats obtenus par ces études sont contradictoires. En effet, certaines études observent

un enrichissement de la solution de sol de la rhizosphère en métaux comparativement à la matrice (Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004), alors que d'autres observent un appauvrissement (Hinsinger, 2001; Lorenz *et al.*, 1997). Par ailleurs, les travaux antérieurs ont porté très peu d'attention sur la spéciation des métaux dans la phase liquide de la rhizosphère. Les quelques études effectuées sur ce sujet semblent indiquer que les formes complexées de métaux dominent dans la rhizosphère. Ces conclusions s'appuient, toutefois, sur un nombre limité d'observations rendant leur généralisation impossible, notamment dans les écosystèmes forestiers où la rhizosphère est encore peu caractérisée. Une documentation fine des formes chimiques des métaux dans la solution de sol est essentielle afin d'évaluer correctement la biodisponibilité des métaux dans la rhizosphère et, ainsi, leurs possibles transferts du sol vers les plantes (Courchesne *et al.*, 2008).

Combiné au manque de données sur la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère, l'influence des mécanismes rhizosphériques sur la spéciation des métaux est aussi peu documentée. Les études antérieures ont porté leur intérêt sur les mécanismes racinaires et édaphiques régulant la spéciation des métaux. Leurs résultats ont montré que les racines exercent une influence considérable sur les métaux (Hinsinger, 2001; Marschner et Römheld, 1996). Comparativement à ces mécanismes, l'action des microorganismes a été passablement négligée. Pourtant, le microenvironnement de la rhizosphère est reconnu pour abriter une biomasse microbienne plus importante et plus active que dans la matrice du sol (Phillips et Fahey, 2006; Paul et Clark, 1996) et pour exercer une influence de premier plan sur les cycles biogéochimiques de nombreux éléments (Hinsinger *et al.*, 2006).

En raison de ces incertitudes, ce projet de recherche quantifie la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers et tente de mieux comprendre le rôle des microorganismes sur le comportement et la spéciation des métaux dans ce microenvironnement. Pour ce faire, un échantillonnage des sols rhizosphériques et matriciels directement sur le terrain à proximité de zones industrielles a été effectué. Ces sols ont été échantillonnés sur six sites présentant des conditions physico-chimiques contrastées et qui se distribuent également entre les régions de Rouyn-Noranda et de la

Montérégie (Québec, Canada). À chacun des sites, les échantillons de sol sous trois peupliers faux-tremble (*Populus tremuloides* Michx) ont été récoltés. La spéciation de trois métaux de comportement biogéochimiques différents, le cuivre (Cu), zinc (Zn) et aluminium (Al), a été documentée et a été liée à des variables microbiennes à l'aide d'analyses statistiques multivariées. Cette dernière étape permet de caractériser l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux en évaluant l'intensité et la polarité des relations s'établissant entre ces groupes de variables. Pour atteindre ces objectifs, les analyses effectuées sur la rhizosphère sont comparées à la matrice du sol afin de démontrer le caractère unique et essentiel joué par ce microenvironnement sur la biogéochimie des métaux en milieux forestiers.

## **1.2 Structure de la thèse**

La thèse est composée de neuf chapitres qui permettent de répondre aux objectifs spécifiques de ce travail. Les chapitres deux et trois font état des connaissances les plus récentes concernant les sujets traités dans cette thèse. Ainsi, le deuxième chapitre synthétise les connaissances actuelles concernant la biogéochimie des métaux dans les écosystèmes et les sols forestiers. De son côté, le chapitre trois dresse un portrait exhaustif de la rhizosphère ainsi que des mécanismes rhizosphériques influençant la biogéochimie des métaux dans ce microenvironnement. Dans ces deux chapitres, les principales incertitudes et lacunes dans la compréhension de la biogéochimie des métaux dans les écosystèmes et les sols rhizosphériques de milieux forestiers sont aussi identifiées. Pour faire suite à ce travail de synthèse des connaissances, le chapitre quatre présente les objectifs spécifiques du projet de doctorat, les sites d'étude sélectionnés, l'approche méthodologique utilisée ainsi qu'une description détaillée des analyses de laboratoire et statistiques appliquées dans cette thèse.

Les principaux résultats de la thèse sont présentés sous forme d'articles scientifiques dans les chapitres cinq à huit. Le chapitre cinq décrit en détail comment il a été possible de compléter, suite aux mesures des formes réactives de Cu, Zn et Al, les portraits de spéciation de ces métaux dans les sols échantillonnés. Pour ce faire, une modélisation de la spéciation des métaux a été effectuée. Afin de s'assurer que la modélisation de la



spéciation des métaux est réaliste à la fois pour des sols rhizosphériques et matriciels et pour des métaux de comportements biogéochimiques différents, une comparaison entre deux logiciels de modélisation utilisant des approches contrastées a été réalisée. La qualité de modélisation des logiciels MINEQL+ 4.5 et WHAM 6 a été évaluée en comparant les résultats à une mesure de référence. Le logiciel de modélisation fournissant les résultats les plus réalistes a par la suite été utilisé dans la thèse pour documenter la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère de sols forestiers. Ce travail de validation et de comparaison de la modélisation de deux logiciels de spéciation a été publié dans la revue *Environmental Science and Technology* (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2007).

La documentation de la spéciation des métaux dans la rhizosphère ainsi que le rôle des microorganismes sur ces métaux est présenté dans les chapitres six à huit de cette thèse. Ces données permettent de répondre aux objectifs du projet de doctorat, il constitue donc le corps de cette thèse. La présentation des données a été structurée de sorte que chacun des chapitres est associé à un métal. Ainsi, le chapitre six présente les données pour le Cu, le chapitre sept les données du Zn et le chapitre huit les données de l'Al. Le choix de cette structure s'explique par le fait que les métaux étudiés présentent des comportements biogéochimiques contrastés et, ainsi, des différences nettes de leur spéciation et du rôle exercé par les microorganismes sur leurs formes réactives. De plus, cette structure particulière permet, dans un même chapitre, de pouvoir caractériser la spéciation d'un métal et d'expliquer les mécanismes agissant sur cette spéciation. Le cinquième chapitre portant sur le Cu a été publié dans la revue *Soil Biology and Biochemistry* (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008), alors que les chapitres six et sept ont été soumis, respectivement, aux revues *Environmental Pollution* et *European Journal of Soil Science*.

La thèse se termine au chapitre neuf par un rappel des principaux résultats et par un court essai comparant et discutant des différences de résultats obtenus entre les métaux. De plus, les originalités et les limites associées à ce projet sont aussi exposées dans ce chapitre. L'ensemble des chapitres de cette thèse forme un tout cohérent, original et innovateur permettant de répondre aux objectifs de ce projet de doctorat et d'améliorer

les connaissances sur la biogéochimie des métaux dans la rhizosphère. Pour ces raisons, ils jettent un éclairage nouveau sur le fonctionnement de la rhizosphère en mettant en valeur le rôle prépondérant que les microorganismes jouent sur les mécanismes actifs dans ce microenvironnement.

## CHAPITRE 2. La biogéochimie des métaux dans les écosystèmes forestiers

### 2.1 Principales définitions

On définit les métaux comme l'ensemble des éléments chimiques donneurs d'électrons. Cette définition fait de ces éléments des cations lorsqu'ils sont présents sous leur forme ionique simple (Essington, 2004). Une classification plus fine des métaux peut être effectuée en fonction de leur abondance dans l'environnement (Tableau 2.1). Ainsi, les éléments métalliques majeurs sont présents en grande quantité dans l'environnement puisqu'ils font partie des principaux constituants de la croûte terrestre. Inversement, en milieu naturel, les métaux traces sont des composantes mineures de la croûte terrestre, ils sont donc présents en concentration plus faible dans les sols. Certains éléments métalliques, comme Al et le fer (Fe), peuvent appartenir aux deux classes d'abondance. En effet, ces éléments métalliques sont des constituants fondamentaux des minéraux, ils sont donc considérés comme majeurs lorsque la phase solide du sol est étudiée. À l'inverse, en raison de leur faible solubilité, leur concentration en solution est comparable aux concentrations mesurées chez les métaux traces. Ils sont donc considérés comme des métaux traces lorsque la phase liquide du sol est étudiée.

**Tableau 2.1.** Classifications des métaux en fonction de leur abondance naturelle dans les sols (Essington, 2004; Helmke, 2000; Schwab, 2000).

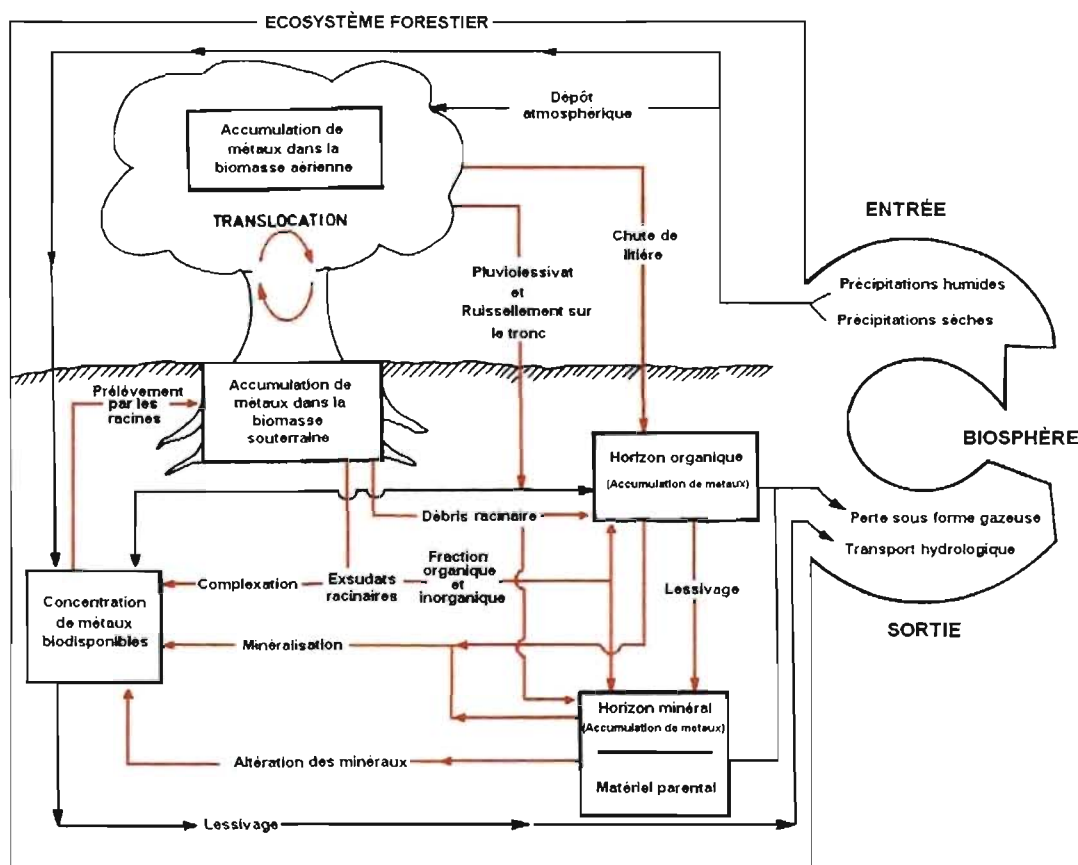
Métaux	Seuil de concentration dans les sols		Exemples de métaux <sup>a, b</sup>
	Phase solide mg kg <sup>-1</sup>	Phase liquide mol L <sup>-1</sup>	
<b>Majeurs</b>	≥ 100	≥ 10 <sup>-4</sup>	Al, Ca, Fe, K, Mg
<b>Traces</b>	< 100	< 10 <sup>-4</sup>	Al, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn

a Al = aluminium; Ca = calcium; Fe = fer; K = potassium; Cu = cuivre; Ni = nickel; Pb = plomb; Zn = zinc.

b En raison de leur abondance dans la phase solide du sol, Al et Fe sont considérés comme des métaux majeurs. Cependant, dans la phase liquide du sol, leurs concentrations satisfont généralement les critères des métaux traces, car ces métaux sont très peu solubles.

L'étude de la distribution des métaux et des réactions se déroulant dans les écosystèmes forestiers s'effectue par le suivi du cycle biogéochimique. Ce dernier se définit comme

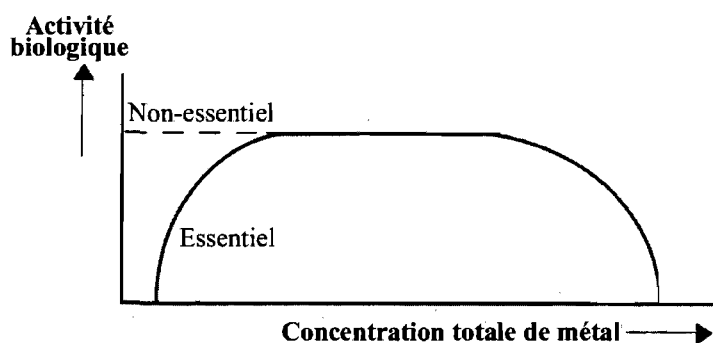
le cycle naturel par lequel la matière et l'énergie se distribuent dans un environnement donné (Gregorich *et al.*, 2002; Likens et Bormann, 1995). En milieu forestier, l'échelle du petit bassin-versant (taille du km<sup>2</sup>) est généralement utilisée pour faire l'étude complète du cycle biogéochimique d'un élément. À cette échelle, le cycle biogéochimique comprend des compartiments agissant comme réservoirs reliés entre eux grâce à des flux permettant à la matière et à l'énergie de circuler dans l'écosystème (Figure 2.1). Ces flux sont régis par des mécanismes d'origines biologiques, géologiques et chimiques.



**Figure 2.1.** Modèle conceptuel théorique du cycle biogéochimique des métaux en milieux forestiers et du cycle sol-plante (flèches rouges) (Fleury, 2007; Likens et Bormann, 1995).

## 2.2 Problèmes environnementaux associés aux métaux

Des métaux présents dans les milieux naturels, certains sont identifiés comme essentiels pour les organismes vivants. À titre d'exemple, le Cu, Fe et Zn sont reconnus pour être des constituants de nombreuses enzymes agissant dans les cellules (Kabata-Pendias, 2001). Ces métaux sont donc nécessaires en petite quantité à la survie des organismes vivants. Inversement, certains métaux n'ont aucune utilité biologique connue, c'est le cas entre autres de l'Al, du cadmium (Cd) et du plomb (Pb) (Kabata-Pendias, 2001). L'assimilation de petites quantités de ces métaux n'a aucune incidence favorable ou défavorable sur l'organisme vivant. Cependant, pour l'ensemble des métaux, une assimilation importante par les organismes vivants entraîne une baisse de la productivité biologique identifiée comme un effet de toxicité lié aux métaux (Figure 2.2). La toxicité des métaux sur les organismes vivants du sol, p. ex. plantes, macroorganismes et microorganismes, se manifeste de plusieurs façons. Ainsi, des diminutions de la taille, de l'activité et de la diversité des populations microbiennes peuvent être observées (Joner *et al.*, 2005; Pennanen, 2001; Sauvé *et al.*, 1998b; Kandeler *et al.*, 1996; Baath, 1989). Pour les plantes, des diminutions de rendement, de croissance des racines et des feuilles sont aussi documentées (Voigt *et al.*, 2006; Kidd et Proctor, 2000; Sauvé *et al.*, 1998b).



**Figure 2.2.** Effet des métaux essentiels et non-essentiels sur l'activité biologique des organismes vivants dans les sols (modifié de McGrath (2002)).

L'industrialisation des sociétés a mené à l'utilisation accrue de métaux, ce qui s'accompagne d'une augmentation de leurs rejets dans l'environnement. Ainsi, à l'échelle planétaire, Nriagu (1989) a estimé que les émissions atmosphériques de métaux

liées aux activités anthropiques sont, selon les métaux, entre 1.3 et 28 fois plus importantes que les émissions naturelles. Cette tendance est aussi observée dans les écosystèmes forestiers où l'on constate une augmentation des dépôts atmosphériques de métaux dans ces écosystèmes à travers le temps (Bergkvist *et al.*, 1989). L'augmentation des apports anthropiques atmosphériques de métaux se traduit donc par un enrichissement des sols, des nappes phréatiques et du système hydrologique en métaux. Ce phénomène a pour conséquence d'accroître le potentiel de toxicité des métaux par rapport aux organismes vivants dans ces écosystèmes. Afin de lutter efficacement contre ce problème, il convient de documenter la distribution des métaux dans les écosystèmes forestiers et d'identifier les mécanismes régulant le mouvement des métaux dans ces écosystèmes. La suite de ce chapitre exposera les connaissances actuelles disponibles quant à la biogéochimie des métaux dans les environnements forestiers. Elle portera une attention particulière aux métaux présents dans la phase liquide du sol ainsi qu'aux mécanismes contrôlant la composition de cette interface.

### **2.3 Distribution des métaux dans les écosystèmes forestiers**

Les études du cycle biogéochimique élémentaire effectuées dans des bassins-versants forestiers se concentrent rarement sur les métaux, mais plutôt sur des macroéléments tels que le carbone (C), l'azote (N) et les cations majeurs. Néanmoins, les études de Ukonmaanaho *et al.* (2001), Derome et Nieminen (1998), Aastrup *et al.* (1995), Bergkvist *et al.* (1989), Bergkvist (1987) et Heinrichs et Mayer (1980) permettent d'avoir une bonne idée de leur distributions dans ces écosystèmes. Dans un premier temps, ces études ont quantifié les bilans nets des métaux dans les bassins-versants forestiers. Un bilan positif se traduit par la rétention nette d'un métal dans l'écosystème forestier puisque les intrants sont supérieurs aux extrants. À l'inverse, la migration nette d'un métal hors de l'écosystème forestier produit un bilan négatif où les extrants sont supérieurs aux intrants. Les résultats montrent des différences marquées entre les métaux (Tableau 2.2) où l'on observe généralement des bilans négatifs pour Al et Cd, positifs pour Cu et Pb ainsi qu'aucune tendance claire pour nickel (Ni) et Zn (Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Aastrup *et al.*, 1995; Bergkvist *et al.*, 1989; Bergkvist, 1987).

**Tableau 2.2.** Bilan biogéochimique de différents métaux dans des bassins-versants forestiers.

<b>Métaux</b>	<b>Bilan biogéochimique<sup>a, b</sup></b> mg m <sup>-2</sup> an <sup>-1</sup>
<b>Al</b>	-2900 – -1930
<b>Cd</b>	-2.4 – 2.2
<b>Cu</b>	0.1 – 86.7
<b>Ni</b>	-13.8 – 10.2
<b>Pb</b>	1.9 – 77.0
<b>Zn</b>	-13.8 – 10,2

a Bilan = intrants (dépôts atmosphériques) – extrants (concentrations de métaux mesurées dans la solution de sol à une profondeur correspondant à l'horizon B inférieur).

b Compilation des travaux d'Ukonmaanaho *et al.* (2001), Aastrup *et al.* (1995), Bergkvist *et al.* (1989) et Bergkvist (1987).

À l'intérieur de l'écosystème forestier, le sol et la végétation sont les deux principaux compartiments biogéochimiques régulant le comportement des métaux (Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Heinrichs et Mayer, 1980). Tout d'abord, le sol agit comme un réservoir biogéochimique de métaux dans les écosystèmes forestiers (Kabata-Pendias, 2001; Ukonmaanaho *et al.*, 2001). Conformément à cette caractéristique, il retient les métaux dans l'écosystème. Cette capacité de rétention du sol est assurée par sa phase solide et par les mécanismes qui lui sont liés, telles l'adsorption et la précipitation (voir sous-section 2.4.3). De plus, le sol alimente aussi les autres compartiments biogéochimiques de l'écosystème forestier en métaux principalement par la solution de sol (Likens et Bormann, 1995; Lindsay, 1979).

Le compartiment biogéochimique qui bénéficie le plus de cette alimentation en métaux est sans contredit la végétation. En effet, celle-ci prélève et séquestre dans sa biomasse d'importantes quantités de métaux. La quantité de métaux retenus par ce mécanisme varie d'une espèce de plante à l'autre, toutefois, en milieux forestiers, les arbres sont les principaux accumulateurs de métaux. À titre d'exemple, il est estimé que le contenu des arbres peut représenter jusqu'à 27 % pour le Cd, 8.4 % pour le Cu, 1.4 % pour le Pb et 4.5 % pour le Zn des quantités totales de métaux présents dans les écosystèmes forestiers tempérés (Bergkvist, 1987; Heinrichs et Mayer, 1980). De plus, les sites d'accumulation

des métaux dans les plantes varient d'un métal à l'autre. Ainsi, le calcium (Ca), Cd, magnésium (Mg), manganèse (Mn), nickel (Ni), potassium (K) et Zn s'accumulent préférentiellement dans la biomasse aérienne, alors que l'Al, chrome (Cr), Cu, Fe et Pb ont plutôt tendance à s'accumuler dans les racines des arbres (Jobbagy et Jackson, 2004; Johnson *et al.*, 2003; Kabata-Pendias, 2001; Likens *et al.*, 1998). La séquestration des métaux par les arbres demeure un mécanisme passager, ainsi, les métaux s'étant accumulés dans les tissus des végétaux retourneront finalement aux sols. Ce lien intime entre le sol et la végétation produit un cycle interne permettant aux métaux d'être biorecyclés à l'intérieur de l'écosystème (Figure 2.1). Ce cycle est d'une grande importance biogéochimique puisqu'il régule la majorité des déplacements de métaux dans l'écosystème et explique l'accumulation de métaux dans les horizons de surface du sol ainsi que dans la zone de sol entourant les racines (Jobbagy et Jackson, 2004; Johnson *et al.*, 2003; Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Heinrichs et Mayer, 1980). L'ensemble des transferts de métaux entre le sol et la végétation ainsi qu'entre le sol et l'extérieur de l'écosystème s'effectue principalement à partir de la solution de sol (Lindsay, 1979). Cette phase du sol joue donc un rôle central sur la biogéochimie des métaux dans les écosystèmes forestiers. Dans ces circonstances, une attention particulièrement est accordée dans la prochaine section aux métaux présents dans cette phase de sol ainsi qu'aux mécanismes agissant sur ces métaux.

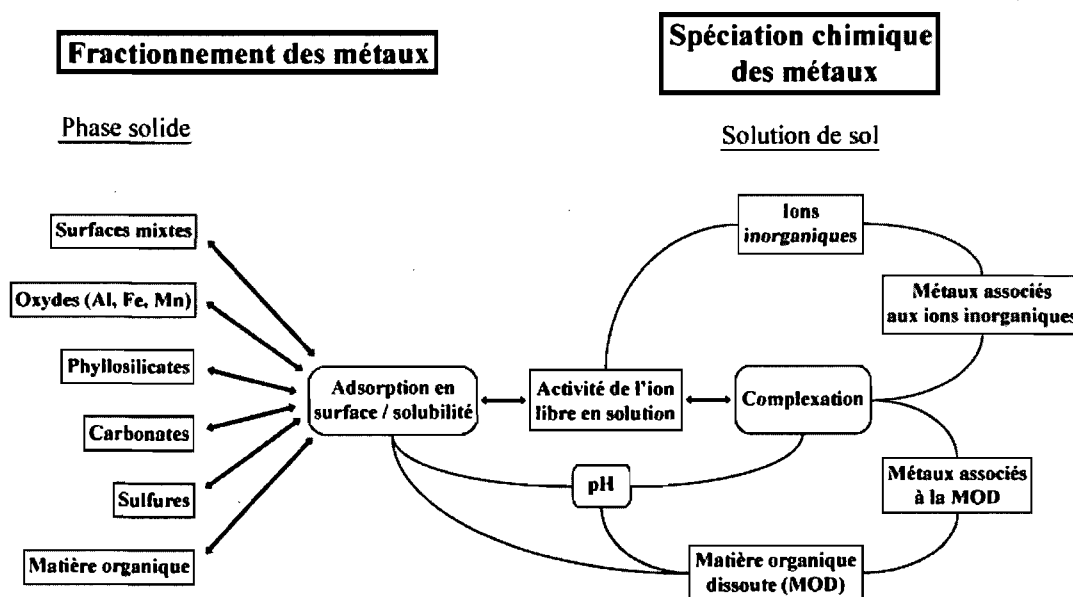
## **2.4 Mécanismes régulateurs de la concentration et de la spéciation des métaux dans la solution de sol**

### **2.4.1 Définitions**

Les métaux présents dans les sols se retrouvent sous plusieurs formes chimiques distribuées entre les phases solide et liquide du sol (Figure 2.3). Le fractionnement des métaux réfère aux diverses formes chimiques des métaux présents dans la phase solide du sol (Sauvé, 2003). Dans la phase liquide, l'ensemble des formes chimiques d'un métal se définit comme sa spéciation chimique (Sauvé, 2003). Ce concept englobe les différents isotopes d'un métal, les différents états d'oxydation, la forme ionique simple ainsi que les formes ioniques complexes liées à des anions organiques et inorganiques (Nolan *et al.*, 2003a). L'intérêt porté à la spéciation chimique s'explique par le fait que

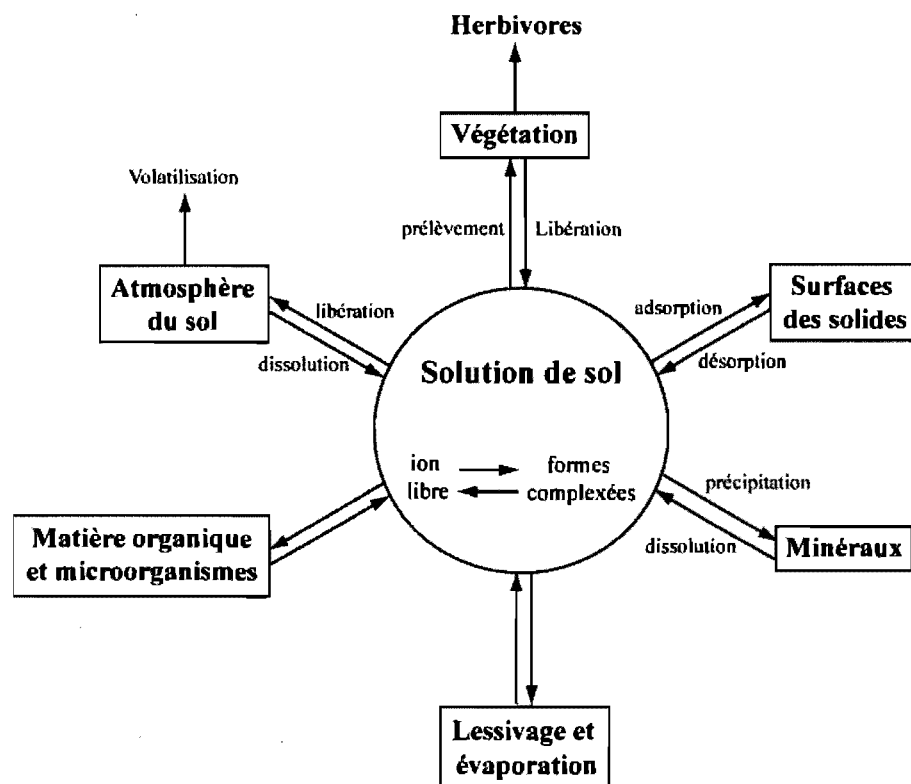


chaque forme chimique d'un métal possède des propriétés distinctes dont certaines exercent un rôle positif ou négatif prépondérant sur les écosystèmes. Ainsi, certaines formes chimiques d'un métal peuvent aussi être qualifiées de biodisponibles puisqu'elles sont assimilables par les organismes vivants (Sauvé, 2003). Ces formes composent une faible fraction de la concentration totale d'un métal dans les sols. Cependant, il a été montré qu'elles prédisent plus adéquatement les contenus en métaux dans les plantes (Krishnamurti et Naidu, 2002; Sauvé *et al.*, 1996) ainsi que la toxicité des métaux pour les plantes et les microorganismes du sol (Sauvé *et al.*, 1998b) que les concentrations totales. Bien qu'il n'y ait pas de consensus à l'heure actuelle, il est généralement admis que la forme ionique libre est la forme la plus biodisponible d'un métal (Nolan *et al.*, 2003a; Sauvé *et al.*, 1998b). Cette forme chimique ne serait toutefois pas la seule forme biodisponible. À titre d'exemple, des recherches semblent indiquer que les formes de Cd complexées avec l'ion chlorure (Cl<sup>-</sup>), les formes d'Al complexées avec l'ion hydroxyle (OH<sup>-</sup>) ainsi que les formes de Fe et potentiellement de Cu et Zn complexés à des anions organiques de faible poids moléculaire, p. ex. sidérophores, sont aussi prélevées par certains organismes vivants (Hinsinger, 1998; Hue *et al.*, 1986; Marschner et Römheld, 1996; Smolders et McLaughlin, 1996a, b).



**Figure 2.3.** Modèle conceptuel décrivant les termes « fractionnement » et « spéciation » ainsi que les mécanismes et les propriétés des sols régulant la spéciation des métaux (modifié de Sauvé (2002)).

En somme, pour bien comprendre le comportement biogéochimique d'un métal et son incidence sur l'environnement, l'étude de sa spéciation chimique est pertinente (Sauvé, 2003). Or, aujourd'hui encore, peu de données de spéciation chimique sont disponibles dans les sols et les principaux mécanismes régulant la spéciation des métaux sont encore mal compris. Une compréhension complète des mécanismes régulant la spéciation des métaux passe inévitablement par l'étude des mécanismes actifs dans la solution de sol. Conformément à cette approche, la spéciation chimique des métaux dans la solution de sol est régulée par des mécanismes internes et externes à cette interface (Figure 2.4). À ce titre, les phases solides minérale et organique du sol, les organismes vivants et l'atmosphère du sol sont susceptibles d'exercer une forte influence sur le comportement des métaux dans la solution de sol (Lindsay, 1979). Les prochaines sous-sections synthétiseront les connaissances actuelles sur les mécanismes susceptibles d'influencer la spéciation des métaux dans la solution de sol. De plus, ces sous-sections permettront de mettre en évidence les différences biogéochimiques existant entre les métaux.



**Figure 2.4.** Facteurs internes et externes au sol régulant la spéciation des métaux dans la solution de sol (modifié de Lindsay (1979)).

## 2.4.2 Mécanismes internes à la solution

Les réactions chimiques se produisant à l'intérieur de la solution ont un impact important sur la spéciation des métaux. Ces réactions se définissent essentiellement comme des réactions de dissociation et de complexation se produisant, d'une part, entre la forme ionique libre et les formes complexées et, d'autre part, entre les formes complexées d'un métal (Figure 2.4). Ces réactions dépendent essentiellement de trois facteurs internes qui sont le pH de la solution de sol, la quantité et la composition de la matière organique dissoute (MOD) ainsi que de l'effet de compétition existant entre les cations.

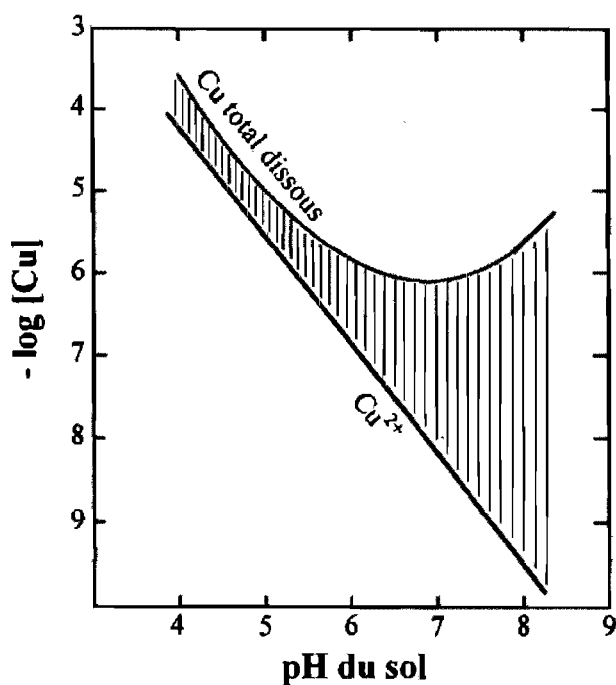
### 2.4.2.1 Effet du pH

Le pH de la solution est la principale propriété contrôlant la spéciation des métaux dans les sols (Lindsay, 1979). Cette propriété régule, chez les métaux, autant l'abondance de l'ion libre que les formes complexées aux anions organiques et inorganiques (Figure 2.5). Cette influence se traduit, pour l'ensemble des métaux, par une relation négative entre le pH et l'activité de la forme ionique libre d'un métal (Stephan *et al.*, 2008; Legrand *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2003b; Krishnamurti et Naidu, 2002; Vulkan *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2000b, 1998a, 1997; Ge *et al.*, 2000; Lindsay et Walthall, 1996). Conformément à cette tendance, l'augmentation absolue et relative de la concentration de la forme ionique libre d'un métal est observée en condition acide, alors qu'une augmentation de pH favorise la complexation des métaux par des ions inorganiques et organiques (Figure 2.5).

### 2.4.2.2 Effet de la matière organique dissoute

L'influence de la MOD sur la mobilité, la spéciation et la biodisponibilité des métaux est aussi bien documentée (Strobel *et al.*, 2001; Fox, 1995). La MOD présente généralement un caractère anionique dominant lui permettant de mobiliser les métaux en les complexant. Le pouvoir de complexation des métaux par les composés organiques est directement relié à la quantité et à la densité de groupes fonctionnels acides, p. ex. carboxyle et phénol, présents sur les molécules organiques (Kabata-Pendias, 2001; Jones, 1998; Vance *et al.*, 1996; Fox, 1995). À ce titre, les anions de dissociation des

substances humiques (fulvate et humate) et des acides organiques de faible poids moléculaire (citrate, oxalate, etc.) sont considérés comme les composés organiques les plus réactifs par rapport aux métaux. Bien que la composition de la MOD pourrait avoir un impact sur le comportement des métaux, Strobel *et al.* (2001) ont montré, sur des horizons organiques provenant de divers peuplements forestiers, que les différences de composition de la MOD entre les sites sont faibles et ne produisent pas de différence marquée sur la mobilisation du Cd, Cu et Fe. Ainsi, comparativement à la concentration totale de MOD, sa composition à un impact mineur sur la mobilité des métaux. Cet impact peut, toutefois, devenir significatif lorsque l'on compare des environnements fortement contrastés.



**Figure 2.5.** Rôle du pH sur la spéciation du Cu. La zone hachurée correspond à la concentration des formes complexées de Cu, alors que les lignes représentent, d'une part, la concentration totale dissoute et, d'autre part, la concentration de la forme ionique libre. La tendance observée dans cette figure entre le pH et la spéciation du Cu est universelle et peut-être appliquée à tous les métaux (modifié de McBride (1994)).

Contrairement au pH, l'influence de la matière organique (MO) sur les métaux est propre à chaque élément métallique. Ainsi, Al, Cu, Fe et Pb possèdent une forte affinité pour la MO, ce qui se traduit par la création de liens covalents forts entre le métal et la molécule organique (Essington, 2004; Vance *et al.*, 1996; Evans, 1989; McBride, 1989). De ce fait, la spéciation de ces métaux est, en partie, dominée par ces formes complexées à la MOD (Sauvé *et al.*, 1998a, 1997). Inversement, le Cd et le Zn possèdent une faible affinité pour la MO, ce qui se traduit par un comportement dans les sols moins contrôlé par celle-ci (Nolan *et al.*, 2003b). Malgré le rôle prépondérant de la MOD sur la spéciation des métaux, les études visant à prédire l'activité de l'ion libre d'un métal ont rarement retenu la MOD comme variable explicative significative. La meilleure explication de cette observation suggère que la relation entre le pH et le métal masque le lien existant entre la MOD et ce même métal (Sauvé *et al.*, 1997), puisque ces deux variables explicatives sont fortement reliées. En effet, une forte relation positive existe entre la solubilité et la dissociation des composés organiques et le pH (Strobel, 2001; Kalbitz *et al.*, 2000; McBride, 1994). De ce fait, puisque le comportement de la MOD est fortement dépendant du pH, sa réactivité avec les métaux l'est tout autant. Néanmoins, dans un microenvironnement comme la rhizosphère où l'activité racinaire entraîne un enrichissement important en MO, MOD et en composés organiques de faible masse moléculaire, une étude récente révèle que le carbone organique dissous (DOC) ressort comme une des variables clés contrôlant l'activité de l'ion libre de Cu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Legrand *et al.*, 2005).

#### 2.4.2.3 Effet de compétition entre les cations pour les anions

Finalement, la complexation des métaux dans la solution de sol est aussi régulée par la compétition existant entre les cations majeurs et traces pour les agents complexants, p. ex. anions organiques et inorganiques. Cette compétition favorisera les métaux les plus abondants dans la solution de sol, ceux ayant la valence la plus élevée ainsi que ceux présentant des affinités particulières pour certains ligands (Schwab, 2000). À titre d'exemple, Al, Cu et Pb sont reconnus pour avoir une forte affinité pour les anions organiques (Kabata-Pendias, 2001; Sauvé *et al.*, 1997; Vance *et al.*, 1996). Il en va de même pour l'Al avec le fluorure ( $\text{F}^-$ ) (Lindsay et Walthall, 1996) et pour le Cd avec  $\text{Cl}^-$  (Smolders et McLaughlin, 1996a, b).

### 2.4.3 Mécanismes d'équilibre entre les phases solide et liquide du sol

Les réactions biogéochimiques s'établissant entre les phases solide et liquide du sol régulent partiellement la composition chimique de la solution de sol. En ce sens, ces réactions exercent une influence importante sur les concentrations de métaux mesurées dans la solution de sol ainsi que sur la spéciation des métaux. La phase solide du sol joue principalement deux rôles sur la composition des métaux dans la solution de sol. Tout d'abord, elle permet de retenir les métaux dans les sols, les empêchant ainsi d'être lessivés hors du sol et de l'écosystème. Les matériaux de la phase solide les plus efficaces pour immobiliser les métaux sont les minéraux argileux, la MO ainsi que les oxyhydroxydes (Essington, 2004; Kabata-Pendias, 2001; McBride, 1989). De plus, la phase solide agit comme réservoir alimentant la solution de sol en éléments chimiques et en métaux. L'adsorption-désorption, la précipitation-dissolution et les réactions d'oxydoréduction sont les trois familles de mécanismes permettant de mobiliser et d'immobiliser les métaux.

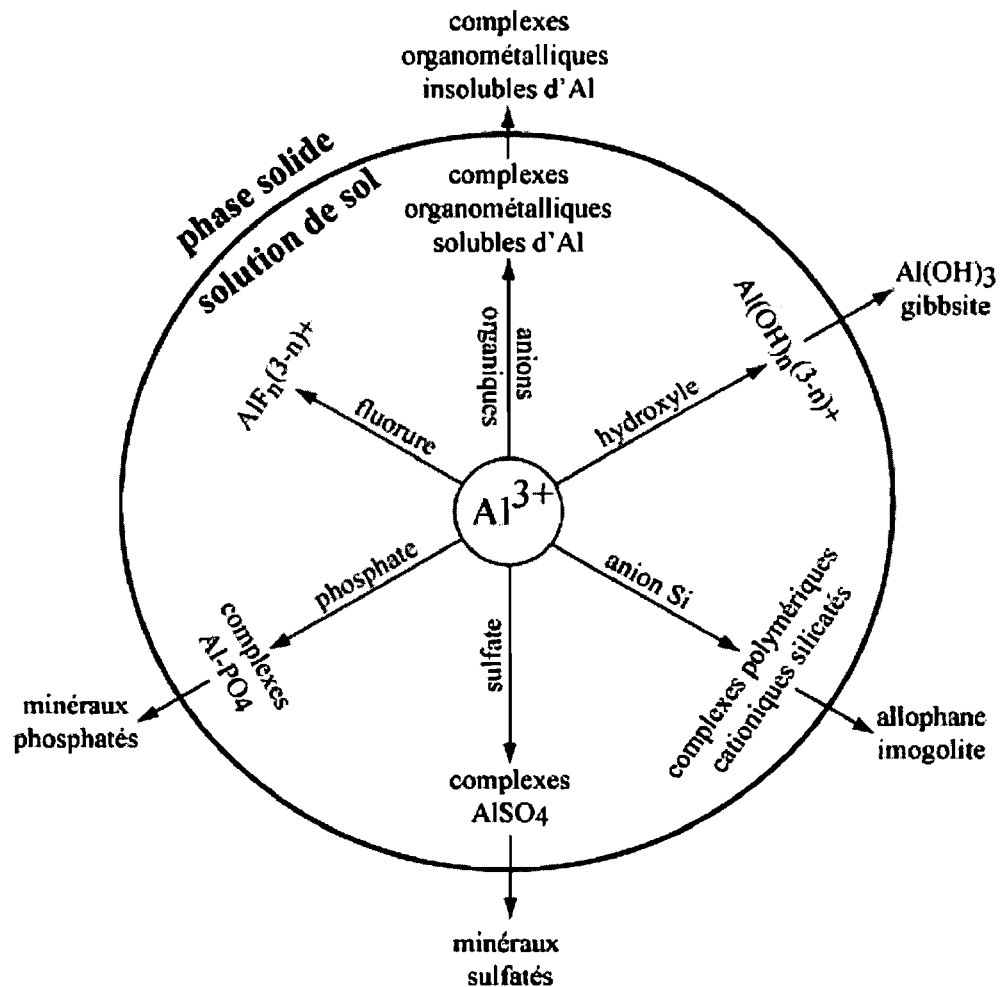
#### 2.4.3.1 *Effet de l'adsorption-désorption*

L'adsorption se définit comme le mécanisme où un ion quitte la solution de sol pour se lier chimiquement à la surface chargée d'un solide. Inversement, la désorption réfère au mécanisme où un ion lié à une surface est libéré de cette liaison et rejoint la solution de sol (Gregorich *et al.*, 2002). L'adsorption des métaux sur les surfaces de la phase solide du sol permet d'immobiliser ceux-ci. La liaison existant entre l'ion et la surface peut être plus ou moins forte, ce qui permet de définir deux types d'adsorption (Essington, 2004; McBride, 1989; Evans, 1989). Ainsi, sur les sites d'échanges, les métaux adsorbés sont faiblement retenus à la surface puisque la liaison entre le métal et la surface est non-spécifique. Ces métaux se désorbent donc facilement et rapidement de la surface et peuvent alimenter la solution de sol. À l'inverse, une adsorption spécifique entre la surface et le métal se produit sur les sites non échangeables. Ces métaux sont fortement et intimement liés à la surface, leur désorption est donc difficile et lente. Ce dernier type d'adsorption alimente donc très peu la solution de sol en métaux, mais permet à ceux-ci d'être immobilisés sur la phase solide.

Les minéraux argileux et la MO sont les matériaux ayant la capacité d'adsorption de métaux la plus importante en raison de leur surface spécifique élevée et de la présence de nombreuses charges spécifiques et non-spécifiques négatives sur leurs surfaces (Evans, 1989). Les oxyhydroxydes adsorbent eux aussi les métaux, leur influence est toutefois moins importante que les minéraux argileux et la MO. Leur effet est néanmoins non-négligeable lorsque le pH du sol est faiblement acide ou alcalin puisque les charges à leurs surfaces deviennent négatives (Evans, 1989; McBride, 1989). L'incidence de ces mécanismes sur la concentration et la spéciation des métaux dans la solution de sol est importante. En effet, dans la plupart des conditions, à l'exception des sols fortement contaminés, ces mécanismes sont reconnus pour être le facteur principal régulant la concentration des métaux en solution (Sauvé, 2003; McBride, 1989).

#### 2.4.3.2 *Effet de la précipitation-dissolution*

Par le mécanisme de précipitation, les métaux quittent la phase liquide du sol, où ils sont mobiles, pour former des minéraux secondaires dans la phase solide du sol. Ce phénomène se produit généralement à proximité des surfaces solides où les métaux abondent dans la solution de sol ainsi qu'en milieux fortement contaminés (Sauvé, 2003; Evans, 1989; McBride, 1989). Ce phénomène est particulièrement important pour Al (Figure 2.6), Fe et Mn qui sont des constituants majeurs des phyllosilicates et des oxyhydroxydes (Hemingway et Sposito, 1996; McBride, 1989) ainsi que pour les minéraux phosphatés contenant du Pb qui sont très peu solubles. Pour les métaux traces, ce mécanisme est moins important puisque leur concentration dans les sols est, dans la plupart des cas, largement insuffisante pour atteindre l'état de saturation nécessaire à la précipitation (Sauvé, 2003). Cependant, lors de la précipitation d'oxyhydroxydes d'Al, Fe ou Mn, des métaux peuvent être présents sous forme d'impureté dans les précipités. Ils sont donc immobilisés indirectement et, dans ces circonstances, le mécanisme est plutôt nommé co-précipitation (Evans, 1989; McBride, 1989).



**Figure 2.6.** Relation existant entre la spéciation de l'Al en solution et les minéraux secondaires pouvant être formés par précipitation (modifié de McBride (1994)).

À l'inverse, l'altération des minéraux libère des métaux dans la solution de sol. Ce mécanisme de mobilisation est particulièrement important pour les métaux présents en grande quantité dans les minéraux, comme c'est le cas notamment pour Al et K (Hendershot *et al.*, 1996). Pour les métaux traces, les études antérieures confirment que l'altération libère des métaux vers la solution de sol. Des estimés récents dans des sols forestiers acides de la Finlande évaluent que ce mécanisme libère  $0.011 \mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$  de Cd,  $4.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$  de Cu,  $5.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$  de Ni,  $1.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$  de Pb et  $8.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{an}^{-1}$  de Zn (Starr *et al.*, 2003). Bien que cette source de métaux soit importante, elle n'apparaît pas comme la source la plus importante contrôlant la concentration des métaux dans la solution de sol (Starr *et al.*, 2003; McBride, 1989).



### 2.4.3.3 Effet des réactions d'oxydoréduction

Le changement d'état d'oxydation des métaux affecte aussi leur mobilité (Sparks, 1995; McBride, 1989). Ces changements sont induits par des réactions d'oxydation ou de réduction régulées par des mécanismes biotiques ou abiotiques. Dans cette sous-section, seules les réactions d'oxydoréduction produites par des mécanismes abiotiques seront exposées. Ces réactions ont une influence certaine sur la concentration et la spéciation des métaux. Cependant, leur poids relatif comparativement aux mécanismes d'adsorption-désorption et de précipitation-dissolution, est limité et s'exerce uniquement sur certains métaux qui présentent une sensibilité particulière à ces réactions et qui possèdent de nombreux états d'oxydations dans l'environnement (McBride, 1989). De plus, à l'heure actuelle, ces réactions sont beaucoup moins documentées que les mécanismes d'adsorption-désorption et de précipitation-dissolution. Il existe donc encore plusieurs incertitudes quant au fonctionnement précis de ces réactions.

Les tendances générales pour l'ensemble des métaux sont que les réactions d'oxydation favorisent généralement l'immobilisation des métaux traces (Kabata-Pendias, 2001; McBride, 1989). Les oxyhydroxydes de Mn et, dans une moindre mesure, de Fe sont reconnus pour être les matériaux les plus susceptibles de produire ces réactions (Sparks, 1995; McBride, 1989). Ainsi, ils peuvent oxyder directement les métaux ou agir comme catalyseur dans l'oxydation de ces métaux par l'oxygène (Sparks, 1995; McBride, 1989). Le changement d'état d'oxydation résultant de l'oxydation de ces métaux favorise leur adsorption sur les surfaces ou leur co-précipitation sur les oxyhydroxydes de Fe et Mn. Ces réactions ont été documentées essentiellement pour l'arsenic (As), cobalt (Co), Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, plutonium et sélénium (James et Bartlett, 2000; Sparks, 1995; McBride, 1989). Toutefois, pour le Cr et le plutonium, l'oxydation de ces métaux favorise plutôt leur mobilisation dans le sol.

Inversement, les minéraux secondaires métalliques de type oxyhydroxydes peuvent être réduits, ce qui entraîne leur dissolution dans la solution de sol. Ces réactions sont produites généralement par les molécules organiques contenant des groupes réactifs phénols. De ces composés organiques, les agents les plus performants sont les acides fulviques, salicyliques, oxaliques et pyruviques (McBride, 1989) ainsi que certains

contaminants organiques telle l'hydroquinone (Sparks, 1995). Ces réactions solubilisent principalement les oxyhydroxydes de Fe et Mn dans les sols. Toutefois, ces oxyhydroxydes sont généralement composés de métaux traces qui ont co-précipité, ce qui fait que ce mécanisme libère aussi une panoplie de métaux traces (McBride, 1989). Bien que ces réactions soient répandues dans les sols, les études antérieures ont observé une intensification de ces réactions à l'interface sol-racine (Hinsinger, 1998; Marschner et Römheld, 1996; McBride, 1989).

#### 2.4.3.4 Prédiction des concentrations totales de métaux dans la solution de sol à l'aide des réactions d'équilibre entre les phases solide et liquide du sol

Les mécanismes expliqués précédemment influencent la concentration des métaux dans la solution de sol et, indirectement, la spéciation de ceux-ci. Ces mécanismes sont tous en équilibre dans l'environnement édaphique et cet équilibre est principalement régi par le pH. Ainsi, le pH est certainement la propriété des sols exerçant le plus grand contrôle sur les réactions s'effectuant dans le milieu édaphique entre les phases solide et liquide du sol. Grâce à cette propriété, de nombreuses études ont pu obtenir des estimés de qualité des concentrations totales dissoutes de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn (Stephan *et al.*, 2008; Degryse *et al.*, 2003; Krishamurti et Naidu, 2002, Sauvé *et al.*, 2000a; Vulkan *et al.*, 2000). Ces études montrent clairement que l'effet du pH sur la mise en solution des métaux est significatif pour chaque élément métallique, malgré le fait qu'ils possèdent tous une sensibilité différente à cette propriété. À ce titre, des relations négatives entre le pH et les concentrations totales dissoutes de métaux sont observées, soulignant par le fait même que les conditions acides favorisent la mise en solution des métaux. En effet, dans ces conditions, les charges positives sont favorisées sur les surfaces limitant ainsi l'adsorption des métaux et favorisant leur désorption. De plus, la dissolution des minéraux secondaires de type oxyhydroxyde est favorisée en milieux acides (Essington, 2004; Sauvé, 2003; Evans, 1989; McBride, 1989).

En lien avec ces mécanismes, la sensibilité des métaux relativement au pH présente la tendance suivante : Ni >> Zn > Cd > Pb >> Cu (Sauvé *et al.*, 2000a). Ce dernier résultat souligne que les comportements du Ni, Zn, Cd et Pb sont plus dépendant du pH que celui du Cu. Ce résultat révèle aussi que la solubilité du Ni, Zn, Cd et Pb est contrôlée

principalement par des mécanismes s'établissant entre les phases solide et liquide du sol dépendant du pH, comme l'est l'adsorption sur les sites d'échanges et la solubilité des minéraux phosphatés. La solubilité du Cu est quant à elle plus fortement régulée par des mécanismes moins sensibles au pH, par exemple l'adsorption spécifique de ces métaux sur la MO.

#### **2.4.4 Apports extérieurs de métaux**

Les dépôts atmosphériques sont l'une des principales sources de métaux pour la solution de sol (Johnson *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2003; Derome et Nieminen, 1998). Cette source influence principalement les concentrations totales de métaux dans la solution de sol. Des preuves de cette influence sont observées dans les études menées sur des sites situés à différentes distances d'une source ponctuelle de métaux. Les résultats montrent généralement une relation forte entre les concentrations de métaux mesurées dans la solution de sol et l'apport atmosphérique de métaux au sol reflété par la distance du site d'échantillonnage à la source de métaux (Legrand *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Derome et Nieminen, 1998). Ce facteur peut aussi avoir une influence importante sur la spéciation des métaux puisque les rejets anthropiques de métaux sont généralement accompagnés de rejets de composés acides, p. ex. acides nitrique et sulfurique. Ces composés peuvent influencer fortement le pH du sol, notamment dans les sols faiblement tamponnés, et ainsi modifier la spéciation des métaux (Derome et Nieminen, 1998).

#### **2.4.5 Mécanismes d'équilibre entre les phases liquide et gazeuse du sol**

La composition chimique de la phase gazeuse du sol exerce un effet non négligeable sur des propriétés de la solution de sol, tels le potentiel oxydoréducteur et le pH, reconnus pour influencer la spéciation des métaux (Sposito, 1989; Lindsay, 1979). Cette influence s'exprime autour de deux mécanismes dont l'un favorise la dissolution des gaz dans la solution de sol et l'autre leur libération dans la phase gazeuse (Figure 2.4). La composition de la phase gazeuse du sol est généralement similaire à celle de l'atmosphère, bien que les concentrations relatives de certains gaz diffèrent (Sposito, 1989). Ainsi, les concentrations dans les sols de l'oxygène (O<sub>2</sub>) et du dioxyde de

carbone (CO<sub>2</sub>) sont, respectivement, plus faibles et plus élevées que dans l'atmosphère. Ces tendances s'expliquent par l'intense activité biologique régnant dans les sols (Sposito, 1989; Lindsay, 1979). Ces deux gaz sont très réactifs dans l'environnement édaphique et, de ce fait, ils sont ceux exerçant la plus grande influence sur la spéciation des métaux.

Les concentrations d'O<sub>2</sub> dans les sols régulent les conditions oxydoréductrices du milieu. Ainsi, lorsque ce gaz est peu abondant, les réactions de réduction prévalent dans la solution de sol, alors que des réactions d'oxydation sont rencontrées lorsque le milieu est riche en O<sub>2</sub> (Essington, 2004). Comme il a été démontré à la sous-section 2.4.3.3, les réactions oxydoréductrices exercent un contrôle sur la spéciation des métaux, contrôle qui dépend des teneurs en O<sub>2</sub> de la solution de sol. De plus, ces réactions influencent principalement les métaux présentant plusieurs états d'oxydations (McBride, 1989).

Le CO<sub>2</sub> abonde dans la phase gazeuse des sols puisqu'il s'agit d'un produit de la respiration des racines et des microorganismes (Hinsinger *et al.*, 2003; Sposito, 1989; Lindsay, 1979). Lorsque ce gaz est dissous, il s'associe avec les molécules d'eau pour former de l'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Lors de la dissociation de cet acide, des ions acides (H<sup>+</sup>) sont libérés dans la solution de sol venant, du même coup, modifier le pH du sol. Les modifications apportées par ce mécanisme au pH du sol ont une incidence directe sur la spéciation des métaux dans la solution de sol. Cependant, l'influence de ce mécanisme sur le pH du sol est à considérer uniquement dans les sols neutres à alcalins puisque la dissociation du H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s'observe pour des pH supérieurs à 6,36 (Lindsay, 1979).

## **2.4.6 Effet des microorganismes sur les métaux**

### **2.4.6.1 Principaux microorganismes présents dans les sols**

Les organismes vivants dans les sols sont généralement classés en fonction de leur taille et de leur niveau de complexité cellulaire. Ainsi, les microorganismes se définissent comme des organismes vivants ayant une taille inférieure à 100 µm (Prescott *et al.*, 1995; Swift *et al.*, 1979). Les microorganismes comprennent des organismes procaryotes

unicellulaires comme les bactéries et des organismes eucaryotes unicellulaires et pluricellulaires comme les algues, les mycètes, les protozoaires et les animaux (Paul et Clark, 1996; Prescott *et al.*, 1995). Le Tableau 2.3 fournit des informations de bases sur ces principaux organismes. De ces microorganismes, les bactéries et les mycètes sont les organismes les plus abondants dans les sols (Tableau 2.3) et ceux influençant le plus les cycles biogéochimiques des éléments (Madsen, 2005; Newman et Banfield, 2002; Paul et Clark, 1996).

Les bactéries sont le groupe de microorganismes le plus abondant dans les sols (Paul et Clark, 1996). On estime qu'il y a entre  $10^6$  et  $10^9$  individus par gramme de sol sec (Tableau 2.3), ce qui représente environ 25 % de la biomasse microbienne du sol (Gobat *et al.*, 1998). Cette abondance est marquée par une grande diversité spécifique dans les sols où il a été évalué qu'un gramme de sol contient plus de 4000 génomes différents de bactéries (Torsvik *et al.*, 1990). Les bactéries se divisent en deux groupes nommés les eubactéries et les archéobactéries qui se différencient principalement sur la base de la composition de leur paroi cellulaire (Prescott *et al.*, 1995). En effet, les eubactéries possèdent de l'acide muramique dans cette paroi alors que les archéobactéries n'en contiennent pas. L'énorme diversité du monde bactérien n'a pas encore livré tous ces secrets puisqu'on estime que moins de 10 % des espèces de bactéries et de microorganismes évoluant en milieux édaphiques sont identifiées à ce jour (Insam, 2001). Cette importante diversité amène nécessairement les espèces de bactéries à se spécialiser et ainsi à pouvoir intervenir sur l'ensemble des cycles biogéochimiques des éléments (Madsen, 2005; Newman et Banfield, 2002). Un bon exemple de cette spécialisation concerne la dégradation par certaines bactéries de polysaccharides complexes résistants à la décomposition (Prescott *et al.*, 1995).

**Tableau 2.3.** Principaux microorganismes présents dans les sols (Gobat *et al.*, 1998; Paul et Clark, 1996; Prescott *et al.*, 1995).

Principaux groupes	Principaux sous-groupes	Caractéristiques	Quantité moyenne dans les sols Organismes / g
<b>Bactéries</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eubactéries<sup>a</sup></li> <li>○ Archéobactéries<sup>b</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Procaryote</li> <li>○ Reproduction asexuée</li> <li>○ Groupe très diversifié</li> </ul>	$10^6 - 10^9$
<b>Mycètes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Champignons</li> <li>○ Levures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eucaryote (uni- ou pluricellulaire)</li> <li>○ Hétérotrophe</li> <li>○ Production de spores</li> <li>○ Sans chlorophylle</li> <li>○ Reproduction sexuée et asexuée</li> </ul>	Non déterminé
<b>Algues</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Algues brunes</li> <li>○ Algues brun-jaune, vert-jaune et diatomés</li> <li>○ Algues rouges</li> <li>○ Algues vertes</li> <li>○ Dinoflagellés</li> <li>○ Euglénoides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eucaryote (uni- ou pluricellulaire)</li> <li>○ Sans racines, tige et feuilles</li> <li>○ Effectue la photosynthèse</li> <li>○ Reproduction sexuée et asexuée</li> </ul>	$1000 - 10^5$
<b>Protozoaires</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Amibes</li> <li>○ Ciliés</li> <li>○ Flagellés</li> <li>○ Sporozoaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eucaryote unicellulaire</li> <li>○ Majoritairement mobile</li> <li>○ Hétérotrophe (prédation)</li> <li>○ Reproduction asexuée (majoritaire)</li> </ul>	$10^4 - 10^6$
<b>Animaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nématodes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eucaryote pluricellulaire</li> <li>○ Forme allongée</li> <li>○ Mobile</li> <li>○ Hétérotrophe (prédation)</li> <li>○ Reproduction sexuée</li> </ul>	0,1 - 1000

a Eubactéries = Gram-positives et négatives, cyanobactéries, etc.

b Archéobactéries = halophiles extrêmes, méthanogènes, thermophiles extrêmes.

Comparativement aux bactéries, les mycètes sont moins abondants dans les sols (tableau 2.3). Toutefois, il s'agit du principal groupe de microorganismes contribuant à la biomasse microbienne du sol (Gobat *et al.*, 1998; Paul et Clark, 1996). Les champignons constituent le sous-groupe de mycète reconnu pour jouer le rôle le plus important dans les sols et sur les cycles biogéochimiques des éléments. Leur caractère hétérotrophique fait en sorte qu'ils puisent leur carbone sous forme organique (Tableau 2.4) et qu'ils sont considérés comme étant l'un des principaux agents de décomposition de la MO (Paul et Clark, 1996; Prescott *et al.*, 1995). Leur action de dégradation s'effectue principalement dans le milieu édaphique suite à la libération d'enzymes dans le sol (exoenzymes) qui dégraderont la MO (Gobat *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 1995). Les champignons sont composés d'un corps végétatif nommé thalle auquel est lié un mycélium. Le mycélium est une structure longiligne composée de filaments ramifiés appelés des hyphes (Paul et Clark, 1996; Prescott *et al.*, 1995). Cette structure se repend dans le sol sur de grandes surfaces, ce qui permet à l'organisme de puiser l'eau et la nourriture utile à ses besoins. Par ailleurs, cette structure permet d'accumuler des nutriments, de pouvoir les transporter à l'intérieur de l'organisme et ainsi de les utiliser pour diverses activités, dont la reproduction (Gobat *et al.*, 1998). Cette fonction de prélèvement et de transport des nutriments dans le mycélium fait en sorte qu'on observe des associations symbiotiques entre champignons et racines (les mycorhizes). Ces associations peuvent prendre plusieurs formes et elles sont généralement bénéfiques pour les deux parties (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). D'une part, le champignon, grâce à son mycélium, colonise une grande surface de sol qui lui permettra de prélever des éléments nutritifs et de l'eau, de les transporter jusqu'aux racines et d'en faire bénéficier son hôte. Cette action permet aux racines des plantes d'avoir accès sans trop dépenser d'énergie à une plus grande surface de sol pour se nourrir. De leur côté, les racines libèrent dans le sol des composés organiques facilement décomposables qui permettront au champignon de se nourrir (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Leyval et Joner, 2001; Gobat *et al.*, 1998; Paul et Clark, 1996; Prescott *et al.*, 1995). Ainsi, on estime que plus de 80 % des plantes de la planète vivent en association symbiotique de type mycorhize avec un champignon (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Landeweert *et al.*, 2000 ; Prescott *et al.*, 1995).

#### 2.4.6.2 *Influence des microorganismes sur les métaux*

Les microorganismes, principalement les bactéries et les mycètes, jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et l'équilibre biogéochimique des écosystèmes (Madsen, 2005; Newman et Banfield, 2002). Leur action est en grande partie associée directement ou indirectement aux transformations qu'ils produisent dans les sols pour se nourrir ou prélever de l'énergie (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). De nombreux mécanismes sont à la disposition des microorganismes pour acquérir l'énergie, le C ainsi que l'hydrogène et les électrons. Ceux-ci sont exposés au Tableau 2.4. Différentes combinaisons de ces modes de nutrition permettront aux microorganismes de survivre et d'influer sur la biogéochimie des éléments. Dans les sols, les organismes phototrophes, qu'ils soient lithotrophes ou organotrophes, ont une influence limitée sur la biogéochimie des éléments puisqu'ils acquièrent leur énergie par la lumière qui est disponible uniquement à la surface du sol (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). En ce sens, l'influence microbienne sur la biogéochimie des métaux et des autres éléments dans les sols est majoritairement assurée par les organismes chimiotrophes qui comprennent les mycètes ainsi que l'ensemble des bactéries non photosynthétiques (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Prescott *et al.*, 1995).

**Tableau 2.4.** Modes de nutrition utilisés par les microorganismes pour assimiler l'énergie, le carbone ainsi que l'hydrogène et les électrons (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Prescott *et al.*, 1995).

Besoins des microorganismes	Sources	Terminologie
Énergie	Électromagnétique	Phototrophe
	Chimiques (oxydation)	Chimiotrophe
Carbone	Molécule inorganique (CO <sub>2</sub> )	Autotrophe
	Molécules organiques	Hétérotrophe
Hydrogène et électrons	Molécules inorganiques	Lithotrophe
	Molécules organiques	Organotrophe

Considérant cela, des études récentes tendent à montrer que les microorganismes ont la capacité d'influencer le comportement des métaux présents dans la phase liquide du sol. Les connaissances de l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux sont toutefois restreintes comparativement à celles obtenues pour d'autres éléments



chimiques, comme l'azote et le phosphore. Néanmoins, depuis deux décennies, les recherches dans ce domaine se sont accélérées, ce qui s'est traduit par la production de plusieurs synthèses sur le sujet (Gadd, 2004; Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Leyval et Joner, 2001; Silver, 1998; Roane *et al.*, 1996; Berthelin *et al.*, 1995). Ainsi, le rôle des microorganismes sur la mobilisation et la spéciation des métaux a pu être partiellement éclairci, principalement en identifiant certains mécanismes agissant à l'échelle cellulaire (Tableau 2.5).

**Tableau 2.5.** Mécanismes d'origines microbiens influençant la mobilité et la spéciation des métaux.

<b>Effet sur les métaux</b>	<b>Mécanismes</b>
<b>Immobilisation</b>	Bioaccumulation Biosorption
<b>Mobilisation</b>	Production de composés acides et/ou chélatants Élution
<b>Immobilisation / Mobilisation</b>	Réactions d'oxydoréduction Biodégradation de complexes organométalliques

Tout d'abord, deux mécanismes d'immobilisation des métaux largement répandus chez les microorganismes ont été identifiés. Ces mécanismes sont la bioaccumulation et la biosorption (Tableau 2.5). La bioaccumulation des métaux par les microorganismes fait intervenir une absorption des métaux dans le but de combler un besoin nutritionnel ou de réduire la toxicité du métal. En accord avec cette dernière explication, le métal absorbé sera immobilisé par précipitation à l'intérieur de la cellule, notamment dans le cytoplasme ou la paroi cellulaire (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Meharg, 2003; Schiewer et Volesky, 2000). D'autre part, une variante de ce mécanisme est aussi observée. Ainsi, certains microorganismes absorbent les métaux, modifient leur spéciation et permettent leur évacuation hors de la cellule. Les formes chimiques des métaux rejetées dans la solution de sol sont peu solubles et mèneront à la précipitation du métal sur la phase solide du sol (Newman et Banfield, 2002; Silver, 1998; Roane *et al.*, 1996). L'immobilisation des métaux dans la cellule est assurée par des protéines et des polysaccharides, p. ex. métallothionéine, chitine, peptidoglycane, qui complexent les métaux et favorisent leur précipitation sous forme de granules (Meharg, 2003; Silver, 1998; Roane *et al.*, 1996; Lepp, 1992). Ce mécanisme est utilisé par des bactéries

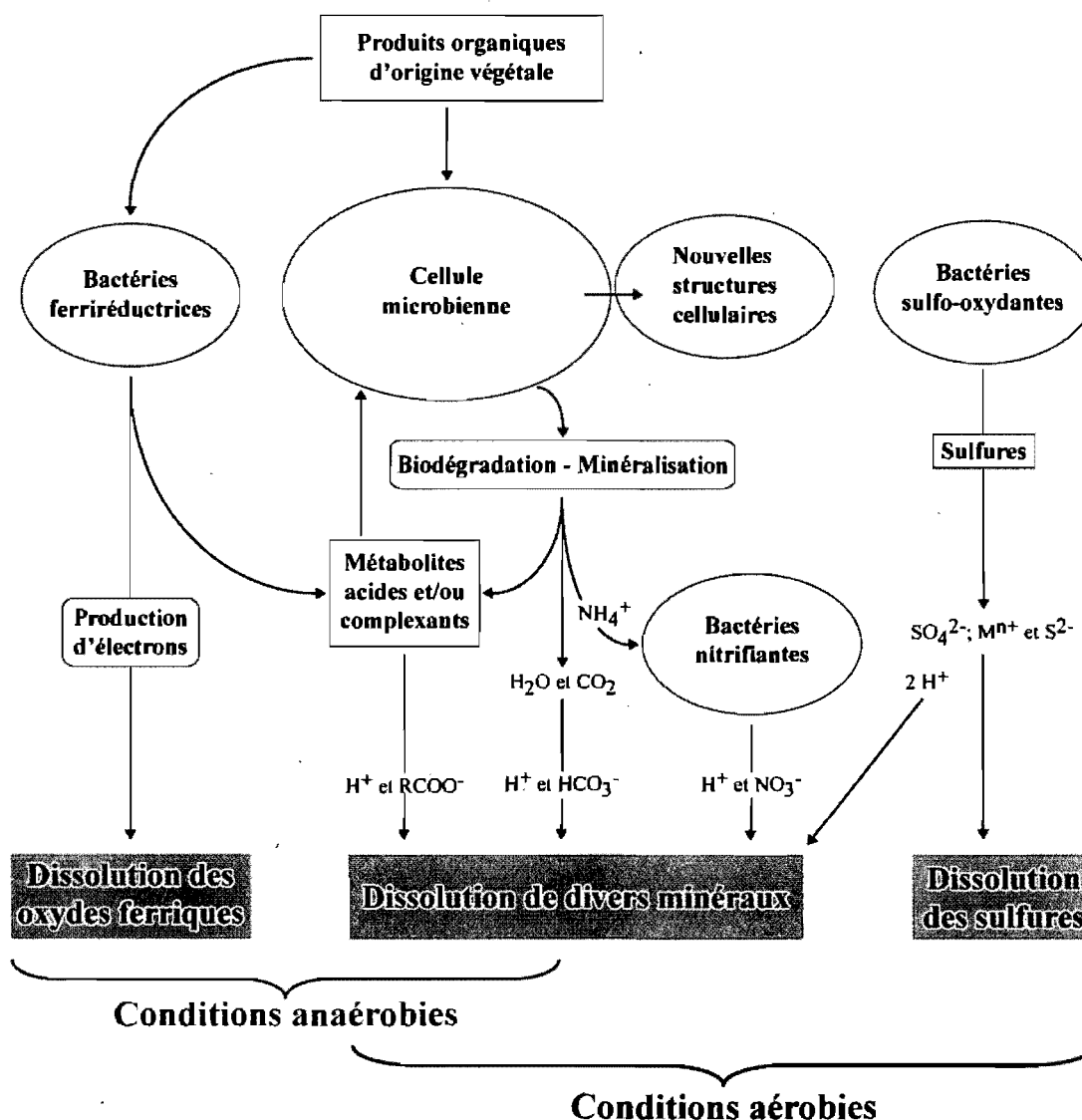
(Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Fein *et al.*, 2001; Schiewer et Volesky, 2000; Silver, 1998; Berthelin *et al.*, 1995; Aiking *et al.*, 1984) et des mycètes (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Meharg, 2003; Leyval et Joner, 2001; Schiewer et Volesky, 2000) pour immobiliser, entre autres, le Cd, Cu, Pb et Zn. De plus, chez les mycètes, les associations mycorhiziennes sont reconnues pour accumuler de façon significative les métaux dans leur biomasse.

On différencie la biosorption de la bioaccumulation par le fait qu'il s'agit d'un processus passif agissant hors de la cellule ou sur la paroi cellulaire externe. Ainsi, la fixation des métaux s'effectue surtout par complexation, mais aussi par adsorption et précipitation (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Schiewer et Volesky, 2000). Par ce mécanisme, des complexes organométalliques extracellulaires sont formés suite à la libération, hors de la cellule, de polymères anioniques complexes (Schiewer et Volesky, 2000; Roane *et al.*, 1996), de polysaccharides ou de mucilages (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Leyval et Joner, 2001). La complexation des métaux s'effectue en réponse à la dissociation des groupes fonctionnels acides de ces substances qui vont produire des charges négatives sur ces molécules (Fox, 1995). De ce fait, l'efficacité de ce mécanisme tend à diminuer en condition fortement acide (Schiewer et Volesky, 2000; Roane *et al.*, 1996) puisque dans ces conditions, les groupes fonctionnels acides ne sont pas dissociés. Il est important de noter que ce mécanisme d'immobilisation est réalisé par une grande diversité de microorganismes, qu'il est susceptible d'exercer un contrôle sur une large gamme de métaux et qu'il peut se produire à la fois sur les organismes morts et vivants (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Kurek *et al.*, 1982). En raison de cela, les mécanismes de biosorption et de bioaccumulation sont reconnus pour être dans les mécanismes microbiens les plus actifs agissant sur les métaux dans les sols (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Meharg, 2003; Leyval et Joner, 2001).

Les microorganismes sont aussi aptes à mobiliser les métaux (Tableau 2.4). Des mécanismes de mobilisation des métaux, le plus répandu fait intervenir la production microbienne de composés acides et complexants (Figure 2.7). Grâce à ce mécanisme, la solubilisation des métaux est assurée par le rejet dans le sol de protons (ions H<sup>+</sup>) et d'agents complexants organiques pouvant agir séparément ou en combinaison (Deneux-

Mustin *et al.*, 2003; Leyval et Joner, 2001; Gobran *et al.*, 1999; Jones, 1998; Hinsinger, 1998; Fox, 1995; Drever et Vance, 1994). Les composés organiques intervenant dans ce mécanisme font généralement partie des molécules organiques de faible masse moléculaire contenant des groupes réactifs carboxyles ou phénols, telles que les acides organiques, les biosurfactants et les sidérophores (Newman et Banfield, 2002; Jones, 1998; Marschner et Römheld, 1996; Berthelin *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1994). Leur présence dans les sols s'explique principalement par un rejet passif (exsudation) de métabolites d'origines microbiennes ou végétales qui sont utilisés par les organismes vivants pour faciliter le prélèvement des nutriments (Landeweert *et al.*, 2001; Jones, 1998; Marschner, 1998; Marschner et Römheld, 1996). Des microorganismes actifs dans la solubilisation des métaux, les mycètes, qu'ils soient sous forme de mycorhize ou non, sont reconnus pour être les plus performants (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Meharg, 2003). En effet, leur vaste réseau de mycélium permet à ces microorganismes d'entrer en contact avec une plus grande surface de particules de sol, ce qui favorise grandement la dissolution des minéraux et la solubilisation des métaux (Landeweert *et al.*, 2001). La solubilisation des métaux par ce mécanisme a été observée, entre autres, pour Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn (Landeweert *et al.*, 2001 ; Jones, 1998; Marschner, 1998; Vance *et al.*, 1996; Miller, 1995; Tan *et al.*, 1994).

Le dernier mécanisme mobilisant les métaux se nomme l'élution (Tableau 2.5). Par ce mécanisme, les métaux qui se bioaccumulent dans les cellules microbiennes deviennent mobiles à la mort de celles-ci. En effet, la cellule suite à sa mort devient une particule de la taille d'un colloïde (1 - 450 nm) qui a la possibilité de se déplacer dans le profil de sol entraînant avec elle les métaux qui y sont associés (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Guine *et al.*, 2003). Les colloïdes peuvent se diriger vers le bas du profil en raison de la gravité ou vers les racines en raison du pompage de la solution de sol par la plante. Par ailleurs, ce mécanisme peut aussi se produire chez les microorganismes vivants où il a été observé pour le Cd, le mercure (Hg) et le Zn (Guine *et al.*, 2003). Ce mécanisme demeure peu documenté comparativement aux autres. En ce sens, son importance sur la distribution des métaux dans les sols est encore mal connue. Il n'apparaît toutefois pas comme le mécanisme principal influençant la mobilité des métaux.



**Figure 2.7.** Principaux mécanismes microbiens favorisant la mobilisation des métaux dans les sols (modifié de Deneux-Mustin *et al.* (2003)).

Par ailleurs, deux mécanismes d'origine microbienne ont la possibilité à la fois de mobiliser et d'immobiliser les métaux. Tout d'abord, les réactions d'oxydoréduction produites par les microorganismes entrent dans cette catégorie (Tableau 2.5). Ces réactions visent principalement à protéger l'organisme de l'effet potentiellement toxique des métaux. En ce sens, elles sont donc spécifiques à un métal et à un microorganisme donné (Roane *et al.*, 1996). Ainsi, en condition aérobie, Fe et Mn vont s'oxyder ce qui favorisera leur précipitation sous forme d'oxyhydroxydes (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). À l'inverse, l'oxydation des minéraux sulfurés entraîne la dissolution du minéral et des métaux présents dans le minéral (Figure 2.7). De plus, l'oxydation des sulfures entraîne

une diminution du pH du sol. Ce phénomène peut entraîner une solubilisation généralisée et marquée de plusieurs métaux, si les minéraux sulfurés sont présents en quantités suffisantes dans le sol. La mobilisation du Cu et de l'uranium par des réactions d'oxydations induites par les bactéries *Thiobacillus* spp. et *Leptothrix* spp. a aussi été observée (Ehrlich et Brierley, 1990).

Par ailleurs, les réactions de réduction actives en milieux anaérobies favorisent généralement la précipitation du Cd, Cu, Ni et Pb qui sont souvent associés aux minéraux sulfurés (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Brierley, 1990). Toutefois, pour Fe et Mn, les conditions réductrices favorisent plutôt la dissolution des oxyhydroxydes ainsi que des métaux qui étaient présents sous forme d'impuretés dans le minéral (Figure 2.7). Des réactions de réductions mobilisant le Cd, Cr, Pb et Zn ont aussi été rapportées et elles sont associées à l'activité des bactéries du genre *Clostridium* spp. (Francis et Dodge, 1990).

Finalement, en laboratoire, il a été démontré que les microorganismes peuvent influencer la mobilité et la spéciation des métaux traces en dégradant les complexes organométalliques présents en solution (Tableau 2.5). L'efficacité de ce mécanisme dépend du type d'agent complexant organique présent, de l'espèce microbienne ainsi que de la toxicité du métal (Berthelin *et al.*, 1995). Ainsi, les travaux de Munier-Lamy *et al.* (1991) ont évalué la séquence suivante de biodégradation du complexe citrate-métal :  $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Fe^{3+} > Cd^{2+}$ . Pour le complexe protocatéchuante-métal, la série est plutôt la suivante :  $Fe^{3+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ . Ce mécanisme agit sur la spéciation du métal en le faisant passer d'une forme organique à la forme ionique libre. Suite à cette transformation, les métaux peuvent rester en solution ou être immobilisés. Bien que peu d'études aient mis l'accent sur ce mécanisme, il apparaît essentiel de le considérer. En effet, les composés organiques de faible masse moléculaire abondent dans les sols, tout en présentant une capacité de complexation importante par rapport aux métaux et une durée de vie courte en raison de leur dégradation rapide par les microorganismes du sol (Jones *et al.*, 2003; Jones, 1998; Fox, 1995).

#### 2.4.7 Effet de la végétation arborescente et du cycle sol-plante sur les métaux

Comme énoncé à la section 2.3, le cycle sol-plante influence fortement la distribution des métaux dans les écosystèmes forestiers. Cette influence s'étend jusque dans la solution de sol où la végétation a un effet marqué sur la concentration totale et la spéciation des métaux (Figure 2.4). En premier lieu, le prélèvement des métaux par les plantes s'effectue dans la solution de sol. Cette action a pour conséquence d'appauvrir la solution de sol à l'interface sol-racine en métaux et plus précisément en formes biodisponibles (Hinsinger, 2001; Knight *et al.*, 1997). Le déséquilibre formé dans la solution de sol par cette action de la plante est compensé par les mécanismes existant entre les phases solide et liquide du sol (voir section 2.4) ainsi qu'entre les solutions de sol situées à proximité de la racine et celles environnantes (voir sous-section 3.3.2).

D'autre part, les métaux séquestrés dans les arbres peuvent aussi alimenter la solution de sol en métaux. En effet, la décomposition des tissus de végétaux et l'écoulement de l'eau sur la végétation représentent des mécanismes alimentant la solution de sol en métaux. Ces apports de métaux aux sols sont importants et de magnitude comparable ou supérieure à la déposition atmosphérique (Johnson *et al.*, 2003; Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Bergkvist *et al.*, 1989; Heinrichs et Mayer, 1980). Par ailleurs, il est aussi possible d'anticiper que ces mécanismes influencent la spéciation des métaux, principalement en alimentant la solution de sol en métaux complexés à la MOD.

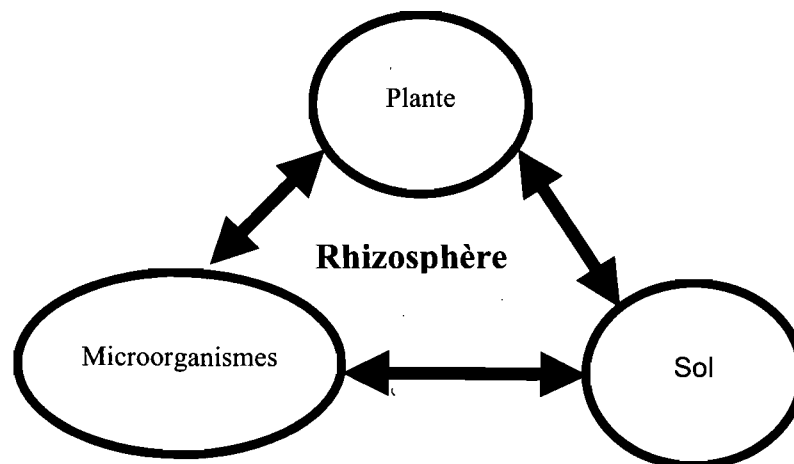
D'un point de vue biogéochimique, le cycle interne sol-plante est régulé par la capacité de prélèvement des métaux par les racines des arbres. Dans ces circonstances, le sol à proximité des racines, où les arbres prélèvent principalement leurs nutriments, joue un rôle clé dans le mouvement des métaux à l'intérieur de l'écosystème forestier (McClain *et al.*, 2003; Gobran *et al.*, 1998). Ce microenvironnement se nomme la rhizosphère. Bien qu'elle soit un maillon essentiel du système sol-plante et du cycle biogéochimique des métaux dans les écosystèmes forestiers, sa dynamique interne et son influence sur le comportement des métaux sont encore peu documentées et mal comprises. Le chapitre suivant présentera l'état des connaissances sur les réactions et les mécanismes agissant dans la rhizosphère ainsi que leur influence sur la spéciation des métaux.

## CHAPITRE 3. La rhizosphère

---

### 3.1 Définition et délimitation spatiale et temporelle

Le concept de rhizosphère a été proposé pour la première fois par Hiltner (1904), lorsqu'il observa une accumulation de microorganismes autour des racines de plants de légumes ainsi qu'une interaction entre ces microorganismes et les racines. Le concept se clarifia, par la suite, en soulignant l'influence des racines vivantes sur l'environnement édaphique (Curl et Truelove, 1986) et par l'introduction du concept de trinité pour représenter la rhizosphère (Lynch, 1990). Selon ce concept, la rhizosphère est la zone de sol entourant les racines qui est influencée par l'interaction de trois composantes : le sol, la plante et les microorganismes (Figure 3.1).



**Figure 3.1.** Schéma conceptuel de la rhizosphère (adapté de Lynch (1990)).

La rhizosphère est un microenvironnement dont l'étendue et la géométrie varient dans l'espace et dans le temps en fonction de la substance ou du mécanisme étudié (Hinsinger *et al.*, 2005). Généralement, elle s'étend dans le sol sur quelques millimètres autour de la racine. À titre d'exemple, les expériences de croissance menées dans la rhizosphère de plantes agricoles montrent un appauvrissement de ce microenvironnement en K. Cette zone appauvrie en K est associée au prélèvement de cet élément par la plante et s'étend

généralement sur quelques millimètres (Hinsinger, 1998). Ainsi, l'échelle de la rhizosphère pour cette propriété est millimétrique. Toutefois, dans certains cas, la rhizosphère peut atteindre plusieurs centimètres (Hinsinger *et al.*, 2005; Pinton *et al.*, 2001). C'est ce qui est observé notamment pour l'anion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) où la zone d'appauvrissement autour des racines de plantes cultivées atteint une échelle centimétrique (Hinsinger, 1998). La délimitation spatiale de la rhizosphère est principalement contrôlée par l'architecture du réseau racinaire, la production d'exsudats racinaires, les besoins nutritifs de la plante, la présence de mycorhizes et les conditions climatiques (Hinsinger *et al.*, 2005; Lombi *et al.*, 2001). L'ensemble de ces facteurs régule l'exploration et la colonisation des racines dans le sol ainsi que l'expression de leur action sur le milieu édaphique. De plus, en milieu naturel, il a été observé que les racines d'arbres et d'herbes occupaient souvent les anciens réseaux racinaires (Gobran *et al.*, 1999; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). Ce phénomène s'explique par le fait que ces anciens réseaux racinaires sont des microsites enrichis en matière organique, en microorganismes, en nutriments biodisponibles et parce que la forte porosité du sol, résultant de la croissance des racines antérieures, permet une croissance aisée des nouvelles racines (Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). De ce fait, dans les écosystèmes forestiers, bien que la durée de vie des racines soit limitée, le microenvironnement de la rhizosphère peut être vu comme un phénomène persistant dans le temps, ce qui se traduit par des propriétés de sols qui tendent à s'accroître et à se différencier du reste du sol avec le temps.

### **3.2 Propriétés de la rhizosphère**

Les activités racinaires et microbiennes ainsi que leurs interactions avec le sol permettent de créer, dans le compartiment de la rhizosphère, un microenvironnement unique qui diffère de la matrice du sol. Le compartiment de la matrice du sol se définit comme le milieu édaphique où les racines actuelles n'ont aucun effet direct sur les propriétés et le développement du sol. Les différences des propriétés physiques, biologiques et chimiques entre la rhizosphère et la matrice sont bien documentées et une synthèse des tendances observées est présentée dans le Tableau 3.1. En plus des différences de propriétés existant entre les deux compartiments de sols, il a été observé



que les réactions biogéochimiques, telles que l'altération des minéraux, la minéralisation du C et N et l'activité enzymatique, sont plus intenses dans la rhizosphère que dans la matrice du sol (Phillips et Fahey, 2006; Séguin *et al.*, 2005; Courchesne et Gobran, 1997). Dans ces circonstances, ce microenvironnement est largement vu comme un « *hot spot* » biogéochimique (Hinsinger *et al.*, 2006; McClain *et al.*, 2003; Gobran *et al.*, 1998).

**Tableau 3.1.** Synthèse des différences observées entre la rhizosphère et la matrice du sol.

<b>Propriétés de la rhizosphère</b>	<b>Augmentation<sup>a</sup></b>	<b>Diminution<sup>a</sup></b>
<u>Propriétés physiques</u>		
Densité	X	
Porosité		X
Agrégation	X	
Viscosité	X	
Tension de surface		X
<u>Propriétés biologiques</u>		
Biomasse microbienne	X	
Activité microbienne	X	
Diversité microbienne	X	
<u>Propriétés chimiques</u>		
pH	X	X
Condition réductrice	X	X
Matière organique (solide et liquide)	X	
Macroéléments	X	X
Métaux traces	X	X

a Signale la tendance observée dans la rhizosphère comparativement à la matrice du sol.

### 3.2.1 Propriétés physiques

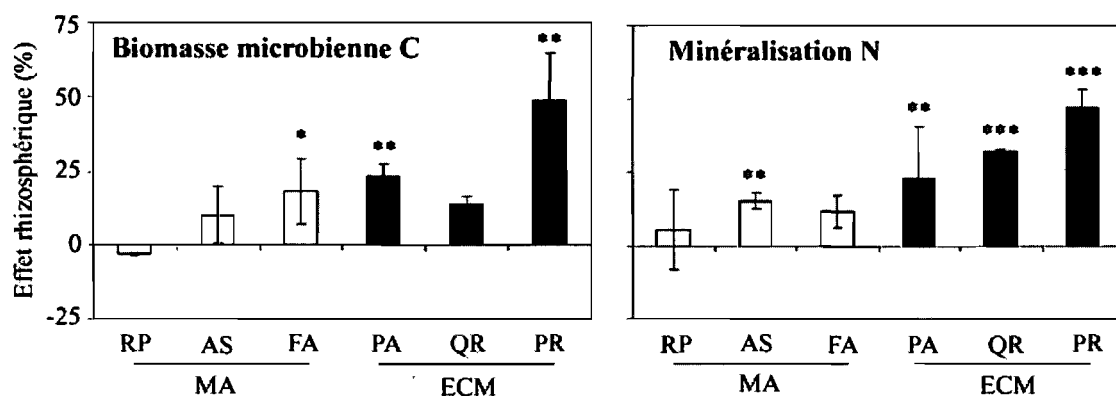
Dans un premier temps, la rhizosphère présente des propriétés physiques qui diffèrent de la matrice du sol. À ce jour, un nombre restreint d'études a montré ces différences qui se manifestent principalement au niveau de la structure du sol et des régimes hydrique et gazeux (Young, 1998). Tout d'abord, la croissance des racines modifie la structure du sol en augmentant la densité du sol ainsi qu'en diminuant sa porosité (Young, 1998; Bruand *et al.*, 1996; Dexter, 1987). Cet effet a été documenté par Bengough et Mullins

(1990) qui ont observé une relation inverse entre la densité du sol et le taux d'élongation des racines. Par ailleurs, des augmentations de densité pouvant atteindre jusqu'à 36 % et des diminutions de porosité de 24 % ont été observées entre l'interface sol-racine et la matrice du sol (Bruand *et al.*, 1996; Dexter, 1987). De plus, la libération de mucilage et de polysaccharides par les racines et les microorganismes favorise l'agrégation du sol et, par ricochet, améliore la structure du sol rhizosphérique (Czarnes *et al.*, 2000; Amellal *et al.*, 1998; Young, 1998). Finalement, le prélèvement d'eau par les racines ainsi que la libération de mucilages influencent les transferts d'eau et de gaz entre les phases solide et liquide de la rhizosphère, principalement en augmentant la viscosité de la solution de sol et en diminuant la tension à la surface des solides (Read *et al.*, 2003; Read et Gregory, 1997). L'ensemble de ces propriétés a un effet marqué sur le prélèvement de l'eau et des éléments nutritifs par les racines ainsi que sur l'établissement d'habitats susceptibles de supporter la croissance des microorganismes du sol (Hinsinger *et al.*, 2005; Young, 1998).

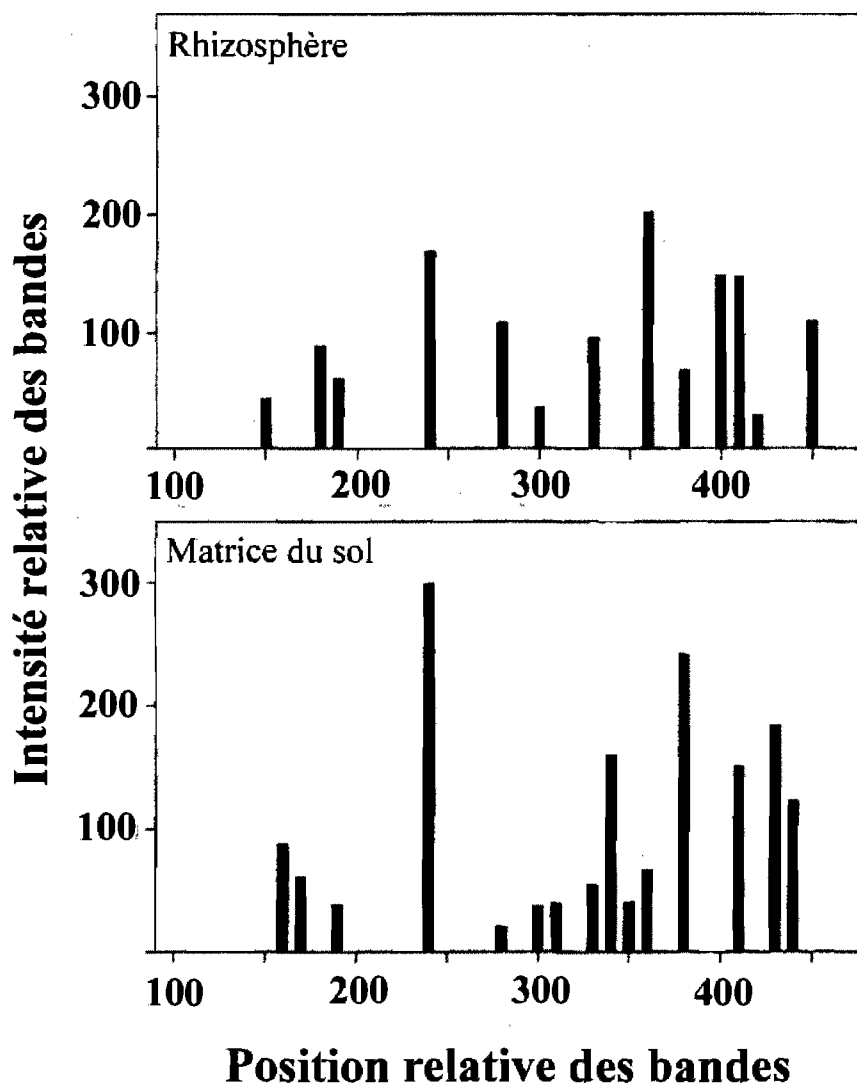
### 3.2.2 Propriétés biologiques

Les propriétés biologiques présentent aussi des différences marquées entre les compartiments du sol. Ainsi, des biomasses microbiennes jusqu'à 100 fois plus abondantes que dans la matrice du sol ont été mesurées dans la rhizosphère (Phillips et Fahey, 2006; Bennisse *et al.*, 2004; Grayston, 2000; Joergensen, 2000; Dandurand et Knudsen, 1997; Paul et Clark, 1996; Prescott *et al.*, 1995). Outre la biomasse microbienne, la richesse microbiologique de la rhizosphère se manifeste aussi par une intensification des réactions biologiques et enzymatiques à l'interface sol-racine (Figure 3.2) (Phillips et Fahey, 2006; Kandeler *et al.*, 2002; Marschner, 1998; Dormaar, 1988; Tarafdar et Jungk, 1987). Finalement, des différences marquées de composition des communautés microbiennes sont aussi observées entre les deux compartiments du sol (Benizri *et al.*, 2002; Kandeler *et al.*, 2002; Steer et Harris, 2000; Grayston, 2000). En effet, les résultats de Kandeler *et al.* (2002) confirment qu'il existe des différences significatives de composition microbienne entre la rhizosphère et la matrice du sol sous le maïs (*Zea mays* L.) et que ces différences sont identifiables jusqu'à une distance de 5 mm de la racine (Figure 3.3). Cette étude n'a toutefois pas procédé à une identification précise des microorganismes dans les deux compartiments du sol. Ces tendances

systématiques d'enrichissement en microorganismes et d'intensification de l'activité microbienne dans la rhizosphère s'expliquent par le fait que ce microenvironnement possède des conditions physico-chimiques favorisant la croissance microbienne dans cette interface, notamment la présence en abondance de MO facilement décomposable (Jones *et al.*, 2003 ; Paul et Clark, 1996).



**Figure 3.2.** Différences entre la rhizosphère et la matrice du sol pour la biomasse microbienne C et le taux de minéralisation N sous diverses essences d'arbres contenant des mycorhizes arbusculaires (MA) ou des ectomycorhizes (ECM). Les comparaisons entre les compartiments du sol sont établies à partir de la proportion de la différence entre la rhizosphère et la matrice du sol pour une propriété donnée. Les différences significatives sont indiquées par \* ( $p < 0.1$ ), \*\* ( $p < 0.05$ ) et \*\*\* ( $p < 0.001$ ). Les essences d'arbres représentées sont, respectivement, le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia* L.; RP), l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.; AS), le frêne blanc (*Fraxinus americana* L.; FA), l'épinette de Norvège (*Picea abies* L. Karst; PA), le chêne rouge (*Quercus rubra* L.; QR) et le pin rouge (*Pinus resinosa* Ait.; PR) (modifié de Phillips et Fahey (2006)).



**Figure 3.3.** Différences de compositions des communautés microbiennes entre la rhizosphère du maïs (*Zea mays* L., cv. Jumbo) et la matrice du sol (Kandeler *et al.*, 2002). Les profils des communautés microbiennes ont été obtenus à partir des bandes d'ADNr 16S analysées par la technique d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE). Les différences de composition des communautés microbiennes entre la rhizosphère et la matrice du sol sont visibles en comparant la position et l'intensité des bandes entre les deux compartiments du sol.

### 3.2.3 Propriétés chimiques

#### 3.2.3.1 *pH*

Le pH est, à ce jour, la propriété de sol ayant été la plus étudiée dans la rhizosphère. Les différences entre la rhizosphère et la matrice du sol peuvent atteindre jusqu'à deux unités de pH (Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner et Römheld, 1996). Les tendances observées dans les études antérieures montrent généralement une acidification de la rhizosphère en milieu alcalin alors qu'en milieu acide, l'acidification et l'alcalinisation de la rhizosphère ont toutes les deux été observées (Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Hinsinger *et al.*, 2003). Quatre mécanismes principaux régulant le pH ont été identifiés dans la rhizosphère. Il s'agit 1) du prélèvement des cations et des anions par les racines et les microorganismes, 2) de la respiration racinaire et microbienne, 3) de la production de réactions oxydoréductrice et 4) de la libération d'acides organiques par les racines et les microorganismes.

Le prélèvement des cations et des anions par les racines et les microorganismes est le mécanisme principal régulant la différence d'acidité entre la rhizosphère et la matrice du sol (Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner et Römheld, 1996). Ainsi, le prélèvement préférentiel de cations par les racines ou les microorganismes entraîne un déséquilibre de charge dans l'organisme et la solution de sol. Ce déséquilibre est compensé par le rejet de proton ( $H^+$ ) de l'organisme vers la solution de sol, menant à l'acidification de la rhizosphère. Inversement, le rejet d'ion  $OH^-$  en réponse au prélèvement préférentiel d'anions par les racines ou les microorganismes fera augmenter le pH de la rhizosphère (Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner et Römheld, 1996). Ce mécanisme est intimement lié à l'assimilation d'azote puisque les besoins nutritifs en cet élément sont élevés et qu'il peut être assimilé, à la fois, sous forme cationique (ammonium -  $NH_4^+$ ) ou anionique ( $NO_3^-$ ) (Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner et Römheld, 1996).

Parmi les autres mécanismes contrôlant le pH de la rhizosphère, la respiration des organismes vivants et les réactions d'oxydoréductions ont une influence marquée sur cette propriété. Toutefois, cette influence s'exprime uniquement sous certaines conditions. Ainsi, la production de  $CO_2$  lors de la respiration des organismes vivants favorise une acidification de la rhizosphère lorsque le  $H_2CO_3$ , composé produit par

l'assemblage du  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , se dissocie et libère des ions  $\text{H}^+$  dans la solution de sol. Cependant, cette dissociation du  $\text{H}_2\text{CO}_3$  s'effectue exclusivement à des pH supérieurs à 6,36 (Lindsay, 1979), indiquant par le fait même que ce mécanisme d'acidification est actif exclusivement dans les sols neutres à alcalins. Les réactions d'oxydoréduction liées au Fe, Mn, N et S consomment et produisent des ions  $\text{H}^+$  modifiant par le fait même le pH de la rhizosphère (Hinsinger *et al.*, 2003). L'action de ces réactions sur le pH de la rhizosphère est marquée lorsque l'ensemble de la rhizosphère se trouve dans un même état oxydoréducteur. Un exemple classique de cette situation concerne les sols qui sont saturés en eau une partie importante de l'année ou toute l'année, p. ex. culture de riz. Dans cette situation, les conditions réductrices dominant et vont fortement influencer le pH de la rhizosphère (Hinsinger *et al.*, 2003). Par contre, généralement, les conditions d'oxydation et de réduction sont présentes en même temps dans la rhizosphère. Leur influence sur le pH tend à s'annuler, réduisant du même coup leur effet sur le pH de la rhizosphère.

Finalement, la libération d'acides organiques par les racines ou les microorganismes contribue aussi à influencer le pH de la rhizosphère. Les acides organiques sont libérés dans la rhizosphère principalement sous formes anioniques. Ce phénomène s'explique par le fait que ces composés se dissocient lorsqu'ils se trouvent dans les parois cellulaires des organismes en raison des conditions alcalines de ces milieux (Hinsinger *et al.*, 2003). Une fois en solution, ces anions organiques vont se complexer aux ions  $\text{H}^+$  ce qui va entraîner la réduction de la forme libre de cet ion en solution faisant du même coup augmenter le pH du sol. Par ailleurs, chez les plantes formant des « clusters roots » comme le lupin (*Lupinus albus* L.), la libération d'anions organiques par les racines excède fortement ce que la plante prélève en ions (Dinkelaker *et al.*, 1989). Le déséquilibre ionique ainsi créé dans la solution de sol est compensé par la libération d'ions  $\text{H}^+$  par la plante, menant à une acidification de la rhizosphère. À l'heure actuelle, encore peu d'études ont quantifié l'importance que les acides organiques libérés par les racines et les microorganismes ont sur le pH de la rhizosphère. Néanmoins, les études s'y étant attardées ont observé que ce mécanisme varie beaucoup en fonction des espèces de plante et des sols étudiés (Hinsinger *et al.*, 2003), suggérant que l'influence des acides organiques sur le pH de la rhizosphère est complexe et encore mal compris.

### 3.2.3.2 Conditions oxydoréductrices

De plus, la rhizosphère est caractérisée par des conditions oxydoréductrices différentes de celles de la matrice du sol. Bien que le potentiel oxydoréducteur soit difficilement mesurable à l'interface sol-racine, des études antérieures ont montré, pour des sols bien aérés, que la respiration des racines et des microorganismes tend à diminuer la pression partielle de l'oxygène dans la rhizosphère (Hinsinger, 2001; Marschner, 1998; Marschner et Römheld, 1996). Ce phénomène favorise l'émergence de conditions réductrices dans ce microenvironnement. Inversement, en condition anaérobie, les plantes adaptées à ces environnements libèrent de l'oxygène dans la rhizosphère. Ce qui favorise l'apparition de conditions oxydantes à l'interface sol-racine, visibles par la présence de précipités d'oxyhydroxydes de Fe et de Mn (Hinsinger, 2001; Marschner et Römheld, 1996). Comme mentionnées dans la sous-section 3.2.3.1, les réactions d'oxydoréductions se produisant dans la rhizosphère ont une influence importante sur le pH de ce microenvironnement (Hinsinger *et al.*, 2003).

### 3.2.3.3 Matière organique

Comparativement à la matrice du sol, la rhizosphère présente un enrichissement en MO autant pour sa phase solide que liquide (Corti *et al.*, 2005; Legrand *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Wang et Zabowski, 1998; Gobran et Clegg, 1996). Cette accumulation de MO est attribuable à deux phénomènes. Premièrement, et comme mentionné plus haut (section 3.1), les racines des arbres ont tendance à occuper les anciens réseaux racinaires (Gobran *et al.*, 1999). Ces réseaux, en plus d'offrir un milieu de croissance aisé pour les racines, sont enrichis en MO et en éléments nutritifs résultant de la décomposition des racines mortes (Hinsinger *et al.*, 2005; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). La durée de vie moyenne des racines fines (< 2 mm) des arbres en forêt tempérée variant entre trois et 72 mois (Ostonen *et al.*, 2005; Matamala *et al.*, 2003; Tierney et Fahey, 2002; Fahey et Hughes, 1994), ces microsites seront régulièrement alimentés en MO rendant les conditions encore plus attrayantes pour les nouvelles racines ainsi que pour les microorganismes (Hodge, 2004).

**Tableau 3.2.** Caractérisation générale des rhizodépôts présentes dans la rhizosphère.

<b>Types de rhizodépôts</b>	<b>Principales substances<sup>a</sup></b>
<b>Substances gazeuses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CO<sub>2</sub></li> <li>○ Éthylène</li> <li>○ Cyanure d'hydrogène (HCN)</li> <li>○ Composés organiques volatils</li> </ul>
<b>Substances solubles (exsudats)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Sucres</li> <li>○ Acides aminés</li> <li>○ Acides organiques</li> <li>○ Acides gras</li> <li>○ stérols</li> <li>○ enzymes</li> <li>○ autres (vitamines et hormones)</li> </ul>
<b>Substances insolubles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Sécrétions</li> <li>○ Lysates</li> <li>○ Mucilages</li> </ul>

<sup>a</sup> D'après Nguyen (2003), Brimecombe *et al.* (2001), Jones (1998), Grayston *et al.* (1996), Bowen et Rovira (1991) et Smith (1976).

Deuxièmement, la rhizosphère est aussi alimentée en MO grâce à la libération, par les racines et les microorganismes, de substances organiques solubles et insolubles nommées rhizodépôts (Tableau 3.2). Ces rhizodépôts sont émises en quantité importante dans la rhizosphère puisqu'il a été établi que les plantes rejettent, sous forme de rhizodépôts, entre 10 et 50 % du carbone assimilé lors de la photosynthèse (Hinsinger *et al.*, 2005; Nguyen, 2003). Les rhizodépôts d'origine végétale sont donc considérés comme plus abondants dans la rhizosphère que celles produites par les microorganismes (Marschner et Römheld, 1996). Les substances organiques solubles se nomment exsudats et elles sont principalement composées d'acides aminés, d'acides organiques et de sucres (Brimecombe *et al.*, 2001; Grayston *et al.*, 1996; Bowen et Rovira, 1991; Smith, 1976). Ces composés sont une source de carbone de qualité pour les microorganismes puisque ces molécules sont facilement décomposables (Jones *et al.*, 2003; Fox, 1995). En raison de ces caractéristiques, l'enrichissement de la rhizosphère en microorganismes comparativement à la matrice du sol est directement lié à l'abondance des exsudats racinaires dans ce microenvironnement (Khan, 2005; Brimecombe *et al.*, 2001; Marschner et Römheld, 1996; Bowen et Rovira, 1991). Pour



leur part, les substances organiques insolubles sont principalement constituées de matériaux cellulaires tels les sécrétions, les lysats et les mucilages (Brimecombe *et al.*, 2001; Bowen et Rovira, 1991). La quantité et la composition des rhizodépôts libérés par les racines et les microorganismes dépendent de nombreux facteurs liés à l'espèce et au génotype de la plante, à la richesse nutritive du milieu, aux conditions environnementales ainsi qu'aux communautés microbiennes colonisant la rhizosphère (Nguyen, 2003; Brimecombe *et al.*, 2001; Marschner, 1998; Grayston *et al.*, 1996).

#### 3.2.3.4 Composition chimique de la rhizosphère en macroéléments et en métaux traces

Des différences de composition et de concentration des éléments chimiques entre la rhizosphère et la matrice du sol sont aussi observées. Premièrement, dans la phase solide du sol, les macroéléments et les métaux traces présentent des concentrations plus élevées dans la rhizosphère que dans la matrice du sol (Legrand *et al.*, 2005; Chaignon et Hinsinger, 2003; Chaignon *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Courchesne *et al.*, 2001; Arocena et Glowa, 2000; McGrath *et al.*, 1997). Les travaux récents menés à l'aide de techniques d'imagerie à haute résolution (*e.g.* TOF-SIMS,  $\mu$ XRF and XANES) et d'extractions spécifiques (*p. ex.* oxalate d'ammonium) montrent l'accumulation d'Al, Fe, Mn, de silicium (Si) et de métaux traces dans la phase solide de la rhizosphère de sols forestiers, principalement en étant associée à des minéraux secondaires de types oxyhydroxyde (Séguin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004). Ces résultats confirment que l'altération des minéraux est plus intense dans la rhizosphère que dans la matrice du sol (Séguin *et al.*, 2005; Courchesne et Gobran, 1997; April et Keller, 1990) en raison de l'activité combinée des racines et des microorganismes (Landeweert *et al.*, 2001; van Breemen *et al.*, 2000; Drever et Vance, 1994; Leyval et Berthelin, 1991).

Outre la phase solide du sol, la composition chimique des solutions de sols rhizosphériques a retenu passablement l'attention puisqu'il s'agit du principal réservoir nutritif des plantes et des microorganismes dans les sols. Dans un premier temps, les différences entre la rhizosphère et la matrice du sol ont été évaluées sur les concentrations totales en éléments chimiques. Les résultats montrent clairement que la rhizosphère est enrichie en Ca, Mg et sulfate ( $\text{SO}_4$ ) et appauvrie en  $\text{NO}_3$

comparativement à la matrice du sol. Cependant, pour de nombreux macroéléments ainsi que pour les métaux traces aucune tendance claire n'est observable. En effet, des résultats contrastés sont observés entre les études menées en laboratoire et sur le terrain. Les études de laboratoire montrent généralement un appauvrissement en Cd, Cu, K, phosphore (P) et Zn dans la rhizosphère (Hinsinger, 2001, 1998; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999; Lorenz *et al.*, 1997). Par contre, les études menées sur le terrain révèlent un enrichissement de la rhizosphère en Al, Cd, chlore (Cl), Cu, K,  $\text{NH}_4^+$ , Ni, Pb, sodium (Na) et Zn (Courchesne *et al.*, 2006; Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999; Gobran et Clegg, 1996). Cette disparité entre les études de terrain et de laboratoire semble s'expliquer par une plus grande hétérogénéité des sols sur le terrain. Celle-ci favorise la colonisation de microsites riches en éléments nutritifs par les racines et les mycorhizes (Hodge, 2004; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). Ces microsites sont généralement identifiés comme étant d'anciens réseaux racinaires présentant des teneurs élevées en MO et qui ont le potentiel d'alimenter la solution de sol de la rhizosphère en éléments nutritifs. Les expériences de laboratoire n'intègrent pas cet élément d'hétérogénéité naturelle puisqu'elles sont menées sur une trop courte période de temps pour favoriser la formation de microsites riches en éléments nutritifs et parce que le sol est homogénéisé avant l'expérience. De plus, les conditions nutritives en laboratoire sont généralement plus homogènes dues à la fertilisation appliquée au sol (Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999), limitant ainsi l'exploitation de microsites enrichis en nutriments par les racines et les mycorhizes.

Pour faire suite à la caractérisation des concentrations totales en métaux dans la solution de sol de la rhizosphère, certaines études ont comparé les portraits de spéciation des métaux entre les deux compartiments du sol. Les études traitant de ce sujet sont toutefois peu nombreuses. Néanmoins, une tendance générale semble ressortir des résultats de ces études. Cette tendance est indépendante du métal et de son comportement biogéochimique. La tendance générale observée chez ces métaux est que la part relative de la forme ionique libre dans le portrait de spéciation d'un métal tend à diminuer dans la rhizosphère comparativement à la matrice du sol. Cette tendance a été observée pour Al (Turpault *et al.*, 2005; Dieffenbach et Matzner, 2000), Cu (Legrand *et al.*, 2005) ainsi

que pour Cd et Zn (Knight *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1997; McGrath *et al.*, 1997). L'enrichissement de la rhizosphère en DOC en serait la cause principale puisque les substances composant la MOD possèdent un fort pouvoir de complexation des métaux (Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Dieffenbach et Matzner, 2000; Hamon *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'enrichissement de la rhizosphère en anions inorganiques peut aussi contribuer à augmenter la complexation des métaux dans ce microenvironnement. C'est le cas notamment pour  $F^-$  qui contribue à augmenter la complexation de l'Al (Turpault *et al.*, 2005) et de  $Cl^-$  pour le Cd (Smolders et McLaughlin, 1996b). Cette tendance n'est toutefois pas universelle puisque certaines études ont aussi observé des concentrations relatives des formes biodisponibles plus élevées dans la rhizosphère que dans la matrice du sol. C'est le cas entre autres de l'étude de Göttlein *et al.* (1999) qui a observé un enrichissement de la forme ionique libre d'Al ( $Al^{3+}$ ) dans la rhizosphère. Cette même tendance est aussi constatée pour les formes de Zn labile, identifiées comme la forme ionique libre et les formes ioniques faiblement liées aux anions inorganiques (Courchesne *et al.*, 2006). Des conditions plus acides dans la rhizosphère comparativement à la matrice du sol sont suggérées par les auteurs pour expliquer ces résultats.

À l'heure actuelle, très peu de données sur la spéciation des métaux sont disponibles dans la rhizosphère. Ceci s'explique, d'une part, par les nombreuses difficultés techniques rencontrées lorsqu'on veut mesurer la spéciation des métaux dans un environnement si petit et, d'autre part, par les nombreuses incertitudes analytiques qui existent concernant les mesures de spéciation des métaux. Cet important manquement permet d'expliquer, entre autres, pourquoi l'incidence de nombreux mécanismes rhizosphériques sur la spéciation des métaux est encore peu connue. Les avancées méthodologiques réalisées au cours de la dernière décennie permettent aujourd'hui d'avoir accès à des techniques de mesure de la spéciation des métaux plus fiables, p. ex. électrode spécifique et polarographie, et pouvant être utilisées dans les sols rhizosphériques. L'obtention de ces données est d'un grand intérêt puisqu'elle nous permettra d'identifier clairement les mécanismes rhizosphériques régulant le comportement biogéochimique des métaux à l'interface sol-racine. L'acquisition de ces connaissances permettra aussi de mieux comprendre et prédire les transferts de métaux

entre le sol et la plante, de pouvoir évaluer les risques écologiques potentiels associés aux métaux dans les écosystèmes et, ainsi, de lutter adéquatement pour réduire leur effet nuisible sur l'environnement (Courchesne *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2003a).

### **3.3 Mécanismes régulant la spéciation des métaux dans la rhizosphère**

Les différences de propriétés observées entre les deux compartiments du sol soulignent à quel point les mécanismes actifs dans la rhizosphère transforment ce microenvironnement. Ainsi, la spéciation des métaux dans la rhizosphère est régie par l'intensité de ces mécanismes (Hinsinger, 2001; Gobran *et al.*, 1998). Basés sur le modèle conceptuel de la rhizosphère (Figure 3.1), les mécanismes rhizosphériques influençant la spéciation des métaux peuvent avoir trois origines, p. ex. le sol, la plante ou les microorganismes. La présente section dresse donc l'état actuel des connaissances sur l'ensemble des mécanismes contrôlant la spéciation des métaux à l'interface sol-racine. Dans cette section, les mécanismes sont classés en fonction de leur entité d'origine où chacun d'entre eux sera présenté et discuté.

#### **3.3.1 Mécanismes édaphiques : rôle des propriétés des sols**

Les matériaux du sol influencent considérablement la concentration et la spéciation des métaux dans la rhizosphère. Dans ce microenvironnement, cette influence se manifeste à travers les mêmes mécanismes que l'on observe dans la matrice du sol et qui ont été présentés en détail dans les sous-sections 2.4.2 et 2.4.3. À titre d'exemple, le pH, autant dans la rhizosphère que dans la matrice du sol, est l'une des principales propriétés influençant la concentration totale et la spéciation des métaux dans la solution de sol. Son influence est importante puisque cette propriété agit, à la fois, dans la solution de sol en régulant la complexation des métaux avec les anions organiques et inorganiques et entre les phases solide et liquide du sol en contrôlant les mécanismes d'adsorption-désorption et précipitation-dissolution (Legrand *et al.*, 2005; Hinsinger *et al.*, 2003; Gobran *et al.*, 1999; Smith et Pooley, 1989). Toutefois, l'intensité des mécanismes régulant la biogéochimie des métaux dans la rhizosphère est supérieure à ce que l'on observe dans la matrice en raison de l'activité racinaire et microbienne (Séguin *et al.*, 2005; Gobran et Clegg, 1996). Ces nouvelles conditions font en sorte que l'influence de certains constituants du sol sur la biogéochimie des métaux est favorisée dans la

rhizosphère comparativement à la matrice du sol. La présente sous-section présentera comment ces constituants, la MO et les oxyhydroxydes, peuvent avoir un effet plus important sur les métaux dans la rhizosphère que dans la matrice du sol.

La MO est l'une des principales propriétés du sol influençant la biogéochimie des métaux dans la rhizosphère (Courchesne *et al.*, 2001; Gobran et Clegg, 1996). Cette influence de la MO se manifeste de deux façons. Dans un premier temps, le pouvoir de complexation important des molécules organiques solubles permet aux métaux de la rhizosphère d'être mobilisés et de se retrouver dans la solution de sol sous des formes complexées (Hinsinger, 2001; Jones, 1998). Ainsi, Legrand *et al.* (2005) ont identifié, à l'aide de régression multiple, que le COD explique significativement l'activité du  $\text{Cu}^{2+}$  de 13 sols rhizosphériques forestiers. La relation existant entre ces deux variables est inverse soulignant qu'une augmentation de COD favorise la complexation du Cu par des anions organiques, ce qui fait diminuer du même coup l'activité du  $\text{Cu}^{2+}$ . Ce type de relation a aussi été effectué dans la matrice du sol où elle ne montre, de manière quasi systématique, aucun lien significatif entre le  $\text{Cu}^{2+}$  et le COD (Nolan *et al.*, 2003b; Sauvé, 2002; Sauvé *et al.*, 2000a), soulignant par le fait même le rôle plus effacé de cette variable et de ce mécanisme. Dans la rhizosphère, ce mécanisme mobilisateur de métaux est principalement effectué par les acides organiques, les biosurfactants et les sidérophores qui sont présents en quantité plus importante que dans la matrice du sol (Jones, 1998; Marschner et Römheld, 1996). Par ailleurs, les composés organiques solides sont de puissants matériaux adsorbants permettant d'immobiliser des métaux sur la phase solide de la rhizosphère et d'ainsi réguler les concentrations de métaux dans la solution de sol. En raison des concentrations élevées de MO présentes dans la rhizosphère, l'action des composés organiques solides et liquides s'observe sur tous les métaux, même ceux reconnus pour présenter une affinité plus faible pour ces substances. C'est le cas, entre autres, du Cd et du Zn qui présentent des portraits de spéciation plus fortement régulés par le DOC dans la rhizosphère, alors que leur spéciation dans la matrice du sol est peu contrôlée par ces substances (Lorenz *et al.*, 1997; Hamon *et al.*, 1995).

L'intensification de l'altération des minéraux dans la rhizosphère comparativement à la matrice du sol est aussi observée (Séguin *et al.*, 2005; Courchesne et Gobran, 1997; Leyval et Berthelin, 1991; April et Keller, 1990). Par ce phénomène, les principaux métaux constituant les minéraux, tels l'Al, Fe et Mn, sont libérés en grande quantité dans le sol, alors que les métaux traces, p. ex. Cd, Cu, Ni, Pb et Zn, sont mobilisés en plus faible quantité. En raison de la faible solubilité de l'Al, Fe et Mn, ces métaux auront tendance à précipiter formant ainsi des minéraux secondaires, tels que les oxyhydroxydes, qui s'accumulent à l'interface sol-racine (Séguin *et al.*, 2005; April et Keller, 1990). L'enrichissement de la rhizosphère en ces minéraux secondaires exerce une influence importante sur le comportement biogéochimique des métaux traces dans ce microenvironnement. En effet, les oxyhydroxydes stimulent la rétention des métaux dans les sols par des mécanismes telles l'adsorption ou la co-précipitation (Séguin *et al.*, 2005; McBride, 1989). Ce phénomène a été observé pour le Cobalt, Cu, Pb et Zn (Séguin *et al.*, 2005; Violante *et al.*, 2005). Il tend à jouer un rôle significatif à des pH supérieurs à 5,0, rôle qui ne cesse d'augmenter avec le pH puisque les charges de surface des oxyhydroxydes deviennent de plus en plus négatives, ce qui favorise la rétention des cations métalliques (Violante *et al.*, 2005; McBride, 1989).

### 3.3.2 Mécanismes racinaires

La concentration et la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère s'expliquent en grande partie par l'action des racines. Des groupes de mécanismes rhizosphériques influençant les métaux, les mécanismes racinaires sont ceux ayant retenu la plus grande attention. L'influence des racines sur les métaux se manifeste à la fois sur les concentrations totales dans la solution de sol et sur leur spéciation. Néanmoins, le rôle joué par les mécanismes racinaires sur la spéciation des métaux a été quelque peu négligé et peu documenté par rapport aux effets portant sur les concentrations totales de métaux dans la solution de sol (Hinsinger, 2001; Marschner et Römheld, 1996). Les mécanismes racinaires influençant les métaux dans la solution de sol sont exposés à la Figure 3.4.

## Racine    Solution de sol    Phase solide

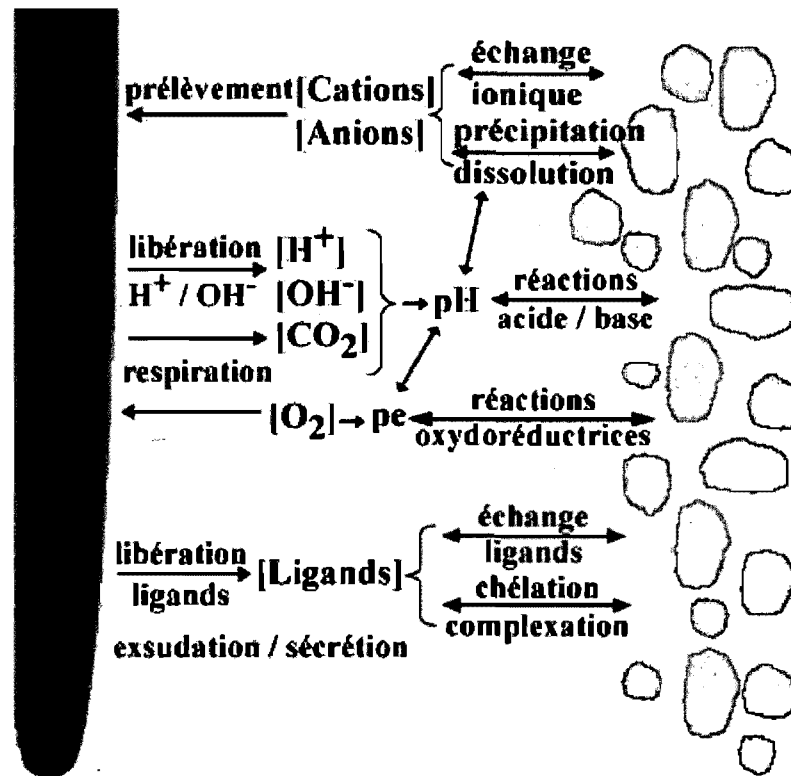


Figure 3.4. Principaux mécanismes d'origine racinaire influençant la concentration et la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère (modifié de Hinsinger *et al.* (2005)).

Tout d'abord, l'assimilation d'ions par les racines permet d'alimenter la solution de sol de la rhizosphère en métaux (Figure 3.4). Ce prélèvement d'ions par les racines bouleverse considérablement la composition chimique de la solution de sol de la rhizosphère. Si le prélèvement de métaux par les racines est combiné à un prélèvement d'eau, un déficit volumétrique entre la solution de sol de la rhizosphère et de la matrice s'observe. Le rétablissement de ce déficit se produit par le transport de solution de la matrice vers la rhizosphère. Lors du transport de solution, des ions sont aussi déplacés vers la rhizosphère. Ainsi, par le biais de ce mécanisme, nommé écoulement massique, la solution de sol de la rhizosphère est alimentée en ions métalliques provenant de la matrice du sol (Hinsinger, 2001, 1998). Dans les sols rhizosphériques de plantes prélevant d'importantes quantités d'eau comme les arbres, les métaux sont transportés dans la solution de sol de la rhizosphère à un taux supérieur à leur prélèvement par les

racines. Il s'ensuit donc un enrichissement progressif de la rhizosphère en métaux dissous par rapport à la matrice du sol. Ce phénomène a été observé pour Al, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb et Zn dans la fraction dissoute de la rhizosphère de plusieurs espèces d'arbres (Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Courchesne *et al.*, 2001). Par contre, les métaux peuvent aussi être transportés dans la solution de sol de la rhizosphère à un taux inférieur à leur prélèvement par les racines, ce qui provoque un appauvrissement de la rhizosphère en métaux. Cette situation se produit dans les sols rhizosphériques de plantes prélevant des quantités normales d'eau, p. ex. herbacées et plantes cultivées (Hinsinger, 2001, 1998; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). L'appauvrissement de la solution de sol de la rhizosphère en métaux produit un gradient de concentration des ions métalliques entre les phases liquides de la rhizosphère et de la matrice. Ce gradient produit un mouvement d'ions de la zone la plus concentrée (solution de sol de la matrice) vers la zone la moins concentrée (solution de sol de la rhizosphère). Ce mécanisme se nomme la diffusion (Hinsinger, 2001, 1998). En combinaison avec les mécanismes d'écoulement massique et de diffusion, les réactions existant entre les phases liquide et solide du sol, p. ex. échanges ioniques et dissolution/précipitation (voir sous-section 2.4.3), seront, elles aussi mises à profit afin de rétablir le bouleversement occasionné dans la solution de sol par le prélèvement d'ions et d'eau par les racines (Figure 3.4).

Deuxièmement, le contrôle exercé par l'activité racinaire sur le pH de la solution de sol représente un mécanisme important de régulation des concentrations totales et de la spéciation des métaux dans la rhizosphère. Celui-ci s'effectue par la libération dans la solution de sol de protons, d'ions OH<sup>-</sup> et de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) ainsi que par la consommation O<sub>2</sub> par les racines (Figure 3.4). La sous-section 3.2.3.1 explique en détail comment les mécanismes racinaires régulent le pH de la rhizosphère. Le contrôle du pH par les racines influence la concentration et la spéciation des métaux dans la rhizosphère en régulant le mécanisme de complexation des métaux dans la solution de sol (voir sous-section 2.4.2) et les mécanismes d'adsorption-désorption, dissolution-précipitation et les réactions d'oxydoréduction entre les phases solide et liquide du sol (voir sous-section 2.4.3).



Finalement, la libération d'exsudats racinaires influence aussi fortement la concentration et la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère (Figure 3.4). Les sous-sections 2.4.2 et 2.4.6.2 expliquent en détail comment les exsudats microbiens influent sur les métaux, cette information peut être transposée aux exsudats racinaires. De manière plus précise, leur pouvoir complexant permet de mobiliser les métaux et de favoriser l'émergence de formes métalliques complexées (Legrand *et al.*, 2005; Hinsinger, 2001; Jones, 1998; Marschner et Römheld, 1996). Les acides organiques, les biosurfactants et les sidérophores sont les composés ayant les effets les plus documentés. Ainsi, ces composés sont reconnus pour mobiliser les métaux grâce à leurs pouvoirs complexant et acidifiant observés, notamment, chez Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn (Hinsinger, 2001; Jones, 1998; Marschner et Römheld, 1996; Fox, 1995). L'influence sur la spéciation des métaux est reconnue comme un moyen utilisé par les plantes, d'une part, pour diminuer la biodisponibilité et la toxicité de certains métaux dans la rhizosphère (Jones, 1998) et, d'autre part, pour mobiliser certains métaux en vue de permettre leur assimilation par les plantes (Marschner et Römheld, 1996).

### 3.3.3 Mécanismes microbiens

Comparativement aux mécanismes d'origine racinaire, l'effet des microorganismes de la rhizosphère sur les métaux a été peu étudié. Deux raisons principales expliquent cet état de fait. Tout d'abord, l'étude de la rhizosphère est relativement récente et a pris de l'expansion uniquement depuis le début des années 80. Au début, la racine était considérée comme l'entité principale régulant les réactions à l'interface sol-racine (Marschner et Römheld, 1996; Bowen et Rovira, 1991). Dans ces conditions, les premiers travaux se sont concentrés sur le rôle joué par les racines sur l'environnement édaphique. De plus, les connaissances associées à l'écologie des microorganismes et à leur incidence sur les cycles biogéochimiques des métaux étaient, il y a à peine quelques décennies, restreintes en raison de contraintes techniques rendant difficile la caractérisation des communautés microbiennes et l'identification de leur rôle écologique. Cependant, l'acquisition de connaissances au cours des dernières années a permis de montrer que les microorganismes transforment considérablement les écosystèmes de la planète et sont à la base de tous les cycles biogéochimiques des éléments (Madsen, 2005; Newman et Banfield, 2002; Silver, 1998). De plus, les progrès

technologiques permettent maintenant de quantifier adéquatement les mécanismes microbiens, l'activité enzymatique et d'identifier les communautés microbiennes de la rhizosphère (Madsen, 2005; Newman et Banfield, 2002). Ainsi, depuis quelques années, les études rhizosphériques portant sur la caractérisation de mécanismes microbiens sont en pleines expansions. Cet essor se concentre toutefois principalement autour de réactions se produisant dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore en raison du caractère essentiel de ces macroéléments pour la vie sur la terre.

En ce qui concerne les métaux, peu d'études et d'informations portant directement sur la rhizosphère sont disponibles. Cependant, les études menées sur la matrice de sol sont d'une grande utilité puisqu'elles ont identifié un ensemble de mécanismes microbiens agissant, à l'échelle cellulaire, sur la mobilité des métaux (voir sous-section 2.4.6.2). Les mécanismes identifiés par ces études sont généralement actifs dans la rhizosphère. Cependant, leur transposition dans ce microenvironnement ne peut être faite directement puisque les communautés microbiennes (Kandeler *et al.*, 2002; Grayston, 2000) et l'intensité des réactions biogéochimiques (Phillips et Fahey, 2006; Séguin *et al.*, 2005; McClain *et al.*, 2003) diffèrent entre ces deux compartiments du sol. Par ailleurs, les interactions existant entre les microorganismes et les racines n'ont pas cours dans la matrice du sol et peuvent avoir un effet considérable sur la mobilité des métaux dans la rhizosphère. L'ensemble de ces observations suggère que les microorganismes évoluant dans la rhizosphère ont la possibilité d'interagir avec l'environnement édaphique et d'influencer la mobilité des métaux. Quelques études rhizosphériques récentes, menées sous différentes espèces de plantes, confirment cette hypothèse, notamment pour As, Cd, césium (Cs), Cr, Ni, Pb, pour de nombreux éléments ultratrace et, dans une moindre mesure, pour Al, Cu, Fe et Zn (Chen *et al.*, 2005; Fomina *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2005; Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Meharg, 2003; So *et al.*, 2003; Landeweert *et al.*, 2001; Leyval et Joner, 2001). Les mycorhizes, notamment les ectomycorhizes et les mycorhizes de type éricoïdes, sont les principaux microorganismes influençant la spéciation des métaux dans la rhizosphère. Par ailleurs, les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus* et *Leptothrix* ont aussi été identifiées comme des acteurs jouant un rôle important sur la biogéochimie des métaux dans la rhizosphère (Fomina *et al.*, 2005; Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Meharg, 2003;

Leyval et Joner, 2001). Bien que les mécanismes d'action soient très diversifiés, les principaux mécanismes microbiens observés dans la rhizosphère sont l'immobilisation des métaux par la biosorption et la bioaccumulation ainsi que la mobilisation des métaux par la production de composés acides et complexants. La production de réactions d'oxydoréduction par les microorganismes influence aussi la biogéochimie de nombreux métaux (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

Ces études fournissent des informations précieuses sur l'aptitude des microorganismes à mobiliser ou immobiliser les métaux. Ces connaissances sont toutefois encore incomplètes principalement pour trois raisons. Tout d'abord, les mécanismes microbiens dans la rhizosphère sont encore peu documentés pour de nombreux métaux, tels Al, Cu et Zn qui exercent une influence importante sur les écosystèmes. En effet, leur abondance dans les sols est élevée en raison de l'existence d'importantes sources naturelles et anthropiques de ces métaux (Kabata-Pendias, 2001; Nriagu, 1989). Leur présence importante dans la solution des sols peut entraîner de nombreux problèmes de toxicité pour les plantes (Kabata-Pendias, 2001). La compréhension de leur biogéochimie dans la rhizosphère est donc essentielle afin de pouvoir agir pour limiter leur effet néfaste dans l'environnement. Deuxièmement, jusqu'à maintenant les mécanismes microbiens identifiés ont permis de documenter les changements d'état des métaux entre les phases solide et liquide de la rhizosphère. Ces mécanismes ont toutefois été peu corrélés à des données de spéciation de métaux dans la solution de sol. Pourtant, il est anticipé que l'action des microorganismes sur les métaux se manifeste aussi par des changements de spéciation dans la solution de sol. La compréhension des mécanismes régissant la spéciation des métaux est d'un grand intérêt puisque le prélèvement des métaux par les racines des plantes se produit principalement dans cette phase du sol et sur certaines formes chimiques précises des métaux. Finalement, la majorité des études se sont appliquées à isoler un à un les mécanismes microbiens actifs dans la rhizosphère à l'aide d'études menées en milieu contrôlé, p. ex. sur culture ou sol (Chen *et al.*, 2005; Fomina *et al.*, 2005; So *et al.*, 2003). D'une part, les résultats des études menées en milieux contrôlés sont généralement peu représentatifs de la réalité. L'absence d'étude rhizosphérique menée en milieu naturel sur ce sujet apparaît donc comme une lacune importante à corriger qui permettrait de mieux comprendre le rôle

que les microorganismes jouent sur les métaux dans la rhizosphère. D'autre part, en milieux naturels en raison de la grande hétérogénéité du milieu, il est anticipé que plusieurs mécanismes microbiens agissent sur les métaux dans la rhizosphère et que ces actions peuvent être antagonistes ou synergiques. Or, actuellement, peu d'informations sont disponibles quant à l'intensité et la polarité de l'effet net de l'ensemble de la communauté microbienne sur la spéciation des métaux dans la rhizosphère. Un début de réponse est livré par une étude récente menée en laboratoire sur le maïs, le soja, les pois et le blé (Tao *et al.*, 2005). Cette étude a observé une augmentation de la fraction échangeable de Cu, de la fraction associée aux minéraux carbonatés pour le Cd et de la fraction associée aux oxydes de Fe et Mn amorphes pour le Pb dans la rhizosphère de sols non stériles comparativement aux mêmes sols une fois stérilisés. Ce résultat n'est toutefois pas clairement expliqué par les auteurs, ils l'attribuent néanmoins à l'interaction complexe existant entre les exsudats racinaires, les microorganismes et les métaux. Cette étude est l'une des premières à déterminer l'influence nette des communautés microbiennes rhizosphériques sur les métaux. L'information fournie est pertinente, mais demeure associée aux métaux présents sur la phase solide des sols et non pas sur les métaux présents dans la solution de sol. L'acquisition de ces connaissances permettrait d'avoir une meilleure compréhension du rôle des microorganismes sur la spéciation des métaux dans la solution de sol et ainsi d'améliorer les connaissances actuelles sur les transferts de métaux entre le sol rhizosphérique et la plante (Courchesne *et al.*, 2008).

## **CHAPITRE 4. Objectifs de recherche et approche méthodologique**

---

### **4.1 Principaux enjeux de l'étude de la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers**

Les rejets anthropiques de métaux dans l'environnement ont contribué à augmenter de façon significative les concentrations de métaux dans les sols forestiers (Kabata-Pendias, 2001; Derome et Nieminen, 1998). En raison de ce phénomène, les risques d'exposition des plantes à des concentrations toxiques de métaux ont augmenté dans ces écosystèmes. Afin d'évaluer adéquatement les risques écologiques associés aux métaux dans les milieux forestiers, une compréhension précise des mécanismes régulant les transferts de métaux entre le sol et les plantes est nécessaire. Or, chez les plantes, le prélèvement des nutriments et des métaux est principalement assuré par les racines. Dans ces circonstances, la rhizosphère est donc le compartiment du sol à considérer afin d'améliorer les connaissances quant aux mécanismes régulant le prélèvement des métaux par les plantes (Courchesne *et al.*, 2006).

Actuellement, le transfert de métaux entre le sol rhizosphérique et la plante est encore mal compris. Plusieurs facteurs permettent d'expliquer cet état de fait, notamment une compréhension limitée des mécanismes intervenant sur les métaux dans la rhizosphère ainsi que des processus de prélèvement des métaux par les plantes. En ce qui concerne le comportement des métaux dans la rhizosphère, trois principales lacunes peuvent être identifiées. Tout d'abord, peu d'études ont quantifié la concentration et la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère. Pourtant, il s'agit des formes de métaux les plus biodisponibles de ce microenvironnement. Sans une quantification précise et complète de la spéciation des métaux dans cette interface, et ce, pour plusieurs types d'environnement, il devient impossible d'évaluer précisément le transfert des métaux entre le sol et la plante.

Deuxièmement, l'identification et la compréhension des mécanismes rhizosphériques influençant la spéciation des métaux sont incomplètes. En effet, à l'heure actuelle, les études rhizosphériques se sont principalement concentrées sur l'influence exercée par les propriétés du sol et les mécanismes racinaires sur la spéciation des métaux. En comparaison, l'influence associée aux microorganismes de la rhizosphère a retenu beaucoup moins d'attention, bien que ces organismes soient reconnus comme l'un des constituants essentiels de ce microenvironnement. Néanmoins, des études récentes ont mis en évidence certains mécanismes et le rôle de certaines espèces microbiennes de la rhizosphère sur la spéciation des métaux (voir sous-sections 2.4.6 et 3.3.3). Les connaissances provenant de ces travaux fournissent un regard nouveau et pertinent sur les mécanismes actifs dans la rhizosphère, faisant entrevoir un vaste domaine de recherche dont une large part demeure à ce jour inexplorée.

Finalement, les études rhizosphériques antérieures portant sur la spéciation des métaux ainsi que sur le rôle exercé par les microorganismes ont généralement été menées en laboratoire ainsi que sur des espèces de plantes cultivables ou hyperaccumulatrices de métaux. Les résultats de ces recherches sont difficilement transférables aux milieux forestiers puisque les conditions dans lesquelles ces études ont été menées, *p. ex.* études de laboratoire menées sur des cultures agar, hydroponique ou des systèmes édaphiques simples, ne sont pas représentatives de la majorité des environnements forestiers. En effet, les conditions naturelles présentent une réalité beaucoup plus complexe contrôlée par une multitude de facteurs environnementaux comparativement aux études de laboratoire. Pour ces raisons, les populations microbiennes et leurs activités peuvent présenter des différences importantes entre ces environnements (Madsen, 2005), influençant du même coup l'intensité et la polarité des mécanismes microbiens agissant sur les métaux. Ainsi, avant d'appliquer les connaissances obtenues en milieux contrôlés aux environnements forestiers, une validation de ces informations par des travaux menés en milieux naturels est nécessaire. Cette étape est cruciale afin d'assurer la compréhension et la généralisation des mécanismes rhizosphériques influençant la spéciation des métaux, de leur influence sur les transferts de métaux entre le sol et les plantes et des risques écologiques qui leur sont associés.

## 4.2 Objectifs de l'étude

Le présent projet de doctorat se veut être une étude pionnière qui tente d'apporter des éclaircissements quant aux lacunes identifiées précédemment. À ce titre, la thèse documente la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers ainsi que l'influence qu'exercent les microorganismes de la rhizosphère sur la spéciation des métaux. Dans ce contexte, les objectifs spécifiques de la thèse sont :

1. de chiffrer la spéciation des métaux dans la rhizosphère et la matrice de sols forestiers,
2. de quantifier l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux dans la rhizosphère et la matrice de sols forestiers, et
3. d'identifier les variables et les mécanismes d'origine microbienne influençant la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers.

Pour atteindre ces objectifs, l'approche scientifique utilisée dans ce projet a combiné des mesures directes des formes les plus réactives de métaux, la spéciation des métaux par modélisation et l'utilisation d'analyses statistiques multivariées pour présenter, décrire et interpréter les relations observées entre les variables. De plus, ce projet de recherche se concentre sur l'étude de la spéciation des métaux Cu, Zn et Al dans la solution de sol de la rhizosphère. Deux raisons principales motivent le choix de ces métaux dans la présente étude. Tout d'abord, ces trois métaux ont des comportements biogéochimiques contrastés et, par le fait même, ils présentent des différences de spéciation marquées (Tableau 4.1). En raison de ces différences biogéochimiques, il est anticipé que l'intensité de l'effet des microorganismes variera d'un métal à l'autre de même que la nature des mécanismes microbiens impliqués. L'étude de ces trois métaux permettra donc de dresser un portrait d'ensemble de l'influence des microorganismes en étudiant la spéciation de métaux distincts dans la rhizosphère. Deuxièmement, pour ces trois métaux, des techniques analytiques validées, fiables et accessibles permettent de mesurer les concentrations des formes biodisponibles. Une quantification de ces formes est particulièrement pertinente puisqu'elle permet de mesurer directement les formes chimiques d'un métal qui interagissent avec les organismes vivants du sol et qui peuvent être potentiellement toxiques. L'existence de techniques de mesure de spéciation bien développées pour Cu, Zn et Al a favorisé le choix de ces métaux comparativement à

d'autres, pour lesquels les techniques de mesure de spéciation sont encore au stade expérimental. Dans ce contexte, l'activité de  $\text{Cu}^{2+}$  a été mesurée par électrode spécifique (ISE) et les concentrations des formes réactives de Zn et Al, identifiées comme la forme ionique libre et les formes liées faiblement aux anions inorganiques, ont été mesurées, respectivement, par polarographie et colorimétrie.

**Tableau 4.1.** Caractérisation du comportement biogéochimique des trois métaux à l'étude.

<b>Propriétés</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Al</b>	<b>Références</b>
<b>Budgets en milieux forestiers (intrant - extrant)</b>	+	+/-	-	Tableau 2.2
<b>Nutriments</b>	Oui	Oui	Non	104 <sup>a</sup>
<b>Concentration dans le sol (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>	< 100	< 100	$\geq 10\ 000$	53
<b>Concentration dans la solution de sol (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	$\leq 10^{-6}$	$\leq 10^{-4}$	$10^{-4} - 10^{-6}$	104, 192
<b>Accumulation préférentielle dans la plante</b>	Biomasse souterraine	Biomasse aérienne	Biomasse souterraine	99, 104
<b>Affinité pour la MO</b>	Forte	Faible	Forte	53
<b>Formes chimiques dominant la spéciation</b>	Complexes organiques	Forme ionique libre	Complexes organiques et inorganiques	128, 129, 185, 235

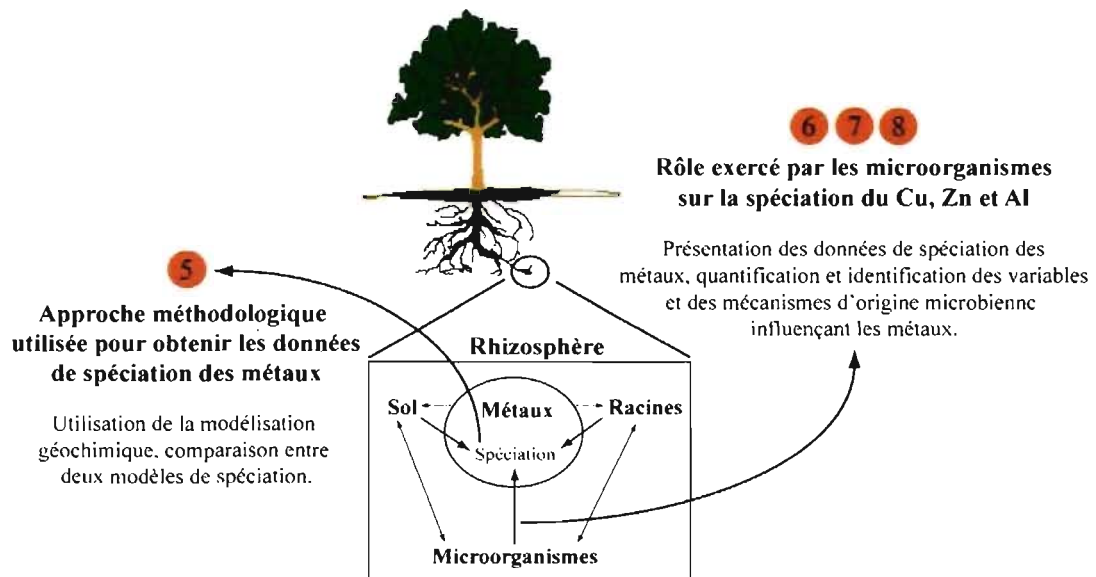
a Voir les références numérotées de la bibliographie.

Le caractère original de cette thèse tient à trois points. Tout d'abord, une approche *in situ* d'échantillonnage est appliquée à cette étude. À ce sujet, l'échantillonnage de la rhizosphère s'effectue, d'une part, sur le terrain et, d'autre part, sous une espèce arborescente. Ces deux éléments sont rarement rencontrés dans les études rhizosphériques sur les métaux qui, pour la plupart, se concentrent sur des plantes cultivables ou hyperaccumulatrices de métaux et sur des rhizosphères créées en laboratoire. De plus, cette étude documente la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère. Encore une fois, peu d'études antérieures ont présenté ce type de données dans la rhizosphère. Finalement, la dernière originalité de cette thèse concerne



le fait qu'elle documente le rôle des microorganismes sur la spéciation des métaux. Cette influence des microorganismes sur la spéciation des métaux a été négligée par le passé, puisque les études antérieures ont privilégié une compréhension des propriétés des sols et des mécanismes racinaires intervenant sur la biogéochimie des métaux dans ce microenvironnement. L'ensemble de ces contributions permettra de mieux comprendre les mécanismes régulant la spéciation des métaux dans la rhizosphère.

Les nouvelles connaissances acquises relativement aux différents objectifs de ce projet de recherche seront présentées dans les prochains chapitres de la thèse (Figure 4.1). Ainsi, le chapitre cinq décrit la méthodologie propre à l'acquisition des données de spéciation des métaux en plus de présenter les données chimiques de base, les concentrations totales de Cu, Zn et Al et l'activité du  $\text{Cu}^{2+}$  mesurées dans les fractions dissoutes de la rhizosphère et de la matrice du sol. Les chapitres six à huit sont consacrés, respectivement, aux métaux Cu, Zn et Al. L'ordre de traitement des métaux dans la thèse est totalement arbitraire et reflète l'ordre chronologique dans lequel ces métaux ont été mesurés en fonction de l'accessibilité des appareils de mesure de spéciation des métaux. Dans chacun de ces chapitres, les données de spéciation du métal, les données biologiques et les analyses statistiques permettant de répondre aux trois objectifs de la thèse sont présentées et discutées en détail. En guise de chapitre de conclusion, le chapitre neuf fait un retour sur les principaux résultats présentés dans la thèse, il effectue une comparaison des résultats entre les métaux et il identifie les principales originalités, limites et perspectives futures liées à ce projet. Les chapitres cinq à huit de cette thèse sont présentés sous forme d'articles scientifiques, alors que le chapitre neuf conserve un format plus classique.



**Figure 4.1.** Organisation de l'information recueillie et présentée dans cette thèse en fonction du corpus théorique décrivant les mécanismes rhizosphériques influençant la spéciation des métaux. L'information recueillie se distribue dans les différents chapitres de la thèse indiqués dans cette figure par les cercles rouges.

### 4.3 Stratégie d'échantillonnage

Pour répondre aux objectifs du projet, trois critères ont été formulés afin d'orienter le choix de la technique d'échantillonnage et des sites d'étude. Tout d'abord, la rhizosphère et la matrice du sol ont toutes les deux été échantillonnées afin de pouvoir comparer les données de spéciation des métaux et l'influence des variables microbiennes sur les métaux entre ces deux compartiments du sol. Ces comparaisons entre la rhizosphère et la matrice du sol sont à la base des deux premiers objectifs du projet de recherche. Pour cette raison, le choix d'une technique d'échantillonnage de la rhizosphère et de la matrice du sol fiable et éprouvée permettant de bien faire ressortir les différences entre ces deux compartiments du sol, s'il y en a, a été privilégiée. La sous-section 4.5 décrit en détail la technique d'échantillonnage des sols qui a été utilisée dans cette thèse.

De plus, il est important d'avoir des échantillons de sols dont les propriétés couvrent un large spectre afin d'obtenir une vaste gamme de conditions de concentration et de

spéciation des métaux dans les sols. Ceci permettra d'extraire et de généraliser plus facilement les relations existant entre l'activité microbienne et la spéciation des métaux. Pour s'assurer d'obtenir des variations de concentrations des métaux dans les sols, un échantillonnage de ceux-ci à proximité de différentes sources anthropiques de métaux et à différentes distances de ces sources a été favorisé. Finalement, pour obtenir des variations de spéciation des métaux dans les sols, l'échantillonnage de sols possédant des propriétés physico-chimiques contrastées, p. ex. pH et MO, a été effectué.

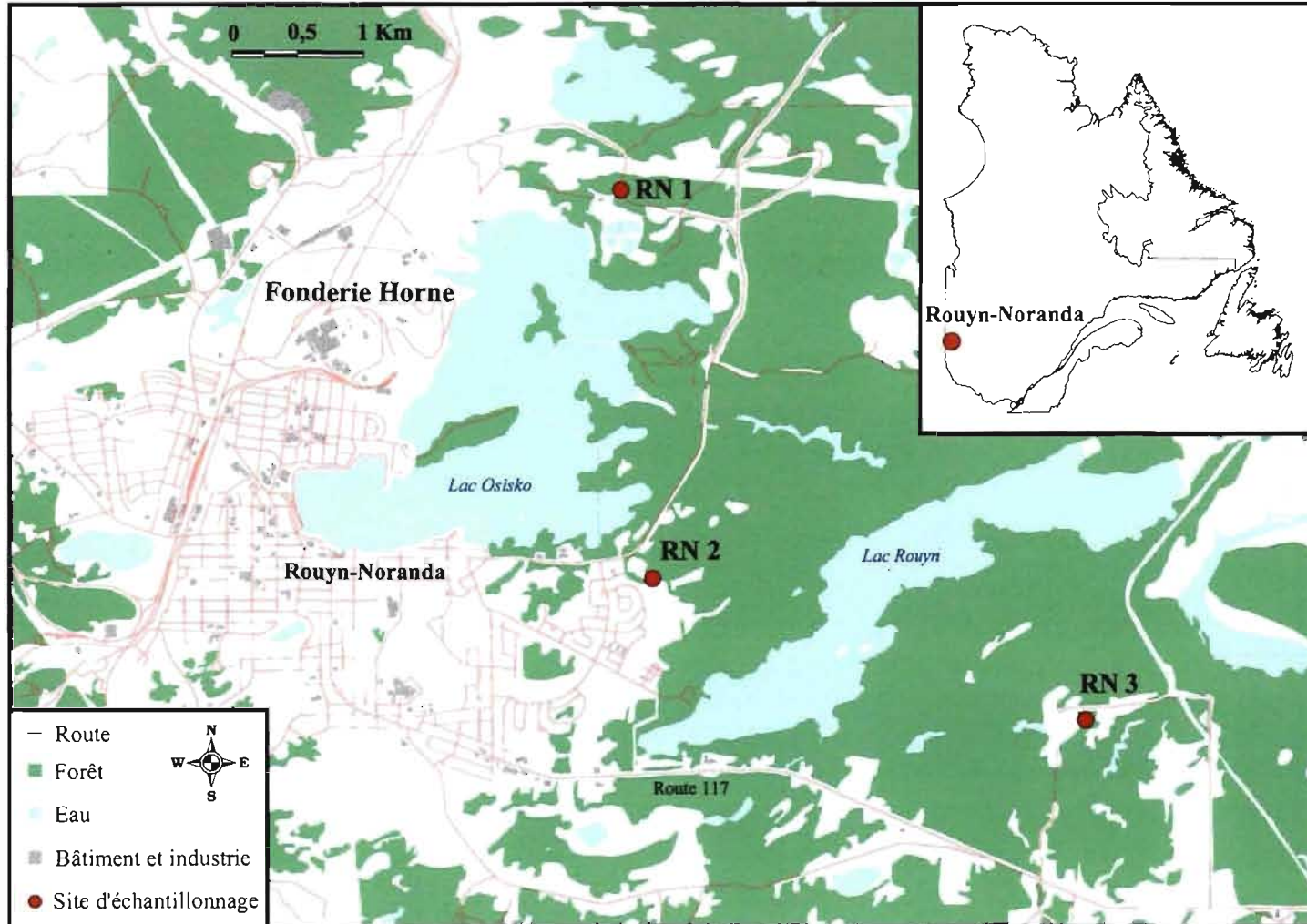
#### **4.4 Sites d'études**

Les critères énumérés ci-dessus ont permis de déterminer des lieux d'échantillonnages adéquats pour le projet. Ainsi, deux régions d'échantillonnages ont été sélectionnées. Celles-ci présentent de nombreuses similarités environnementales (topographie, texture des sols, végétation) tout en possédant des différences marquées de pH et, dans une moindre mesure, de MO. À ce titre, trois sites ont été échantillonnés à proximité de la municipalité de Rouyn-Noranda (RN) et trois autres sites l'ont été dans la région de la Montérégie (MTG).

##### **4.4.1 Campagne d'échantillonnage de Rouyn-Noranda**

La première campagne d'échantillonnage a été menée à Rouyn-Noranda qui se situe à environ 600 km au nord-ouest de Montréal, Canada (48° 14'N, 79° 01'W). Les moyennes climatiques de la station météorologique la plus proche, située à Val-d'Or (100 km de RN), font état d'une température annuelle moyenne de l'air de 1.2 °C et de précipitation totale de 936 mm pour la période de 1971-2000 (Environnement Canada, 2008). Dans cette région, les sols forestiers entourant la municipalité reçoivent, depuis 1927, des quantités importantes de métaux provenant de la fonderie de Cu *Horne*. En raison des rejets anthropiques de métaux dans l'atmosphère, des concentrations anormalement élevées en métaux sont détectées jusqu'à 24.5 km de la fonderie, pour les sols organiques et les horizons de surfaces (Dumontet *et al.*, 1990), et jusqu'à 2 km de la fonderie pour les horizons minéraux des sols (Dumontet *et al.*, 1992).

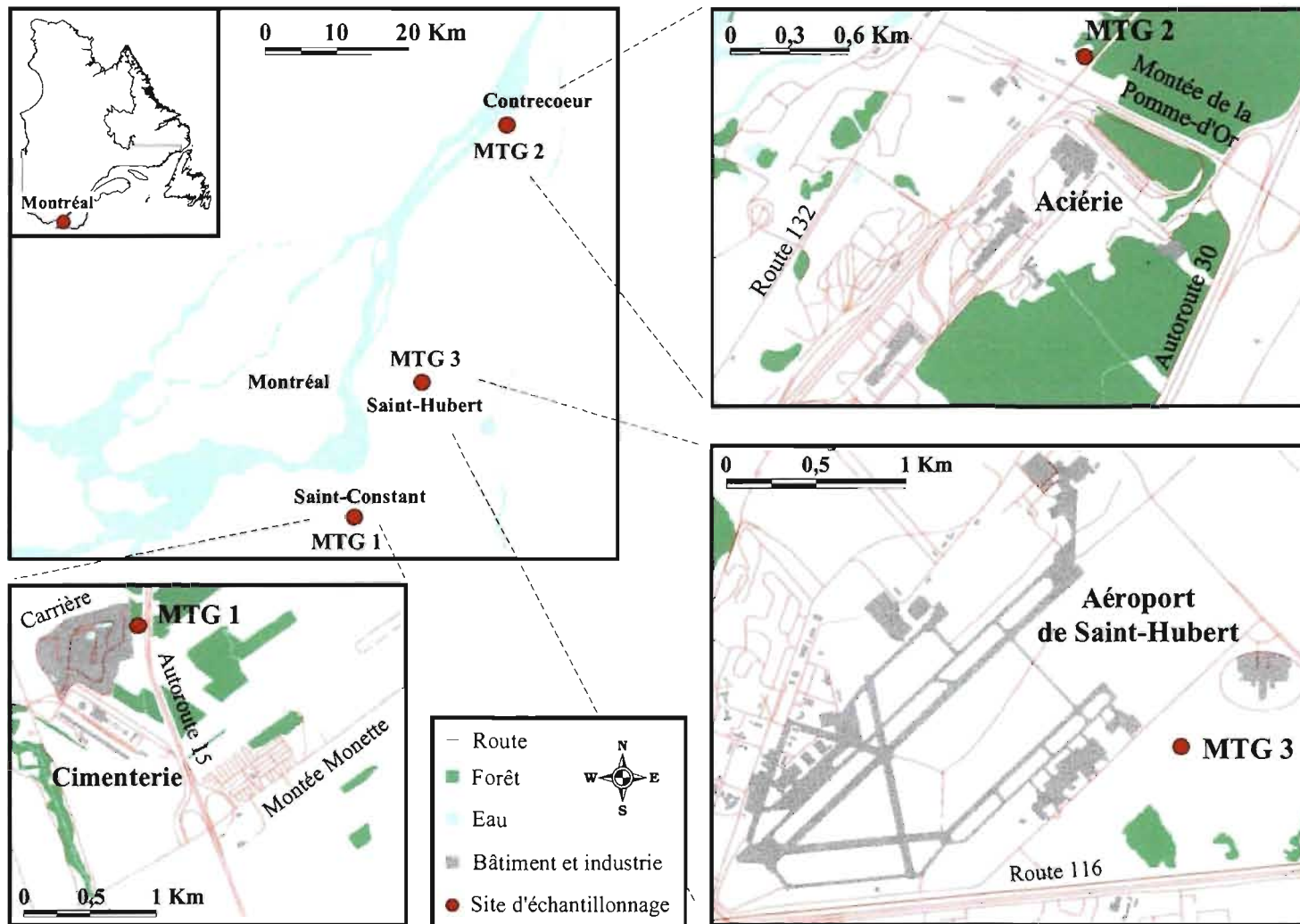
Figure 4.2 : Localisation des sites d'échantillonnage de la région de Rouyn-Noranda.



Source : Carte topographique numérique au 1:20 000,  
Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec

Projection : Longitude / Latitude (NAD 83)  
Données cartographiques datant de l'année 2000

Figure 4.3 : Localisation des sites d'échantillonnage de la région de la Montérégie.



Source : Carte topographique numérique au 1:20 000,  
Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec

Projection : Longitude / Latitude (NAD 83)  
Données cartographiques datant de l'année 2000

L'échantillonnage des sols a été effectué, en août 2004, sur trois sites, situés à 0.5; 2 et 8 km de la fonderie (identifié RN 1, RN 2 et RN 3, respectivement). Les sites ont été sélectionnés de sorte qu'ils forment un transect linéaire se déployant dans le sens des vents dominants, à partir de la principale source de métal de la région (Figure 4.2). Cette stratégie permet d'échantillonner des sols dont les concentrations en métaux diminuent avec l'augmentation de la distance à la fonderie (Séguin *et al.*, 2004). La composition de la végétation aux sites d'échantillonnages est dominée par les bouleaux jaunes et blancs (*Betula alleghaniensis* et *Betula papyrifera*, respectivement), le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides* Michx), le sapin baumier (*Abies balsamea*) et l'érable à sucre (*Acer saccharum*). Les sols échantillonnés sont des Luvisols s'étant développés sur des sédiments lacustres post-glaciaire de texture fine (Soil Classification Working Group, 1998). Les sites d'échantillonnages ont été choisis de sorte que leurs différences environnementales, p. ex. climat, topographie, orientation, nature et texture du matériel parental, végétation, soient minimales. Ceci permet d'affirmer que les différences de concentrations en métaux, tels que contrôlés par la distance entre les sites d'échantillonnages et la fonderie, représentent la principale source de variation entre les sites.

#### 4.4.2 Campagne d'échantillonnage en Montérégie

La deuxième campagne d'échantillonnage a été menée en août 2005 dans la région de la Montérégie qui se situe dans la vallée du St-Laurent au sud de Montréal (Figure 4.3). Les moyennes climatiques annuelles de la station météorologique de l'aéroport de St-Hubert, situé non loin du centre de la région, pour la période de 1971-2000 sont de 5.8 °C pour la température de l'air et de 1046 mm pour les précipitations totales (Environnement Canada, 2008). Dans cette région, trois sites ont été échantillonnés. Le premier se situe à St-Constant (27 km au sud-ouest de Montréal; 45° 16'N, 73° 28'W) à proximité d'une cimenterie, le deuxième à Contrecoeur (55 km au sud-est de Montréal; 45° 51'N, 73° 13'W) à proximité d'une aciérie et le troisième à St-Hubert (22 km au sud de Montréal; 45° 31'N, 73° 23'W) le long de l'aéroport (identifié, MTG 1, MTG 2 et MTG 3, respectivement). Les principales essences d'arbres des sites d'échantillonnages de cette région sont l'érable à sucre (*Acer saccharum*), le peuplier faux-tremble (*Populus*

*tremuloides* Michx) et le bouleau blanc (*Betula papyrifera*) qui croissent sur des sols identifiés comme des Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998). Cependant, contrairement aux sols de RN, les sols de cette région se sont formés sur des sédiments marins de texture fine. Les trois sites échantillonnés présentent donc des caractéristiques environnementales semblables à celles des sols de RN au niveau de la topographie, de la végétation et de la texture du matériel parental. Des différences entre les régions d'échantillonnage sont toutefois observées pour les conditions climatiques et la nature du matériel parental. En effet, les moyennes annuelles de la MTG montrent un climat plus chaud de 4.6 °C et plus humide de 110 mm qu'à RN. Afin de limiter les différences climatiques entre les régions d'échantillonnages, les sols de MTG ont été échantillonnés au mois d'août, lorsque ces différences sont à leur niveau minimum (3.4 °C et 2.6 mm de précipitation).

#### **4.5 Échantillonnage des compartiments du sol**

À chacun des six sites, la rhizosphère et la matrice du sol ont été échantillonnées sous trois jeunes peupliers faux-tremble (*Populus tremuloides* Michx). L'échantillonnage des compartiments du sol sous le peuplier faux-tremble s'explique par l'abondance de cette espèce végétale dans les deux régions d'échantillonnages et, surtout, parce qu'il s'agit de la seule espèce d'arbre présente à tous les sites. Comme les propriétés de la rhizosphère sont directement influencées par l'espèce de plante, il est primordial d'échantillonner la même espèce à tous les sites. Pour échantillonner la rhizosphère et la matrice du sol, de jeunes peupliers faux-tremble ont été sélectionnés et déraciner (Figure 4.4). La hauteur, le diamètre, la circonférence à hauteur de poitrine et l'âge des arbres ont été mesurés afin de s'assurer que les arbres échantillonnés étaient comparables. Par la suite, l'ensemble des racines vivantes et actives dans le prélèvement des nutriments et des métaux (< 2 mm de diamètre) ont été échantillonnées (Gobran *et al.*, 1998). L'échantillonnage des sols a été effectué dans les horizons B des différents sites. Deux raisons motivent ce choix. Premièrement, outre les racines associées aux arbres, peu de racines sont présentes dans les horizons B. Il est donc plus facile de s'assurer que les racines échantillonnées appartiennent bien à la bonne espèce de plante. De plus, en raison de la faible densité de racine dans l'horizon B, il est aisé de différencier et d'échantillonner les deux compartiments du sol. Cette même séparation entre la



rhizosphère et la matrice du sol est beaucoup plus ardue à obtenir dans les horizons de surfaces, en raison de la forte densité racinaire.



**Figure 4.4.** Peupliers faux-trembles sélectionnés (A) et déracinés (B) afin d'échantillonner la rhizosphère (site de St-Hubert et Rouyn-Noranda, respectivement).

La séparation des compartiments de sol s'effectue directement sur le terrain en brassant délicatement les racines. Le sol qui tombe, lors du brassage, est considéré comme de la matrice de sol alors que le sol restant sur les racines est considéré comme de la rhizosphère (Figure 4.5) (Séguin *et al.*, 2004; Gobran et Clegg, 1996). Cette technique produit une séparation incomplète des deux compartiments du sol qui se traduit par une contamination potentielle des matériaux rhizosphériques par des matériaux de la matrice. Cette contamination peut avoir des conséquences importantes du fait de la petite quantité de sols rhizosphériques récoltés. Cependant, plusieurs études ayant utilisé cette technique d'échantillonnage en milieu naturel ont obtenu, pour de nombreuses propriétés chimiques, des différences significatives entre les compartiments du sol (Courchesne *et al.*, 2006, 2001; Phillips et Fahey, 2006; Legrand *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2005, 2004; Turpault *et al.*, 2005; Arocena *et al.*, 1999; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999; Gobran *et al.*, 1998; Courchesne et Gobran, 1997; Gobran et Clegg, 1996). Ainsi, puisque cette technique d'échantillonnage produit une séparation incomplète des sols rhizosphériques et matriciels, il est anticipé que les différences observées dans cette étude entre les compartiments du sol sous-estimeront les différences réelles existant



entre ces compartiments. Il s'en suit que les différences seraient encore plus marquées si la séparation entre la rhizosphère et la matrice du sol était plus nette.



**Figure 4.5.** Racine de peuplier faux-tremble et le sol rhizosphérique associé (site de Rouyn-Noranda).

Suite à l'échantillonnage des sols sur le terrain, les racines et leurs sols rhizosphériques ainsi que les sols matriciels ont été transférés dans des sacs en plastiques stériles et entreposés à la noirceur dans une glacière maintenue à 4 °C. Ces conditions d'entreposage permettent de conserver le taux d'humidité des sols et de minimiser la croissance microbienne dans les échantillons. La séparation du sol rhizosphérique de la surface des racines s'est effectuée en laboratoire en grattant délicatement les racines à l'aide d'une spatule en plastique. Les fragments racinaires qui sont tombés dans le sol rhizosphérique, lors de cette étape, ont été enlevés par électricité statique. Durant l'extraction de la rhizosphère, le sol a été régulièrement vaporisé avec de l'eau déionisée (eau Milli-Q) afin de maintenir un niveau d'humidité comparable à celui des conditions de terrain. Suite à ces manipulations, tous les sols ont été entreposés à la noirceur et à 4 °C.

#### **4.6 Analyses de laboratoire**

À la suite de l'échantillonnage des rhizosphères et des matrices du sol, de nombreuses analyses de laboratoire ont été effectuées afin de caractériser les sols et de répondre aux objectifs du projet de recherche (Tableau 4.2). La description détaillée de ces analyses est présentée dans cette section.

**Tableau 4.2.** Ensemble des données recueillies sur les rhizosphères et les matrices du sol.

Types d'échantillons	Propriétés	Variables	Mesurée ou Calculée
Sol	Biologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Biomasse microbienne totale de carbone et d'azote</li> <li>○ Biomasse microbienne active de carbone</li> <li>○ Activité de la déshydrogénase et de l'uréase</li> </ul>	Mesurée
Sol (phase solide)	Physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Granulométrie et assemblage des minéraux argileux<sup>b</sup></li> <li>○ Carbone organique et pH<sup>b</sup></li> <li>○ Concentration totale de Cu, Zn et Al dans le sol</li> </ul>	Mesurée
Sol (phase liquide) <sup>a</sup>	Chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ pH et conductivité électrique</li> <li>○ Anions et cations majeurs (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)</li> <li>○ Concentration totale de Cu, Zn, Al, Ca et Mg</li> </ul>	Mesurée
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Formes biodisponibles de Cu, Zn et Al</li> <li>○ Spéciation complète de Cu, Zn et Al</li> </ul>	Calculée <sup>c</sup>
Racines	Chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Concentration totale de Cu, Zn et Al dans les racines</li> </ul>	Mesurée

a Les analyses sont effectuées sur des extraits à l'eau qui simulent une solution de sol.

b Ces analyses servent à caractériser les sites d'échantillonnage. Ainsi, elles sont effectuées uniquement sur une matrice de sol pour chaque site d'échantillonnage.

c La spéciation complète de Cu, Zn et Al est obtenue par modélisation à l'aide du logiciel MINEQL+ v.4.5.

#### 4.6.1 Propriétés biologiques des sols

Les propriétés biologiques ont été les premières variables mesurées sur les sols afin d'obtenir les résultats les plus représentatifs des conditions de terrain. Ainsi, pour les deux régions étudiées, la majorité des analyses biologiques ont été effectuées dans le premier mois suivant l'échantillonnage, alors que l'ensemble des analyses a été fait en moins de trois mois. Avant de procéder aux analyses, les sols humides ont été tamisés à 2 mm et leur contenu en eau a été évalué en pesant un sous-échantillon de chaque sol avant et après un séchage à l'air. À ce sujet, il est important de mentionner que les sols rhizosphériques du site de Contrecoeur (MTG 2) ainsi que de deux des trois arbres des sites de St-Constant (MTG 1) et de St-Hubert (MTG 3) présentaient des anomalies quant à leur niveau respectif d'humidité lors de l'échantillonnage. Ainsi, pour ces sols,

l'humidité était inférieure à 10 % (m/m) et 1.5 fois plus faibles que celle des sols de la matrice correspondante. Puisque le statut hydrique des sols peut avoir une incidence sur les données biologiques, celui-ci a été corrigé en ajustant l'humidité des sols rhizosphériques à des niveaux comparables à ceux des matrices de sol correspondantes. Cependant, pour les sols du site MTG 2, cette correction n'a pu être effectuée en raison des faibles masses disponibles. Les données de ces échantillons ont été conservées, mais elles n'ont pas été intégrées dans les analyses statistiques. Pour chacune des analyses biologiques, la masse de sols humides utilisée est indiquée en masse de sols secs. Les mesures biologiques ont été faites sur trois répétitions pour chaque matrice de sol alors que pour les rhizosphères, deux répétitions furent réalisées en raison des faibles masses de sols disponibles. Les analyses ont été menées dans des contenants stériles. La réplicabilité des analyses et la qualité des données fournies par les instruments de laboratoire ont été validées, respectivement, par des sols contrôles et des solutions de référence (National Water Research Institute; Burlington, Canada).

Comme il a été montré dans les chapitres précédents, peu de connaissances sont disponibles quant à l'effet global que les microorganismes ont sur la spéciation des métaux, à l'échelle de la rhizosphère et de l'ensemble de la communauté microbienne. À ce sujet, peu de variables microbiennes peuvent *a priori* être soupçonnées d'exercer un contrôle sur les métaux. Dans ce contexte, la présente étude a adopté une approche exploratoire. Ainsi, une caractérisation générale des propriétés biologiques des sols a été privilégiée à l'identification précise des communautés microbiennes. Plus précisément, seules les biomasses microbiennes et l'activité de certaines enzymes ont été mesurées sur les sols de la rhizosphère et de la matrice.

Ainsi, la totalité de la communauté microbienne (cellules microbiennes actives, dormantes et mortes) a été quantifiée en mesurant la biomasse microbienne totale de carbone (TMBC) et d'azote (TMBN). La communauté microbienne active a aussi été évaluée en mesurant la biomasse microbienne active de carbone (AMBC). La mesure de ces variables permet d'évaluer le rôle exercé par les microorganismes actifs et non actifs sur les métaux. Le contenu en carbone et en azote de la biomasse microbienne permet aussi d'évaluer le rôle que la décomposition peut avoir sur la spéciation des métaux.

Outre les paramètres de biomasse microbienne, les activités enzymatiques de la déshydrogénase et de l'uréase ont aussi été quantifiées. Les enzymes appartenant à la famille des déshydrogénases sont intracellulaires et interviennent dans l'oxydation des molécules organiques (Tabatabai, 1994). En raison de ces caractéristiques, les déshydrogénases sont présentes uniquement chez la fraction active de la population microbienne et, de ce fait, elles fournissent une bonne estimation de l'activité enzymatique totale des microorganismes dans les sols. Dans le cas de l'uréase, cette enzyme est présente à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des cellules microbiennes (Klose et Tabatabai, 1999) où elle minéralise l'azote en transformant l'urée en  $\text{NH}_4^+$  et en  $\text{CO}_2$  (Tabatabai, 1994). L'uréase est l'une des enzymes les plus documentées facilitant, du même coup, sa mesure et son interprétation. De plus, elle fournit des informations pertinentes sur la décomposition de la MO et sur l'influence des microorganismes dans le cycle de l'azote, un élément reconnu pour être l'un des nutriments limitant la croissance des végétaux en milieux forestiers.

#### 4.6.1.1 Mesures de la biomasse microbienne

Les variables TMBC et TMBN ont été mesurées aux conditions d'humidité du terrain selon la technique de *fumigation-extraction* décrite par Voroney *et al.* (2008). En bref, pour chaque échantillon de sol, deux fois 2 g de sol sec ont été pesés, l'un pour un sous-échantillon fumigé et l'autre pour un aliquot non-fumigé. Pour le sous-échantillon fumigé, un traitement de fumigation au chloroforme a été appliqué dans un dessiccateur. Ce traitement d'une durée de 24 heures est effectué dans le noir et à la température de la pièce. Suite à la fumigation, une extraction des sols au sulfate de potassium (0.5 M), selon un ratio sol:solution de 1:4, a été réalisée sur les sous-échantillons fumigés et non-fumigés. Ceux-ci ont été, par la suite, homogénéisés, centrifugés (1400 g pour 15 minutes) et filtrés (filtre Fisherbrand Q8). Les solutions ont été conservées durant 72 heures aux frais (4 °C) et à la noirceur avant leur analyse. Un aliquot de chaque sous-échantillon a permis de mesurer le DOC à l'aide d'un analyseur de carbone (Shimadzu, USA). La solution restante a été digérée par du persulfate de potassium (0.22 M) et le contenu total en azote a été mesuré sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm (Solorzano et Sharp, 1980). Les différences de DOC et d'azote total entre le

sous-échantillon fumigé et le non-fumigé sont reliées à la biomasse microbienne totale par des constantes. Celles-ci sont utilisées pour corriger l'efficacité de l'extraction de la biomasse microbienne de carbone ( $K_{ec}$ ) et d'azote ( $K_{en}$ ) par la solution de sulfate de potassium. Les valeurs des constantes  $K_{ec}$  et  $K_{en}$  utilisées dans cette étude sont, respectivement, de 0,25 et de 0,18, ce qui est en accord avec les recommandations de Voroney *et al.* (2008).

La variable AMBC a été mesurée en utilisant la technique de *substrate-induced respiration* développée par Anderson et Domsch (1978). Conformément à cette technique, la réponse respiratoire maximale initiale d'un sol suite à l'ajout de glucose est directement reliée à la biomasse microbienne C du sol. Brièvement, 2 g de sol sec et 0.5 g d'une mixture, contenant 3 % de glucose et 97 % de talc (m/m), ont été mélangés. Par la suite, le contenu en eau de l'échantillon a été ajusté à 50 % (m/m) afin de pouvoir comparer la réponse respiratoire maximale initiale de sols de texture fine, présentant d'importantes différences de pH (Lin et Brookes, 1999). L'ensemble du mélange a été homogénéisé et maintenu en contact avec l'atmosphère durant 100 minutes. Par la suite, les pots ont été scellés et incubés afin de mesurer la concentration de CO<sub>2</sub> au temps représentant la réponse respiratoire maximale initiale. Des tests préliminaires ont révélé que pour les sols de RN, le temps d'incubation optimal était de 270 minutes alors que, pour les sols de MTG, cette durée était de 180 minutes. Les concentrations de CO<sub>2</sub> ont été mesurées par un chromatographe en phase gazeuse (Shimadzu Mini2 GC avec une colonne Poropak Q) combiné à un *methanizer* transformant le CO<sub>2</sub> en méthane (Moore et Dalva, 1997).

#### 4.6.1.2 Mesures de l'activité enzymatique

L'activité de l'uréase a été mesurée par détection colorimétrique du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Kandeler et Gerber, 1988). En bref, 2 g de sol sec combiné avec 1 ml d'une solution d'urée (0.0799 M) ont été incubés pendant 2 heures à 37 °C et à la noirceur. Suite à l'incubation, 10 ml de chlorure de potassium (2 M) ont été ajoutés, la mixture a été homogénéisée et la solution a été filtrée (filtre Fisherbrand Q8). La concentration du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 690 nm, suite au mélange de 2 ml de

solution filtrée, 8 ml d'eau Milli-Q, 5 ml d'une solution composée d'un tiers de salicylate de sodium (1.06 M), d'un tiers d'eau Milli-Q et d'un tiers de dichloroisocyanide ( $C_3Cl_2N_3O_3Na$ ; 0,1 %).

Finalemment, l'activité de la déshydrogénase est mesurée par colorimétrie suite à la réduction microbienne du *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* (TTC;  $C_{19}H_{15}N_4Cl$ ) en *triphenyl formazan* (TPF;  $C_{19}H_{16}N_4$ ) (Tabatabai, 1994). Ainsi, un mélange comprenant 5.94 g de sol sec, 0.06 g de carbonate de calcium, 1 ml d'une solution de TTC (0.0896 M) et 2.5 ml d'eau Milli-Q a été incubé à 37°C et à la noirceur durant 24 heures. Par la suite, le TPF est extrait à l'aide de 10 ml de méthanol, puis homogénéisé et filtré (filtre Fisherbrand Q8). Les concentrations de TPF sont mesurées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 485 nm. Par ailleurs, une expérience de Chander et Brookes (1991) souligne que la présence de Cu dissous inhibe l'absorbance du TPF à des concentrations supérieures à 5 mg L<sup>-1</sup>. Toutefois, dans cette thèse, les sols échantillonnés présentent des concentrations totales de Cu soluble dans l'eau variant entre 0.002 et 0.13 mg L<sup>-1</sup>, des valeurs nettement inférieures aux concentrations de Cu dissous utilisées par Chander et Brookes (1991). Ainsi, pour compléter les données de Chander et Brookes (1991), une expérience similaire a été effectuée pour des concentrations totales dissoutes de Cu variant entre 0.001 et 5 mg L<sup>-1</sup>. Cette expérience révèle qu'une inhibition de 10 % de la mesure de TPF est observée à des concentrations de Cu total dissous supérieures à 0.5 mg L<sup>-1</sup> (Figure 4.6). Or, cette différence est considérée comme non significative (test Mann-Whitney;  $p = 0.33$ ), ce qui permet de conclure que les mesures d'absorbance de TPF dans les sols de la présente étude ne sont pas inhibées par le Cu.

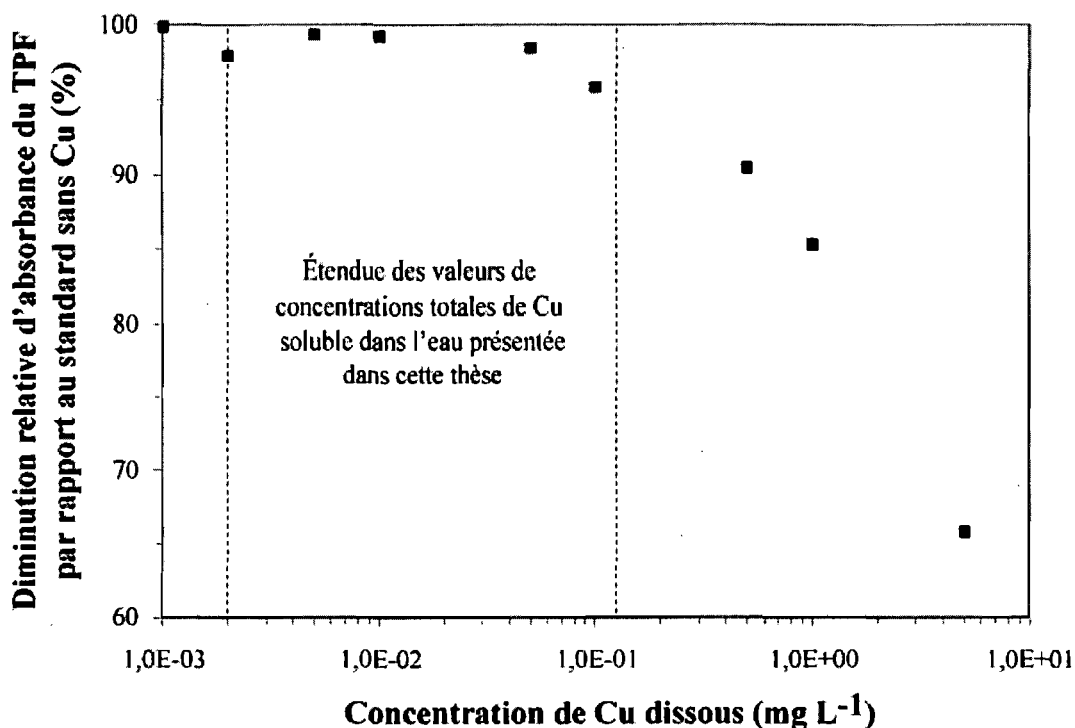


Figure 4.6. Effet d'inhibition de l'absorbance du TPF par le Cu dissous.

#### 4.6.2 Propriétés physico-chimiques des sols

##### 4.6.2.1 *Propriétés de la phase solide des sols*

Pour caractériser la phase solide des sols, des mesures de distribution granulométrique, de composition des minéraux argileux et de pH du sol ont été uniquement effectuées sur un sol matriciel de chaque site d'échantillonnage. Tout d'abord, la distribution granulométrique des particules de sol a été mesurée par la technique d'hydrométrie (Gee et Bauder, 1994). Cette analyse a été suivie, pour les mêmes échantillons, d'une détermination de la minéralogie des particules argileuses par diffraction des rayons X (Whittig et Allardice, 1994). Afin d'identifier adéquatement les minéraux argileux, différents traitements ont été appliqués : saturation au K à la température de la pièce, saturation au K chauffé à 300 °C et à 550 °C, saturation au Mg à la température de la pièce et saturation au Mg ainsi qu'à l'éthylène-glycol. Les analyses minéralogiques ont été réalisées sur un diffractomètre *Rigaku Miniflex* (Tokyo, Japan; Cu-K $\alpha$  radiations) fonctionnant à 30 kV, 10 mA et pour une vitesse de balayage de 2°  $\theta$ /min sur une zone variant entre 2 et 30°. L'abondance relative des minéraux sur chaque diffractogramme a

été évaluée à l'aide du ratio  $I/I_{QZ}$  qui normalise l'intensité ( $I$ ) d'un minéral donné à l'aide de l'intensité du plan  $hkl = 001$  ( $d = 0.426$  nm) du quartz ( $I_{QZ}$ ) (Courchesne et Gobran, 1997). Le pH du sol a aussi été mesuré selon la technique décrite par Hendershot *et al.* (2008). Un ratio sol:solution de 1:2 a été utilisé ainsi qu'une électrode de pH (Accumet) combiné à un pH mètre (Fisher Accumet AR10).

Par ailleurs, le contenu en carbone organique du sol a aussi été mesuré à l'aide de la technique modifiée de Walkley-Black (Skjemstad et Baldock, 2008). Toutefois, contrairement aux analyses décrites précédemment, cette variable a été utilisée dans les analyses statistiques. De ce fait, les mesures de carbone organique ont été réalisées sur 17 des 18 matrices du sol et sur 11 des 18 sols rhizosphériques. Des masses trop faibles de sols expliquent pourquoi le carbone organique solide n'a pu être mesuré dans certaines rhizosphères.

Finalement, une digestion acide au micro-ondes (CEM MDS-2000) a aussi été utilisée afin de mesurer les concentrations totales de Cu, Zn et Al dans les sols. Conformément à la méthode de la US EPA (1998), 9 ml d'acide nitrique (15.9 M) et 2 ml d'acide chlorhydrique (12.1 M), tous deux certifiés sans métaux traces, sont ajoutés à 0.5 g de sols sec. Les échantillons sont, par la suite, digérés à une température moyenne de 173 °C durant 20 minutes. Suite à la digestion, 40 ml d'eau Milli-Q sont ajoutés, l'échantillon est centrifugé durant 15 minutes à 1400 g et les concentrations d'Al, Cu et Zn sont mesurées dans le surnageant, à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique (Varian AA-1475; Palo Alto, USA).

#### 4.6.2.2 *Propriétés de la phase liquide des sols*

Les analyses sur la fraction dissoute ont été menées sur des extraits à l'eau de sols secs tamisés à 0.5 mm. Ces extraits à l'eau sont considérés comme une solution analogue à la solution de sol de terrain. Deux raisons justifient l'utilisation de cette procédure pour caractériser la phase liquide des sols. Premièrement, des études antérieures ont montré que cette technique permet d'extraire les formes chimiques des métaux les plus mobiles et les plus biodisponibles (Courchesne *et al.*, 2006; Séguin *et al.*, 2004). Deuxièmement,



en raison du faible volume de la rhizosphère et de la grande quantité de solution nécessaire pour faire l'ensemble des analyses sur la fraction dissoute du sol, la procédure d'extraction de la phase solide par l'eau est la seule technique pouvant être utilisée afin d'obtenir un analogue de la solution de sol de la rhizosphère. Trois répétitions des extraits à l'eau ont été effectuées pour chaque sol matriciel alors qu'un maximum de deux répétitions a été effectué pour les sols rhizosphériques, lorsque les masses de sols le permettaient. Les extraits à l'eau effectués dans ce projet utilisent la méthodologie décrite par Séguin *et al.* (2004). En bref, l'extraction à l'eau s'effectue dans des tubes de polyéthylène de 50 ml à un ratio sol:solution de 1:10. La mixture est alors homogénéisée durant 2 heures, centrifugée à 1400 g durant 15 minutes et filtrée à 0.45 µm (filtres de cellulose). Pour l'ensemble des analyses menées sur les extraits à l'eau, la qualité des données produites par les instruments de laboratoire a été validée à l'aide de solutions de référence (National Water Research Institute; Burlington, Canada). De plus, la vaisselle utilisée pour ces analyses a d'abord été lavée à l'acide nitrique (20 % v/v).

#### 4.6.2.2.1 Analyses des propriétés chimiques majeures

Dans un premier temps, les propriétés chimiques majeures de la fraction dissoute des sols ont été mesurées. Ainsi, le pH et la conductivité électrique (EC) ont été mesurés sur les solutions non filtrées à l'aide, respectivement, d'une électrode de pH (Accumet) combinée à un pH-mètre (Fisher Accumet pH meter, 825 MP) et d'une cellule radiométrique (Copenhagen, CDC 314) intégrée à un conductimètre (Copenhagen radiometer CDM 83). Par ailleurs, les solutions filtrées ont permis de mesurer les concentrations des cations ( $K^+$ ,  $Na^+$  et  $NH_4^+$ ) et des anions ( $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  et phosphate ( $PO_4^{3-}$ )) majeurs par chromatographie ionique (Waters); la concentration de carbone organique soluble dans l'eau (WSOC) avec un analyseur de carbone (Shimadzu) et les concentrations totales solubles dans l'eau de Ca ( $Ca_{ws}$ ) et de Mg ( $Mg_{ws}$ ) par spectrométrie d'émission atomique au plasma (ICP-AES). En plus des solutions de références, la réplicabilité et la qualité des analyses ont aussi été validées à l'aide du sol contrôle RN 0.5 C provenant de l'étude de Séguin *et al.* (2004).

#### 4.6.2.2.2 Analyses des métaux

Les extraits à l'eau ont aussi servi à mesurer les concentrations totales solubles dans l'eau des métaux ainsi que leurs formes biodisponibles. Tout d'abord, les concentrations totales solubles dans l'eau de Cu ( $Cu_{WS}$ ), Zn ( $Zn_{WS}$ ) et Al ( $Al_{WS}$ ) ont été mesurées par ICP-AES sur les mêmes extraits à l'eau filtrés ayant servi à la mesure des propriétés chimiques majeures. La réplicabilité et la qualité de cette analyse ont été validées à l'aide du sol contrôle RN 0.5 C provenant de l'étude de Séguin *et al.* (2004) ainsi que par des échantillons enrichis en métaux qui montrent des taux de recouvrement variant entre 100 et 117 %.

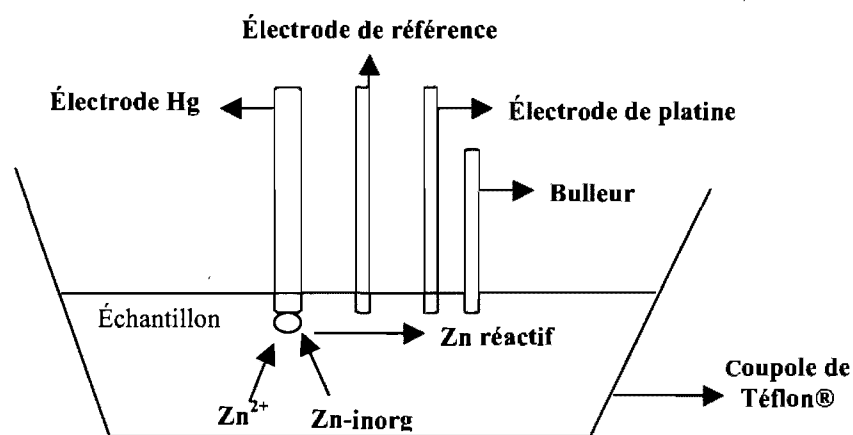
Pour la mesure des formes chimiques biodisponibles de Cu, Zn et Al, des extractions à l'eau spécifiques à chaque métal ont été effectuées. Cette procédure permet de s'assurer que les mesures fines de spéciation sont effectuées sur des solutions fraîches. Lors de ces extraits, le pH de la solution a aussi été mesuré afin de s'assurer que les conditions de spéciation sont comparables aux extraits à l'eau ayant servi à mesurer les propriétés chimiques majeures et les concentrations totales de métaux. Comme le pH est la variable exerçant le plus grand contrôle sur la spéciation des métaux (Sauvé, 2002; Lindsay, 1979), la comparaison des valeurs de pH entre les différents extraits à l'eau permet d'évaluer si l'entreposage a influencé la spéciation des métaux dans les sols. Les résultats de cette comparaison révèlent qu'aucune différence significative de pH n'est observée entre les extraits à l'eau (test apparié de Wilcoxon;  $p > 0,10$ ). Ceci permet d'affirmer que les conditions chimiques régulant la spéciation des métaux dans les différents extraits à l'eau sont comparables. Ainsi, les données des différents extraits à l'eau pourront être intégrées dans les mêmes analyses statistiques.

Pour le Cu, et ce contrairement à l'Al et au Zn, il est possible de mesurer l'activité de l'ion libre  $Cu^{2+}$  considéré comme la forme la plus biodisponible. En effet, l'utilisation d'une électrode spécifique à cette fin a été largement documentée. Les études révèlent qu'elle mesure l'activité du  $Cu^{2+}$  de manière fiable, sans interférence majeure, avec une haute sensibilité et qu'elle offre une bonne réplicabilité (Rachou *et al.*, 2007; Sauvé *et al.*, 1995). En ce sens, le présent projet a utilisé le protocole développé par Rachou *et al.*

(2007) pour mesurer l'activité du  $\text{Cu}^{2+}$ . Conformément à ce protocole, du nitrate de potassium (certifié sans métaux traces; 99.99%) a été ajouté aux extraits à l'eau filtrés de manière à atteindre une concentration de 0.01 M dans les échantillons. L'ajout de ce sel permet d'homogénéiser la force ionique des échantillons, ce qui facilite la lecture de l'activité du  $\text{Cu}^{2+}$ . Les mesures d'activité du  $\text{Cu}^{2+}$  ont été effectuées sur une électrode spécifique combinée à une électrode de référence (detecION® Cupric 227 ISE). Pour chaque échantillon, le temps de stabilisation de la lecture a été réduit en brassant légèrement la solution à l'aide d'un barreau magnétique. Une lecture de potentiel par l'électrode est considérée comme valide lorsque sa variation est inférieure à 0.3 mV durant une période de trois minutes. Les mesures de potentiels obtenues par l'électrode spécifique sont converties en activité de  $\text{Cu}^{2+}$  grâce à une courbe de calibration établie à l'aide d'une solution de référence composée de 1 mM IDA (acide iminodiacétique), 0.1 mM  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , 6 mM NaOH et 2.5 mM  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  (phtalate de potassium). À la fin de chaque journée d'analyse, la courbe de calibration a été mesurée à nouveau afin de vérifier si une dérive de la lecture de l'instrument se produisait. La réplicabilité et la qualité de l'analyse ont aussi été validées à l'aide du sol contrôle n° 10 provenant de l'étude de Sauvé *et al.* (1997).

À l'heure actuelle, la mesure des formes biodisponibles de Zn peut être effectuée par un nombre limité de techniques. Parmi ces méthodes, la technique électrochimique de *differential pulse anodic stripping voltammetry* (DPASV) a été utilisée dans ce projet puisqu'elle est l'une des plus simples, des plus fiables, des plus rapides et des moins coûteuses (Florence, 1986). Conformément à cette technique, les formes réactives de Zn ( $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$ ), plus précisément l'ion libre ( $\text{Zn}^{2+}$ ) et les formes de Zn complexées aux anions inorganiques, sont mesurées (Mota et Correia Dos Santos, 1995; Florence, 1986). La technique de mesure du  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$  décrite par Courchesne *et al.* (2006) et Stephan *et al.* (2008) utilisant un voltamètre de type *Radiometer VoltaLab50* (Radiometer Analytical) connecté à une électrode de mercure (MDE 150; Radiometer Analytical) a été utilisée dans ce projet. Pour effectuer les mesures de  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$ , il a tout d'abord fallu uniformiser la force ionique des extraits à l'eau en ajoutant 0,01 M de nitrate de potassium (certifié sans métaux traces; 99.99%) dans les échantillons. Par la suite, les mesures ont été effectuées dans une cellule de Teflon® qui est rincée, entre chaque échantillon, avec de

l'acide nitrique (10 %) puis de l'eau Milli-Q. Avant chaque mesure, l'échantillon est purgé durant cinq minutes avec de l'azote gazeux afin d'enlever l'oxygène dissous dans l'échantillon. Suite à cela, une goutte de mercure est libérée sous l'électrode et un courant électrique est produit afin de transformer la goutte en cathode et ainsi attirer les formes réactives de Zn (Figure 4.7). Les conditions optimales favorisant la fixation des formes réactives de Zn sur la goutte de mercure s'obtiennent à un potentiel de -1.2 V pour une durée de 60 secondes en incorporant un brassage de l'échantillon, par un barreau magnétique, à une vitesse de 400 rpm. La fixation des formes réactives de Zn est suivie d'une période passive d'attente d'une durée de 15 secondes. Au-delà de cette période passive, le barreau magnétique se remet à tourner dans la solution à une vitesse de 525 rpm et l'instrument réinjecte un courant électrique de 10  $\mu\text{A}$  qui produit un potentiel final de -0.7 V. Cette action a pour conséquence de transformer la goutte de mercure en anode et ainsi, de libérer le Zn réactif de la goutte vers la solution (Figure 4.7). Lors de ce transfert, le Zn réactif libéré émet un courant électrique se situant précisément à -0.98 V sur le spectre de potentiel. La hauteur du pic à ce potentiel est reliée à la quantité de Zn réactif quittant la goutte. Cette quantité est transformée en concentration grâce à l'utilisation d'une courbe de calibration. La réplicabilité et la qualité de l'analyse ont été validées à l'aide du sol contrôle RN 0.5 C provenant de l'étude de Séguin *et al.* (2004) qui a été utilisé par Courchesne *et al.* (2006).



**Figure 4.7.** Dispositif utilisé et principe général de mesure des concentrations de Zn réactifs sur un voltamètre VoltaLab50 par *differential pulse anodic stripping voltammetry* (DPASV).

Les formes biodisponibles d'Al sont composées d'un amalgame d'espèces chimiques réactives comprenant  $Al^{3+}$  ainsi que les formes d'Al faiblement liées à des anions inorganiques monomériques (e.g.  $OH^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ). Ces formes biodisponibles peuvent être quantifiées de nombreuses façons. À ce jour, les techniques les plus utilisées, les plus documentées et fournissant les résultats considérés comme les plus fiables utilisent la colorimétrie pour mesurer les formes réactives d'Al ( $Al_{labile}$ ). De ces techniques, la procédure développée par James *et al.* (1983) et modifiée par Lalande et Hendershot (1986) est devenue l'une des techniques standards dans le domaine. Cette technique utilise un agent organique (8-hydroxyquinoline) pour complexer l'Al et le rendre détectable par colorimétrie. Durant cette analyse, le pH est ajusté à 5.0 pour optimiser la complexation de l'Al par l'hydroxyquinoline. De plus, le temps de réaction entre l'agent complexant et la solution contenant de l'Al est limité à 15 secondes afin de restreindre la complexation de l'Al aux formes les plus réactives. En bref, 25 ml de l'extrait à l'eau est mélangé à 1 ml d'un tampon d'acétate de sodium (1 M) et à 1 ml de 8-hydroxyquinoline (0.8 %) dans un tube de borosilicate. Après 15 secondes, la réaction de complexation est arrêtée et le complexe Al-quinolate est extrait en ajoutant 5 ml d'acétate de butyle. Par la suite, la concentration d'Al, interprété comme de l' $Al_{labile}$ , est mesurée sur un spectrophotomètre aux longueurs d'ondes de 395 et 600 nm. Cette dernière longueur d'onde est utilisée pour corriger les mesures en raison de l'interférence causée par le Fe qui peut, lui aussi, se complexer avec l'hydroxyquinoline (James *et al.*, 1983). La réplicabilité et la qualité de l'analyse ont été validées à l'aide du sol contrôle RN 0.5 A provenant de l'étude de Séguin *et al.* (2004).

#### 4.6.2.2.3 Modélisation géochimique de la spéciation du Cu, Zn et Al

En complément aux mesures des formes biodisponibles de Cu, Zn et Al, le portrait global de leur spéciation a été obtenu à l'aide du logiciel de modélisation géochimique MINEQL+ v.4.5 (Schecher et McAvoy, 2003, 1992). Ce portrait a permis d'évaluer la distribution des métaux entre leur forme ionique libre et leurs formes complexées aux anions inorganiques et organiques. La spéciation des métaux a été calculée sur chaque répétition de laboratoire (76 échantillons) en ajustant les paramètres pour que la modélisation soit menée à 25 °C, dans un système fermé et sans phase solide. De plus,

l'activité de chaque forme chimique des métaux a été corrigée à l'aide des équations de Debye-Hückel.

**Tableau 4.3.** Scénarios estimant la composition chimique du WSOC (%) pour les différents échantillons de sols de ce projet.

Scénario <sup>a, b</sup>	Sites d'échantillonnages <sup>c</sup>	Acide fulvique	Acide humique	Acide acétique
1	RN 1-3 et MTG 3 (matrice)	95		5
2	RN 1-3 et MTG 3 (rhizosphère)	40		60
3	MTG 1-2 (matrice)	70	30	
4	MTG 1-2 (rhizosphère)	17	8	75

a Les scénarios sont estimés en fonction des connaissances actuelles de la littérature (voir chapitre 5).

b Les scénarios 1 et 2 sont pour des sols acides, alors que les scénarios 3 et 4 sont pour des sols neutres à alcalins.

c RN = Rouyn-Noranda; MTG = Montérégie.

L'ensemble des données mesurées sur les extraits à l'eau, c'est-à-dire les concentrations totales solubles dans l'eau de Cu, Zn, Al, Ca et Mg, le pH, les concentrations en ions majeurs et en WSOC, ont été introduites dans le modèle pour calculer la spéciation des métaux. De plus, la composition chimique du WSOC a aussi été prise en compte dans le calcul de spéciation. Toutefois, en raison des faibles masses de sols échantillonnés, notamment pour les rhizosphères, aucune analyse permettant d'identifier la composition du WSOC n'a pu être menée. De ce fait, cette composition a été estimée en fonction des connaissances issues de la littérature. Ces estimations ont permis de produire quatre scénarios décrivant la composition du WSOC dans les sols échantillonnés (Tableau 4.3). Dans ces scénarios, la composition du WSOC varie en fonction des compartiments du sol (rhizosphère vs matrice) et du pH des sols (acide vs neutre). Pour chacun des scénarios, trois ligands organiques ont été considérés, les acides fulvique, humique et acétique. Le choix de ces ligands s'explique par leurs abondances dans les solutions de sols de milieux forestiers ainsi que par leurs affinités contrastées pour les métaux (Sandnes *et al.*, 2005; Van Hees *et al.*, 2005; Strobel, 2001; Strobel *et al.*, 2001; Jones, 1998; Shen *et al.*, 1996). Le chapitre cinq présente en détail le cheminement scientifique menant à l'acquisition de ces données de spéciation.

### 4.6.3 Propriété chimique de la végétation

Finalement, les concentrations de Cu et Zn séquestrées par les racines du peuplier faux-tremble ont aussi été mesurées. Ces mesures ont été effectuées en suivant la méthode décrite par Jones Jr et Case (1990). Ainsi, dans des tubes de polyéthylène de 50 ml, 2 ml d'acide nitrique (15.9 M; certifié sans métaux traces) ont été ajoutés à 0.2 g de tissus racinaires secs et moulus. Les échantillons ont trempé dans l'acide durant toute une nuit et, par la suite, les tissus racinaires ont été digérés sur bloc à une température moyenne de 120 °C durant cinq heures. Suite à la digestion des tissus racinaires par l'acide nitrique, le volume des échantillons a été amené à 50 ml en ajoutant de l'eau Milli-Q. En utilisant le surnageant, les concentrations de Zn ont été mesurées sur un spectrophotomètre à absorption atomique (Varian AA-1475; Palo Alto, USA), alors que le contenu en Cu a été mesuré à l'aide d'un spectromètre de masse au plasma (ICP-MS).

## 4.7 Traitements statistiques sur les données

### 4.7.1 Pré-traitements statistiques

Les traitements statistiques utilisés dans ce projet requièrent une base de données complète, exempte de données manquantes. Or, pour les sols rhizosphériques, certaines données biologiques et chimiques sont manquantes ou de faible qualité. Dans ce contexte, certaines actions ont été menées sur la base de données afin de pouvoir réaliser les analyses statistiques. Premièrement, pour les variables et les sites d'échantillonnage où des données sont disponibles pour deux des trois arbres, la donnée manquante a été comblée en utilisant la moyenne des deux autres arbres du site. Cette procédure permet d'interpoler la donnée en prenant en compte la variabilité intra-site et en minimisant son effet sur la variabilité entre les sites d'échantillonnage (Legendre et Legendre, 1998). Ainsi, les données manquantes pour les variables TMBC, TMBN et l'activité de l'uréase aux sites RN 1 (arbre A) et RN 2 (arbre B), pour la variable  $Al_{ws}$  au site MTG 1 (arbre B) et pour la variable TMBN au site MTG 2 (arbre B) ont été comblées de cette façon (voir chapitres six à huit). Deuxièmement, les échantillons rhizosphériques du site MTG 2 ont été écartés des analyses statistiques parce que les mesures de TMBC et TMBN ont été fortement affectées par le faible contenu en eau des sols et qu'aucune correction n'a

pu être appliquée. De plus, les échantillons rhizosphériques du site RN 3 ainsi que les données d'activités de la déshydrogénase ont aussi été supprimés en raison des multiples données manquantes. Finalement, certaines données de  $\text{NO}_3^-$  (site MTG 1 arbres A et C),  $\text{NH}_4^+$  (site MTG 1 arbres A à C et site MTG 3 arbre A),  $\text{Al}_{\text{labile}}$  (site MTG 1 arbres A à C) et  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$  (site MTG 1 arbres A à C), situées sous la limite de détection, ont été comblées en insérant les valeurs de limite de détection des méthodes qui sont de  $0.50 \mu\text{M}$  pour  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ , de  $1.00 \mu\text{M}$  pour  $\text{Al}_{\text{labile}}$  et de  $1.00 \text{ nM}$  pour le  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$ . Cette approche n'introduit aucun artéfact méthodologique dans l'étude puisque la variabilité et la distribution de ces variables dans la base de données sont maintenues intactes. En raison de ces différentes règles appliquées à la base de données, uniquement 12 échantillons rhizosphériques ont pu être intégrés dans les analyses statistiques. En raison du faible nombre d'échantillons rhizosphériques, le niveau de signification utilisé dans les analyses statistiques a été fixé à  $\alpha = 0.10$ .

**Tableau 4.4.** Analyses statistiques effectuées dans le cadre du projet de recherche.

<b>Informations à acquérir</b>	<b>Analyses Statistiques utilisées</b>	<b>Informations fournies</b>
<b>Différences entre régions d'échantillonnage ou entre compartiments du sol</b>	Analyse discriminante	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Identifie les principales sources de variations dans la base de données.</li> <li>○ Identifie les principales variables qui contrôlent les sources de variations dans la base de données.</li> </ul>
	Test de Mann-Whitney	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Différence entre les régions d'échantillonnage pour une propriété donnée.</li> </ul>
	Test apparié de Wilcoxon	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Différence entre les compartiments du sol pour une propriété donnée.</li> </ul>
<b>Quantifier l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux</b>	Partition de la variance	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Évalue la distribution de la variance de la spéciation du Cu, Zn et Al entre les principaux groupes de variables contrôlant cette variation.</li> <li>○ Évalue les interactions existant entre les groupes expliquant la variance des métaux.</li> </ul>
<b>Identifier les variables microbiennes régulant la spéciation des métaux</b>	Analyse canonique de redondance (RDA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Identifie et quantifie l'intensité des relations existant entre les variables microbiennes et la spéciation du Cu, Zn et Al.</li> </ul>



#### 4.7.2 Différences entre les régions d'échantillonnages et les compartiments biogéochimiques du sol

L'interprétation des données provenant de la rhizosphère et de la matrice du sol échantillonnées directement sur le terrain et dans des milieux forestiers fortement contrastés est complexe. En effet, plusieurs facteurs environnementaux peuvent réguler la distribution des données. De ce fait, afin de mieux comprendre l'origine des variations observées dans la base de données de ce projet, une analyse discriminante a été produite (Tableau 4.4). Cette analyse multivariée a incorporé l'ensemble des variables, à l'exception des données de spéciation des métaux, afin d'évaluer si des différences marquées s'observaient entre les régions d'échantillonnage (Rouyn-Noranda vs Montérégie) et les compartiments du sol (rhizosphère vs matrice). Pour tester cette hypothèse, des fonctions discriminantes produites à partir de l'ensemble des variables explicatives sont calculées (Legendre et Legendre, 1998). À l'aide de ces fonctions, l'analyse a procédé à une classification des échantillons de sol qui a ultimement été comparée à celle définie *a priori* par l'utilisateur. L'utilisation de l'analyse discriminante va permettre, dans un premier temps, de hiérarchiser les variables en fonction de leurs différences entre les régions d'échantillonnage et les compartiments du sol et, dans un deuxième temps, de quantifier l'importance que les différences entre les régions d'échantillonnage et entre la rhizosphère et la matrice du sol ont sur la variabilité totale de la base de données. Pour y arriver, l'analyse discriminante a été effectuée sur des variables centrées-réduites à l'aide du logiciel SPSS 16.0 pour Windows®.

Pour compléter les informations obtenues par l'analyse discriminante et les autres analyses multivariées décrites ici-bas, les tests non-paramétriques de Mann-Whitney et apparié de Wilcoxon ont été produits par le logiciel SPSS 16.0 pour Windows® (Tableau 4.4). Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour révéler des différences statistiques entre les régions d'échantillonnages. Le test apparié de Wilcoxon a, quant à lui, permis d'évaluer les différences statistiques entre les compartiments du sol à l'échelle du site d'échantillonnage. Les informations procurées par ces tests non-paramétriques ont principalement été utilisées pour appuyer des hypothèses avancées suite à l'analyse des résultats des tests statistiques multivariés.

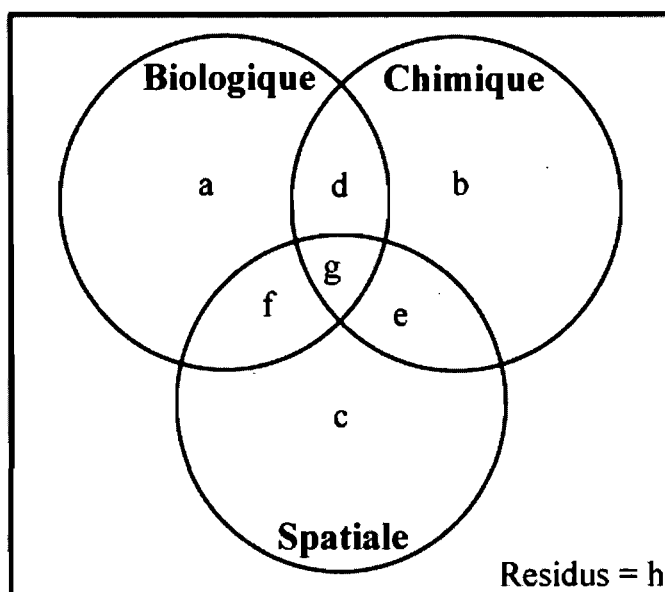
### 4.7.3 Évaluation de l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux

Deux aspects du rôle exercé par les microorganismes sur la spéciation des métaux ont été documentés dans ce projet. Tout d'abord, conformément au deuxième objectif de la thèse, la magnitude de cette influence a été quantifiée pour la rhizosphère et la matrice du sol en effectuant une partition de la variance de la spéciation de chaque métal étudié (Tableau 4.4). Ces partitions de la variance ont été effectuées pour chaque métal et chaque compartiment de sol séparément, en incorporant les formes chimiques suivantes :  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ ;  $\text{Zn}_{\text{WS}}$  et  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$ ;  $\text{Al}_{\text{WS}}$  et  $\text{Al}_{\text{labile}}$  (Tableau 4.5). De plus, trois groupes de variables explicatives ont été considérés dans cette étude. Ces groupes représentent les principales catégories de variables régulant la spéciation des métaux. Il s'agit des variables biologiques ( $X_1$ ), des variables chimiques ( $X_2$ ) et des variables spatiales ( $X_3$ ) (Tableau 4.5). Les variables biologiques et chimiques décrivent, respectivement, le rôle joué par les microorganismes et les propriétés chimiques du sol sur la spéciation des métaux. De leur côté, les variables spatiales représentent toutes variations entre les régions ou les sites d'échantillonnages pouvant contrôler la spéciation des métaux et qui sont induites par des facteurs environnementaux extérieurs aux deux premiers groupes de variables, tels que le climat, le matériel parental, etc. Deux variables semi-quantitatives ont été créées pour traduire cette réalité, elles identifient, respectivement, les régions et les différents sites échantillonnés. Grâce aux partitions de la variance, l'influence totale d'un groupe de variable sur la spéciation des métaux peut être décomposée en son effet exclusif et son effet combiné aux autres groupes de variables (Figure 4.8). L'utilisation de cette analyse statistique contribue donc à quantifier l'effet associé à chacun des groupes de variables explicatives sur la spéciation des métaux, en plus de documenter les interactions existant entre ces groupes de variables. Il permet aussi d'améliorer la compréhension des mécanismes biogéochimiques contrôlant la spéciation des métaux. Les partitions de la variance ont été effectuées à l'aide de la fonction *varpart* disponible dans la librairie *vegan* du langage R v.2.4.1 (R Foundation, 2003).

**Tableau 4.5.** Matrices de données utilisées pour effectuer les partitions de variance et les analyses canoniques de redondance (RDA).

Types de matrice		Variables de départ
Y (réponses)	Y <sub>1</sub>	Cu <sub>WS</sub> et Cu <sup>2+</sup>
	Y <sub>2</sub>	Zn <sub>WS</sub> et Zn <sub>DPASV</sub>
	Y <sub>3</sub>	Al <sub>WS</sub> et Al <sub>labile</sub>
X <sup>a</sup> (explicatives)	X <sub>1</sub>	TMBC, TMBN, AMBC, ratio C/N microbien, activité de l'uréase
	X <sub>2</sub>	pH, WSOC, carbone organique, Ca <sub>WS</sub> , Mg <sub>WS</sub> , K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
	X <sub>3</sub>	Régions, Sites

a En raison du petit nombre d'échantillons rhizosphériques (12), il n'y a pas assez de degrés de liberté disponibles pour permettre à toutes les variables explicatives d'être intégrées en même temps lors des analyses statistiques. Ainsi, pour la PV et les RDA associées à un métal donné, la signification de chacune des variables explicatives a été évaluée dans sa matrice explicative correspondante. À la suite de cette évaluation, seules les variables significatives ont été conservées et celles-ci sont incorporées dans les analyses statistiques multivariées présentées dans cette thèse.



**Figure 4.8.** Partition de la variance théorique d'une matrice réponse (Legendre et Legendre, 1998). Les portions A à C quantifient l'effet exclusif des groupes de variables explicatives sur la matrice réponse, alors que les portions D à G réfèrent aux effets combinés des groupes de variables explicatives. La portion H quantifie, quant à elle, la variance inexpliquée.

Enfin, les relations statistiques entre les variables biologiques et la spéciation des métaux ont été décrites, quantifiées et interprétées à l'aide d'analyses canoniques de redondance (RDA) menées sur chacun des métaux séparément (Tableau 4.4). La RDA est une combinaison de la régression multiple linéaire et d'une analyse en composante principale (Legendre et Legendre, 1998). Toutefois, contrairement à la régression multiple linéaire, elle permet d'expliquer plusieurs variables réponses en même temps. Cette analyse procède donc en identifiant la meilleure combinaison linéaire de variables pour expliquer la distribution des données de la matrice Y. Cette étape est suivie d'une projection de ces résultats dans une analyse en composante principale afin d'y extraire les valeurs propres et vecteurs propres de l'analyse permettant, ainsi, de quantifier l'intensité des relations observées (Legendre et Legendre, 1998). En raison de l'intérêt de ce projet pour la rhizosphère, les RDA ont été effectuées uniquement sur ce microenvironnement en ciblant, d'après les résultats obtenus par les partitions de la variance, uniquement les groupes de variables explicatives jouant un rôle significatif sur la spéciation du Cu, Zn et Al. Dans le cadre de ce projet, les RDA ont été produites par le logiciel CANOCO 4.5 pour Windows® (ter Braak et Smilauer, 1998). Les variables utilisées ont été centrées-réduites par CANOCO et des RDA de type 2 ont été effectuées afin d'identifier les relations existant entre les variables (Legendre et Legendre, 1998). La signification des variables explicatives et des axes canoniques ont tous les deux été évalués par des tests de permutations de Monte-Carlo (10 000 permutations). Ceux-ci ont été effectués sur les résidus de l'analyse en limitant les permutations d'objets à une même région d'échantillonnage (Legendre et Legendre, 1998).

## PARAGRAPHES DE LIAISON A

Afin de répondre au premier objectif de ce projet qui est de documenter la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère et la matrice de sols forestiers, des données de spéciation des métaux doivent être recueillies. Pour ce faire, deux approches complémentaires ont été utilisées dans cette thèse. Tout d'abord, les formes chimiques les plus réactives des métaux ont été mesurées directement sur les extraits à l'eau des sols échantillonnés. Par cette approche, une documentation précise de la fraction la plus biodisponible des métaux a été effectuée. Toutefois, à l'heure actuelle, il n'est pas possible d'obtenir un portrait complet de la spéciation d'un métal par des mesures directes puisque de nombreux métaux et formes chimiques ne sont pas encore mesurables.

Dans le but de faciliter l'accès à des données de spéciation, des logiciels de modélisation ont été développés. Par cette approche, un portrait complet de la spéciation d'un métal est obtenu indirectement par modélisation. L'obtention de résultats représentatifs de la réalité nécessite, toutefois, une calibration et une validation de ces modèles. Or, jusqu'à maintenant, peu d'études ont modélisé la spéciation des métaux dans les sols forestiers et dans la rhizosphère, de sorte que l'efficacité des modèles de spéciation n'est pas connue pour ces environnements. Afin de s'assurer que les données de spéciation des métaux obtenus dans cette thèse soient réalistes, une évaluation de la spéciation des métaux obtenue par modélisation est nécessaire. Cette étape d'évaluation de l'efficacité de la modélisation est d'autant plus importante dans ce projet que des environnements édaphiques contrastés, p. ex. sols rhizosphériques et matriciels; sols acides et neutres, sont couverts dans cette étude. L'article<sup>1</sup> présenté au chapitre cinq évalue donc l'efficacité de deux logiciels de spéciation, MINEQL+ 4.5 et WHAM 6, à modéliser l'activité du  $\text{Cu}^{2+}$ . Ces deux logiciels ont été choisis en raison de leur utilisation répandue et de leur approche de modélisation différente. Le logiciel de modélisation offrant les résultats les plus comparables à la mesure de référence a été utilisé afin d'obtenir les données de spéciation du Cu, Zn et Al dans ce projet.

---

<sup>1</sup> Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F. (2007) Comparing WHAM 6 and MINEQL+4.5 for the chemical speciation of  $\text{Cu}^{2+}$  in the rhizosphere of forest soils, *Environmental Science & Technology*, 41 (23): 8104-8110.

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. Identification de l'étudiant

Benoît Cloutier-Hurteau

Département de géographie. Faculté des arts et sciences

Ph. D. Géographie (3-155-1-0)

Directeur : François Courchesne, Université de Montréal

Co-directeur : Sébastien Sauvé, Université de Montréal

### 2. Description de l'article

**Titre :** Comparing WHAM 6 and MINEQL+ 4.5 for the chemical speciation of  $\text{Cu}^{2+}$  in the rhizosphere of forest soils.

**Auteurs :** Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F.

**Revue :** Article publié dans *Environmental Science & Technology* (vol. 41, p. 8104-8110).

### 3. Contribution de chaque auteur à l'article

**B. Cloutier-Hurteau :** Conception du projet, échantillonnage sur le terrain, analyse des échantillons, traitements des données, rédactions initiale et finale.

**S. Sauvé :** Conception du projet, rédaction finale.

**F. Courchesne :** Conception du projet, rédaction finale.

### 4. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Benoît Cloutier-Hurteau inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre « Rôle des microorganismes sur la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère de sols forestiers ».

SÉBASTIEN SAUVÉ		15 Sept. 2008
Nom	Signature	Date

F. COURCHESNE		16 Sept 2008
Nom	Signature	Date

## **CHAPITRE 5. Comparing WHAM 6 and MINEQL+ 4.5 for the chemical speciation of $\text{Cu}^{2+}$ in the rhizosphere of forest soils**

### **5.1 Introduction**

It is widely recognized that the environmental impact of metals is not dependent on total soil metals but mediated through dissolved metal species (Nolan *et al.*, 2003a, b). In that context, studying the chemical speciation of metals in soil solution helps us understand their potential environmental impacts. This concern is especially true for rhizosphere environments that control the transfer of elements from soil to plant.

Unfortunately, because many metal species are difficult to measure, the main tool used to study the speciation of metals in soil solution is computer modelling. Among the speciation models available, WHAM 6 and MINEQL+ 4.5 are some of the most cited, they are well established and they integrate the metal complexation capacity of dissolved organic matter differently. Indeed, WHAM 6 is a discrete site/electrostatic model that simulates the interactions of metals with humic substances using sites presenting two types of affinity for cations (type A and B) and three types of binding capacity (monodentate, bidentate or tridentate) (Tipping, 1998, 1994). Conversely, MINEQL+ 4.5, is a classical chemical equilibrium model that integrates all inorganic and organic ligands, mass balance and thermodynamic reactions to model chemical speciation (Schecher and McAvoy, 2003, 1992). Unfortunately, few studies have evaluated the reliability of these speciation models in soils and even more so in rhizospheric soils.

Since the free ionic form of copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) can be easily measured, Cu seems to be an ideal metal candidate to compare the reliability of these two speciation models. Therefore, the aim of this study was to evaluate the performance of modelling the  $\text{Cu}^{2+}$  activity in bulk and in rhizosphere forest soils by MINEQL+ 4.5 and WHAM 6.

## 5.2 Experimental section

### 5.2.1 Sampling and Analyses

Forest soils were sampled in two Canadian areas covering a range of chemical conditions (soil pH and Cu concentrations) but that were similar in terms of topography, vegetation, soil order, texture and mineralogy. Soils were collected on three sites in the Rouyn-Noranda area (48° 14'N, 79° 01'W) in August 2004, at 0.5, 2 and 8 km downwind from a Cu smelter (identified respectively as RN 1 to RN 3); and on three sites in the Monteregian area in August 2005, near a cement plant (45° 16'N, 73° 28'W), a steel-work (45° 51'N, 73° 13'W) and an airport (45° 31'N, 73° 23'W) (identified respectively as MTG 1 to MTG 3).

At each of the six sites, the rhizosphere and the bulk soil components were sampled under three trembling aspens (*Populus tremuloides* Michx.) from the B horizons of L<sub>u</sub>visol profiles, as described by Séguin *et al.* (2004). Briefly, the trees were uprooted and the fine roots (< 2 mm) were collected. The separation of the soil components was made in the field by shaking the roots. The soil material that fell down from the root was considered as bulk soil whereas, the material that stayed attached to the roots was considered as rhizosphere soil. In the laboratory, the separation of the rhizospheric material from the roots was completed by gently scraping the soil away with a plastic spatula. The root fragments were individually removed from the rhizosphere soil using plastic tweezers.

For each soil samples, the characterization of the soluble fraction was made on soil water extracts (soil:solution ratio of 1:10) obtained according to the methodology of Séguin *et al.* (2004). From the soil water extracts, pH and electrical conductivity (EC) were analyzed prior to filtration, while measurements of major cations ( $K^+$ ,  $Na^+$  and  $NH_4^+$ ) and anions ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  and  $PO_4^{3-}$ ) by ion-chromatography, dissolved organic carbon (DOC) by TOC analyzer, total water-soluble Al, Ca, Cu, Mg and Zn by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and  $Cu^{2+}$  activity by ion-selective electrode (ISE) were made after filtration through 0.45- $\mu m$  cellulosic membranes. The measurement of  $Cu^{2+}$  activity by ISE is based on the protocol



developed by Rachou *et al.* (2007). Water-extracts were done in triplicates for bulk samples while, due to mass shortage, the rhizosphere samples were duplicated when possible, for a total of 76 samples.

### 5.2.2 Data Input in Speciation Models

Copper speciation was calculated on laboratory replicates using total water-soluble Cu as input data, together with pH, the concentrations of major ions and the DOC concentration and composition. All these variables were measured directly, except for the composition of organic ligands which was estimated based on the literature (Courchesne and Turmel, 2005; Sandnes *et al.*, 2005; Van Hees *et al.*, 2005; Strobel, 2001; Strobel *et al.*, 2001; Ström *et al.*, 2001; Jones, 1998; Ström, 1997; Powell and Fenton, 1996; Shen *et al.*, 1996; Tani *et al.*, 1993; Grierson, 1992; Powell and Town, 1992). The literature review allowed us to establish four scenarios for organic ligands composition. As seen in Table 5.1, the scenarios vary with soil components (rhizosphere vs bulk) and as a function of soil pH (acidic vs neutral to alkaline). Moreover, they integrate three organic ligands: fulvic, humic and acetic acids. Indeed, these ligands are among the most common organic substances measured in forest soil solutions and are representative of the range of affinities existing between metals and soluble organic ligands. Thus, fulvic and humic acids are the main dissolved organic substances present in the solutions of forest soils (Van Hees *et al.*, 2005; Strobel, 2001) and are largely responsible for the formation of organic-Cu complexes (Strobel *et al.*, 2001). As for non-humic substances, monoprotic acids such as acetic acid are generally the main organic acids present in the Bk (Van Hees *et al.*, 2005; Strobel, 2001) as well as in the Rz soils (Sandnes *et al.*, 2005; Jones, 1998; Shen *et al.*, 1996).

The literature shows that the dissolved organic matter present in the bulk component of forest soils was composed of humic substances at more than 90% and that this proportion increased with increasing pH (Strobel, 2001; Tani *et al.*, 1993). We considered humic substances to be dominated by fulvic acids under acidic conditions (Courchesne and Turmel, 2005) while humic acids represented up to one-third of total humic substances under near-neutral condition (Powell and Fenton, 1996; Powell and Town, 1992) (Table 5.1). For non-humic substances in Bk forest soil samples, Strobel

(2001) derived an inverse relationship between the proportion of C originating from low-molecular-weight carboxylic acids (LMWCAs) and soil solution pH. This relationship clearly demonstrated that at a pH close to 5, up to 5% of the total DOC was composed of LMWCAs whereas virtually no LMWCAs were present in the DOC at a pH close to neutrality (Table 5.1).

**Tableau 5.1.** Scenarios, estimated from the literature, used to represent the composition of dissolved organic substances in the different types of soil samples.

Scenario <sup>a</sup>	Sampling sites <sup>b</sup>	Fulvic acids	Humic acids	Acetic acid
1	Bulk: RN sites and site MTG 3	95%	-	5%
2	Rhizosphere: RN sites and site MTG 3	40%	-	60%
3	Bulk: sites MTG 1 and MTG 2	70%	30%	-
4	Rhizosphere: sites MTG 1 and MTG 2	17%	8%	75%

a Based on works of Courchesne and Turmel (2005), Sandnes *et al.* (2005), Van Hees *et al.* (2005), Strobel (2001), Strobel *et al.* (2001), Ström *et al.* (2001), Jones (1998), Ström (1997), Powell and Fenton (1996), Shen *et al.* (1996), Tani *et al.* (1993), Grierson (1992) and Powell and Town (1992).

b RN = Rouyn-Noranda area; MTG = Monteregian area.

Several studies reported that the proportion of non-humic substances increased several-fold in the rhizosphere component compared to the associated bulk soil, because of the release of exudates from roots and microbes which are the main sources of soluble organic materials in the rhizosphere (Strobel, 2001; Ström *et al.*, 2001; Jones, 1998). However, observations made in the rhizosphere of plants adapted to calcareous environments (calcicole plants) revealed that root exudates contained more LMWCAs than in the rhizosphere of calcifuge plants that are adapted to acidic environments (Jones, 1998; Ström, 1997). These observations reflect the need for calcicole plants to increase the availability of nutrients such as Fe and P which are insoluble at high pH. A similar trend was observed in the rhizosphere of forest soils from Sweden, where a significant positive correlation was detected between soil pH and the concentration of LMWCAs (Shen *et al.*, 1996). However, few studies have specifically quantified the magnitude of the difference in monoprotic acid concentrations between the bulk and rhizosphere components. Yet, Grierson (1992) demonstrated that the concentrations of citrate and malate were up to one order of magnitude higher in the rhizosphere of *Banksia integrifolia* as compared to the bulk soil. In the absence of other data, we

postulated that the same pattern could be applied to monoprotic organic compounds. Therefore, we considered that at least 60% of the total DOC was present as non-humic substances under acidic conditions. At neutral pH in the Rz, this level was assumed to increase to 75% according to results gathered by Ström (1997) and Shen *et al.* (1996) (Table 5.1).

### 5.2.3 Comparison of Modelling and Parameters Settings

To test the reliability of model outputs, the  $\text{Cu}^{2+}$  activities obtained from direct ISE measurements were compared with those obtained through modelling with WHAM 6 and MINEQL+ 4.5. The reliability of the models was determined by calculating the root mean square residual (RMSR) as described by Macdonald and Hendershot (2006).

$$\text{RMSR} = [\Sigma(X_{\text{measured}} - X_{\text{predicted}})^2 / n]^{1/2} \quad (1)$$

Where  $X_{\text{measured}}$  and  $X_{\text{predicted}}$  refer to the  $\text{Cu}^{2+}$  activity measured by ISE and predicted by modelling, respectively, while  $n$  refers to the number of samples analyzed (76 in the present study). Consequently, small RMSR values imply that the model fits the measured data well.

An extensive evaluation of both speciation models revealed the existence of two main differences between WHAM 6 and MINEQL+ 4.5. First, the expression of the thermodynamic reactions between metals and hydroxide anions differed between models and, consequently, generated differences in the conditional association constants. Second, the complexation behaviour of humic substances with metals was integrated differently in the two models. Because these characteristics were part of the original design of the models, they were maintained for the comparison. However, to insure an objective comparison of WHAM 6 and MINEQL+ 4.5, we harmonized the constants for the inorganic reactions between models, except for the constants with the hydroxide anion and their conditional association constants. Since MINEQL+ 4.5 integrates more inorganic reactions than WHAM 6 and because it was updated recently (Schecher, 2001), the WHAM 6 database for inorganic reactions was completed by adding the reactions documented in the MINEQL+ 4.5 database. Moreover, the acetate anion and

the reactions of this ligand with metals were added to both models (Table 5.2). These modifications increased the comparability of the two models without fundamentally modifying their respective natures.

**Tableau 5.2.** Conditional association constants between metals and organic ligands used in the speciation models to calculate Cu speciation.

Complexes	Log K	References <sup>a</sup>	Complexes	Log K	References <sup>a</sup>	
<b>Metals complexed with fulvic acids (FA)<sup>b</sup></b>			<b>Metals complexed with acetic acid (AA)<sup>d</sup></b>			
<b>AlFA<sup>+</sup></b>	4.60	116	<b>AlAA<sup>+2</sup></b>	2.02	163	
<b>AlFA<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	3.50	116	<b>AlAA<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	3.50	163	
<b>CaFA</b>	3.40	104	<b>CaAA<sup>+</sup></b>	1.18	187	
<b>MgFA</b>	2.20	104	<b>CuAA<sup>+</sup></b>	2.61	196	
<b>CuFA</b>	pH < 6.00	5.90	248	<b>CuAA<sub>2</sub></b>	3.40	187
	pH > 6.00	5.03	176	<b>CuAA<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	3.94	187
<b>CuFA<sub>2</sub><sup>-2</sup></b>	pH < 6.00	3.95	136	<b>CuHAA<sup>+2</sup></b>	4.59	196
	pH > 6.00	4.03	136	<b>HAA</b>	4.76	187
<b>ZnFA</b>	pH < 6.00	4.78	4	<b>KAA</b>	-0.19	187
	pH > 6.00	4.50	4	<b>MgAA<sup>+</sup></b>	1.27	187
<b>Metals complexed with humic acids (HA)<sup>b</sup></b>			<b>NaAA</b>	-0.18	187	
<b>AlHA<sup>+</sup></b>	6.62	2, 116 et 118 <sup>c</sup>	<b>ZnAA<sup>+</sup></b>	1.58	187	
<b>CaHA</b>	3.60	161	<b>ZnAA<sub>2</sub></b>	2.64	187	
<b>Ca<sub>2</sub>HA<sup>+2</sup></b>	6.70	161				
<b>CuHA</b>	9.70	243				
<b>CuHA<sub>2</sub><sup>-2</sup></b>	5.40	63				
<b>MgHA</b>	5.50	104				
<b>ZnHA</b>	4.93	236				

a See the bibliography section for correspondance of the reference.

b Conditional association constants integrated in MINEQL+ 4.5 model.

c Based on interpolation made from these references.

d Conditional association constants integrated in MINEQL+ 4.5 and WHAM 6 models.

Finally, MINEQL+ did not contained, as WHAM 6 does, a complete database describing the reactions of organic substances with metals. Consequently, the conditional

association constants for fulvic and humic with metals were compiled from the IUPAC database (IUPAC, 2001) and from other recent references (Kabata-Pendias, 2001; Wolf *et al.*, 1999) (Table 5.2) and were subsequently added to MINEQL+. When an organic-metal complex had multiple conditional constant values, we selected the constant obtained under the experimental conditions that most closely reflected those of our study. Moreover, in both models, the modelling of Cu speciation was performed at 25 °C, in closed system, without taking into account the solid phase of the soil and using activity corrections according to the Debye-Hückel equation.

## 5.3 Results and Discussion

### 5.3.1 Properties of Water Extracts

The properties of water extracts and of soil components are presented for each site in Tables 5.3 and 5.4. The laboratory replicates of these properties were used, for each soil component and under each tree, as input data in the speciation models. Soil solution pH spanned up to two orders of magnitude between sampling sites, with sites of RN and MTG 3 considered as acidic while sites MTG 1 and 2 had near-neutral conditions (Table 5.3). Higher concentrations of water-soluble Al, Cu, Zn, K<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were observed at the RN sites (Tables 5.3 and 5.4) and were attributed to higher anthropogenic deposition in this area and to more acidic soil pH levels. On the other hand, higher values of EC, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, water-soluble Ca and Mg were measured at the MTG sites (Tables 5.3 and 5.4). They are linked to the mineralogy and texture of the parent material in this area. For DOC and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> concentrations, no clear patterns were noted.

The water extracts of the rhizosphere were enriched in DOC, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and water-soluble Al, Ca, Cu, Mg and Zn, but were depleted in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as compared to bulk soils (Tables 5.3 and 5.4). No trend existed for SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. These observations generally agreed well with previous studies (Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2003; Gobran and Clegg, 1996) except for some studies conducted under controlled environment (Hinsinger, 1998). For example, in our rhizosphere samples, acidification was observed in acidic soils and alkalisation was recorded in near-neutral soils (Table 5.3). This pattern differed from results of other studies (Hinsinger *et al.*, 2003) and could be attributed to the adaptation of tree species to pH-contrasted environments.

**Tableau 5.3.** Chemical variables and concentrations of dissolved metals in water extracts for the bulk (B) and the rhizosphere (R) soils of the six sampling sites.

Sites <sup>a</sup>		pH <sup>b</sup>		DOC <sup>c</sup>		EC <sup>c</sup>		Al <sub>ws</sub> <sup>c</sup>		Cu <sub>ws</sub> <sup>c</sup>		Zn <sub>ws</sub> <sup>c</sup>	
		M <sup>d</sup>	SD <sup>d</sup>	M <sup>d</sup>	SD <sup>d</sup>	M <sup>d</sup>	SD <sup>d</sup>	M <sup>d</sup>	SD <sup>d</sup>	M <sup>d</sup>	SD <sup>d</sup>	M <sup>d</sup>	SD <sup>d</sup>
				--- mg L <sup>-1</sup> ---		--- µS cm <sup>-1</sup> ---		-----		µmol L <sup>-1</sup> -----			
<b>Rouyn-Noranda area</b>													
<b>RN 1</b>	B	5.01	0.04	26.8	4.5	20.1	3.0	40.0	8.8	0.36	0.11	0.70	0.08
	R	4.98	0.02	78.1	15.0	33.6	1.5	47.4	35.0	0.86	0.34	1.18	0.09
<b>RN 2</b>	B	5.40	0.09	48.9	23.5	12.3	4.4	31.2	7.1	0.85	0.63	0.31	0.24
	R	5.34	0.12	75.7	3.5	25.6	3.6	44.9	17.9	1.63	0.47	0.56	0.27
<b>RN 3</b>	B	5.44	0.16	64.1	3.0	11.9	1.6	36.2	21.9	0.29	0.04	0.08	0.04
	R	5.35	0.08	82.1	4.8	23.7	3.3	58.8	16.9	0.56	0.03	0.15	0.01
<b>Monteregian area</b>													
<b>MTG 1</b>	B	6.79	0.15	60.1	19.3	66.3	28.6	11.8	2.8	0.11	0.03	0.12	0.09
	R	6.93	0.21	90.2	36.2	98.7	33.9	22.0	9.0	0.16	0.05	0.07	0.09
<b>MTG 2</b>	B	7.03	0.11	44.7	4.1	61.4	6.6	8.51	2.96	0.08	0.01	0.05	0.01
	R	7.06	0.18	55.2	4.9	87.9	14.6	15.3	15.5	0.13	0.04	0.09	0.06
<b>MTG 3</b>	B	5.54	0.22	51.0	8.5	43.8	7.0	23.4	4.2	0.04	0.01	0.07	0.02
	R	5.43	0.16	91.8	7.0	56.6	7.0	29.6	6.7	0.08	0.02	0.09	0.02

a See text for full descriptions of site codes.

b Soil solution pH measured in a 1:10 soil:water extract.

c DOC = dissolved organic carbon; EC = electrical conductivity; Al<sub>ws</sub> = total water-soluble Al; Cu<sub>ws</sub> = total water-soluble Cu; Zn<sub>ws</sub> = total water-soluble Zn.

d Mean (M) and standard deviations (SD) of field triplicates.

**Tableau 5.4.** Cations and anions concentrations in the water extracts of the bulk (B) and the rhizosphere (R) soils of the six sampling sites.

Sites <sup>a</sup>		Cl <sup>-</sup>		F <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		Ca <sub>ws</sub> <sup>b</sup>		Mg <sub>ws</sub> <sup>b</sup>		Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		
		M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	
----- μmol L <sup>-1</sup> -----																				
<b>Rouyn-Noranda area</b>																				
RN 1	B	10.2	2.2	<dlm <sup>d</sup>	-	7.97	0.73	71.3	14.3	42.7	5.3	17.4	1.1	24.9	2.0	13.0	1.0	38.1	1.7	
	R	28.7	4.7	<dlm	-	3.37	0.92	71.1	12.6	38.7	1.9	18.7	3.3	48.9	12.3	22.8	6.6	99.3	15.2	
RN 2	B	6.61	3.08	<dlm	-	34.1	24.5	17.5	4.1	24.0	5.1	16.6	1.5	36.0	1.9	8.96	0.92	26.4	18.7	
	R	22.9	7.2	<dlm	-	12.4	11.2	35.9	8.7	29.6	2.0	18.7	2.7	42.9	13.8	17.5	4.5	99.7	42.7	
RN 3	B	8.41	2.41	<dlm	-	4.01	1.76	8.66	0.72	15.3	3.0	19.5	5.5	50.8	2.8	9.52	0.92	26.1	4.9	
	R	13.9	2.6	<dlm	-	4.46	0.89	27.1	5.2	29.5	3.4	33.8	2.4	44.4	3.0	18.1	3.2	88.0	7.7	
<b>Monteregian area</b>																				
MTG 1	B	32.2	21.4	31.1	18.2	32.8	24.2	92.2	74.1	237	98	59.8	25.6	87.5	36.1	5.54	3.78	10.6	0.9	
	R	67.2	15.1	<dlm	-	<dlm	-	74.5	43.1	397	149	73.3	24.3	77.9	20.3	0.62	1.07	41.6	29.2	
MTG 2	B	27.1	10.7	81.3	68.5	106	23.2	47.0	15.8	214	22	52.8	9.0	38.2	3.5	8.34	3.16	9.34	2.25	
	R	73.9	17.4	<dlm	-	30.7	23.1	60.9	21.9	282	30	73.2	19.2	55.9	15.6	7.21	4.88	38.3	30.3	
MTG 3	B	26.3	14.8	<dlm <sup>e</sup>	-	71.9	20.9	63.1	10.0	62.6	4.8	43.7	5.4	102	26	3.71	4.77	18.0	7.7	
	R	68.5	21.9	<dlm	-	30.8	43.1	45.9	11.0	85.4	8.9	49.8	0.6	111	21	3.75	2.46	55.1	17.7	

a See text for full descriptions of site codes.

b Total water-soluble Ca, Mg.

c Mean and standard deviations of field triplicates.

d Below the detection limit of the method (F<sup>-</sup> = 5 μmol L<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 1 μmol L<sup>-1</sup>).

e Two of the three trees of the site are below the detection limit, while the other has a F<sup>-</sup> concentration = 216 μmol L<sup>-1</sup>.

**Tableau 5.5.** Free-ion Cu activity measured by ion-selective electrode and Cu speciation calculated by MINEQL+ 4.5 and WHAM 6.

Sites <sup>a</sup>		Cu <sup>2+</sup> <sup>b</sup>		MINEQL+ 4.5			WHAM 6		
		M <sup>c</sup>	SD <sup>c</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Cu-inorg <sup>d</sup>	Cu-org <sup>d</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Cu-inorg <sup>d</sup>	Cu-org <sup>d</sup>
		----- nM -----		----- % -----					
<b>Rouyn-Noranda area</b>									
<b>RN 1</b>	B <sup>e</sup>	28.4	4.2	11.2	0.20	88.6	11.2	0.20	88.6
	R	40.7	8.0	10.5	0.20	89.3	12.2	0.20	87.6
<b>RN 2</b>	B	16.8	10.9	5.05	0.05	94.9	1.00	-	99.0
	R	32.4	12.8	9.80	0.10	90.1	15.0	0.20	84.8
<b>RN 3</b>	B	16.1	4.7	4.15	0.05	95.8	0.10	-	99.9
	R	22.8	7.4	8.70	0.10	91.2	8.00	0.10	91.9
<b>Monteregian area</b>									
<b>MTG 1</b>	B	0.64	0.53	0.40	-	99.6	-	-	100
	R	1.33	0.70	1.60	0.40	98.0	0.10	-	99.9
<b>MTG 2</b>	B	0.39	0.30	0.50	0.10	99.4	-	-	100
	R	1.59	0.30	2.90	1.10	96.0	0.10	-	99.9
<b>MTG 3</b>	B	1.28	0.48	5.50	0.10	94.4	-	-	100
	R	2.80	0.24	7.70	0.10	92.2	0.20	-	99.8

a See text for full descriptions of site codes.

b Free Cu ion measured by ion-selective electrode.

c Mean and standard deviations of field triplicates.

d Cu-inorg = inorganic forms of Cu; Cu-org = organic forms of Cu.

e B = bulk soil; R = rhizosphere soil.

Finally, large variations in pH values and water-soluble Cu concentrations between sampling sites appeared as the main factors responsible for the wide range of measured Cu<sup>2+</sup> activities (0.39 to 41 nM) reported in Table 5.5. These activities were higher in the rhizosphere compared to bulk soils and were comparable to previous determinations in forest soils (Legrand *et al.*, 2005; Sauvé *et al.*, 1997). Yet, these contrasts in absolute Cu<sup>2+</sup> activities differed from the results of Legrand *et al.* (2005) where no trend was noted between soil components. They also found that the fraction of water-soluble Cu present as Cu<sup>2+</sup> was systematically higher in bulk soils as compared to the rhizosphere component (Legrand *et al.*, 2005). The differences in tree species, soil orders and soil textures between studies probably explain these discrepancies.



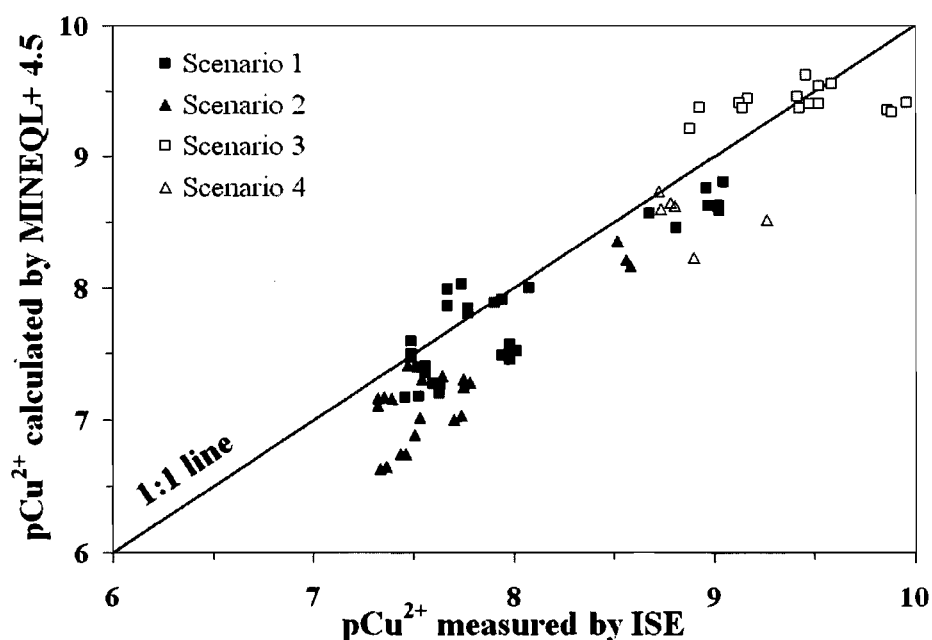
### 5.3.2 Estimation of $\text{Cu}^{2+}$ Activity using MINEQL+ 4.5

The  $\text{Cu}^{2+}$  activities measured by ISE and the values calculated with MINEQL+ 4.5 generally differed by less than 0.5 order of magnitude, except for some soils in scenarios 2 to 4 where the disparity reached up to 0.75 order of magnitude (Figure 5.1). MINEQL+ 4.5 provided excellent estimates of  $\text{Cu}^{2+}$  activities as demonstrated by the low RMSR value (RMSR = 0.37). Despite its good prediction of  $\text{Cu}^{2+}$  activities, we noted that MINEQL+ slightly overestimated the measured  $\text{Cu}^{2+}$  activities for all DOC scenarios. Many factors can be invoked to explain these discrepancies. One of them is the error associated with the free-ion measurements which could be expected to be larger at lower  $\text{Cu}^{2+}$  activities. All our measurements were however well above the detection limits of the method estimated at  $10^{-14}$  M (Rachou *et al.*, 2007). Moreover, because the errors between measured and estimated  $\text{Cu}^{2+}$  activities were constant for the whole  $\text{pCu}^{2+}$  range, this source of discrepancy was viewed as minor for our dataset. The disparities may also be associated with the scenarios developed to represent the DOC composition or to the conditional stability constants used to describe the complexation of metals by organic substances (Tables 5.1 and 5.2). However, in both cases the data used in the models were gathered from the most recent publications on these topics. It remains that the literature on DOC composition in the rhizosphere is sparse, especially for forest soils and for a wide range of pH levels. We submit that our limited knowledge of the composition of DOC in the rhizosphere could contribute to explaining the slight but systematic discrepancies observed between measured  $\text{pCu}^{2+}$  values and those modelled with MINEQL+ (Figure 5.1). In contrast, the selection of complexation constants for metals was based on an abundant and critically-evaluated literature. We thus assumed that the errors due to these complexation constants values were relatively minor compared to those associated with the scenarios for DOC composition.

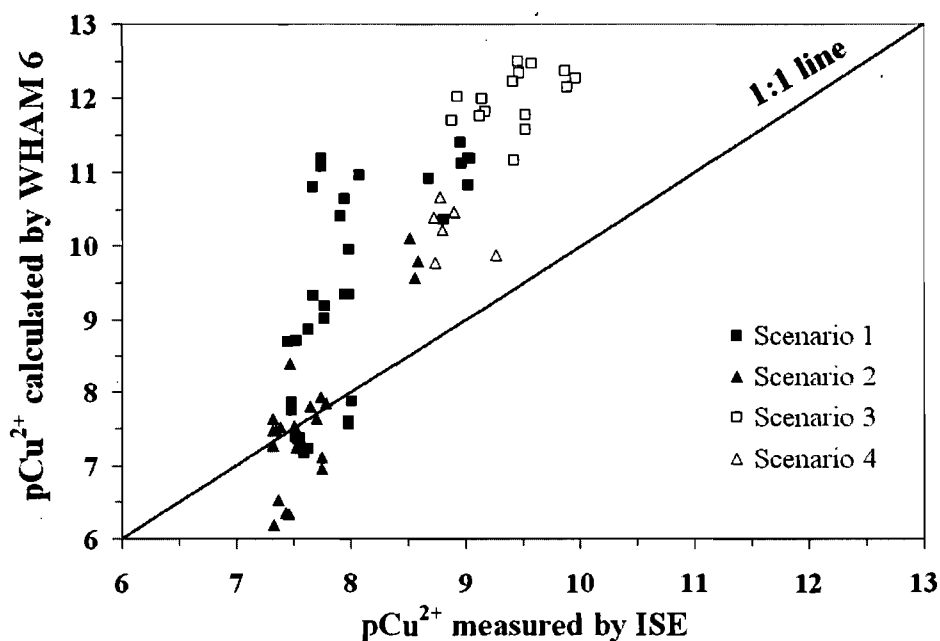
### 5.3.3 Estimation of $\text{Cu}^{2+}$ Activity using WHAM 6

In contrast to MINEQL+ 4.5, WHAM 6 did not provide good estimates of  $\text{Cu}^{2+}$  activities (RMSR = 1.74; Figure 5.2). For most samples, WHAM 6 underestimated the activity of  $\text{Cu}^{2+}$  in water extracts when compared to measured values, mostly because it overestimated the complexation of Cu by organic ligands (Table 5.5). This observation

suggests that predicted interactions of metals with humic substances in WHAM 6 are too aggressive as compared to measured data, mostly for near-neutral soils and for bulk acidic soils. The role of competition between metals for organic ligands could partly help explain this observation. Recent simulations performed with WHAM 6 revealed that the competition between Al and Cu for DOC binding sites was highest at pH values below 5.5, when Al concentrations increased markedly (Tipping, 2005). Our results agreed with this finding and showed that Al competition at pH values below 5.5 had increased the proportion of  $\text{Cu}^{2+}$  activities in solution (see supplementary data 1). At pH values above 5.5, the competition with Al decreased sharply and most Cu was then bound to DOC. Therefore, the slight improvement in WHAM 6 predictions for  $\text{Cu}^{2+}$  activities in acidic samples as compared to near-neutral solutions could be associated to the pH-dependent competition between Al and Cu for organic ligands.



**Figure 5.1.** Comparison of  $\text{Cu}^{2+}$  activities measured with an ion-selective electrode (ISE) with  $\text{Cu}^{2+}$  activities modelled by MINEQL+ 4.5 (root mean square residual (RMSR) = 0.37). For modelling purposes, four distinct scenarios were used to estimate the DOC composition and to calculate Cu speciation (see Table 5.1 for details on scenarios).



**Figure 5.2.** Comparison of  $\text{Cu}^{2+}$  activities measured with an ion-selective electrode (ISE) with  $\text{Cu}^{2+}$  activities modelled by WHAM 6 (root mean square residual (RMSR) = 1.74). For modelling purposes, four distinct scenarios were used to estimate the DOC composition and to calculate Cu speciation (see Table 5.1 for details on scenarios).

Other studies have estimated the Cu speciation in soil solutions using WHAM 6 although with varying degrees of success. For example, good predictions of  $\text{Cu}^{2+}$  activities modelled by WHAM 6 were obtained when compared to ISE (Vulkan *et al.*, 2000) and Donnan membrane techniques (Weng *et al.*, 2002) for a range of soil solution properties. Inversely, Nolan *et al.* (2003a) did not obtain a good fit between WHAM 6 predictions and  $\text{Cu}^{2+}$  measurements by the Donnan dialysis membranes for a variety of contaminated and agricultural soils. In all cases, the authors mentioned that the best results were obtained with WHAM 6 when only 70% of the DOC was active, the remaining DOC being considered as inert. In our modelling study with WHAM 6, the entire DOC was considered as active. Therefore, and based on previous studies, this initial condition was probably not optimal for WHAM 6 and may explain the poor  $\text{Cu}^{2+}$  predictions. To test this possibility, a sensitivity analysis was performed by varying the proportions of inert DOC. It revealed that increasing the proportion of inert DOC

decreased the RMSR (see supplementary data 2). The best prediction was obtained when 70% of total DOC was considered inert, with a RMSR of 0.94. This indeed improved the simulation of  $\text{Cu}^{2+}$  activities by WHAM 6 but the predictions nonetheless remained much weaker than those obtained with MINEQL+ 4.5 (see supplementary data 2). Moreover, the improved prediction at 70% of inert DOC only poorly reflected the conditions observed in forest soil solutions of bulk and rhizosphere samples (Strobel *et al.*, 2001). Also, it could not help explain the discrepancies in  $\text{Cu}^{2+}$  observed between the two speciation models.

The sensitivity analysis further indicated that the reliability of the  $\text{Cu}^{2+}$  predictions was dependent on the organic ligands concentration and composition. Indeed, the sensitivity test for WHAM 6 was conducted with or without the scenario of DOC composition and with or without the acetate ion (see supplementary data 2). The results showed, for up to 50% of inert DOC, that  $\text{Cu}^{2+}$  activities were better modelled by integrating the DOC scenario and the acetate ion. Between 50% and 90% of inert DOC, no differences were observed between runs. This emphasized the fact that knowledge of the composition of DOC and its consideration when estimating metal species have a clear impact on the reliability of the prediction of speciation models (Nolan *et al.*, 2003a; Weng *et al.*, 2002). It is especially true in bulk and rhizosphere components of forest soils where the composition of DOC vary widely (Kaiser *et al.*, 2001; Michalzik *et al.*, 2001). Nevertheless, the good fit between  $\text{Cu}^{2+}$  activities simulated with MINEQL+ 4.5 and measurements by ISE suggests that the composition of DOC was adequately estimated from literature. In short, more data on the composition of dissolved organic substances in solution samples of the bulk and rhizosphere components of forest soils are needed to improve the prediction of Cu speciation.

#### **5.3.4 Comparison of the Modelling between MINEQL+ 4.5 and WHAM 6**

The prediction of  $\text{Cu}^{2+}$  activities differed markedly between the two speciation models with a better fit observed for MINEQL+ 4.5 (Figures 5.1 and 5.2). However, our comparison procedure did not allow to identify the causes of the differences between the speciation models. This was particularly difficult because the models differed markedly

in their representation of thermodynamic reactions between metals and hydroxide anions as well as in the complexation behaviour of humic substances with metals.

Therefore, the inorganic reactions between metals and hydroxide anions in MINEQL+ 4.5 were harmonized with those of WHAM 6 as a second step to identify the source of the discrepancies between models. The idea was to reduce the difference between models in terms of metals complexation with humic substances. Simulations showed that  $\text{Cu}^{2+}$  activities were well predicted by MINEQL+, with a RMSR of 0.48 (see supplementary data 3). This corresponded to a slight decrease of the  $\text{Cu}^{2+}$  prediction as compared to the previous outputs of MINEQL+ (Figure 5.1). It suggests that the representation of thermodynamic reactions between metals and hydroxide anions has a weak effect on the modelling of  $\text{Cu}^{2+}$  activities. In other words, the  $\text{Cu}^{2+}$  discrepancies observed between MINEQL+ 4.5 and WHAM 6 may be attributed to differences in the complexation behaviour of humic substances with metals.

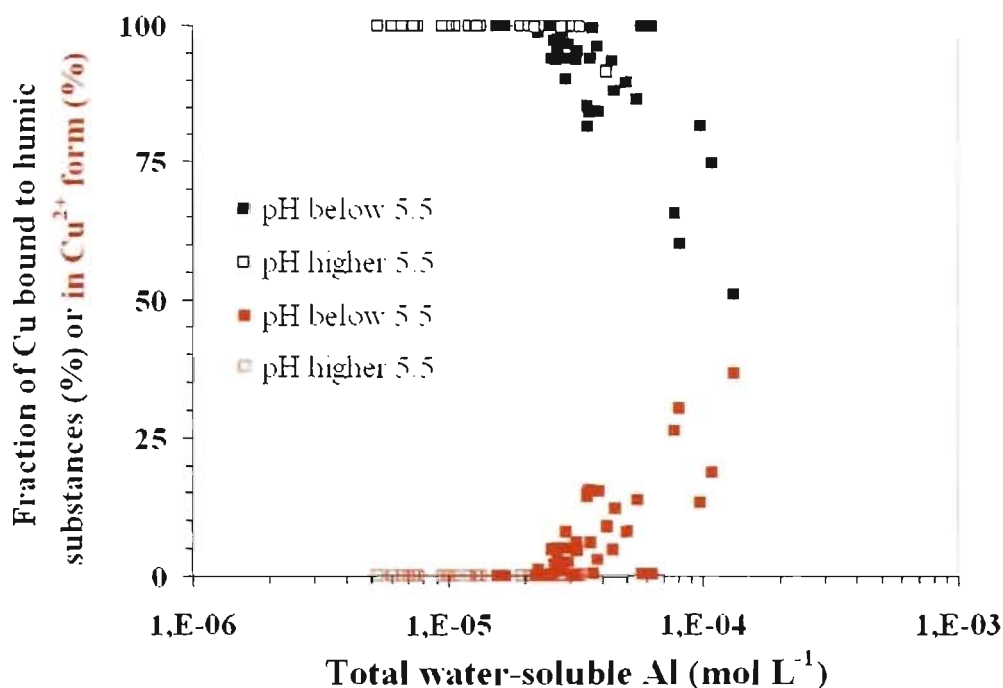
For humic substances, WHAM 6 integrates two types of site affinity for cations (type A and B), three types of binding capacity (monodentate, bidentate or tridentate) as well as association constants describing their interactions with metals. MINEQL+ 4.5 considers their interactions between metals and ligands using only association constants. From our results, the approach proposed by MINEQL+ 4.5 appeared to work well because the reactions and the association constants were well defined. Inversely, the approach of WHAM 6 generates two problems even if it appeared more thorough and realistic. Firstly, the interactions between humic substances and Cu do not seem to be fully calibrated. Indeed, previous studies with WHAM 6 obtained better results with 30% of inert DOC (Nolan *et al.*, 2003a; Weng *et al.*, 2002; Vulkan *et al.*, 2000; Tipping, 1998) while we obtained an optimal response at 70% of inert DOC (see supplementary data 2). These optimal conditions did not necessarily reflected the conditions in forest soils (Strobel *et al.*, 2001) but rather a limitation of the speciation model. Secondly, despite the optimization of the DOC composition, the  $\text{Cu}^{2+}$  predictions of WHAM 6 were still less reliable than those of MINEQL+ 4.5 (see supplementary data 2). To that effect, our previous simulations suggested that the interactions of humic substances with Cu in

WHAM 6 were too aggressive and overestimated the role of humic substances (Table 5.5).

Our study indicated that, in its present form, WHAM 6 could not reliably estimate the activity of  $\text{Cu}^{2+}$ , and thus the speciation of Cu, in bulk and rhizosphere soil solutions presenting a range of DOC concentration and composition. In comparison, MINEQL+ 4.5 provided a good estimation of  $\text{pCu}^{2+}$  values. Our results also revealed that the reliability of the predictions was mostly associated to the composition of DOC and to differences in the way models treated the interactions of humic substances with metals. These two aspects need to be taken into account when Cu speciation is estimated from soil solutions presenting large variations in DOC composition.

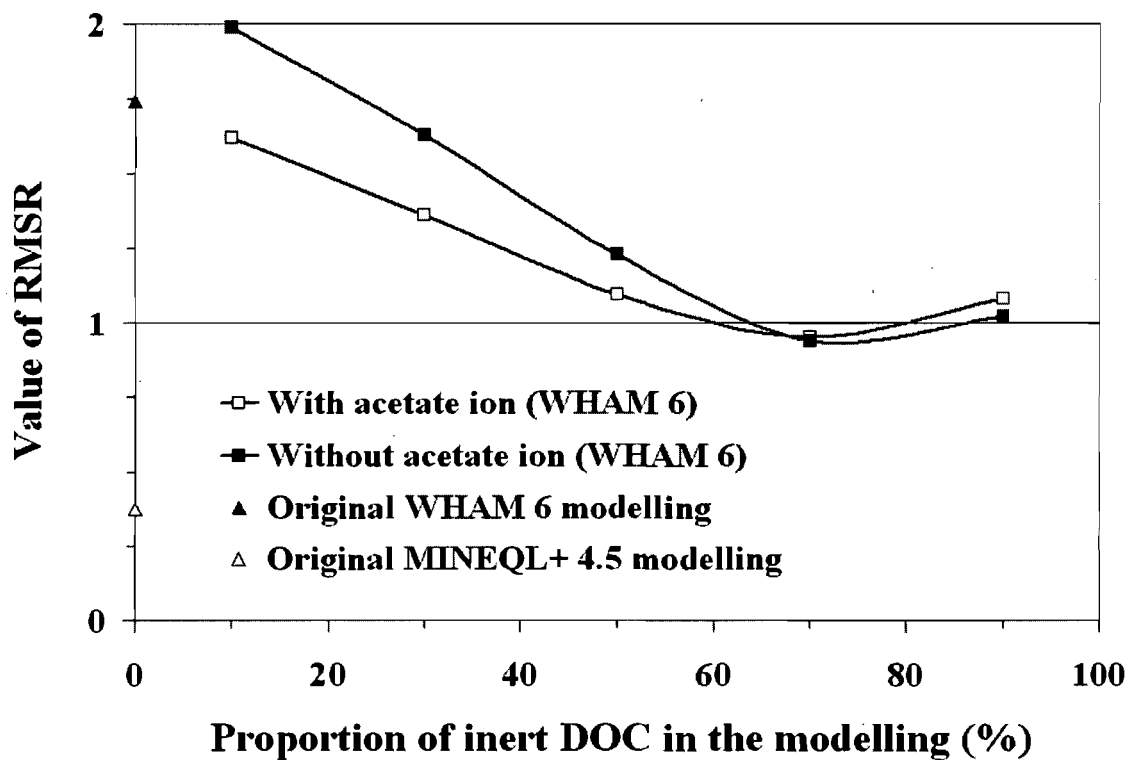
## 5.4 Supplementary data

### 5.4.1 Supplementary data 1



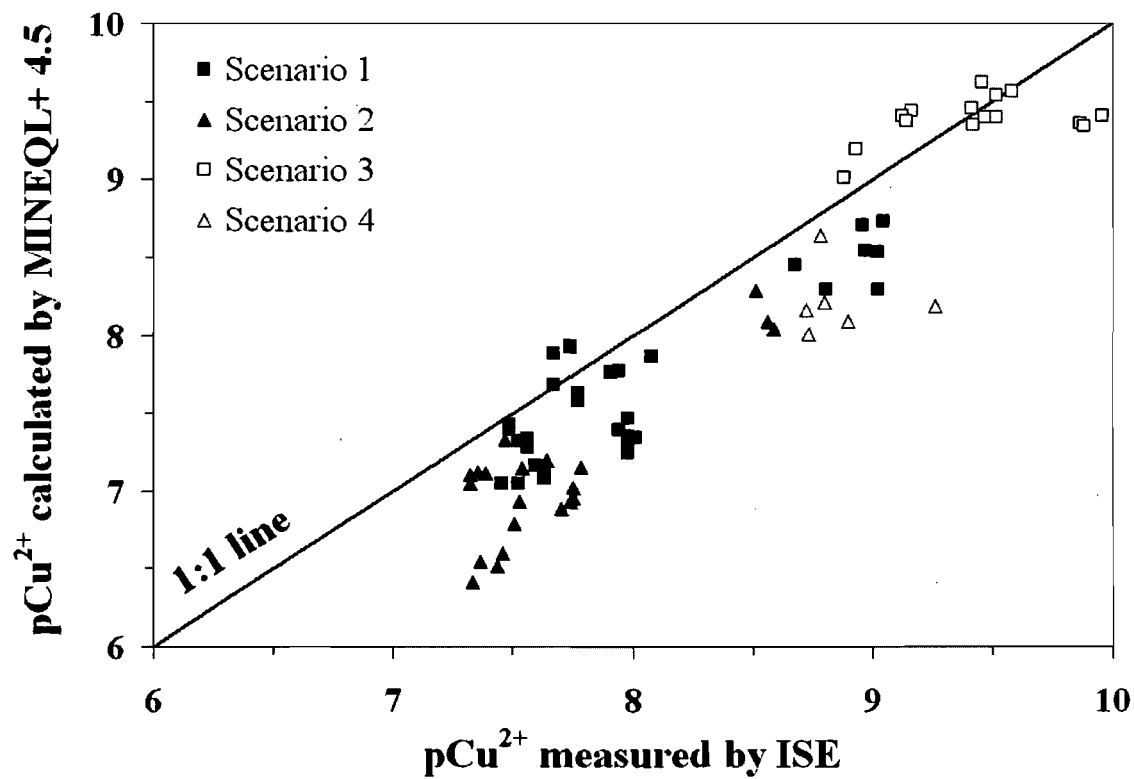
**Figure 5.3.** pH dependency of the competition between Al and Cu for binding sites on humic substances and, its incidence on the Cu speciation calculated by WHAM 6.

## 5.4.2 Supplementary data 2



**Figure 5.4.** Sensitivity analysis conducted with WHAM 6 on the influence of acetate on the prediction of  $\text{Cu}^{2+}$  activities. The Cu speciation was calculated using different proportions of inert DOC. The calculated  $\text{Cu}^{2+}$  activities were then compared with those measured by ion-selective electrode using the root mean square residual (RMSR).

## 5.4.3 Supplementary data 3



**Figure 5.5.** Comparison between Cu<sup>2+</sup> activities measured with an ion-selective electrode (ISE) and Cu<sup>2+</sup> activities modelled by MINEQL+ 4.5 (root mean square residual (RMSR) = 0.48). Before modelling, the reactions between cations and hydroxide anion in MINEQL+ 4.5 were harmonized with those of WHAM 6. For modelling purposes, four distinct scenarios were used to estimate DOC composition and to calculate Cu speciation (see Table 5.1 of the manuscript for details on scenarios).



## PARAGRAPHERS DE LIAISON B

Le chapitre précédent a présenté et validé l'approche de modélisation utilisée pour documenter la spéciation des métaux dans ce projet. Suite à cette validation, le chapitre six<sup>2</sup> est le premier de trois chapitres documentant la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers. Dans ce chapitre, les résultats de spéciation du Cu, obtenus à l'aide de mesures directes ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et par modélisation (formes organiques et inorganiques), permettent de répondre au premier objectif du projet de doctorat.

Dans un deuxième temps, l'intensité et la polarité de l'influence des microorganismes sur la spéciation du Cu ont aussi été documentées dans le chapitre six. Pour ce faire, des propriétés biologiques ont été mesurées sur les sols. Ces données ont par la suite été mises en relation à l'aide d'analyses statistiques multivariées afin de pouvoir quantifier et dégager des liens statistiques entre ces variables. L'interprétation de ces liens permet de mettre en évidence l'action de certains mécanismes microbiens sur les formes biodisponibles de Cu dans la rhizosphère de sols forestiers et, de ce fait, d'atteindre les deuxième et troisième objectifs de cette thèse.

L'intérêt porté au Cu dans cette thèse tient à trois points. Tout d'abord, le Cu est l'un des métaux traces les plus présents dans l'environnement (Essington, 2004) et, ainsi, les plus susceptibles de produire des effets de toxicité. De plus, comme le Cu est essentiel pour les organismes vivants, il possède un comportement biogéochimique contrôlé par le cycle sol-plante en milieux forestiers (Ukonmaanaho *et al.*, 2001), ce qui se traduit par des accumulations importantes de Cu dans la végétation, notamment les racines des arbres (Séguin *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2003). Ces caractéristiques soulignent le rôle clé joué par la rhizosphère sur la biogéochimie de ce métal. Finalement, des techniques analytiques fiables permettent de mesurer les formes biodisponibles de ce métal. Les résultats présentés dans ce chapitre fournissent un éclairage nouveau quant au rôle joué par les microorganismes de la rhizosphère sur la biogéochimie du Cu.

---

<sup>2</sup> Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F. (2008) Influence of microorganisms on Cu speciation in the rhizosphere of forest soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 40 (9): 2441-2451.

## CHAPITRE 6. Influence of microorganisms on Cu speciation in the rhizosphere of forest soils

---

### 6.1 Introduction

In temperate forested watersheds, the copper (Cu) fraction retained by either trees or soils has been reported to represent 61 to 94% of the total Cu input from the atmosphere (Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Bergkvist *et al.*, 1989). The accumulation of Cu mostly occurs in the organic horizons of soils and its spatial distribution in the ecosystem is controlled by cycling in the soil-plant sub-system (Johnson *et al.*, 2003; Ukonmaanaho *et al.*, 2001). The uptake of Cu by trees regulates the intensity of Cu cycling as well as its redistribution in the ecosystem and occurs preferentially in the rhizosphere. Recent studies conducted in this microenvironment have shown that both the solid and the liquid phases of the rhizosphere were significantly Cu enriched (Legrand *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2005, 2004; Chaignon et Hinsinger, 2003a; Wang *et al.*, 2002). Since high Cu concentrations may be toxic to living organisms (Sauvé *et al.*, 1998b), the accumulation of Cu in the rhizosphere may induce toxic effects to plants following the transfer and accumulation of Cu in plant roots.

The influence of the rhizosphere on the biogeochemistry of Cu in forested ecosystems can be viewed as the result of the interaction between three constitutive entities: soil materials, roots and microorganisms. The relationships existing between these entities generate a highly dynamic environment that generally favours elemental uptake by roots and produces unique conditions of Cu speciation. The speciation of Cu in the rhizosphere was achieved by Legrand *et al.* (2005) under white birch. Their results revealed no significant difference of free Cu ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) activity between the rhizosphere and bulk fractions. However, when the  $\text{Cu}^{2+}$  fraction was normalized with respect to the concentration of total water-soluble Cu ( $\text{Cu}_{\text{WS}}$ ), the fraction of  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  present as  $\text{Cu}^{2+}$  was significantly lower in the rhizosphere than in the bulk soil (Legrand *et al.*, 2005). This was attributed to an increase in the complexation of Cu by soluble organic ligands in the rhizosphere. These organic compounds abound in the rhizosphere because of microbial

activity and root exudation (Hinsinger, 2001). To our knowledge, no other study has evaluated the liquid-phase speciation of Cu in the rhizosphere of forest soils. Acquiring this type of data is needed to increase our understanding of soil processes in the rhizosphere and to predict the transfer of Cu from soils to plants (Courchesne *et al.*, 2006).

The influence of root activity on the mobility and speciation of metals in the rhizosphere via processes such as uptake and excretion, the production of redox conditions and the release of organic compounds has been under considerable scrutiny (see reviews of Hinsinger (2001) and Marschner and Römheld (1996)). Microorganisms are also widely recognized as important contributors to the biogeochemical cycle of trace elements in terrestrial environments (Newman and Banfield, 2002). However, the interactions between microorganisms and metals in the rhizosphere have seldom been studied. This is mostly due to technical constraints associated to the measurements of microbial properties and metal speciation in the rhizosphere. However, reviews on the influence of microbial activity on the mobility of metals in bulk soils revealed that several microbially-mediated processes could affect the mobilization of metals such as biosorption, complexation, dissolution and redox reactions (Gadd, 2004; Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Berthelin *et al.*, 1995).

Using growth chamber experiments, Tao *et al.* (2005) showed that indigenous microorganisms had a major influence on the fractionation of Cu in the rhizosphere of maize, soybean, pea and wheat. Indeed, the concentration of exchangeable Cu was significantly enhanced in the rhizosphere by the activity of the microbial community. Moreover, Chen *et al.* (2005) observed that Cu-tolerant bacterial strains isolated from the rhizosphere of Cu-tolerant shiny elsholtzia (*Elsholtzia splendens*) increased  $Cu_{ws}$  concentrations in the rhizosphere as well as the amount of Cu retained in plant tissues. Inversely, a controlled hydroponic experiment on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.)), with and without a bacterial strain having a high Cu removal capacity, revealed that this strain was able to decrease  $Cu^{2+}$  activity in the rhizosphere solution (So *et al.*, 2003). The transfer of results from such controlled experiments to natural systems is, however, constrained by the inherent complexity of the latter compared to controlled

environments. Moreover, the nature, direction and magnitude of the influence of microorganisms on the liquid-phase speciation of Cu in the rhizosphere of natural forested ecosystems have not yet been documented.

Therefore, the objectives of this study are: (1) to determine the liquid-phase speciation of Cu in the rhizosphere and bulk components of contrasted forest soils, (2) to quantify the contribution of microbial and chemical variables to Cu speciation in rhizosphere and bulk soils and (3) to identify the main microbial variables influencing the liquid-phase speciation of Cu in the rhizosphere. The approach used to gain new insights on the role of microbes on Cu speciation was to combine, under field conditions, the direct measurements of Cu species, the geochemical modelling of Cu speciation and the use of multivariate statistical tools to establish relationships among variables.

## **6.2 Materials and methods**

### **6.2.1 Field sites**

To answer the research objectives, two sampling campaigns were performed. Soils were first sampled in August 2004 in the Rouyn-Noranda (RN) area, Canada (48° 14'N, 79° 01'W) at three sites located respectively at 0.5, 2 and 8 km downwind from the Horne's Cu smelter (RN 1 to 3, respectively). The soils sampled were developed on fine-textured post-glacial lake sediments and were classified as Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998). Soils were also sampled in August 2005 in the Monteregian (MTG) area, Canada (south of Montreal) at three sites located near a cement plant (site MTG 1; 45° 16'N, 73° 28'W), a steel-work plant (site MTG 2; 45° 51'N, 73° 13'W) and along an airport strip (site MTG 3; 45° 31'N, 73° 23'W). The soils were formed on clay deposits of the Champlain Sea and were also classified as Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998). The two sampling areas are similar with respect to topography, soil texture and clay mineralogy. Soils are generally composed of silt and clay-size materials (35-85%) and are dominated by quartz, chlorite, vermiculite and chlorite-vermiculite intergrades (Table 6.1). Furthermore, vegetation, climate and the nature of parent materials differed slightly between areas. The forest of the RN area was dominated by yellow and white birch (*Betula alleghaniensis* and *Betula papyrifera*), trembling aspen

(*Populus tremuloides*), balsam fir (*Abies balsamea*) and sugar maple (*Acer saccharum*) with a mean annual air temperature of 1.2 °C and a total annual precipitation amount of 914 mm. The MTG sites were composed mainly of sugar maple, trembling aspen and white birch with a mean annual air temperature of 5.8 °C and a total annual precipitation of 1046 mm. All the soils were sampled in August, when climatic differences between sampling areas were at minimum (3.4 °C). However, soils differed strongly with respect to pH and Cu loadings from the atmosphere. Indeed, larger atmospheric Cu deposition was measured in the RN area due to the presence of a Cu smelter (Séguin *et al.*, 2004) whereas, no significant point source of Cu existed in MTG area. These contrasts in soil properties induced differences of Cu concentration and speciation between the two sampling areas.

**Tableau 6.1.** Texture and mineralogy of one soil sampled from each site.

Sites	Sand <sup>a</sup>	Silt <sup>a</sup>	Clay <sup>a</sup>	Clay mineralogy <sup>b</sup>	Micas
					abundance
----- Bulk soils -----					Rhizosphere
----- % -----					soils
					I/I <sub>QZ</sub> <sup>c</sup>
<b>RN 1</b>	55	31	14	Quartz, Chlorite, Plagioclase, Amphibole, Vermiculite = K-Feldspar	0.22
<b>RN 2</b>	16	57	27	Quartz, Chlorite, Vermiculite = K-Feldspar, Amphibole = Plagioclase	0.51
<b>RN 3</b>	16	45	39	Quartz, Chlorite, Vermiculite, Amphibole, Plagioclase, K-Feldspar	0.51
<b>MTG 1</b>	15	33	52	Quartz, Chlorite = Micas = Ca-Na feldspar, Interstratified Chlorite-Vermiculite, Vermiculite, K-feldspar, Amphibole	- <sup>d</sup>
<b>MTG 2</b>	65	2	33	Quartz, Interstratified Chlorite-Vermiculite, Chlorite, Ca-Na feldspar, Vermiculite, K-Feldspar, Amphibole	-
<b>MTG 3</b>	15	42	43	Quartz, Ca-Na feldspar, Vermiculite = Micas, Chlorite, K-feldspar, Amphibole	-

a Particle size: Sand > 53 µm; Silt = 2 – 53 µm; Clay < 2 µm.

b Minerals in the clay fraction are in order of relative abundance.

c I/I<sub>QZ</sub> is the ratio of the abundance I of micas (1.0 nm peak at Mg 25°C) divided by the abundance I<sub>QZ</sub> of quartz (0.426 nm).

d No data are available due to mass shortage.

### 6.2.2 Sampling of soil components

At each of the six sampling sites, three young trembling aspens (*Populus tremuloides* Michx.) were carefully uprooted and cut to determine their age by counting growth rings (Supplementary data 1). The trembling aspens were selected because they abound in the two sampling areas and were present at all the sampling sites. The rhizosphere and bulk components were sampled in the B horizons of each soil and only the fine roots (< 2 mm in diameter) were collected. The separation of the rhizospheric and bulk components was performed in the field by gently shaking the roots (Séguin *et al.*, 2004). The soil material that fell down from the root was viewed as the bulk soil, whereas the material that stayed attached to the roots was considered as rhizosphere soil. The field-moist rhizospheric and bulk samples were immediately transferred to sterile plastic bags and stored in a cooler to minimize microbial growth. In the laboratory, the separation of the rhizospheric material from the roots was completed by gently scraping the soil away with a plastic spatula. Root fragments were then removed using plastic tweezers. All along, the soils were vaporized with Milli-Q water to maintain moisture to a level similar to that of field conditions.

### 6.2.3 Physical properties of the bulk soil materials

For the six sites, the characterization of the mineral soil (< 2 mm) was performed on one of the field replicates of the bulk component. The particle-size distribution was estimated by the hydrometer technique (Gee et Bauder, 1994). The mineralogy of the clay-sized particles was determined by X-ray diffraction according to the following treatments: K at room temperature, K heated to 300 °C and 550 °C, Mg at room temperature and Mg saturated with ethylene-glycol (Whittig and Allardice, 1994). The samples were analyzed on a Rigaku Miniflex diffractometer (Rigaku; Cu-K $\alpha$  radiations) at 30 kV, 10 mA and at scanning speed of 2 °/min from 2 to 30 °. The relative abundance of minerals in each diffractogram was established using the  $I/I_{QZ}$  ratio which normalizes the intensity (I) of any given mineral to the intensity of the  $hkl = 001$  peak ( $d = 0.426$  nm) of quartz ( $I_{QZ}$ ) according to Courchesne and Gobran (1997).

#### 6.2.4 Microbial analyses

Soils were first sieved at 2 mm and stored at 4°C in the dark under field-moist conditions. Most microbial analyses were conducted during the first month following sampling with maximum storage duration of less than three months. For bulk soil samples, analyses were triplicated but analyses on rhizosphere samples were duplicated due to mass shortage. The data validation of the microbial analyses was ensured by using an internal soil control and certified water samples (NWRI, Burlington, Canada) as external quality controls for instrumentation.

Functional microbial biomass information on the entire community (active and dormant microbial cells) were obtained at field-moist conditions using the fumigation-extraction technique of Voroney *et al.* (2008) and are identified as total microbial biomass C (TMBC) and N (TMBN). However, at sites MTG 1 to 3, TMBC and TMBN values were strongly affected by the low water content of the rhizospheric soils (< 10 % w/w) at the moment of sampling. Consequently, for sites MTG 1 to 3, where enough rhizosphere soil masses were available, soil water contents were adjusted to the level of the other rhizosphere soil materials and properties were re-measured. The TMBC and TMBN values were measured at these sites by limiting the microbial growth to indigenous microorganisms in dormant state, using an incubation time of two hours at room temperature. Functional information about the maximal potential active microbial biomass C (AMBC) were obtained using the substrate-induced respiration technique (Anderson and Domsch, 1978). The AMBC measurements were made at 50 % of soil water content (w/w) to insure that fine-textured soils having different pH values could be compared (Lin and Brookes, 1999). Data on the mineralization process and on the nitrogen cycle were obtained by measuring the enzymatic activity of the intracellular and extracellular urease using the method of Kandeler and Gerber (1988). Finally, to obtain the enzymatic activity of the active microbial community, dehydrogenase was measured colorimetrically (Tabatabai, 1994) and no inhibition effect of Cu on the dehydrogenase measurements was detected at the  $Cu_{ws}$  concentrations found in our soil samples. For a complete description of the microbial analyses used in this paper, the reader is referred to Supplementary data 2.

### 6.2.5 Chemical analyses

After microbial analyses and before performing the chemical analyses, soils were air-dried and sieved at 0.5 mm. Chemical analyses were conducted on water extracts to mimic the conditions found in the soil solution. Water extracts were obtained using a 1:10 soil-solution ratio, two hours of shaking, 15 minutes of centrifugation at 1400 g and filtration through 0.45- $\mu\text{m}$  cellulosic membranes. To insure that the speciation measurements were made on fresh solutions, two distinct extraction series were performed. However, the data produced by these two distinct extracts series were combined and interpreted together. Therefore, the similarity of the two water extract series was evaluated by comparing their respective pH values. The comparison revealed no statistical differences between the two extractions ( $p > 0.10$  with the Wilcoxon signed-ranks test) and, consequently, we considered that the water extracts were similar. All the bulk soil samples were extracted in triplicates, whereas the rhizosphere samples extractions were generally duplicated when enough soil was available. The data validation was ensured using two soil controls (soil RN 0.5 A and C from Séguin *et al.* (2004)) and certified water samples (NWRI, Burlington, Canada). All glasswares and plastic materials were acid washed with 20%  $\text{HNO}_3$ .

On the first series of water extractions and before filtration, we measured pH using a pH electrode with calomel reference (Accumet) on a Fisher Accumet pH meter (825 MP). After filtration, we measured major cations ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ ) and anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) by ion chromatography (Waters), water-soluble organic carbon (WSOC) with a Shimadzu TOC analyzer and total water-soluble aluminum ( $\text{Al}_{\text{WS}}$ ), calcium ( $\text{Ca}_{\text{WS}}$ ), copper ( $\text{Cu}_{\text{WS}}$ ), magnesium ( $\text{Mg}_{\text{WS}}$ ) and zinc ( $\text{Zn}_{\text{WS}}$ ) using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

The second batch of water extractions was used to measure pH and  $\text{Cu}^{2+}$  activity. The protocol for the measurement of  $\text{Cu}^{2+}$  activity was developed by Rachou *et al.* (2007) and used a detecION® Cupric 227 ISE combination electrode. The calibration curve solution is composed of Iminodiacetic acid,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , NaOH and potassium acid phthalate and a range of  $\text{pCu}^{2+}$  activity levels was obtained by adjusting the pH of the



different sub-solutions of the calibration curve with nitric acid (trace metal grade). We used soil #10 from Sauvé *et al.* (1997) as an external soil control for this analysis.

Total recoverable Cu ( $Cu_{TR}$ ) in soil was measured by acid digestion with the modified US EPA (1998) method and a CEM MDS-2000 microwave system. The digestion was made using nitric and hydrochloric acids (all trace metal grade) at an average temperature of 173 °C for 20 minutes and the  $Cu_{TR}$  was analyzed on an atomic absorption spectrophotometer (AAS). The solid phase organic carbon (SPOC) was determined according to the modified Walkley-Black method (Skjemstad et Baldock, 2008). Finally, concentration of Cu in root tissues was measured by acid digestion on a dry bath with the modified method of Jones Jr and Case (1990). Root tissue digestion was made with nitric acid (trace metal grade) at an average temperature of 120 °C for five hours and was measured on an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For a complete description of the chemical analyses used in this paper, the reader is referred to Supplementary data 3.

#### **6.2.6 Geochemical modelling of Cu speciation**

To complement the  $Cu_{TR}$ ,  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  measurements, the concentrations of Cu complexed with inorganic (Cu-inorg) and organic (Cu-org) ligands were calculated using the software MINEQL+ v.4.5 (Schecher and McAvoy, 2003). This speciation software was chosen after a comparison with the speciation package WHAM 6. The result of this comparison, for our soil samples, was that MINEQL+ 4.5 provided a more realistic modelling of the Cu speciation than WHAM 6 (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2007). The modelling of Cu speciation was performed using pH, total water-soluble metals, major cations, inorganic anions as well as organic ligands as input data. All these variables were measured directly except for the composition of dissolved organic ligands which was estimated based on a review of the literature. Four scenarios were defined to contrast the composition of organic ligands between soil components (bulk vs rhizosphere) and soil pH levels (acidic vs near-neutral). Fulvic, humic and acetic acids were used as organic ligands in the model and the conditional association constants in MINEQL+ v.4.5 were updated. The modelling was performed at 25°C, in closed

systems, without taking into account the solid phases and using the Debye-Hückel equation for activity corrections. A complete description of the modelling procedure and validation is found in Cloutier-Hurteau *et al.* (2007).

### 6.2.7 Statistical analyses

For each variable, the normality of the datasets was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. If necessary, square root or logarithmic transformations were applied to variables, to achieve a normal distribution. The differences between the rhizosphere and bulk components or between the RN and the MTG areas for a given variable were assessed using the non-parametric Wilcoxon signed-ranks test and the non-parametric Mann-Whitney test, respectively. Due to small sample numbers, variables were considered significant at a level of  $\alpha \leq 0.10$ . These statistical tests were performed with the SPSS 16.0 software for Windows® (SPSS, Chicago, IL, USA).

To interpret as accurately as possible the relationships between microbial, chemical and dissolved Cu variables, the influence of the variability associated to differences in environmental conditions (e.g. climate and parent material) between the sampling areas and the sampling sites was determined. Consequently, the spatial component of our sampling design was considered in the statistical analyses by creating a binary variable representing the two sampling areas and a variable representing the various sampling sites.

As a first step towards this, a partition of the variance of measured Cu variables ( $\text{Cu}_{\text{ws}}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ) was performed for both soil components to discriminate the contribution of microbial, chemical and spatial variables. The partition of the variance is derived from partial redundancy analyses (RDA) (Legendre and Legendre, 1998) and was calculated using the function *varpart* available in the vegan library of the R language free software (R Foundation, 2003). Based on results of the partition of the variance, targeted RDA analyses were performed exclusively on rhizosphere samples as well as on both soil components of each sampling area, to evaluate the influences of chemical and microbial variables on Cu speciation. The CANOCO 4.5 software for Windows® (ter Braak and

Smilauer, 1998) was used to run the RDA. The free  $\text{Cu}^{2+}$  activity and  $\text{Cu}_{\text{ws}}$  concentration were the Cu variables introduced as response variables whereas the microbial, chemical and spatial variables were used as explanatory variables. Due to small sample numbers, variables or axes were considered significant at a level of  $\alpha \leq 0.10$ . For a complete description of the RDA analyses used in this paper, the reader is referred to Supplementary data 4.

To perform statistical analyses (partition of the variance and RDA), a complete database was needed. However, gaps existed in the rhizosphere database, notably for microbial variables and, to a lesser extent, for some chemical variables (Tables 6.2 to 6.4). In this context, a series of actions were undertaken. First, we considered filling the gaps in the database. For variables and sampling sites where we had data for two out of the three trees, e.g. TMBC at site RN 1, the mean value was used for the third tree. This procedure takes into account the intra-site variability, has no effect on the measured inter-sites variability and is widely used in ecology (Legendre and Legendre, 1998). Secondly, the rhizospheric samples of site MTG 2 were suppressed from the statistical analyses because the TMBC and TMBN measurements were strongly affected by the low water content of the rhizosphere at this site and, because no correction could be applied due to mass shortage (Table 6.2). Furthermore, site RN 3 was also suppressed from statistical analyses because microbial data were missing. Finally, the dehydrogenase variable was also suppressed from the statistical analyses because numerous values were missing (Tables 6.2). In the case of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ , values representing the detection limit were used to fill the gaps for sites MTG 1 and 3. This procedure allowed us to integrate  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in the statistical analyses without compromising the interpretation, because the general trend and the inter-sites variability were maintained. Consequently, partition of the variance and RDA were performed on sites RN 1 and 2 as well as MTG 1 and 3 using TMBC, TMBN, AMBC, urease as well as all the chemical variables presented in Tables 6.2 and 6.3.

## 6.3 Results

### 6.3.1 Microbial and chemical data

Microbial biomass indicators varied from 213 to 1630  $\mu\text{g C g}^{-1}$  for TMBC and between 25.7 and 242  $\mu\text{g N g}^{-1}$  for TMBN, whereas AMBC ranged from 218 to 1340  $\mu\text{g C g}^{-1}$  (Table 6.2). The enzymatic activity of the dehydrogenase varied from 1.50 to 85.5  $\mu\text{g TPF g}^{-1}$  and the urease level ranged from 20.7 to 147  $\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1}$  (Table 6.2). For the chemical data presented in Tables 6.3 and 6.4, the water-soluble pH varied from 4.96 to 7.19 with acidic pH observed at the RN sites and at MTG 3 while pH was close to neutrality at sites MTG 1 and 2 (Table 6.3). The SPOC and the WSOC values varied between 10.7 and 55.9  $\text{g C kg}^{-1}$  and 21.9 and 129  $\text{mg C L}^{-1}$ , respectively, whereas solute concentrations in the soil water extracts covered up to two orders of magnitude (Tables 6.3 and 6.4). The soil properties vary primarily among samplings sites and, to a lesser extent, between soil components (Tables 6.2 to 6.5). The statistical analysis indicated that 87 % of the total variance of the dataset was associated to variation between sampling areas and that 10 % of the variance was due to contrasts between soil components (Supplementary data 5). The differences between sampling areas were mostly expressed for  $\text{Ca}_{\text{WS}} > \text{Na}^+ > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cu}_{\text{TR}} > \text{NO}_3^- > \text{Mg}_{\text{WS}} > \text{WSOC} > \text{AMBC}$  whereas, the contrast between soil components was preferentially associated to  $\text{AMBC} > \text{Ca}_{\text{WS}} > \text{Na}^+ > \text{Cu}_{\text{TR}} > \text{urease} > \text{K}^+ > \text{NO}_3^- > \text{Cu}_{\text{WS}}$  (Supplementary data 5). Therefore, a general enrichment of the rhizosphere in microbial variables, SPOC, WSOC,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}_{\text{WS}}$  and  $\text{Mg}_{\text{WS}}$  was visible compared to the bulk component. The rhizosphere was however depleted in  $\text{NO}_3^-$  and no clear trends existed for  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  (Tables 6.2 to 6.4).

**Tableau 6.2.** Microbial properties of the bulk and the rhizosphere (R) soils for each tree sampled.

Site	TMBC <sup>a</sup> µg C g <sup>-1</sup>		TMBN <sup>a</sup> µg N g <sup>-1</sup>		AMBC <sup>a</sup> µg C g <sup>-1</sup>		Dehydrogenase µg TPF g <sup>-1</sup>		Urease µg NH <sub>4</sub> -N g <sup>-1</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>										
<b>RN 1a</b>	603	- <sup>b</sup>	136	-	513	728	31.8	41.6	49.4	-
<b>RN 1b</b>	531	989	101	194	384	700	15.4	51.2	39.4	68.7
<b>RN 1c</b>	508	958	103	183	422	717	22.8	52.4	43.9	70.5
<b>RN 2a</b>	349	930	83.4	149	308	700	15.4	44.3	23.6	55.1
<b>RN 2b</b>	507	-	125	-	382	738	20.3	62.2	37.2	-
<b>RN 2c</b>	506	1060	111	185	345	694	20.2	44.7	30.7	69.5
<b>RN 3a</b>	483	1210	124	242	402	752	19.7	65.8	47.4	85.9
<b>RN 3b</b>	412	-	99.3	-	418	636	14.5	59.5	37.3	-
<b>RN 3c</b>	473	-	107	-	340	652	18.4	85.5	37.6	-
<b>Monteregian area</b>										
<b>MTG 1a</b>	804	1170	86.5	96.0	291	630	7.30	-	34.2	85.5
<b>MTG 1b</b>	1120	1440	136	67.7	562	-	1.50	-	56.9	90.7
<b>MTG 1c</b>	189	250	25.7	32.7	218	553	7.20	-	20.7	25.4
<b>MTG 2a</b>	547	323	110	-	352	732	41.7	-	47.1	80.0
<b>MTG 2b</b>	691	213	140	105	293	-	48.6	-	31.6	60.5
<b>MTG 2c</b>	605	515	120	82.1	263	600	49.4	-	38.6	56.7
<b>MTG 3a</b>	1050	1540	172	201	496	1340	10.1	-	81.0	132
<b>MTG 3b</b>	416	1010	64.3	171	324	1180	15.4	-	31.4	95.8
<b>MTG 3c</b>	1270	1630	245	219	731	1260	18.5	-	102	147

a TMBC = total microbial biomass C; TMBN = total microbial biomass N; AMBC = active microbial biomass C.

b No data are available due to mass shortage.

**Tableau 6.3.** pH values and cations concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils for each tree sampled.

Samples	pH <sup>a</sup>		Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		Caws <sup>b</sup>		Mgws <sup>b</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>												
<b>RN 1a</b>	5.04	5.00	26.9	61.3	14.0	30.4	37.3	115	39.3	36.6	18.7	22.5
<b>RN 1b</b>	5.03	4.97	22.9	36.7	12.9	19.0	40.1	84.8	48.7	39.6	16.7	17.1
<b>RN 1c</b>	4.97	4.96	24.9	48.6	12.0	19.0	36.9	97.7	40.0	39.9	16.8	16.6
<b>RN 2a</b>	5.50	5.43	35.2	56.3	9.60	19.7	9.87	55.5	20.1	31.7	16.7	15.7
<b>RN 2b</b>	5.31	5.39	38.1	43.6	9.38	20.5	22.7	103	22.2	29.1	15.2	20.9
<b>RN 2c</b>	5.37	5.21	34.6	28.7	7.91	12.4	46.6	141	29.8	27.8	18.0	19.6
<b>RN 3a</b>	5.26	5.39	50.7	43.6	9.51	16.7	28.3	82.1	18.8	32.0	25.8	36.0
<b>RN 3b</b>	5.53	5.25	53.6	47.7	8.60	21.7	20.5	96.7	13.8	30.8	16.0	31.2
<b>RN 3c</b>	5.54	5.39	48.1	41.9	10.4	15.8	29.5	85.2	13.4	25.6	16.7	34.3
<b>Monteregian area</b>												
<b>MTG 1a</b>	6.85	7.11	78.5	64.1	4.95	< dlm <sup>c</sup>	11.0	38.2	231	392	54.7	65.2
<b>MTG 1b</b>	6.63	6.71	127	101	9.58	1.86	11.2	72.3	338	548	87.6	101
<b>MTG 1c</b>	6.90	6.98	56.9	68.4	2.10	< dlm	9.55	14.2	143	250	37.2	54.2
<b>MTG 2a</b>	7.10	7.19	39.1	67.0	11.2	12.5	11.2	70.4	216	307	62.2	95.1
<b>MTG 2b</b>	7.07	7.14	34.3	38.0	4.96	2.79	6.83	10.2	236	292	51.7	59.5
<b>MTG 2c</b>	6.91	6.86	41.1	62.6	8.87	6.40	10.0	34.3	192	249	44.4	65.0
<b>MTG 3a</b>	5.37	5.39	132	135	9.22	2.36	20.7	68.9	67.8	77.6	48.4	50.0
<b>MTG 3b</b>	5.85	5.63	88.1	95.0	1.09	2.30	9.29	35.1	61.7	95.0	44.9	50.2
<b>MTG 3c</b>	5.39	5.28	86.1	103	0.84	6.59	24.1	61.1	58.2	83.5	37.9	49.2

a pH is measured in a 1:10 soil:water extract.

b Caws = water-soluble Ca; Mgws = water-soluble Mg.

c Below the detection limit of the method (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.50 µmol L<sup>-1</sup>).

**Tableau 6.4.** Solid-phase and water-soluble organic matter and anions<sup>a</sup> concentration in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils for each tree sampled.

Samples	SPOC <sup>b</sup> g kg <sup>-1</sup>		WSOC <sup>b</sup> mg L <sup>-1</sup>		Cl <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> μmol L <sup>-1</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>										
<b>RN 1a</b>	17.3	- <sup>c</sup>	31.1	95.3	8.84	24.1	8.45	4.33	55.7	59.3
<b>RN 1b</b>	18.0	24.2	27.3	71.4	9.03	28.5	7.13	2.49	83.7	69.6
<b>RN 1c</b>	16.3	22.7	22.1	67.5	12.7	33.4	8.34	3.29	74.7	84.4
<b>RN 2a</b>	13.2	-	21.9	76.8	3.96	16.0	23.4	25.4	21.6	26.2
<b>RN 2b</b>	15.3	25.0	60.3	78.6	9.99	22.3	16.8	6.21	17.5	38.4
<b>RN 2c</b>	17.0	24.0	64.6	71.8	5.89	30.3	62.2	5.58	13.3	43.0
<b>RN 3a</b>	11.9	-	67.5	86.1	6.25	13.8	4.52	4.50	8.85	23.9
<b>RN 3b</b>	11.3	-	62.1	83.5	11.0	16.5	2.06	5.33	9.27	33.1
<b>RN 3c</b>	11.0	24.0	62.6	76.8	7.97	11.4	5.46	3.55	7.86	24.3
<b>Monteregian area</b>										
<b>MTG 1a</b>	29.9	55.9	61.4	84.3	21.2	54.2	35.8	< dlm <sup>d</sup>	71.7	70.0
<b>MTG 1b</b>	-	-	78.4	129	56.8	63.7	55.3	< dlm	175	120
<b>MTG 1c</b>	10.7	19.8	40.4	57.3	18.5	83.7	7.30	< dlm	30.6	33.9
<b>MTG 2a</b>	28.9	44.3	40.4	59.4	36.4	94.0	129	49.6	60.8	68.8
<b>MTG 2b</b>	25.4	26.9	48.7	49.8	15.4	64.0	107	4.97	29.7	36.2
<b>MTG 2c</b>	25.7	-	44.8	56.2	29.3	63.6	82.4	37.5	50.4	77.9
<b>MTG 3a</b>	28.2	52.0	54.5	98.9	43.1	76.9	85.9	< dlm	73.9	53.6
<b>MTG 3b</b>	19.8	-	41.4	84.9	14.7	43.7	47.9	11.5	54.0	33.3
<b>MTG 3c</b>	31.1	44.1	57.2	91.6	21.2	84.9	82.1	80.2	61.4	50.8

a F<sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> anions were not compiled in the table because their concentrations were almost always below the detection limit of the method (F<sup>-</sup> = 5.00 μmol L<sup>-1</sup>; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = 1.00 μmol L<sup>-1</sup>).

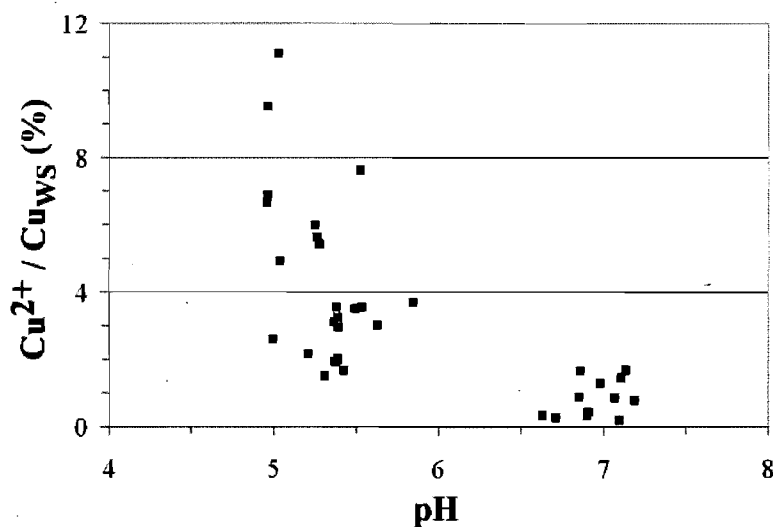
b SPOC = Solid phase organic carbon; WSOC = water-soluble organic carbon.

c No data are available due to mass shortage.

d Below the detection limit of the method (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 0.50 μmol L<sup>-1</sup>).

### 6.3.2 Cu speciation

Measured  $\text{Cu}_{\text{TR}}$ ,  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  concentrations and  $\text{Cu}^{2+}$  activities together with the calculated Cu-inorg and Cu-org concentrations are presented in the Table 6.5. The  $\text{Cu}_{\text{TR}}$ ,  $\text{Cu}_{\text{WS}}$ , Cu-inorg (Cu-OH and Cu-SO<sub>4</sub> compounds) and Cu-org (Cu-acetate, Cu-fulvate and Cu-humate compounds) concentrations were one order of magnitude higher at RN compared to the MTG area. The differences reached two orders of magnitude for  $\text{Cu}^{2+}$  activity. Cu variables were closely linked to solution pH as indicated by the increase in the fraction of  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  present as  $\text{Cu}^{2+}$  when pH decreased (Figure 6.1). Moreover, Cu-org was the dominant fraction of  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  at all sites and for both soil components as it represented 88.3 to 99.5 % of  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  (Figure 6.2). The remaining  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  fraction was dominated by  $\text{Cu}^{2+}$  while Cu-inorg forms were virtually absent, except in the rhizosphere of site MTG 2. When soil components were compared at the sampling site level, significantly higher concentrations were observed in the rhizosphere of the RN sites as compared to the associated bulk soils ( $p < 0.05$  with the Wilcoxon signed-ranks test) for all Cu species except for Cu-inorg at site RN 1. At MTG sites, the differences between soil components were not statistically significant, even if higher concentrations were generally measured in the rhizosphere.



**Figure 6.1.** Percentage of total water-soluble Cu ( $\text{Cu}_{\text{WS}}$ ) present as free Cu ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) plotted as a function of solution pH.

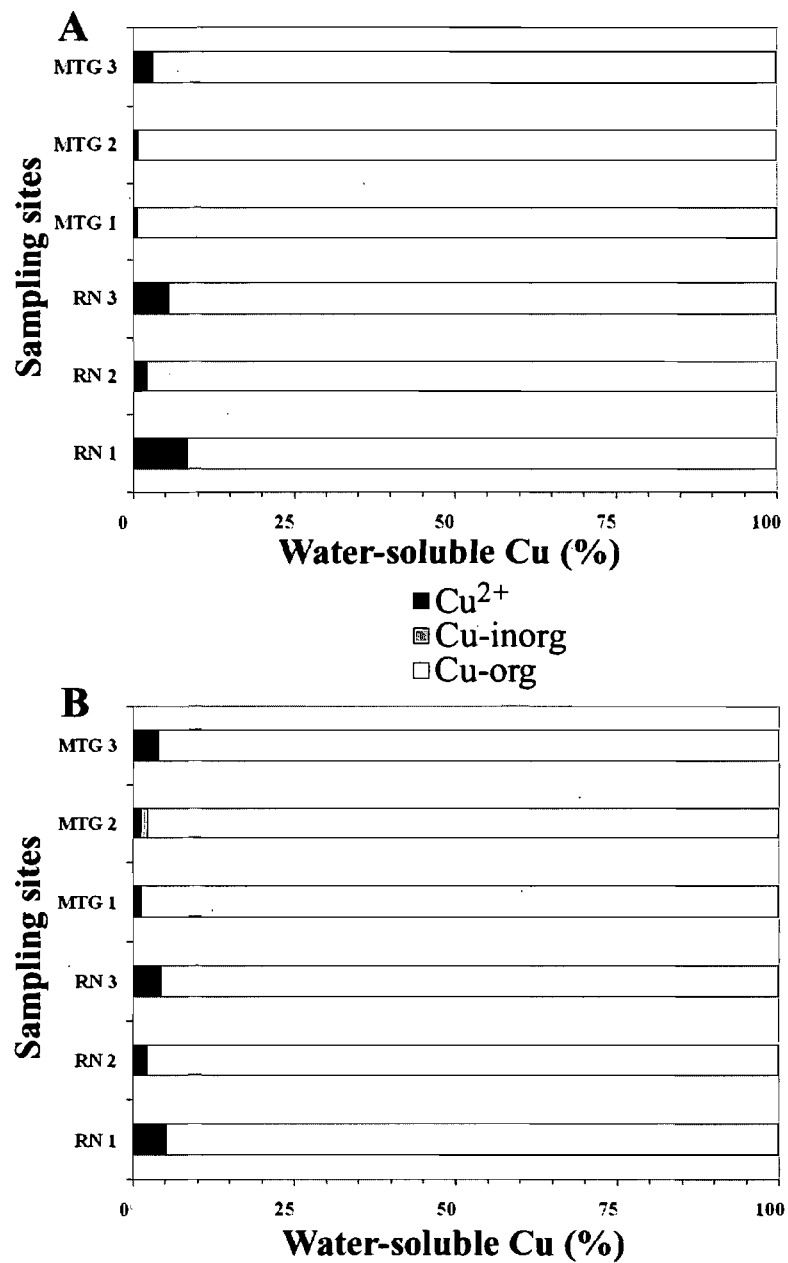


**Tableau 6.5.** Measured ( $Cu_{TR}$ ,  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$ ) and modelled ( $Cu$ -inorg and  $Cu$ -org)  $Cu$  variables in water extracts for the bulk and the rhizosphere (R) soils of each tree sampled.

Site	$Cu_{TR}^a$ mg kg <sup>-1</sup>		$Cu_{WS}^a$		$Cu^{2+a}$ nmol L <sup>-1</sup>		$Cu$ -inorg <sup>a,b</sup>		$Cu$ -org <sup>a,b</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>										
<b>RN 1a</b>	30.6	71.4	493	1240	23.9	32.0	0.69	1.62	468	1207
<b>RN 1b</b>	29.2	44.4	294	693	32.6	47.7		1.05	261	644
<b>RN 1c</b>	20.4	45.3	297	636	28.3	42.3	0.66	1.17	268	592
<b>RN 2a</b>	45.5	174	292	1150	10.1	19.0	0.44	1.21	281	1130
<b>RN 2b</b>	85.2	155	724	1660	10.8	33.7	0.31	2.12	703	1625
<b>RN 2c</b>	141	130	1530	2080	29.3	44.5	0.63	2.81	1500	2032
<b>RN 3a</b>	47.9	59.1	326	570	19.1	20.2		0.53	307	550
<b>RN 3b</b>	38.4	68.7	253	521	19.7	31.1		0.48	234	489
<b>RN 3c</b>	44.8	56.5	302	582	10.7	17.1	0.14	0.61	291	564
<b>Monteregian area</b>										
<b>MTG 1a</b>	18.7	24.3	144	131	1.40	1.88	0.12	0.69	142	128
<b>MTG 1b</b>	27.5	31.5	99.1	214	0.34	0.55	0.07	0.48	98.6	213
<b>MTG 1c</b>	13.6	20.4	98.6	121	0.32	1.58	0.09	0.66	98.2	119
<b>MTG 2a</b>	11.8	19.3	74.5	165	0.63	1.27	0.16	2.67	73.7	161
<b>MTG 2b</b>	10.8	13.7	84.5	97.6	0.74	1.65		0.90	83.8	95.0
<b>MTG 2c</b>	12.8	10.2	74.5	112	0.33	1.85	0.07	0.65	74.1	109
<b>MTG 3a</b>	22.1	21.8	32.3	85.0	1.03	2.74	0.03	0.10	31.2	82.0
<b>MTG 3b</b>	12.9	19.9	51.4	86.6	1.93	2.59	0.10	0.13	49.3	83.9
<b>MTG 3c</b>	16.9	18.8	50.4	56.7	0.99	3.07	0.05	0.06	49.3	53.6

a  $Cu_{TR}$  = total-recoverable Cu;  $Cu_{WS}$  = water-soluble Cu;  $Cu^{2+}$  = free-ion Cu;  $Cu$ -inorg = sum of inorganic Cu complexes (Cu-OH and Cu-SO<sub>4</sub>);  $Cu$ -org = sum of organic Cu complexes (Cu-acetate, Cufulvate and Cu-humate).

b Cu species modelled using MINEQL+ 4.5. For details on the modelling, readers are referred to section 6.2.6 of this paper and to chapter five.



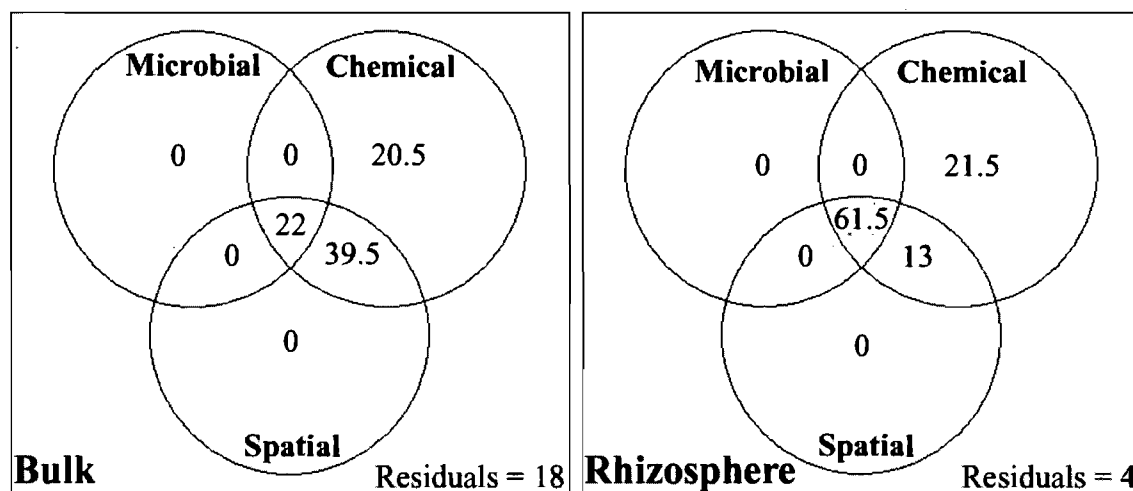
**Figure 6.2.** Mean cumulative fractions of total water-soluble Cu in the bulk (A) and rhizosphere (B) soils at each sampling site. For details on codes for Cu species, reader is referred to Table 6.5.

### 6.3.3 Influence of chemical and microbial variables on $Cu_{WS}$ and $Cu^{2+}$

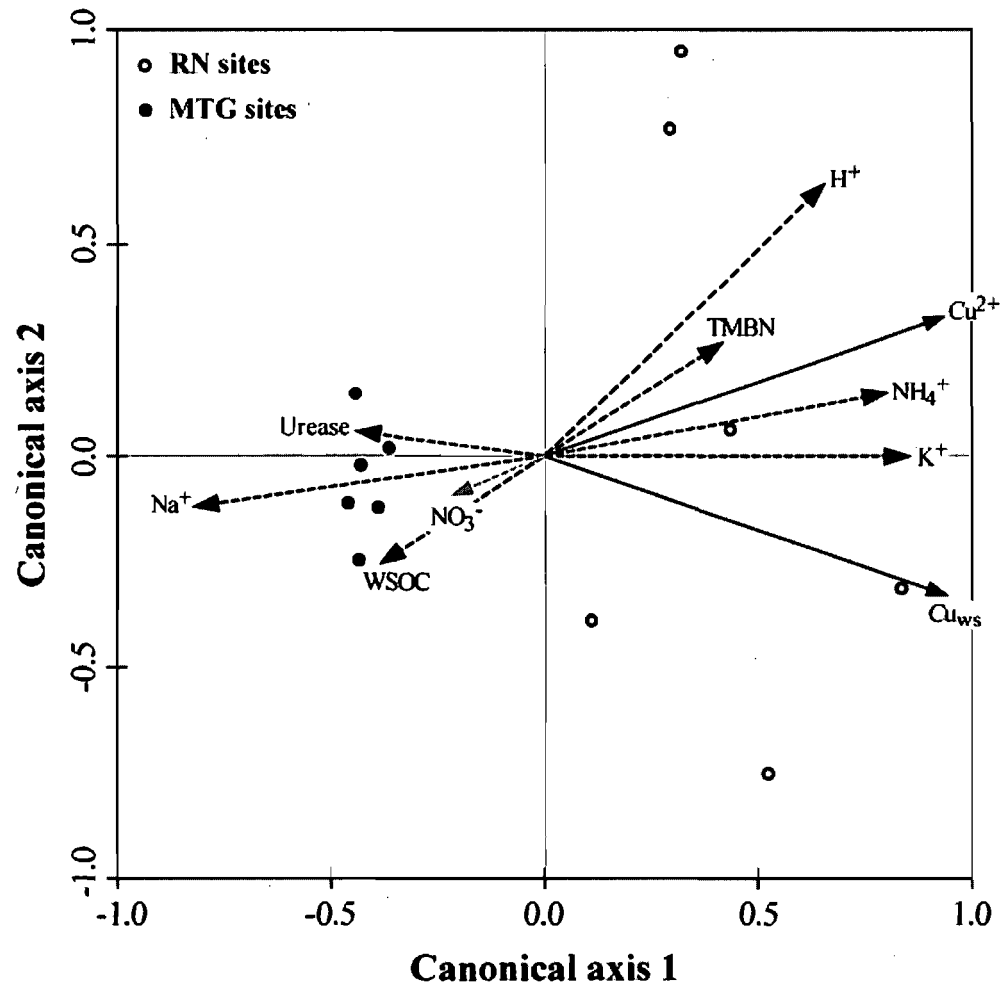
The partition of the variance of measured Cu variables ( $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$ ) between microbial, chemical and spatial variables is presented for both soil components in Figure 6.3. For bulk samples, microbial, chemical and spatial variables respectively explained 22, 82 and 61.5 % of the adjusted variance of Cu variables ( $p < 0.01$ ), while 18 % of the variance remained unexplained. It follows that in the bulk soils, the explained variance of Cu species was entirely associated to the action of chemical variables, either individually (20.5 %) or in combination with spatial variables (39.5 %) or with spatial and microbial variables (22 %). This combined action of different groups of variables was interpreted as reflecting the joint effects of chemical and microbial variables on Cu, as modulated by differences in environmental conditions between sampling areas, e.g. nature of parent material and climate. For rhizosphere samples, microbial, chemical and spatial variables respectively explained 61.5, 96 and 74.5 % of the adjusted variance ( $p < 0.01$ ) of  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  (Figure 6.3). The unexplained variance thus amounted to only 4 %. A significant fraction (21.5 %) of the variation of Cu variables was attributed to the individual action of chemical variables ( $p < 0.10$ ) whereas the individual actions of microbial or spatial variables were nil. However, and contrary to the bulk component, variations of Cu variables in the rhizosphere were best accounted for when the three groups of variables were considered simultaneously, with an explanation level of 61.5 %.

To increase our understanding of rhizosphere processes and of their influence on Cu speciation, we first produced an RDA analysis describing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Cu variables between rhizospheric samples of both sampling area (Figure 6.4). The results of this RDA revealed that the Cu variables were significantly controlled by these groups of variables ( $p < 0.01$ ) which explained 96 % of the adjusted variance of  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$ . The biplot indicated that the two Cu variables were positively linked together and that a clear distribution of objects occurred between sampling areas (Figure 6.4). Furthermore,  $K^+$  and  $NH_4^+$  concentrations were positively linked together as well as with Cu variables (Figure 6.4). The TMBN and  $H^+$  concentration were also positively correlated to  $Cu^{2+}$  activity. On the other hand, urease,  $Na^+$  and WSOC were inversely associated to  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  (Figure 6.4).

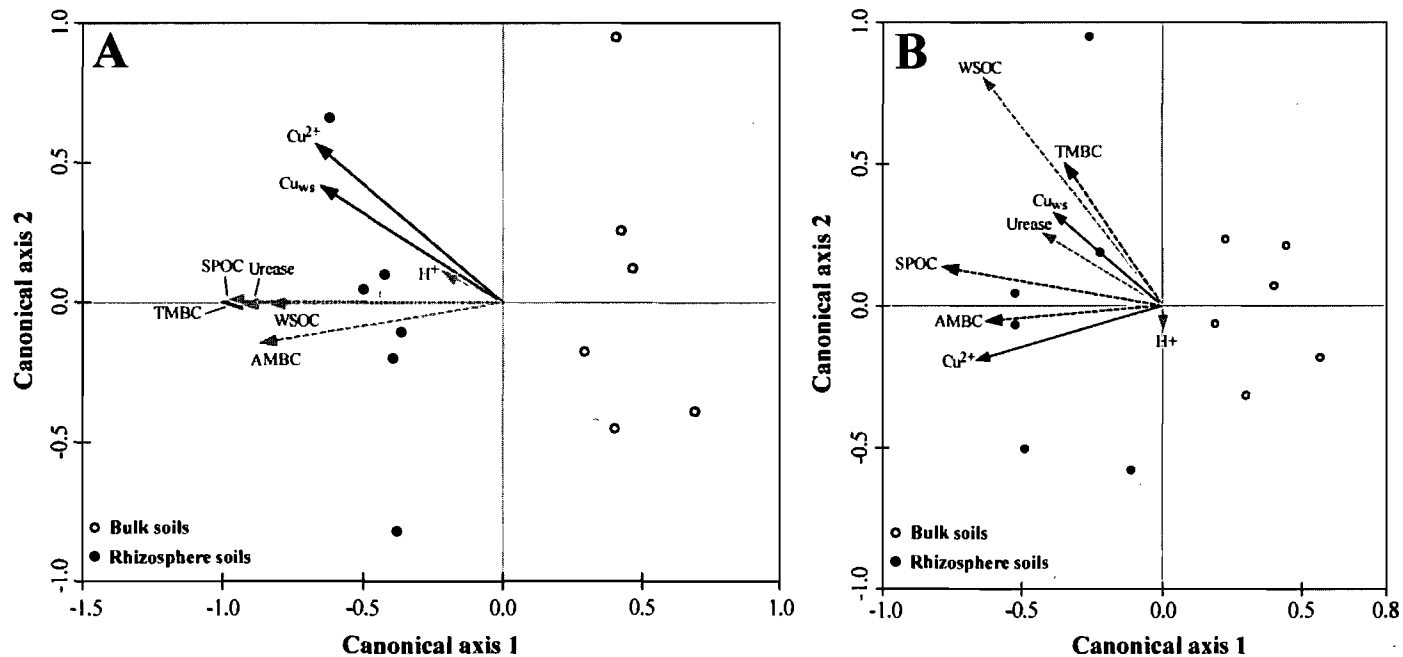
Moreover, the microbial and chemical variables that controlled the distribution of Cu variables between soil components were evaluated for each sampling area (Figure 6.5). The results from these RDA revealed that the measured Cu variables were significantly controlled by microbial and chemical variables ( $p < 0.01$  for RN and  $p < 0.05$  for MTG) and that the amount of variance explained reached 37.5 and 12.5 % of the adjusted variance of  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  in the RN and MTG areas, respectively. These statistical analyses further evidenced a clear distribution of objects between the two soil components and, in both cases, TMBC, AMBC, urease activity, SPOC and WSOC were positively linked to Cu variables (Figure 6.5). Stronger correlations were generally observed for  $Cu_{WS}$  than  $Cu^{2+}$ , except for AMBC in MTG area (Figure 6.5).



**Figure 6.3.** Venn diagram of the partition of the variation of  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  for the two soil components. The rectangles represent the total variance of Cu variables while each circle is associated to a given group of explaining variables. The adjusted  $r^2$  (expressed in %) of the variance of Cu variables for each surface of the Venn diagram are presented and are obtained from equations described in Legendre and Legendre (1998). Intersections between circles represent a fraction of the variance of Cu variables jointly explained by different groups of variables whereas residuals refer to the unexplained variance.



**Figure 6.4.** Redundancy analysis ordination biplot of rhizospheric samples describing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Cu variables. Full arrows refer to response variables, dotted arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Cu variables and grey arrow represents explanatory variable not compiled in the RDA analysis. The combination of all canonical axes was statistically significant ( $p < 0.01$ ). For details on variables codes, reader is referred to Tables 6.2 to 6.5.



**Figure 6.5.** Redundancy analysis ordination biplots of bulk and rhizospheric samples describing the influence of microbial and chemical variables on the distribution of Cu variables, without the sampling sites influence, for Rouyn-Noranda (A) and Monteregian (B) areas. Full arrows refer to response variables, dotted arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Cu variables and grey arrows represent collinear explanatory variables not compiled in the RDA analyses. The combination of all canonical axes was statistically significant ( $p < 0.05$ ). For details on variables codes, reader is referred to Tables 6.2 to 6.5.

## 6.4 Discussion

### 6.4.1 Microbial and chemical data

The microbial biomasses and activities were almost always higher in the rhizosphere than in the bulk soils and agreed well with other study on forest ecosystems (Phillips and Fahey, 2006). However, we obtained some unexpected results in that the proportion of active microorganisms in the total microbial biomass, represented by the AMBC:TMBC ratio, varied between 0.36 and 2.26 (Table 6.2). Odd values exceeding unity were measured for six samples, most of them in the rhizosphere of MTG sites. These high ratios were probably due to differences in the moisture content of the rhizosphere materials used for the AMBC (normalized at 50 % w/w) and the TMBC (field conditions generally below 10 % w/w) analyses, with the latter reducing microbial activity. Similarly, lower TMBC and TMBN values in the rhizosphere than in the bulk soils were recorded in MTG area, mainly at site MTG 2 (Table 6.2). The reasons for these results were that the rhizosphere contained 1.5 times less water than the bulk soil at sampling and that the total microbial biomass was measured under field-moist conditions. The warmer conditions prevailing in the MTG area compared to RN as well as the coarser texture of soils at site MTG 2 probably explained these results (Table 6.1).

Sharp contrasts between sampling areas were visible for  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca_{ws}$ ,  $Cl^-$  and  $NO_3^-$  concentrations (Tables 6.3 and 6.4). In this case, the differences in the nature of parent material played a key role. Indeed, MTG soils were formed on marine deposits that were enriched in  $Na^+$ ,  $Ca_{ws}$  and  $Cl^-$  and showed higher pH values compared to soils of the RN area that developed on lake sediments containing K-bearing minerals. The inverse trend in  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$  between sampling areas appeared to be related to pH which is known to limit nitrification under acidic condition and to favour it at higher pH (Ste-Marie and Paré, 1999). Moreover, the strong positive correlation observed between  $K^+$  and  $NH_4^+$  in the rhizosphere of the RN area (Figure 6.4) could be related to the presence of micas in the rhizosphere soils (Table 6.1). Indeed, Dahlgren (1994) demonstrated that micas represented a significant source of nitrogen to living organisms in forest soils because the  $NH_4^+$  ion has the potential to replace  $K^+$  in the interlayer

position of micaceous minerals. The  $K^+$  and  $NH_4^+$  ions could subsequently be mobilized in the soil environment through weathering process.

As for differences between the two soil components, results for WSOC and major ions were in general agreement with published data from forest field studies (Legrand *et al.*, 2005; Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Gobran and Clegg, 1996). However, when compared to results from controlled experiments, some differences emerged. For example, and contrary to our data, the depletion of  $K^+$ ,  $Ca_{WS}$  and  $Mg_{WS}$  was previously recorded in the rhizosphere and was attributed to root uptake being higher than solute transport to the root surface (Hinsinger, 2001; Schottelndreier and Falkengren-Grerup, 1999). Such discrepancies mostly originate from differences in experimental conditions (field vs laboratory), in the nutritional status of the soil and in plant species (tree vs graminaceous) between studies (Schottelndreier and Falkengren-Grerup, 1999). Nonetheless, our results are supported by *in situ* microscopic measurements (TOF-SIMS and  $\mu$ XRF) of trembling aspen roots showing the accumulation of K, Ca and trace metals in the soil materials surrounding plant roots (Séguin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004).

#### **6.4.2 Cu speciation in the rhizosphere of forest soils**

The increase in  $Cu_{WS}$  in the rhizosphere agreed well with results of Legrand *et al.* (2005); Séguin *et al.* (2004) and Wang *et al.* (2002). Similarly, our observation that  $Cu_{WS}$  was mainly complexed to organic ligands in both the bulk and rhizosphere was in-line with the works of Legrand *et al.* (2005) and Sauvé *et al.* (1997). However, the systematically higher  $Cu^{2+}$  activities recorded in the rhizosphere differed from the results of Legrand *et al.* (2005). Indeed, they reported no significant trend in  $Cu^{2+}$  activities between soil components and they found that the fraction of  $Cu_{WS}$  present as the  $Cu^{2+}$  was systematically higher in the bulk component. This discrepancy could be attributed to differences in tree species or in soil types and texture between studies.

The  $Cu_{TR}$  and  $Cu_{WS}$  concentrations showed sharp contrast between sampling areas, with higher values observed in the RN area (Table 6.5). These contrasts are associated to



differences in atmospheric Cu deposition between the sampling areas. Indeed, because of the presence of a Cu smelter, the RN soils received much higher Cu loadings from the atmosphere (Séguin *et al.*, 2004) than the soils of the MTG area, where no significant Cu point source exists. Furthermore, Cu speciation varied between sampling areas as modulated by the pH differences. Accordingly, increases in  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  concentration (Table 5), in the proportion of  $\text{Cu}^{2+}$  (Figure 6.1) together with a decrease in Cu-org (Figure 6.2) were observed under increasingly acidic conditions. These trends had already been reported in the literature and were explained by the decreasing solubility and complexing ability of dissolved organic substances as pH decreases (Figure 6.4), thus favouring an increase in  $\text{Cu}^{2+}$  activity (Legrand *et al.*, 2005; Sauvé *et al.*, 2000a, 1997; Vulkan *et al.*, 2000).

#### **6.4.3 Influence of rhizospheric microorganisms on $\text{Cu}_{\text{WS}}$ and $\text{Cu}^{2+}$ in forest soils**

When comparing soil components, the stronger influence of microbial variables on the partition of the variance of measured Cu variables in the rhizosphere as compared to the bulk soils stood as the most striking observation (Figure 6.3). A small fraction of the increase could be linked to the decrease of the unexplained variance of Cu variables in soils surrounding roots. However, the higher level of explanation in the rhizosphere was primarily associated to a shift involving a larger contribution of microbial variables. This is in agreement with the microbial enrichment of the rhizosphere as compared to bulk soils (Table 6.2). To our knowledge, these are the first results to quantify the association existing between microbial variables and Cu speciation in water extracts of the rhizosphere.

The nature of the microbial influence on Cu speciation in the rhizosphere was documented using RDA analyses. These statistical analyses allowed us to identify significant relationships between microbial and Cu variables. Because a field study always has an uncontrolled component and because differences existed between sampling areas and soil components (Tables 6.2 to 6.5), one has to be cautious when interpreting such statistical relationships in order to identify the biological and chemical processes at play. Therefore, different working hypotheses were submitted to explain the

links between variables. These hypotheses were based on our data as well as on data available in the literature. A full test of these hypotheses should involve further experiments to be conducted under controlled conditions.

As noted in Figure 6.1, pH exerted a strong influence on Cu speciation. In our rhizosphere samples, the pH was the primary chemical variable that explained the variations of  $\text{Cu}^{2+}$  activity observed between the two sampling areas (Figure 6.4). To the contrary, pH exerted no significant influence on  $\text{Cu}^{2+}$  distribution between the two soil components of a given sampling area (Figure 6.5) as indicated by the slight and generally non-significant pH differences recorded (Table 6.2), except at site RN 1 ( $p < 0.10$  with the Wilcoxon signed-ranks test). The influence of pH on  $\text{Cu}^{2+}$  activities in the rhizosphere appeared to be partly regulated by the uptake of nitrogen by microbes, as revealed by the correlations between  $\text{H}^+$  or  $\text{Cu}^{2+}$  and TMBN (Figure 6.4). The nature of the nitrogen form taken up by microorganisms, as well as by roots, was widely recognized has one of the main processes controlling the rhizospheric pH (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner and Römheld, 1996). The process of  $\text{NH}_4^+$  uptake favours the acidification of the rhizosphere whereas  $\text{NO}_3^-$  absorption consumes acidity. In our study, and based on the lower TMBN values, the microbial assimilation of nitrogen was shown to be higher in the rhizosphere of the RN than the MTG soils, probably because of nitrogen limitation in the latter sampling area (Tables 6.2 and Figure 6.4). It is thus hypothesized that the higher microbial assimilation of nitrogen in the RN soils induced a larger influence of microorganisms on water-soluble pH and  $\text{Cu}^{2+}$  activity in this area compared to the MTG area.

Organic matter also exerted a strong influence on Cu speciation, especially on  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  concentration. This influence was apparent when the distributions of Cu variables between sampling areas (Figure 6.4) and soil components (Figure 6.5) were considered. The influence of organic matter on  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  concentrations was further associated to urease activity and microbial biomass variables (Figures 6.4 and 6.5). It follows that the  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  increase appeared to be predominantly associated to chemical reactions between organic matter and Cu, such as complexation and solubilisation. However, the positive correlations of SPOC, WSOC and  $\text{Cu}_{\text{WS}}$  with urease activity, TMBC and AMBC

variables (Figure 6.5) rather suggest that the mobilization of Cu in the rhizosphere occurs during the microbial mineralization of organo-metal complexes. If we consider that dead roots constitute one of the main sources of organic materials to the rhizosphere and that Cu is preferentially sequestered in tree roots (Johnson *et al.*, 2003), we can submit that the microbial mineralization of roots supplied Cu to the solution of the rhizosphere. This second hypothesis was derived from a recent study conducted at RN and at Sudbury, two Canadian areas that received large atmospheric inputs of metals, where root decay was found to release Cu to the soils in amounts that were equal to or even higher than atmospheric deposition (Johnson *et al.*, 2003).

When the rhizosphere samples of both sampling areas were integrated in the same RDA analysis, the correlations between  $Cu_{WS}$  and urease activity became negative, reflecting the inverse distribution of these variables in the two sampling areas (Figure 6.4). This could first reflect a more toxic effect of Cu to urease in the RN than the MTG soils. Although this enzyme is known to be sensitive to Cu, the toxicity thresholds derived from the literature often suffer from large variability across studies and thus lead to ambiguous conclusions for our soils (Chaperon and Sauvé, 2007; Sauvé *et al.*, 1998b; Kandeler *et al.*, 1996). It was therefore difficult to confirm or reject an interpretation based on toxicity. It is noteworthy that the distribution of urease activity between sampling areas was clearly associated to the distribution of SPOC. As such, the urease activity and SPOC variables showed significantly higher values in the MTG than the RN soils ( $p < 0.10$  with the Mann-Whitney test). However, when the urease values were normalized with respect to the amount of SPOC, no statistical difference between sampling areas remained ( $p > 0.10$  with the Mann-Whitney test). These results therefore suggested that the higher urease activities in the MTG soils were predominantly related to an increase in organic matter content in the rhizosphere soils of this area, not to a lower  $Cu_{WS}$  concentration. This does not lend a strong support in favour of an explanation based on toxicity at the RN sites.

The statistical link between  $Cu_{WS}$  and urease activity might however reflect the impact of microbial mineralization on the supply of Cu to the rhizospheric solution. Indeed, while mineralization is anticipated to be higher in the MTG than the RN soils, the Cu

concentration in roots could follow the inverse pattern. Root tissues analyses confirmed that the Cu concentrations in roots of RN trees were significantly higher than those of the MTG area ( $p < 0.01$  with the Mann-Whitney test) by up to one order of magnitude (Table 6.6). The Cu enrichment of root tissues in RN compared to MTG soils was attributed to the larger atmospheric deposition of Cu in the RN area and by the subsequent action of biocycling that favoured the transfer of Cu to the living roots of the subsoil (Johnson and Hale, 2008). The root tissues analyses agreed with soil Cu analyses and suggested that each unit root decomposed at RN supplied a higher amount of Cu to the soil solution than at MTG, even if organic matter mineralization proceeded more slowly in the RN soils. This trend was reported for two forest soils of the Sudbury area presenting sharp contrasts in Cu contamination (Johnson and Hale, 2008; Johnson *et al.*, 2003). The direct quantification of root turnover rates and of the amounts of Cu released by root decay in the RN and MTG soils is, however, needed to confirm the occurrence, the intensity and the role of this process as a significant source of Cu to the rhizospheric solution of forest soils.

**Tableau 6.6.** Total Cu concentration in the root tissues of each tree sampled.

Site	Cu <sup>a</sup>	
	----- $\mu\text{g g}^{-1}$ dwt -----	
	Rouyn-Noranda area	Monteregian area
<b>1a</b>	198	15.9
<b>1b</b>	80.4	15.5
<b>1c</b>	66.2	37.6
<b>2a</b>	206	22.0
<b>2b</b>	138	31.9
<b>2c</b>	165	38.9
<b>3a</b>	16.4	7.94
<b>3b</b>	41.7	10.9
<b>3c</b>	42.7	7.03

<sup>a</sup> According to the Mann-Whitney test, significant differences in the Cu concentration of root tissues occurred between sampling areas ( $p < 0.01$ ).

## 6.5 Conclusions

Our study on forest soils confirmed that the rhizosphere is a very dynamic microenvironment. Indeed, higher microbial biomass and activity, higher macronutrient

concentrations as well as increase in  $Cu_{WS}$  concentrations and  $Cu^{2+}$  activities were measured in the rhizosphere as compared to the adjacent bulk soil. Moreover, the processes responsible for the differences in Cu speciation among sampling sites differed between the two soil components. In the bulk soils, the variance of  $Cu_{WS}$  and  $Cu^{2+}$  was mostly attributed to the joint effect of spatial and chemical variables, while microbial variables were only weakly involved. In the rhizosphere soils, the explanation shifted to include the joint influence of microbial, chemical and spatial variables leading to an increased contribution of the microbial variables. According to our results, microbial activity increased the  $Cu_{WS}$  concentration and  $Cu^{2+}$  activity in the rhizosphere of forest subsoil through their effects on solution pH following the assimilation of nitrogen. Some evidences also suggest that rhizospheric solution is, to a lesser extent, supplied in Cu by the microbial mineralization of roots. This latter process will however need further validation.

The results of this study indicated that rhizospheric microorganisms were involved in the preferential mobilization of Cu at the soil-root interface of trembling aspens for soils having contrasted microbial and chemical properties. These results further provided new insights regarding a key biogeochemical uncertainty related to rhizosphere dynamics in forest soils: the idea that rhizosphere microbes have a significant effect on the mobilization and speciation of metals and, potentially, on their uptake by plant roots. Multivariate statistical analyses indeed allowed the quantification of this microbial effect for Cu as well as the identification of statistical links among variables. Key questions however remain regarding the precise identification of the microbial communities and biochemical processes involved. The role of microbes on the process of Cu uptake by root should also be clarified.

## 6.6 Supplementary data

### 6.6.1 Supplementary data 1

**Tableau 6.7.** Mean properties of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx) trees sampled at each site. Standard deviation values are in parentheses.

<b>Sites</b>	<b>Diameter<sup>a</sup></b> cm	<b>Height</b> m	<b>Age</b> years
<b>RN 1</b>	3.59 (0.05)	4.26 (1.36)	18 (2.8)
<b>RN 2</b>	3.45 (0.09)	5.15 (0.34)	16 (4.1)
<b>RN 3</b>	3.82 (0.16)	5.61 (0.53)	10 (2.7)
<b>MTG 1</b>	2.02 (0.24)	5.67 (0.47)	6 (1.5)
<b>MTG 2</b>	1.64 (0.09)	4.58 (0.17)	4
<b>MTG 3</b>	1.72 (0.17)	4.93 (0.57)	6 (1.8)

<sup>a</sup> Trees diameters were measured at breast height.

### 6.6.2 Supplementary data 2: Methodological details on microbial analyses

#### 6.6.2.1 *TMBC and TMBN measured by fumigation-extraction technique (Voroney et al., 2008)*

For each soil sample, 2 g, equivalent dry weight, of soil were weighed for both the fumigated and the unfumigated subsamples. Fumigation treatment, in a desiccator using ethanol-free chloroform, was applied only to fumigated subsample during 24 hours in the dark and at room temperature. After this, both the fumigated and the unfumigated subsamples were extracted using 0.5 M potassium sulphate solution at a soil to solution ratio of 1:4. The samples were subsequently shaken for one hour on a horizontal shaker, centrifuged at 1400 g for 15 minutes and filtered through Fisherbrand Q8 filters. The solutions were kept at 4 °C in the dark until analyzed within 72 hours. A fraction of the samples was analyzed for dissolved organic carbon with a TOC analyzer (Shimadzu). The remaining fraction was digested with 0.22 M potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) solution and subsequently analyzed for total nitrogen by colorimetry at a wavelength of 550 nm on a spectrophotometer (Solorzano et Sharp, 1980). Differences of organic carbon or total nitrogen measured between the fumigated and the unfumigated subsamples are

related to total microbial biomass by constants, reflecting the extraction efficiency of microbial biomass C ( $K_{ec}$ ) and microbial biomass N ( $K_{en}$ ) by the potassium sulphate solution. The dimensionless  $K_{ec}$  and  $K_{en}$  values used are in the range recommended by Voroney *et al.* (2008) and are respectively set at 0.25 and 0.18.

#### 6.6.2.2 AMBC measured by substrate-induced respiration (Anderson and Domsch, 1978)

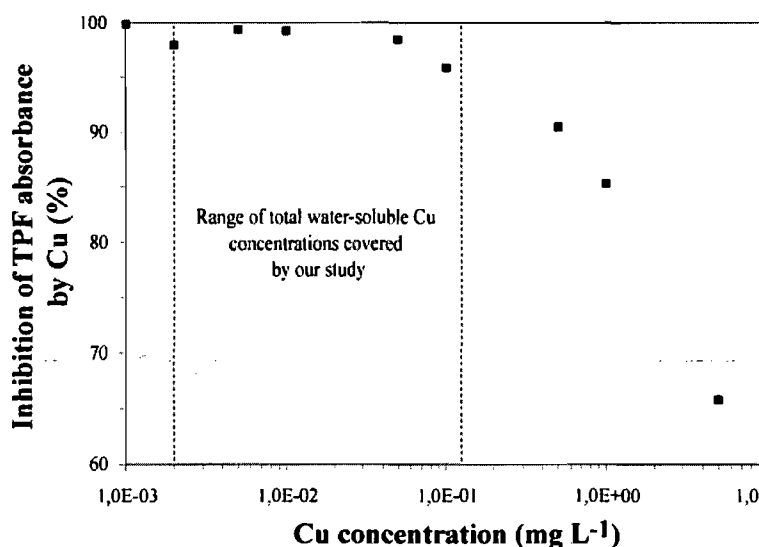
To 2 g, equivalent dry weight of soil, 0.5 g of a mixture of 3% glucose and 97% talcum (w/w) was added. The water content of the soil was then adjusted to 50% in order to obtain a maximal respiration response, that could be compared between fine-textured soils having different pH values (Lin and Brookes, 1999). The mixture was homogenized and kept in contact with the atmosphere for 100 minutes. The pots were afterwards sealed and incubated until the  $CO_2$  concentrations were measured at the maximal initial respiration rate. To that effect, preliminary tests revealed that for the RN soils, the optimal incubation time was 270 minutes while it was set at 180 minutes for the MTG soils. The  $CO_2$  measurements were made on a Shimadzu Mini2 Gas chromatograph that used a Poropak Q column and which is coupled to a methanizer that convert  $CO_2$  to  $CH_4$  (Moore and Dalva, 1997).

#### 6.6.2.3 Urease measured colorimetrically (Kandeler and Gerber, 1988)

2 g equivalent dry weight soil were incubated at 37°C for two hours along with 1 ml of urea solution (0.0799 M). After the incubation, 10 ml of 2 M potassium chloride was added, the mixture was shaken for 30 minutes and the solution was filtered through Fisherbrand Q8 membrane. The concentration of  $NH_4^+$  was then measured by spectrophotometry at a wavelength of 690 nm, after adding 2 ml of soil extract, 8 ml of Milli-Q water, 2 ml of dichloroisocyanide ( $C_3Cl_2N_3O_3Na$ ; 0.1 %) and 5 ml of a solution composed of one-third of sodium salicylate (1.06 M), one-third of sodium hydroxide (0.3 M) and one-third of Milli-Q water.

#### 6.6.2.4 *Dehydrogenase measured colorimetrically (Tabatabai, 1994)*

The dehydrogenase activity of the soil samples is measured by the microbially-mediated reduction of 2,3,5- Triphenyltetrazolium chloride (TTC;  $C_{19}H_{15}N_4Cl$ ) to Triphenyl formazan (TPF;  $C_{19}H_{16}N_4$ ). Briefly, 5.94 g of dry soil were mixed with 0.06 g of calcium carbonate, 1 ml of TTC solution (0.0896 M) and 2.5 ml of Milli-Q water, and were incubated at 37 °C for 24 hours. The end-product of the incubation reaction was extracted with 10 ml of methanol, shaken with a glass tip and filtered through Fisherbrand Q8 membrane. The amount of TPF was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 485 nm. As mentioned by Chander and Brookes (1991), the presence of soluble Cu may inhibit the absorbance of TPF at Cu concentrations greater than 5 mg  $L^{-1}$ . For our soils, the total water-soluble Cu concentrations measured in water extracts are two to three orders of magnitude less than the Cu concentrations used in Chander and Brookes (1991) experiment. We therefore evaluated the potential Cu inhibition in our soils by conducting a similar experiment using total dissolved Cu concentrations ranging from 0.001 to 5 mg  $L^{-1}$  (Figure 6.6). The results showed that Cu does not inhibit dehydrogenase measurement in our soils.



**Figure 6.6.** Inhibition of TPF absorbance by Cu. The test followed the methodology of Chander and Brookes (1991) and the inhibition is normalized to the control solution which contained no Cu concentration. According to the Mann-Whitney test, no statistical differences in TPF absorbance were observed between the control solution without Cu and the solution containing up to 0.5 mg  $Cu L^{-1}$  ( $p > 0.10$ ).



### 6.6.3 Supplementary data 3: Methodological details on chemical analyses

#### 6.6.3.1 *Measurement of $\text{Cu}^{2+}$ activity (Rachou et al., 2007)*

The  $\text{Cu}^{2+}$  activity were measured on water extracts where ultra-pure  $\text{KNO}_3$  was added to homogenize the ionic strength and to obtain a final uniform background concentration of 0.01 M. The  $\text{Cu}^{2+}$  measurements were made using a detecION® Cupric 227 ISE combination electrode based on a calibration curve constructed from a series of solutions containing 1 mM IDA (Iminodiacetic acid), 0.1 mM  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , 6 mM NaOH and 2.5 mM  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  (potassium acid phthalate). The pH of the different solutions used for the calibration curve was adjusted with nitric acid (trace metal grade) to obtain a range of  $\text{pCu}^{2+}$  activity levels. To speed up the equilibration time of the ISE electrode, we used a magnetic stirrer. At the end of each day, the standards used for electrode calibration were reanalyzed to evaluate the accuracy of readings and to identify potential instrumental drift.

#### 6.6.3.2 *Measurement of $\text{Cu}_{\text{TR}}$ (US EPA, 1998)*

We added 9 ml of nitric acid 15.9 M and 2 ml of hydrochloric acid 12.1 M (all trace metal grade) to 0.5 g of dry soil. The samples were then digested at an average temperature of 173 °C for 20 minutes. After the digestion, 40 ml of Milli-Q water were added. To separate the soil from the solution, the samples were centrifuged for 15 minutes at 1400 g and the samples were analyzed.

#### 6.6.3.3 *Measurement of Cu sequestered in root tissues (Jones Jr and Case, 1990)*

We added 2 ml of nitric acid 15.9 M (trace metal grade) to 0.2 g of dry ground tissues. The samples were soaked in the acid overnight and then digested at an average temperature of 120 °C for five hours. After the digestion, Milli-Q water was added to obtain 50 ml of solution and the samples were analyzed.

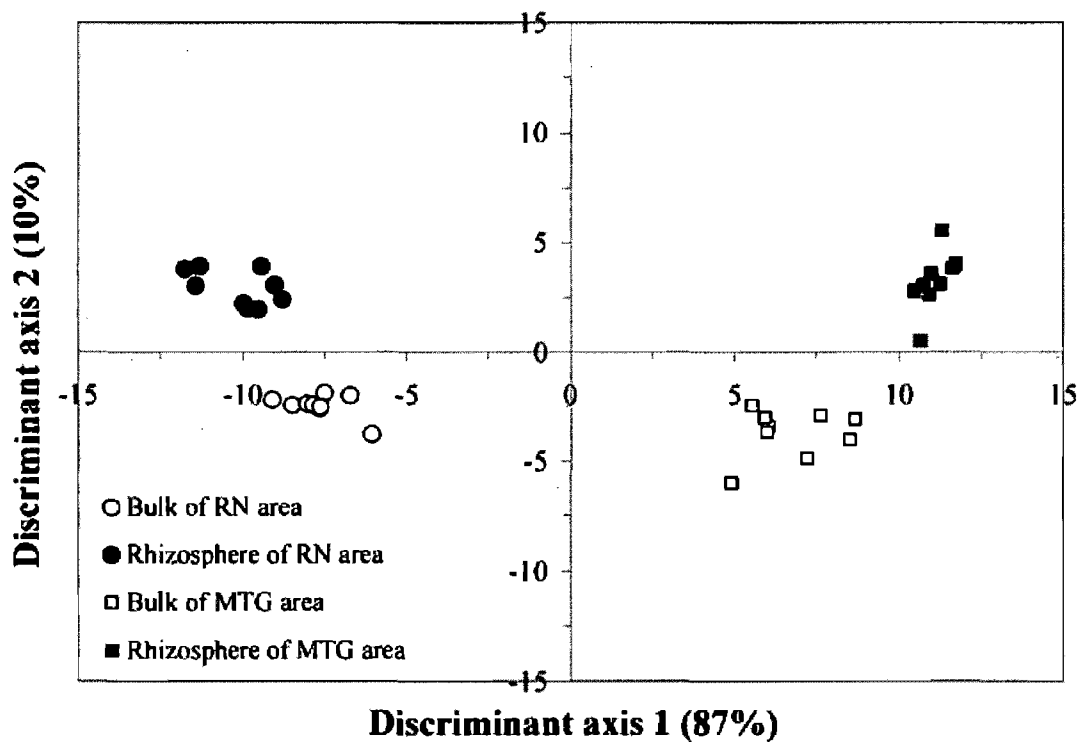
#### **6.6.4 Supplementary data 4: Methodological details on RDA**

“ RDA is the direct extension of multiple regression to the modelling of multivariate response data ” (Legendre and Legendre, 1998). Therefore, when a RDA is produced, multiple linear regression of each response variable is first computed followed by a principal component analysis applied to fitted values of the multiple regression.

For the RDA produced in our study, both the response and explanatory variables were centered and standardized by CANOCO. To identify correlations among variables, a type-2 scaling was used in the RDA. The significance of explanatory variables as well as the canonical axes were tested using a Monte-Carlo permutation test (10 000 simulations) performed under full model by constraining the permutation of objects within a sampling area (Legendre and Legendre, 1998).

#### **6.6.5 Supplementary data 5: Discrimination the variability of the database between sampling areas and soil components**

Factors controlling the variations across the dataset were evaluated using the discriminant analysis by differentiating objects among soil components (bulk and rhizosphere) and sampling areas (RN and MTG). In order to do this, the discriminant analysis creates the best discriminate functions able to differentiate objects (Figure 6.7) and determines the variables contributing the most to the discriminate functions (Table 6.8). The discriminant analysis was performed, in our study, on centered and standardized variables using the SPSS 16.0 software for Windows®. For details on the discriminant analysis, the reader is referred to Legendre and Legendre (1998).



**Figure 6.7.** Results of the discriminant analysis performed to differentiate the sampling areas (Rouyn-Noranda - RN vs Montérégie - MTG) and the soil components (bulk vs rhizosphere). Each discriminant axis explained a significant portion of the variance of the database ( $p < 0.01$ ). An *a posteriori* classification indicated that more than 91 % of the objects were successfully classified by the discriminant functions calculated during the analysis.

**Tableau 6.8.** Statistical informations<sup>a</sup> and standardized coefficients obtained from the discriminant analysis that differentiate objects as a function of sampling areas and soil components.

	<b>Discriminant function 1</b>	<b>Discriminant function 2</b>
<b>Eigenvalues</b>	92.5	10.9
<b>Wilks lambda</b>	< 0.01	0.02
<b><math>\chi^2</math></b>	211	95.1
<b>Degrees of freedom</b>	45	28
<b>Significance level</b>	< 0.01	< 0.01
<b>Percentage of variance explained</b>	87	10
<b>Standardized coefficients of</b>		
<b>Urease activity</b>	-0.01	-0.63
<b>AMBC</b>	0.77	1.40
<b>H<sup>+</sup></b>	-0.38	-0.07
<b>SPOC</b>	0.34	0.04
<b>WSOC</b>	-0.97	0.10
<b>Na<sup>+</sup></b>	2.82	-0.72
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	-1.03	0.24
<b>K<sup>+</sup></b>	0.41	0.62
<b>Cl<sup>-</sup></b>	0.43	0.49
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	1.20	-0.58
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	-2.12	-0.46
<b>Ca<sub>ws</sub></b>	3.84	0.73
<b>Cu<sub>ws</sub></b>	0.38	-0.55
<b>Mg<sub>ws</sub></b>	-1.03	-0.18
<b>Cu<sub>TR</sub></b>	-1.73	0.68

<sup>a</sup> The third discriminant function calculated by the discriminant analysis was not presented here because it explained less than 3 % of the variance of the dataset.

## PARAGRAPHE DE LIAISON C

Le chapitre sept<sup>3</sup> est en tout point similaire au chapitre six. Toutefois, il s'attarde à documenter la biogéochimie du Zn dans la rhizosphère de sols forestiers contrastés. Pour ce faire, la spéciation du Zn a été documentée, d'une part, en mesurant les formes réactives et les plus biodisponibles par polarographie et, d'autre part, en produisant un portrait complet de sa spéciation par modélisation (forme ionique libre et formes ioniques complexées). L'influence des microorganismes de la rhizosphère a, par la suite, été évaluée sur les variables de Zn mesurées à l'aide d'analyses statistiques multivariées. Les résultats du Zn sont présentés dans un chapitre distinct de celui traitant du Cu, en raison des nombreuses différences biogéochimiques existant entre ces deux métaux (Tableau 4.1). Il est ainsi anticipé que les différences de comportement entre ces deux métaux se traduisent par des différences au niveau du portrait de spéciation et de l'influence des microorganismes de la rhizosphère sur les métaux.

---

<sup>3</sup> Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F. On Zn speciation in the rhizosphere of forest soils: the impact of microbial activity, *Environmental Pollution*, soumis le 28 juillet 2008.

## CHAPITRE 7. On Zn speciation in the rhizosphere of forest soils: the impact of microbial activity

---

### 7.1 Introduction

Previous studies in forest ecosystems have shown that the retention of zinc (Zn) mostly occurs in the organic horizons of soils and in the vegetation. As such, the distribution of this essential trace metal is strongly associated to the soil-plant sub-system and in particular to biocycling (Ukonmaanaho *et al.*, 2001). Accordingly, between 61 and 75% of the uptake of Zn by vegetation preferentially accumulated in the above-ground parts of trees (Johnson *et al.*, 2003; Whittaker *et al.*, 1979). Furthermore, the Zn sequestered in the vegetation account generally for more than 50% of the total Zn inputs through the soil via processes such as litterfall, throughfall or stemflow (Johnson *et al.*, 2003; Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Derome and Nieminen, 1998; Bergkvist *et al.*, 1989). The uptake of Zn by trees thus regulates the intensity of Zn cycling as well as its redistribution in the terrestrial ecosystem. The uptake process mostly occurs in the rhizosphere because of favourable nutrient conditions induced by the interactions of roots and microorganisms with soil materials. The increase consumption of Zn for industrial activities contributed to the release of large amounts of Zn into the environment. This anthropogenic Zn release was progressively integrated in forest ecosystems and may exceeded Zn toxicity threshold, exposing soil organisms as well as plants to potentially toxic conditions (Kabata-Pendias, 2001). This is particularly true in the rhizosphere, where transfers of Zn to plants occur and may reduce plant growth, plant productivity and root elongation (Kabata-Pendias, 2001).

Comparison of soil properties between the rhizosphere and the bulk materials revealed that the rhizosphere is a biogeochemical hot spot (Courchesne *et al.*, 2006; McClain *et al.*, 2003), where unique conditions of metal speciation occurred (Hinsinger, 2001). Knowledge on Zn speciation in the rhizosphere was mostly gathered from controlled experiments conducted on edible crop plants, hyperaccumulator plants or young trees (Zhao *et al.*, 2007; Knight *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1997; McGrath *et al.*, 1997). These studies generally observed a depletion of dissolved Zn concentration in the rhizosphere,

as explained by root uptake of Zn being higher than solute transport to the root surface. They also found that the free-ion form ( $\text{Zn}^{2+}$ ) and the labile inorganic species of Zn dominated Zn speciation in the rhizosphere. However, when compared to solutions from the bulk soils, the absolute concentrations of these Zn species were found to be lower in the rhizosphere. They attributed this decrease to the complexation of Zn with organic ligands in the organically-enriched rhizosphere. Different results were obtained from studies that collected rhizospheric soils directly from the field. Indeed, Zn enrichment of both the solid and the liquid phases of the soils was observed in the rhizosphere of trees compared to the associated bulk soils (Legrand *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2005, 2004). When data on Zn speciation were obtained, they revealed a systematic enrichment of the rhizosphere in labile inorganic Zn species (Courchesne *et al.*, 2006). Other than this work, studies on the liquid phase speciation of Zn are scarce. Acquiring this type of data is thus needed to increase our understanding of the biogeochemical behaviour of Zn in the rhizosphere and to predict its transfer from soils to the plants (Courchesne *et al.*, 2008).

The influence of soil properties on the mobility and speciation of Zn has been under considerable scrutiny. Soil pH regulates the partitioning of Zn between the solid and liquid phases as well as its complexation with organic and inorganic ligands in soil solution (Stephan *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2003b; Sauvé *et al.*, 2000a). The presence of soil organic matter contributes to either mobilize Zn through complexation with dissolved organic matter in the soil solution or to immobilize Zn through sorption to the solid-phase organic matter (Stephan *et al.*, 2008; Almas *et al.*, 2000). The role of root activity is also well documented and showed that the uptake or excretion of ions, the release of root exudates and the production of redox reactions are processes influencing the mobility and speciation of Zn in the rhizosphere (Hinsinger, 2001).

Microorganisms also impact on the mobilization of trace metals in bulk soils through processes similar to those of roots such as biosorption, bioaccumulation, complexation and dissolution by exudates as well as production of redox reactions (Gadd, 2004; Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Berthelin *et al.*, 1995). In the rhizosphere, specific mycorrhizal fungi and bacterial communities, isolated from the soil-root interface of

plants growing on Zn contaminated sites, were inoculated in agar media or in simple soil system and demonstrated their ability to solubilize Zn (Fomina *et al.*, 2005, 2004; Whiting *et al.*, 2001). These results highlighted the key role played by rhizosphere microorganisms on Zn speciation. However, the transfer of these results, from such controlled experiments conducted with specific microbial strains to natural rhizospheric systems containing diverse microbial communities, is constrained by the inherent complexity of the latter compared to the controlled environments. Therefore, the role of microbial activity on the distribution of dissolved Zn species has not yet been documented, especially at the scale of the rhizosphere in natural forested ecosystems.

Consequently, the objectives of this study are: (1) to determine the liquid-phase speciation of Zn in the rhizosphere and bulk components of contrasted forest soils, (2) to quantify the contribution of microbial and chemical variables to the speciation of Zn in rhizosphere and bulk soils and (3) to identify the main microbial variables influencing the liquid-phase chemical speciation of Zn in the rhizosphere. The approach used to gain new insights on the role of microorganisms on Zn speciation was to combine the direct measurements of Zn species on field samples, the geochemical modelling of Zn speciation and the use of multivariate statistical tools to establish relationships among variables.

## **7.2 Materials and methods**

### **7.2.1 Field sites**

To answer the research objectives, soils were collected in two sampling areas. Soils were first sampled in August 2004 in the Rouyn-Noranda (RN) area, Canada (48° 14'N, 79° 01'W) at three sites located respectively at 0.5, 2 and 8 km downwind from the Horne's smelter (identified as RN 1 to 3, respectively). The soils sampled were developed on fine-textured post-glacial lake sediments and were classified as Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998). Soils were also sampled in August 2005 in the Monteregian (MTG) area, Canada at three sites located near a cement plant (site MTG 1; 45° 16'N, 73° 28'W), a steel-work plant (site MTG 2; 45° 51'N, 73° 13'W) and along an airport strip (site MTG 3; 45° 31'N, 73° 23'W). The soils were formed on clay deposits



of the Champlain Sea and were also classified as Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998). The soils sampled were predominantly composed of silt and clay-size materials, except in sites RN 1 and MTG 2 where a coarser texture was observed. At all sites, the clay mineralogy was dominated by quartz, chlorite, vermiculite and chlorite-vermiculite intergrades (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008). In both sampling areas, the forest was dominated by white birch (*Betula papyrifera*), trembling aspen (*Populus tremuloides*) and sugar maple (*Acer saccharum*). In the RN area, yellow birch (*Betula alleghaniensis*) and balsam fir (*Abies balsamea*) were also present. Furthermore, difference of climatic conditions existed between sampling areas (mean annual differences of 4.6 °C and 132 mm of precipitation). However, this effect was in part controlled by sampling the soils in August when climatic differences between sampling areas were at minimum (mean august differences of 3.4 °C). Finally, the soils differed with respect to the origin of parent materials and pH between areas. These latter differences induced variations in the liquid-phase concentration and speciation of Zn between the two sampling areas.

### **7.2.2 Sampling of soil components**

At each of the six sampling sites, three young trembling aspens (*Populus tremuloides* Michx.) were carefully uprooted. The rhizosphere and bulk components were sampled in the B horizons of each tree and only the fine roots (< 2 mm in diameter) were collected. The separation of the rhizospheric and bulk components was performed in the field by gently shaking the roots. The soil material that fell down from the root was viewed as the bulk soil, whereas the material that stayed attached to the roots was considered as rhizosphere soil. Further details on the separation procedure are found in Cloutier-Hurteau *et al.* (2008).

### **7.2.3 Microbial analyses**

The soils were first sieved at 2 mm and stored at 4°C in the dark under field-moist conditions. Most microbial analyses were conducted during the first month following sampling with maximum storage duration of less than three months. For bulk soil samples, analyses were triplicated except for rhizosphere samples which were duplicated

due to the small mass of soil collected. The data validation for the microbial analyses was ensured by using an internal soil control and certified water samples (NWRI, Burlington, Canada) as external quality controls for instrumentation. Total microbial biomass C and N, identified as TMBC and TMBN respectively, were obtained at field-moist conditions using the fumigation-extraction technique described by Voroney *et al.* (2008). However, at sites MTG 1 to 3, TMBC and TMBN measurements were strongly affected by the low water content of the rhizospheric soils (< 10 % w/w) at the time of sampling. Consequently, for these sites, and when enough rhizosphere soil was available, soil water contents were adjusted to the level of the other rhizosphere soil materials (20 % w/w) and TMBC and TMBN were measured after an incubation time of two hours at room temperature. Functional information about the maximal potential active microbial biomass C (AMBC) were obtained at a 50 % soil water content (w/w) using the substrate-induced respiration technique (Anderson and Domsch, 1978). Data on the mineralization process and on the nitrogen cycle were obtained by measuring the enzymatic activity of the intracellular and extracellular urease (Kandeler and Gerber, 1988). Finally, the enzymatic activity of the active microbial community was obtained by measuring dehydrogenase by the TTC method (Tabatabai, 1994). For a complete description of the microbial analyses performed in this paper, the reader is referred to Cloutier-Hurteau *et al.* (2008).

#### **7.2.4 Chemical analyses**

After the microbial analyses and before performing the chemical analyses, soils were air-dried and sieved at 0.5 mm. Chemical analyses were conducted on water extracts to mimic the conditions found in the soil solution. Water extracts were obtained using a 1:10 soil-solution ratio, after two hours of shaking, 15 minutes of centrifugation at 1400 g and filtration through 0.45- $\mu$ m cellulosic membranes. To insure that the Zn speciation measurements were made on fresh solutions, two distinct extraction series were performed. The data produced by these two extraction series were combined and interpreted together. Previously, the similarity between the two water extract series was evaluated by comparing their respective pH values. The comparison revealed no statistical differences between the two extractions series ( $p > 0.10$  with the Wilcoxon

signed-ranks test) and, consequently, we considered both water extracts as similar. All the bulk soil samples were extracted in triplicates, whereas the extractions on rhizosphere samples were generally duplicated, depending on the availability of soil materials. The data validation was ensured using two soil controls (soil RN 0.5 A and C from Séguin *et al.* (2004)) and certified water samples (NWRI, Burlington, Canada).

The first series of water extractions was used to measure pH before filtration using a pH electrode with calomel reference (Accumet) on a Fisher Accumet pH meter (825 MP). After filtration, we measured major cations ( $K^+$ ,  $Na^+$  and  $NH_4^+$ ) and anions ( $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  and  $PO_4^{3-}$ ) by ion chromatography (Waters), water-soluble organic carbon (WSOC) with a Shimadzu TOC analyzer and total water-soluble aluminum ( $Al_{ws}$ ), calcium ( $Ca_{ws}$ ), copper ( $Cu_{ws}$ ), magnesium ( $Mg_{ws}$ ) and zinc ( $Zn_{ws}$ ) using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

The second series of water extractions was used to measure pH and bioavailable Zn species. In order to do this, the differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) technique was used because it allowed measurements of the electrochemically-labile Zn fraction ( $Zn_{DPASV}$ ). This operationally defined Zn fraction is considered to include  $Zn^{2+}$  as well as Zn occurring as ion pairs with inorganic ligands (Mota et Correia Dos Santos, 1995; Florence, 1986).  $Zn_{DPASV}$  measurement was assessed on water extracts within 24 hours using the protocol described by Courchesne *et al.* (2006) and Stephan *et al.* (2008). Briefly, the ionic strength of the water extracts was maintained constant during the measurement by adding 0.01 M  $KNO_3$  (trace metal grade; 99.99%). The  $Zn_{DPASV}$  measurements were made on a Radiometer VoltaLab50 analyzer (Radiometer Analytical) connected to a hanging mercury drop electrode module (MDE 150; Radiometer Analytical) and coupled to a magnetic stirrer. The solution samples were pre-purged for five minutes with  $N_2$  to remove dissolved oxygen. The metals were deposited at -1.2 V for 60 s, with stirring at 400 rpm, followed by a 15-s quiescent period. Metal stripping was then carried out at a stirring rate of 525 rpm by scanning potential with the use of a 10  $\mu A$  electrical current to a final potential of -0.7 V. The Zn peak appeared close to -0.98 V. Each sample was analyzed twice to ensure that the electrode was completely conditioned. The calibration equation was obtained daily with standard additions of

microliters of Zn (Fisher Scientific, USA) through the upper port of the cell. We used soil RN 0.5 C from Courchesne *et al.* (2006) as an external soil control for this analysis.

Total recoverable Zn ( $Zn_{TR}$ ) in soil was measured by acid digestion with the modified US EPA (1998) method and a CEM MDS-2000 microwave system. The digestion was made using nitric and hydrochloric acids (all trace metal grade) at an average temperature of 173 °C for 20 minutes. Then, the dissolved  $Zn_{TR}$  was analyzed on an atomic absorption spectrophotometer (AAS; Varian AA-1475). The solid-phase organic carbon (SPOC) was determined according to the modified Walkley-Black method (Skjemstad and Baldock, 2008). Finally, the concentration of Zn in the root tissues was measured by acid digestion on a dry bath with the modified method of (Jones Jr and Case, 1990). Root digestion was performed with nitric acid (trace metal grade) at an average temperature of 120 °C for five hours and Zn was measured by AAS.

#### **7.2.5 Geochemical modelling of Zn speciation**

To complement the  $Zn_{TR}$ ,  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$  measurements, the concentrations of  $Zn^{2+}$ , of inorganic Zn complexes (Zn-inorg) and of Zn complexed to organic ligands (Zn-org) were calculated using the software MINEQL+ v.4.5 (Schecher and McAvoy, 2003). This speciation software was chosen after a comparison with the speciation package WHAM 6. For our soil samples, the result of this comparison indicated that MINEQL+ 4.5 provided more realistic speciation than WHAM 6 (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2007). The modelling of Zn speciation was performed using pH, total water-soluble metals, major cations, inorganic anions as well as organic ligands as input data. All these variables were measured directly except for the composition of dissolved organic ligands which was estimated based on a review of the literature. Four scenarios were defined to contrast the composition of organic ligands between soil components (bulk vs rhizosphere) and soil pH levels (acidic vs near-neutral). Fulvic, humic and acetic acids were used as organic ligands in the model and the conditional association constants in MINEQL+ v.4.5 were updated. The modelling was performed at 25 °C, in closed systems, without taking into account the solid phases and using the Debye-Hückel

equation for activity corrections. A complete description of the modelling procedure and validation is found in Cloutier-Hurteau *et al.* (2007).

### 7.2.6 Statistical analyses

For each variable, the normality of the datasets was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. If necessary, square root or logarithmic transformations were applied to the variables, to achieve a normal distribution. The differences between the rhizosphere and bulk components or between the RN and the MTG areas for a given variable were assessed using the non-parametric Wilcoxon signed-ranks test and the non-parametric Mann-Whitney test, respectively. Due to small sample numbers, variables were considered significant at a level of  $\alpha \leq 0.10$ . These statistical tests were performed with the SPSS 16.0 software for Windows® (SPSS, Chicago, IL, USA).

To interpret as accurately as possible the relationships between microbial, chemical and water-soluble Zn variables, the influence of the spatial component describing the environmental differences between the sampling areas and the sampling sites was determined. The spatial component of our sampling design was considered in the statistical analyses by creating a binary variable representing the two sampling areas and a variable representing the various sampling sites.

The role of microorganisms on Zn speciation was first assessed by performing a partition of the variance of measured Zn variables ( $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$ ) for both soil components to discriminate the respective contribution of microbial, chemical and spatial variables. The partition of the variance was calculated using the function *varpart* available in the *vegan* library of the R language free software (R Foundation, 2003). Based on results of the partition of the variance, targeted redundancy analyses (RDA) were performed exclusively on rhizosphere samples, to evaluate the influence of chemical and microbial variables on Zn speciation. The CANOCO 4.5 software for Windows® (ter Braak and Smilauer, 1998) was used to run the RDA. The  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$  concentrations were the Zn variables introduced as response variables whereas the microbial, chemical and spatial variables were used as explanatory variables.

To perform the statistical analyses (partition of the variance and RDA), a complete database was needed. However, gaps existed in the rhizosphere database, notably for microbial variables and, to a lesser extent, for some chemical variables (Tables 7.1 to 7.3). In this context, a series of actions were undertaken. First, we considered filling the gaps in the database. For variables and sampling sites where we had data for two out of the three trees, e.g. TMBC at site RN 1, the mean value was used for the third tree. This procedure takes into account the intra-site variability, has no effect on the measured inter-sites variability and is widely used in ecology (Legendre and Legendre, 1998). Secondly, the rhizospheric samples of site MTG 2 were suppressed from the statistical analyses because the TMBC and TMBN measurements were strongly affected by the low water content of the rhizosphere at this site and, because no correction could be applied due to mass shortage (Table 7.1). Furthermore, site RN 3 as well as dehydrogenase variable were also suppressed from the statistical analyses because several data were missing. Finally, for  $Zn_{DPASV}$ ,  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$ , values representing the detection limit of the method were used to fill the gaps for sites MTG 1 to 3. This procedure allowed us to integrate  $Zn_{DPASV}$ ,  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$  in the statistical analyses without compromising the interpretation, because the general trend and the inter-sites variability were maintained. Consequently, the partition of the variance and the RDA analyses were performed on sites RN 1 and 2 as well as sites MTG 1 and 3 using TMBC, TMBN, AMBC, urease and all the chemical variables presented in Tables 7.2 and 7.3.

## 7.3 Results

### 7.3.1 Microbial and chemical variables

Microbial biomass ranged from 213 to 1630  $\mu\text{g C g}^{-1}$  for TMBC and between 25.7 and 245  $\mu\text{g N g}^{-1}$  for TMBN, whereas AMBC varied from 218 to 1340  $\mu\text{g C g}^{-1}$  (Table 7.1). The dehydrogenase activity covers less than two orders of magnitude whereas the urease level ranged from 20.7 to 147  $\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1}$ . In general, microbial variables were higher in the soils of the MTG area, in particular at site MTG 3. Moreover, the values of microbial variables were, for almost all the trees sampled, systematically higher in the

rhizosphere than in the bulk soils (Table 7.1). The chemical variables generally showed a sharp contrast between sampling areas as observed for the water-soluble pH that varied from 4.96 to 7.19, with acidic pH observed at the RN sites and at site MTG 3 while near-neutral pH was observed at sites MTG 1 and 2 (Table 7.2). Also, the SPOC and the WSOC values varied between 10.7 and 55.9 g C kg<sup>-1</sup> and 21.9 and 129 mg C L<sup>-1</sup>, respectively. Differences between soil components were also observed for chemical variables as shown by the general enrichment of the rhizosphere in SPOC, WSOC, K<sup>+</sup>, Ca<sub>WS</sub>, Mg<sub>WS</sub> and Cl<sup>-</sup>. The rhizosphere was however depleted in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and no clear trends existed for H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Tables 7.2 and 7.3). For a more complete description of these results and an exhaustive discussion of these data, the reader is referred to Cloutier-Hurteau *et al.* (2008).

### 7.3.2 Zn speciation

Measured Zn<sub>TR</sub>, Zn<sub>WS</sub> and Zn<sub>NDPASV</sub> together with the calculated Zn<sup>2+</sup>, Zn-inorg and Zn-org concentrations are presented in Table 7.4. Except for Zn<sub>TR</sub>, the concentrations of Zn variables were up to two orders of magnitude higher at RN compared to the MTG area and were closely linked to solution pH. Indeed, a general increase of the fraction of Zn<sub>WS</sub> present as Zn<sub>NDPASV</sub> was observed when pH decreased (Figure 7.1). This relation was quite strong (adjusted r<sup>2</sup> = 0.54), when four of the bulk soils of sites RN 2, RN 3 and MTG 3 were not considered. Moreover, calculations with MINEQL+ revealed a Zn speciation, in both soil components, dominated by Zn<sup>2+</sup> and Zn-org complexes, with Zn-inorg complexes accounting for less than 1 % of Zn<sub>WS</sub> (Table 7.4 and Figure 7.2). Among acidic soils, the proportion of individual Zn species followed a pH-related trend where a decrease in pH led to an increase in Zn<sup>2+</sup> and an increasing pH favoured the formation of Zn-org complexes (Figure 7.2). The bulk soils appeared to follow more closely this trend than the rhizosphere. However, when near-neutral soils were considered, the trend changed and Zn<sup>2+</sup> largely dominated Zn speciation at higher pH in both soil components. Finally, when soil components were compared at the scale of individual sampling site, significantly higher concentrations were noted in the rhizosphere than the bulk soils of the RN sites for all Zn variables (p < 0.10), except for Zn<sub>NDPASV</sub> at site RN 2 and for Zn-org at sites RN 2 and 3. In MTG sites, the differences between soil components were not statistically significant (Table 7.4).

**Tableau 7.1.** Mean microbial properties of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Samples	TMBC <sup>a</sup> µg C g <sup>-1</sup>		TMBN <sup>a</sup> µg N g <sup>-1</sup>		AMBC <sup>a</sup> µg C g <sup>-1</sup>		Dehydrogenase µg TPF g <sup>-1</sup>		Urease µg NH <sub>4</sub> -N g <sup>-1</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>										
<b>RN 1a</b>	603	- <sup>b</sup>	136	-	513	728	31.8	41.6	49.4	-
<b>RN 1b</b>	531	989	101	194	384	700	15.4	51.2	39.4	68.7
<b>RN 1c</b>	508	958	103	183	422	717	22.8	52.4	43.9	70.5
<b>RN 2a</b>	349	930	83.4	149	308	700	15.4	44.3	23.6	55.1
<b>RN 2b</b>	507	-	125	-	382	738	20.3	62.2	37.2	-
<b>RN 2c</b>	506	1060	111	185	345	694	20.2	44.7	30.7	69.5
<b>RN 3a</b>	483	1210	124	242	402	752	19.7	65.8	47.4	85.9
<b>RN 3b</b>	412	-	99.3	-	418	636	14.5	59.5	37.3	-
<b>RN 3c</b>	473	-	107	-	340	652	18.4	85.5	37.6	-
<b>Monteregian area</b>										
<b>MTG 1a</b>	804	1170	86.5	96.0	291	630	7.30	-	34.2	85.5
<b>MTG 1b</b>	1120	1440	136	67.7	562	-	1.50	-	56.9	90.7
<b>MTG 1c</b>	189	250	25.7	32.7	218	553	7.20	-	20.7	25.4
<b>MTG 2a</b>	547	323	110	-	352	732	41.7	-	47.1	80.0
<b>MTG 2b</b>	691	213	140	105	293	-	48.6	-	31.6	60.5
<b>MTG 2c</b>	605	515	120	82.1	263	600	49.4	-	38.6	56.7
<b>MTG 3a</b>	1050	1540	172	201	496	1340	10.1	-	81.0	132
<b>MTG 3b</b>	416	1010	64.3	171	324	1180	15.4	-	31.4	95.8
<b>MTG 3c</b>	1270	1630	245	219	731	1260	18.5	-	102	147

a TMBC = total microbial biomass C; TMBN = total microbial biomass N; AMBC = active microbial biomass C.

b No data available because of mass shortage.



**Tableau 7.2.** Mean pH values and the concentrations of cations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Samples	pH <sup>a</sup>		Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		Ca <sub>ws</sub> <sup>b</sup>		Mg <sub>ws</sub> <sup>b</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>												
RN 1a	5.04	5.00	26.9	61.3	14.0	30.4	37.3	115	39.3	36.6	18.7	22.5
RN 1b	5.03	4.97	22.9	36.7	12.9	19.0	40.1	84.8	48.7	39.6	16.7	17.1
RN 1c	4.97	4.96	24.9	48.6	12.0	19.0	36.9	97.7	40.0	39.9	16.8	16.6
RN 2a	5.50	5.43	35.2	56.3	9.60	19.7	9.87	55.5	20.1	31.7	16.7	15.7
RN 2b	5.31	5.39	38.1	43.6	9.38	20.5	22.7	103	22.2	29.1	15.2	20.9
RN 2c	5.37	5.21	34.6	28.7	7.91	12.4	46.6	141	29.8	27.8	18.0	19.6
RN 3a	5.26	5.39	50.7	43.6	9.51	16.7	28.3	82.1	18.8	32.0	25.8	36.0
RN 3b	5.53	5.25	53.6	47.7	8.60	21.7	20.5	96.7	13.8	30.8	16.0	31.2
RN 3c	5.54	5.39	48.1	41.9	10.4	15.8	29.5	85.2	13.4	25.6	16.7	34.3
<b>Monteregian area</b>												
MTG 1a	6.85	7.11	78.5	64.1	4.95	< dlm <sup>c</sup>	11.0	38.2	231	392	54.7	65.2
MTG 1b	6.63	6.71	127	101	9.58	1.86	11.2	72.3	338	548	87.6	101
MTG 1c	6.90	6.98	56.9	68.4	2.10	< dlm	9.55	14.2	143	250	37.2	54.2
MTG 2a	7.10	7.19	39.1	67.0	11.2	12.5	11.2	70.4	216	307	62.2	95.1
MTG 2b	7.07	7.14	34.3	38.0	4.96	2.79	6.83	10.2	236	292	51.7	59.5
MTG 2c	6.91	6.86	41.1	62.6	8.87	6.40	10.0	34.3	192	249	44.4	65.0
MTG 3a	5.37	5.39	132	135	9.22	2.36	20.7	68.9	67.8	77.6	48.4	50.0
MTG 3b	5.85	5.63	88.1	95.0	1.09	2.30	9.29	35.1	61.7	95.0	44.9	50.2
MTG 3c	5.39	5.28	86.1	103	0.84	6.59	24.1	61.1	58.2	83.5	37.9	49.2

a pH measured in a 1:10 soil:water extract.

b Ca<sub>ws</sub> = total water-soluble Ca; Mg<sub>ws</sub> = total water-soluble Mg.

c Below the detection limit of the method (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.50 µmol L<sup>-1</sup>).

**Tableau 7.3.** Mean solid-phase and water-soluble organic carbon and the concentrations of anions<sup>a</sup> in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Samples	SPOC <sup>b</sup> g kg <sup>-1</sup>		WSOC <sup>b</sup> mg L <sup>-1</sup>		Cl <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> μmol L <sup>-1</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>										
<b>RN 1a</b>	17.3	- <sup>c</sup>	31.1	95.3	8.84	24.1	8.45	4.33	55.7	59.3
<b>RN 1b</b>	18.0	24.2	27.3	71.4	9.03	28.5	7.13	2.49	83.7	69.6
<b>RN 1c</b>	16.3	22.7	22.1	67.5	12.7	33.4	8.34	3.29	74.7	84.4
<b>RN 2a</b>	13.2	-	21.9	76.8	3.96	16.0	23.4	25.4	21.6	26.2
<b>RN 2b</b>	15.3	25.0	60.3	78.6	9.99	22.3	16.8	6.21	17.5	38.4
<b>RN 2c</b>	17.0	24.0	64.6	71.8	5.89	30.3	62.2	5.58	13.3	43.0
<b>RN 3a</b>	11.9	-	67.5	86.1	6.25	13.8	4.52	4.50	8.85	23.9
<b>RN 3b</b>	11.3	-	62.1	83.5	11.0	16.5	2.06	5.33	9.27	33.1
<b>RN 3c</b>	11.0	24.0	62.6	76.8	7.97	11.4	5.46	3.55	7.86	24.3
<b>Monteregian area</b>										
<b>MTG 1a</b>	29.9	55.9	61.4	84.3	21.2	54.2	35.8	< dlm <sup>d</sup>	71.7	70.0
<b>MTG 1b</b>	-	-	78.4	129	56.8	63.7	55.3	< dlm	175	120
<b>MTG 1c</b>	10.7	19.8	40.4	57.3	18.5	83.7	7.30	< dlm	30.6	33.9
<b>MTG 2a</b>	28.9	44.3	40.4	59.4	36.4	94.0	129	49.6	60.8	68.8
<b>MTG 2b</b>	25.4	26.9	48.7	49.8	15.4	64.0	107	4.97	29.7	36.2
<b>MTG 2c</b>	25.7	-	44.8	56.2	29.3	63.6	82.4	37.5	50.4	77.9
<b>MTG 3a</b>	28.2	52.0	54.5	98.9	43.1	76.9	85.9	< dlm	73.9	53.6
<b>MTG 3b</b>	19.8	-	41.4	84.9	14.7	43.7	47.9	11.5	54.0	33.3
<b>MTG 3c</b>	31.1	44.1	57.2	91.6	21.2	84.9	82.1	80.2	61.4	50.8

a The anions F<sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> were not included because their concentrations were almost always below the detection limit of the method (F<sup>-</sup> = 5.00 μmol L<sup>-1</sup>; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = 1.00 μmol L<sup>-1</sup>).

b SPOC = Solid phase organic carbon; WSOC = water-soluble organic carbon.

c No data available because of mass shortage.

d Below the detection limit of the method (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 0.50 μmol L<sup>-1</sup>).

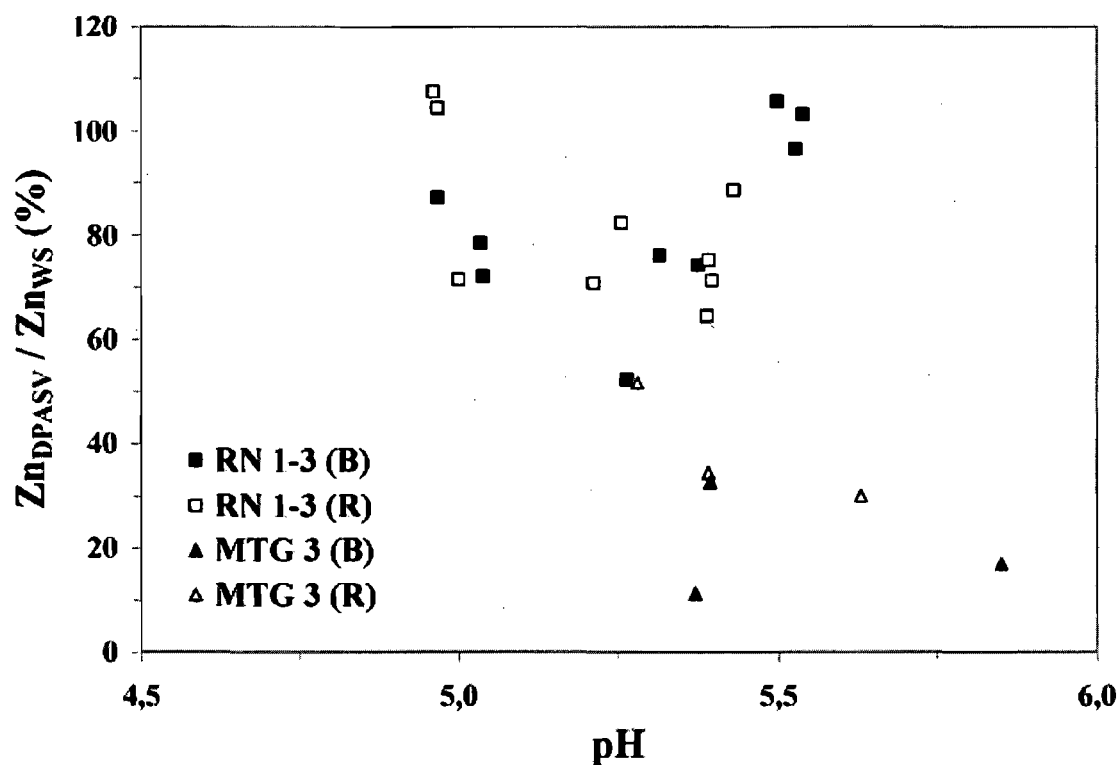
**Tableau 7.4.** Mean measured ( $Zn_{TR}$ ,  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$ ) and modeled ( $Zn^{2+}$ ,  $Zn\text{-inorg}$  and  $Zn\text{-org}$ ) Zn variables in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Samples	$Zn_{TR}^a$ mg kg <sup>-1</sup>		$Zn_{WS}^a$		$Zn_{DPASV}^a$		$Zn^{2+a,b}$ nmol L <sup>-1</sup>		$Zn\text{-inorg}^{a,b}$		$Zn\text{-org}^{a,b}$	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>												
<b>RN 1a</b>	81.2	99.5	787	1080	567	772	482	657	4.42	5.71	301	417
<b>RN 1b</b>	87.9	87.3	630	1255	495	1310	377	751	5.38	8.68	248	495
<b>RN 1c</b>	90.7	94.2	675	1205	588	1294	455	733	5.78	10.3	214	462
<b>RN 2a</b>	102	118	105	392	111	347	65.1	213	0.29	1.02	40.0	178
<b>RN 2b</b>	101	107	247	412	188	310	93.0	235	0.32	1.44	154	176
<b>RN 2c</b>	116	115	577	877	428	620	214	541	0.59	3.89	362	332
<b>RN 3a</b>	105	109	125	163	65.2	105	47.7	88.2	0.08	0.36	76.9	74.0
<b>RN 3b</b>	99.6	107	71.6	143	69.1	118	24.8	78.9	0.05	0.44	46.7	63.8
<b>RN 3c</b>	102	106	58.4	156	60.3	111	20.5	89.2	0.04	0.38	37.9	66.8
<b>Monteregian area</b>												
<b>MTG 1a</b>	132	130	218	15.3	< dlm <sup>c</sup>	< dlm	145	12.9	2.64	0.28	70.5	2.07
<b>MTG 1b</b>	118	125	106	168	< dlm	< dlm	67.9	136	2.02	2.75	36.1	29.7
<b>MTG 1c</b>	112	116	35.9	24.5	< dlm	< dlm	25.5	21.5	0.50	0.30	9.85	2.74
<b>MTG 2a</b>	109	226	59.6	110	< dlm	< dlm	42.9	95.9	0.88	2.32	15.8	11.7
<b>MTG 2b</b>	80.7	88.6	59.1	27.5	< dlm	< dlm	43.5	24.5	0.68	0.44	14.9	2.57
<b>MTG 2c</b>	78.3	108	33.6	142	< dlm	< dlm	23.9	124	0.38	2.30	9.34	15.4
<b>MTG 3a</b>	114	134	50.5	115	5.69	39.5	21.0	58.2	0.27	0.51	29.2	56.3
<b>MTG 3b</b>	109	123	76.0	91.8	12.9	27.6	35.5	48.9	0.37	0.29	40.1	42.6
<b>MTG 3c</b>	112	121	96.9	71.9	31.5	37.1	39.0	37.7	0.43	0.32	57.5	33.9

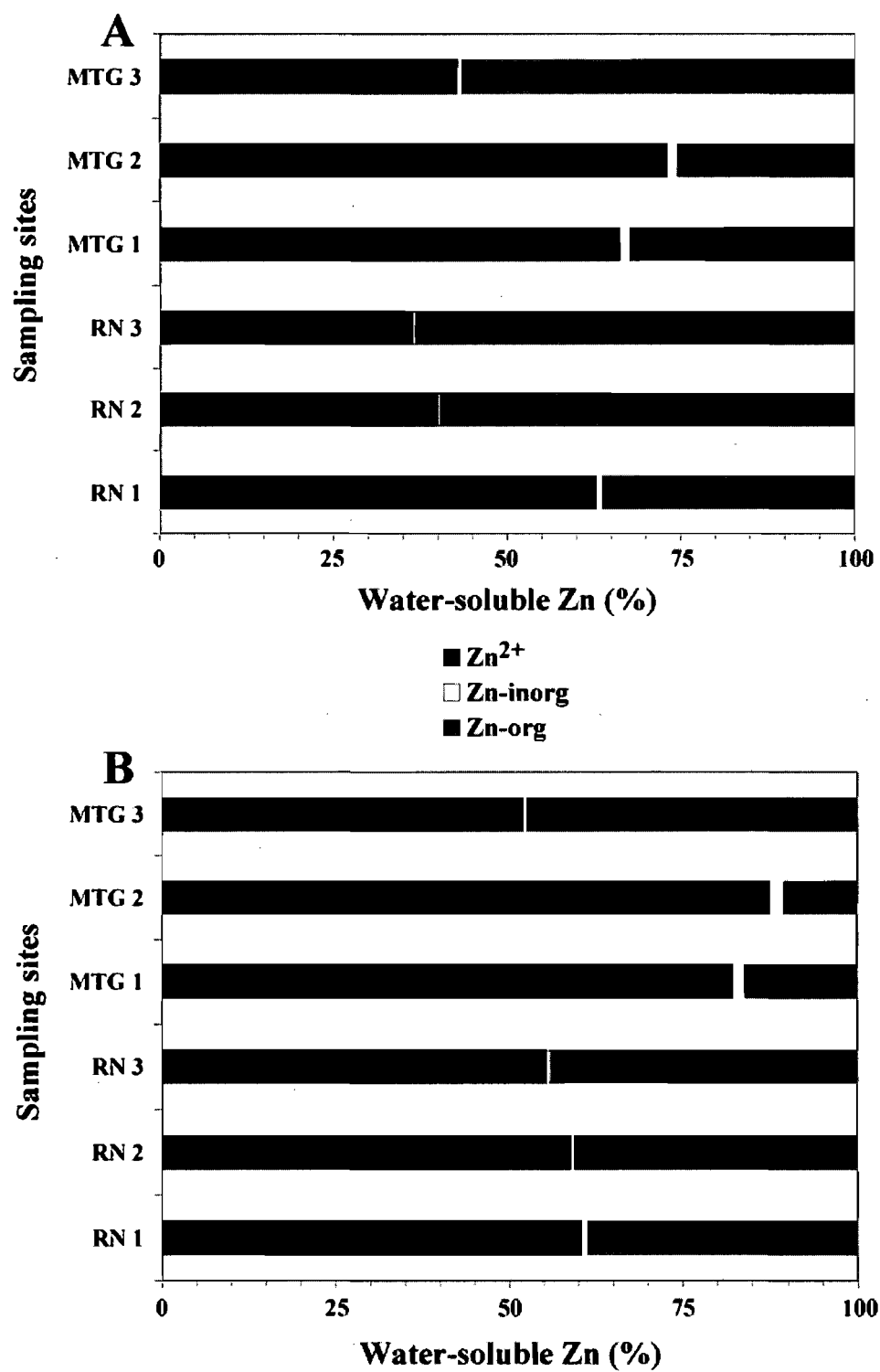
a  $Zn_{TR}$  = total-recoverable Zn;  $Zn_{WS}$  = total water-soluble Zn;  $Zn_{DPASV}$  = electrochemically labile fraction of Zn species measured by DPASV;  $Zn^{2+}$  = free-ion Zn;  $Zn\text{-inorg}$  = sum of inorganic Zn complexes ( $Zn\text{-OH}$ ,  $Zn\text{-Cl}$ ,  $Zn\text{-NO}_3$  and  $Zn\text{-SO}_4$ );  $Zn\text{-org}$  = sum of organic Zn complexes ( $Zn\text{-acetate}$ ,  $Zn\text{-fulvate}$  and  $Zn\text{-humate}$ ).

b Zn species modelled using MINEQL+ 4.5. For details on the modeling, readers are referred to section 7.2.5 of this paper and to chapter five.

c Below the detection limit of the method ( $Zn_{DPASV} = 1.00 \text{ nmol L}^{-1}$ ).



**Figure 7.1.** Fraction of total water-soluble Zn ( $Zn_{WS}$ ) present as electrochemically-labile Zn ( $Zn_{DPASV}$ ) plotted as a function of solution pH. The  $Zn_{DPASV}$  was measured using differential pulse anodic stripping voltammetry. Objects are discriminated according to sampling areas and soil components (B = bulk soil and R = rhizosphere soil). See the materials and methods section for sites codes.



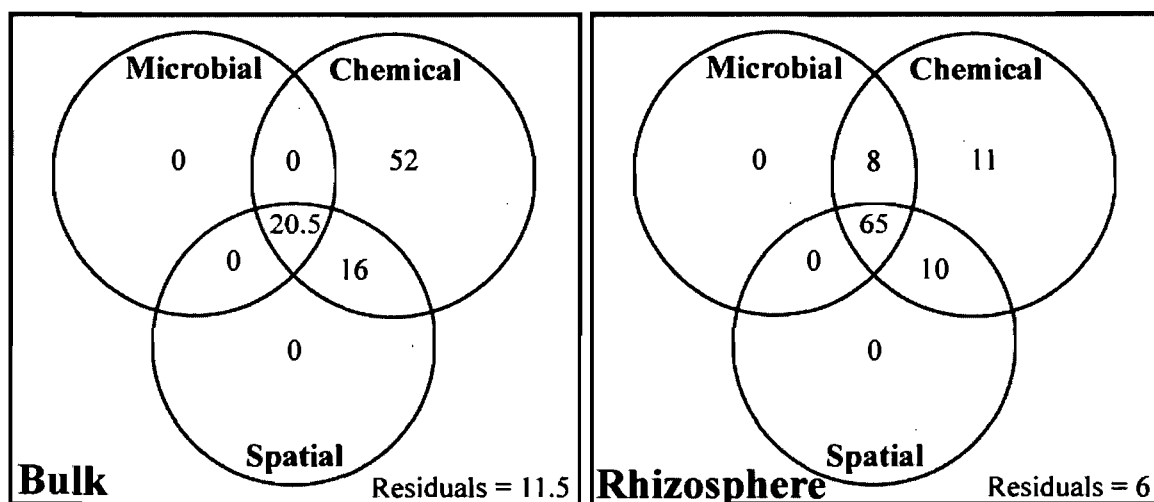
**Figure 7.2.** Mean cumulative fractions of total water-soluble Zn in the bulk (A) and rhizosphere (B) at each sampling sites. Refer to Table 7.4 for codes of Zn species.

### 7.3.3 Influence of chemical and microbial variables on $Zn_{WS}$ and $Zn_{DPASV}$

The partition of the variance of measured Zn variables ( $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$ ) between the microbial, chemical and spatial variables is presented for both soil components in Figure 7.3. For bulk samples, microbial, chemical and spatial variables explained 20.5, 88.5 and 36.5 % of the adjusted variance of Zn variables, respectively, with 11.5 % of the variance being unexplained. It follows that in the bulk soils, the explained variance of Zn species was entirely associated to the action of chemical variables, either individually (52 %) or in combination with spatial variables (16%) or with microbial and spatial variables (20.5 %). For rhizosphere samples, microbial, chemical and spatial variables respectively explained 73, 94 and 75 % of the adjusted variance of Zn variables (Figure 7.3) while the unexplained variance amounted 6 %. A significant fraction (11 %) of the variation in Zn variables was attributed to the individual action of chemical variables ( $p < 0.05$ ) whereas the individual action of microbial or spatial variables was nil. Contrary to the bulk soil, variations in Zn species in the rhizosphere were best explained when the three groups of variables were considered simultaneously, with a total explanation level of 65 % (Figure 7.3). However, the influence of microbial variables on Zn was not entirely controlled by spatial differences and a significant fraction of Zn variation (8 %;  $p < 0.05$ ) was associated exclusively to the combined action of microbial and chemical variables.

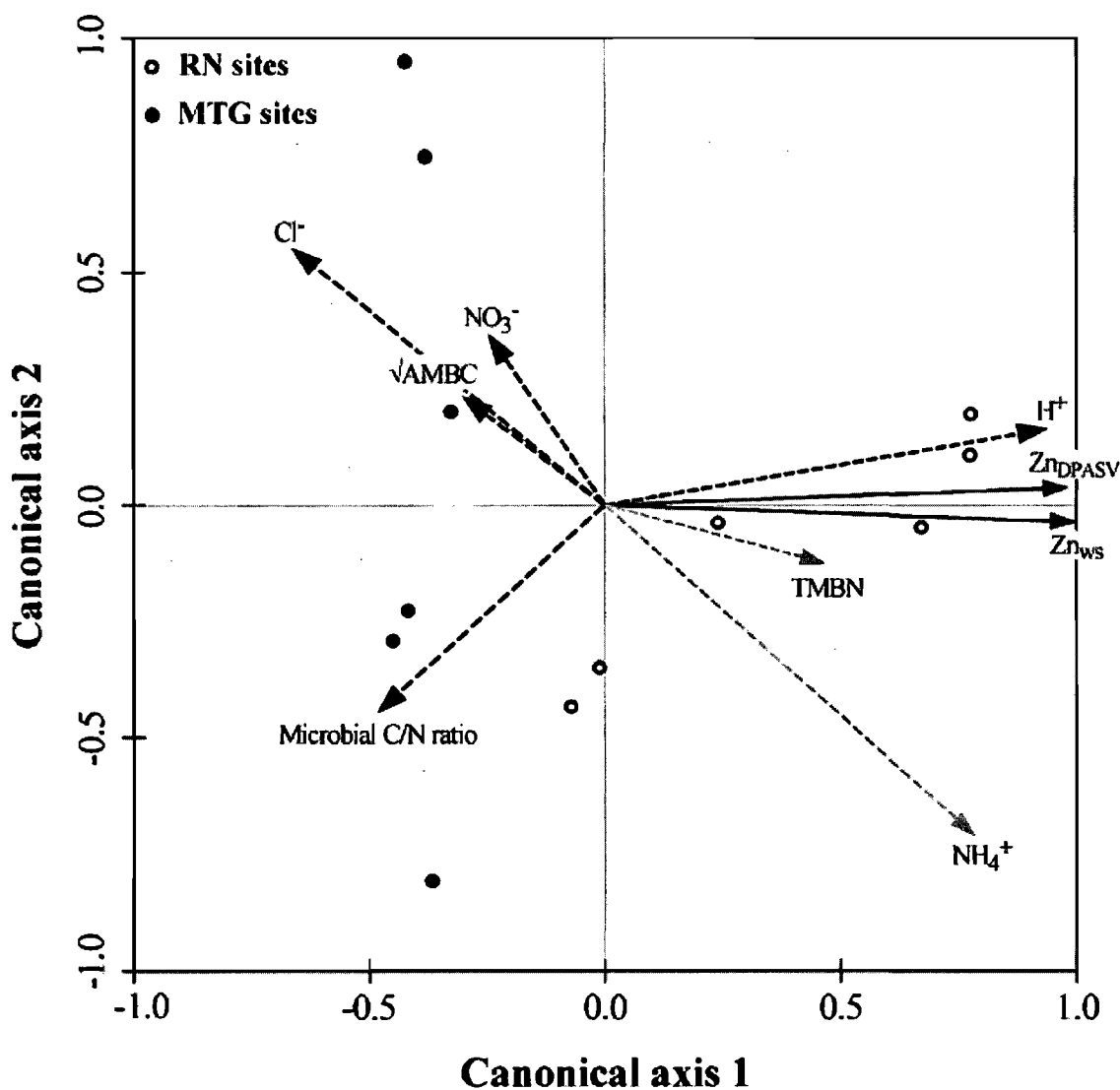
To increase our understanding of rhizosphere processes and their influence on Zn speciation, we first performed a RDA on rhizosphere soils that describe the influence of microbial and chemical variables modulated by spatial differences between sampling areas (Figure 7.4). The results showed that the variance of  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$  was controlled by up to 94 % ( $p < 0.01$ ) by these groups of variables. The biplot further indicated that the two Zn variables were positively linked together and that a clear separation of objects occurred between sampling areas (Figure 7.4). The variables AMBC,  $Cl^-$  and  $NO_3^-$  were positively correlated together and were inversely related to both Zn variables. The same negative relation with Zn was also observed for the microbial C/N ratio. On the other hand,  $H^+$  concentration as well as the collinear

variables TMBN and  $\text{NH}_4^+$  concentration showed a positive links with the response variables.



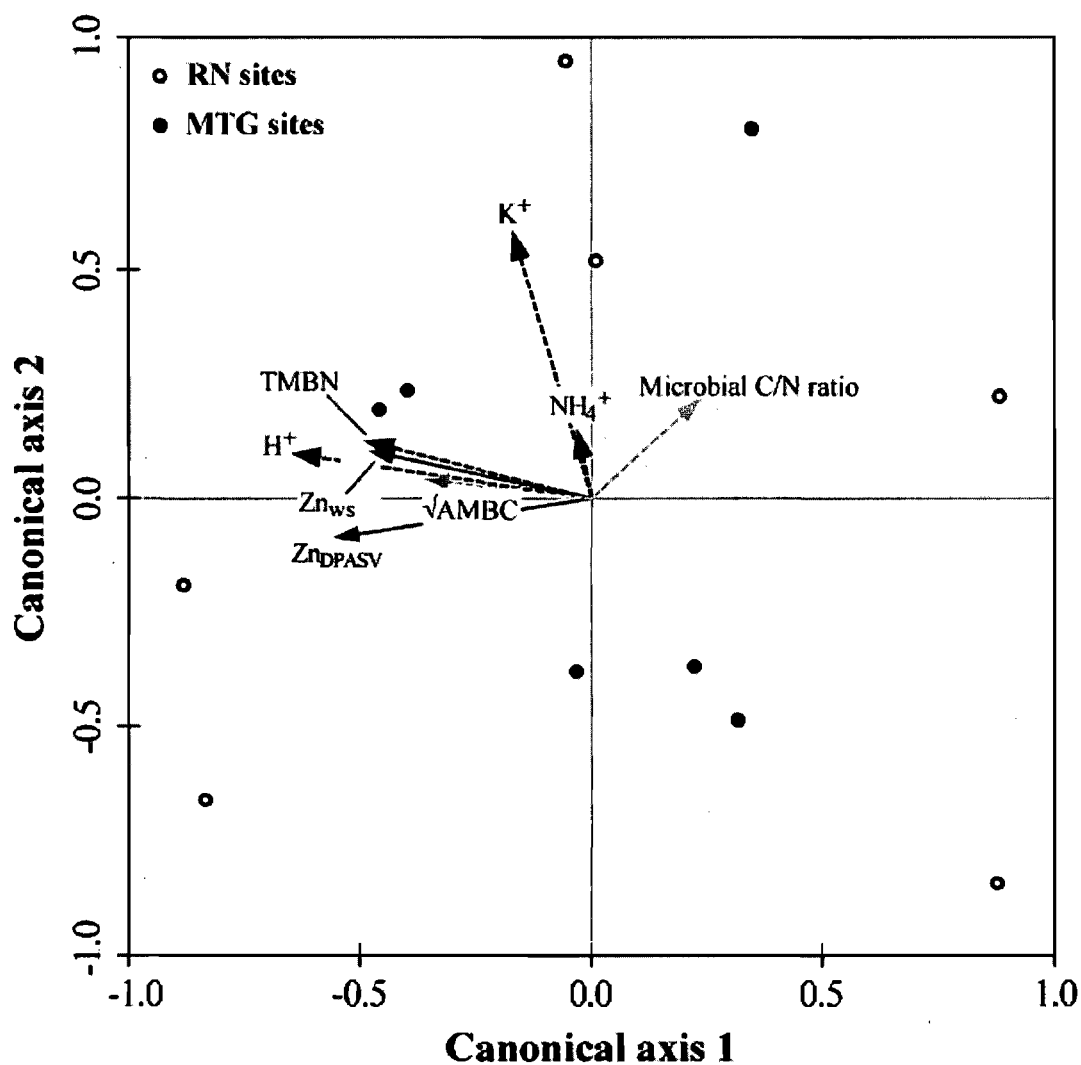
**Figure 7.3.** Venn diagram of the partition of the variation of  $\text{Zn}_{\text{WS}}$  and  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$  for the two soil components. The rectangles represent the total variance of Zn variables while each circle is associated to a given group of explaining variables. The adjusted  $r^2$  (expressed in %) of the variance of Zn variables for each surface of the Venn diagram are presented and were obtained from equations described in Legendre and Legendre (1998). Zones defined by the intersection between circles represent a fraction of the variance of Zn that is jointly explained by different groups of variables whereas residuals refer to the unexplained variance of Zn variables.

For the second RDA, the spatial effect was removed in order to focus on the combined influence of microbial and chemical variables on Zn (Figure 7.5). According to this RDA, the microbial and chemical variables explained 19 % ( $p < 0.01$ ) of the adjusted variance of  $\text{Zn}_{\text{WS}}$  and  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$ . The biplot also indicated that the two Zn variables were positively linked together. However, no clear distribution of objects between sampling areas was established (Figure 7.5). According to the biplot,  $\text{H}^+$  concentration, TMBN as well as the collinear variable AMBC was positively correlated together and to Zn variables. The  $\text{K}^+$  and  $\text{NH}_4^+$  concentrations were positively linked only to  $\text{Zn}_{\text{WS}}$ , whereas the collinear microbial C/N ratio was inversely associated to both Zn variables.



**Figure 7.4.** Redundancy analysis ordination biplot of rhizospheric samples representing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Zn variables. Full black arrows refer to response variables, black dotted arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Zn and grey dotted arrows represent collinear explanatory variables not compiled in the RDA analysis. The combination of all canonical axes explained 94 % of the adjusted variance of Zn variables and was statistically significant ( $p < 0.01$ ). See Tables 7.1 to 7.4 for variables codes.





**Figure 7.5.** Redundancy analysis ordination biplots of rhizospheric samples representing the links between microbial, chemical and the distribution of Zn variables while controlling for the influence of spatial variables. Full black arrows refer to response variables, dotted black arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Zn and grey dotted arrows represent collinear microbial explanatory variables and chemical variable not compiled in the RDA analyses. The combination of all canonical axes explained 19 % of the adjusted variance of Zn variables and was statistically significant ( $p < 0.05$ ). See Tables 7.1, 7.2 and 7.4 for variables codes.

## 7.4 Discussion

### 7.4.1 Zn speciation in the rhizosphere of forest soils

Except for  $Zn_{TR}$ , all the Zn variables showed a sharp contrast between sampling areas, with higher concentrations measured in the RN than the MTG soils (Table 7.4). The pH differences between areas explained these contrasts especially for  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$  (Figure 7.4), where lowering the pH increased their concentrations (Stephan *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007; Meers *et al.*, 2006). These two Zn variables were highly sensitive to pH as illustrated by a five-fold increase of  $Zn_{DPASV}$  for a pH variation of less than one unit (Figure 7.1). The sensitivity of Zn to pH was reported before together with its key role on the biogeochemical cycle of Zn in forest ecosystems (Stephan *et al.*, 2008; Nolan *et al.*, 2003b; Krishnamurti and Naidu, 2002; Sauvé *et al.*, 2000a).

In accordance with previous findings, the Zn speciation modeled by MINEQL+ showed that the  $Zn^{2+}$  form dominated the Zn speciation (Mertens *et al.*, 2007; Nolan *et al.*, 2003b; Lorenz *et al.*, 1997). However, the results also showed that the highest  $Zn^{2+}$  proportions were recorded in either the most or the less acidic sites (Figure 7.2). This trend was not in-line with previous studies for less acidic sites where a decreasing proportion of  $Zn^{2+}$  and an increasing proportion of Zn-org were observed as pH increased (Stephan *et al.*, 2008; Meers *et al.*, 2006; Krishnamurti and Naidu, 2002). This discrepancy suggested that the modeling of Zn speciation with MINEQL+ worked well in acidic soils but not so much in near-neutral sites MTG 1 and 2. No definite explanation could be submitted from our study but two hypotheses emerged. First, for the rhizosphere soils of sites MTG 1 and 2, their lower proportions of Zn-org complexes seemed to be associated to their generally lower WSOC concentrations compared to the other rhizosphere soils (Table 7.3). Second, the discrepancy could be associated to modeling since the choice of the speciation model as well as the parameters used, e.g. conditional association constants and organic ligands, were reported to strongly influence the results of Zn speciation (Meers *et al.*, 2006). However, the choices of the speciation software and of the parameters were done according to the most recent knowledge and were validated for copper (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2007) as well as for  $Zn_{DPASV}$  (Supplementary data 1). In the case of  $Zn_{DPASV}$ , the Zn speciation data obtained

with MINEQL+ revealed that the best fit was obtained with the sum of  $Zn^{2+}$  plus Zn-inorg complexes (Supplementary data 1), in agreement with the electrochemical theory for the DPASV technique (Stephan *et al.*, 2008; Mota et Correia Dos Santos, 1995; Florence, 1986). In the near-neutral MTG 1 and 2 sites, the correspondence of  $Zn_{DPASV}$  with the sum of  $Zn^{2+}$  and Zn-inorg complexes was, however, weak because  $Zn_{DPASV}$  values were under the detection limit and  $Zn^{2+}$  concentrations were higher than the detection limit of DPASV (Table 7.4). Reaching the detection limit of the DPASV technique at sites MTG 1 and 2 might suggest that the modelling underestimated Zn-org complexation and overestimated  $Zn^{2+}$  concentrations in the near-neutral soils of this study.

The general increase of  $Zn_{WS}$  concentration in the rhizosphere agreed with previous studies (Legrand *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004) and suggested that Zn uptake by roots was lower than Zn transport to the root surface. Inversely, the depletion of  $Zn_{WS}$  was also reported in MTG soils and in the literature (Zhao *et al.*, 2007; Lorenz *et al.*, 1997), indicating that root Zn uptake was higher than Zn transport through the rhizosphere for these trees. In contrast to  $Zn_{WS}$ ,  $Zn_{DPASV}$  was systematically enriched in the rhizosphere. This trend was already reported by Courchesne *et al.* (2006) and was attributed to an increase in  $Zn^{2+}$  coupled with a decrease in Zn-org complexes in the rhizosphere compared to bulk soils (Figure 7.2). This observation is supported by Lorenz *et al.* (1997) and highlighted the low affinity of Zn for organic ligands (Kabata-Pendias, 2001), in particular for the monoprotic low molecular mass organic acids, such as acetic acids, that abound in the rhizosphere of forest soils (Strobel, 2001). Contrary to the rhizosphere, the WSOC composition in the bulk forest soils is mainly composed of complex organic compounds (Strobel, 2001), such as fulvic and humic acids, that have a stronger Zn complexing capacity than monoprotic ligands (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2007). The differences in WSOC composition between soil components thus help explain the higher concentration of Zn-org complexes in the bulk component compared to the rhizosphere and the  $Zn_{DPASV}$  enrichment in the rhizosphere.

#### 7.4.2 Influence of rhizospheric microorganisms on $Zn_{WS}$ and $Zn_{DPASV}$ in forest soils

The increased influence of microbial variables on the explanation of the variance of Zn in the rhizosphere compared to bulk soils stood as a striking observation. Similar results were obtained for copper with the same dataset (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008) and were attributed to the microbial enrichment of the rhizosphere compared to bulk soil (Table 7.1). To our knowledge, these are the first results to quantify the association existing between microbial variables describing the whole microbial community and Zn speciation in water extracts of the rhizosphere. Different working hypotheses are submitted below to explain the existence of a microbial influence on Zn speciation in the rhizosphere, as identified by the RDA analyses. A full test of these hypotheses should however involve further experiments conducted under controlled conditions.

The RDA analyses identified pH as the primary variable explaining the rhizospheric variations of  $Zn_{WS}$  and  $Zn_{DPASV}$  concentrations between the sampling sites (Figures 7.4 and 7.5). Furthermore, the influence of pH on Zn variables in the rhizosphere appeared to be partly regulated by the microbial uptake of nitrogen, as revealed by the correlations between  $H^+$  or Zn variables and TMBN (Figures 7.4 and 7.5). The nature of the nitrogen form taken up by microorganisms and by roots is recognized as one of the main processes controlling rhizospheric pH (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Hinsinger *et al.*, 2003) and the mobilization of Zn (Fomina *et al.*, 2005, 2004). As such,  $NH_4^+$  uptake favours the acidification of the rhizosphere whereas absorption of  $NO_3^-$  consumes acidity. In our study, and based on the lower TMBN values in the rhizosphere of MTG area, the microbial assimilation of nitrogen in the rhizosphere was shown to be higher in the RN than the MTG soils (Table 7.1). This trend and the orientation of the AMBC and microbial C/N ratio vectors indicated that the microbial communities in the MTG area suffered from nitrogen limitation (Figure 7.4). Our study thus suggested that the higher microbial assimilation of nitrogen in the RN soils induced a larger microbial effect on pH and on Zn variables than in the MTG area.

The RDA analyses also pointed to a link between microbial C/N ratio and Zn variables (Figures 7.4 and 7.5). The microbial C/N ratio is generally considered to provide information on organic matter decomposition because the sources of carbon and nitrogen

to microorganisms in forest ecosystem are linked to the organic pool. Therefore, the inverse links between microbial C/N ratio and Zn variables (Figures 7.4 and 7.5) as well as the positive relationships between AMBC and Zn variables (Figure 7.5) suggested that the active microorganisms could promote the mobilization of Zn in the rhizosphere through decomposition. According to recent findings, we propose that the microbial mineralization of organo-metal complexes from dead roots supplied Zn to the rhizosphere solution and influenced its speciation (Johnson and Hale, 2008). Indeed, dead roots constitute one of the main sources of organic materials to the rhizosphere due to their abundance, their fast turnover rate and because living roots often reoccupy old-root channels (Gobran *et al.*, 1999; Schottelndreier and Falkengren-Grerup, 1999). In addition, large amounts of Zn were sequestered in tree roots (Table 7.5) and recent work showed that Zn inputs to the soil from fine roots decay reached 0.13 to 0.44 kg ha<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup> in moderately to highly metal-contaminated forest soils of Canada (Johnson *et al.*, 2003).

**Tableau 7.5.** Mean total Zn concentration in the root tissues of each tree sampled.

Site	Zn <sup>a</sup>	
	----- µg g <sup>-1</sup> dwt -----	
	Rouyn-Noranda area	Monteregian area
<b>1a</b>	360	48.4
<b>1b</b>	253	59.6
<b>1c</b>	244	62.9
<b>2a</b>	199	60.4
<b>2b</b>	180	41.2
<b>2c</b>	350	54.8
<b>3a</b>	64.6	90.3
<b>3b</b>	96.5	89.8
<b>3c</b>	127	71.8

<sup>a</sup> According to the Mann-Whitney test, significant differences in the Cu concentration of root tissues occurred between sampling areas ( $p < 0.01$ ).

When the spatial component was integrated in the RDA, clear contrasts between sampling areas were observed for AMBC and the Zn variables (Figure 7.4). These spatial contrasts were particularly sharp for AMBC and might suggest Zn toxicity or microbial assimilation as possible explanations for the negative links between AMBC

and Zn variables. These explanations were however rejected because positive relationships existed between AMBC and Zn variables, when the RDA analyses were controlled for spatial effects (Figure 7.5). The results rather suggested that microbial mineralization in the RN soils supplied more Zn to the rhizospheric solution than in the MTG area, despite higher microbial biomass and mineralization values in the latter sites (Table 7.1). Root tissue analyses seemed to confirm this assumption, since Zn concentrations in the roots of RN trees were significantly higher than in the MTG area ( $p < 0.01$ ; Table 7.5). The Zn enrichment of root tissues in RN compared to MTG soils was attributed to a higher bioavailability of Zn ( $Zn_{NWS}$  and  $Zn_{DPASV}$ ) in the rhizosphere of this area and suggested that each unit root decomposed at RN supplied a higher amount of Zn to the soil solution than at MTG. This trend was also observed for copper at the same sites (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008) and was reported earlier in the literature (Johnson and Hale, 2008; Johnson *et al.*, 2003). Further investigations are however needed to confirm the role of this process as a significant source of Zn to the rhizosphere solution in forest soils.

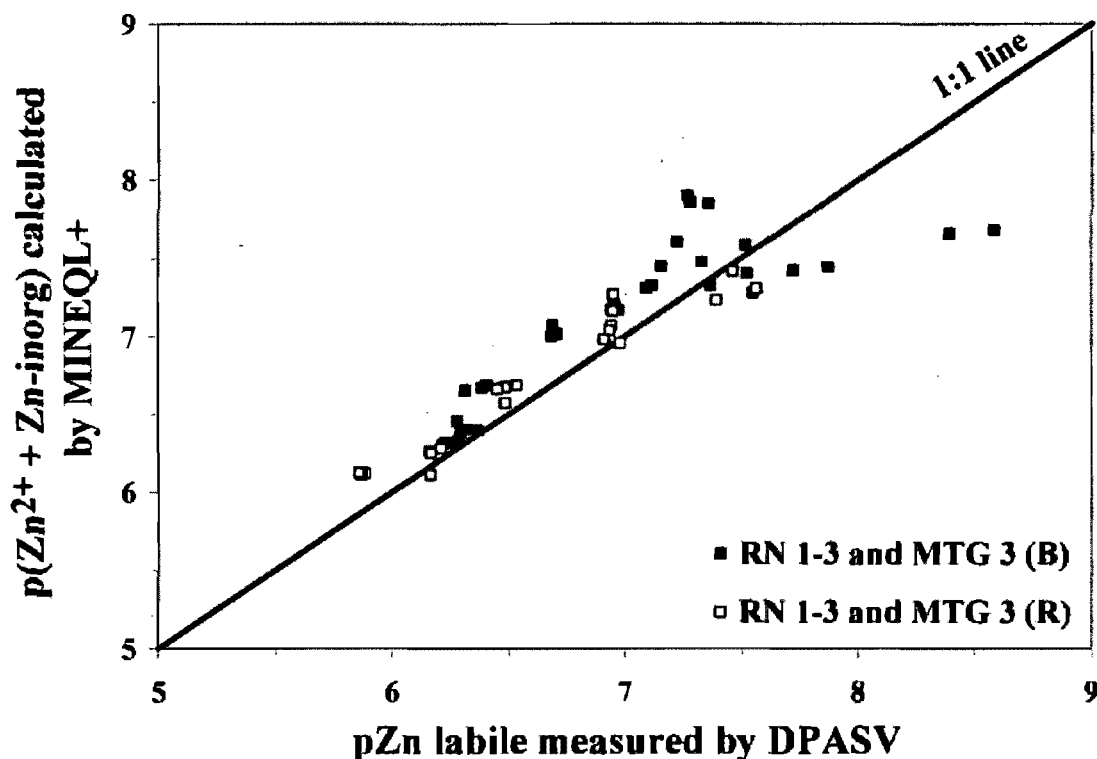
## 7.5 Conclusions

The characterization of Zn speciation in our rhizospheric forest soils showed a general enrichment of  $Zn_{NWS}$  and  $Zn_{DPASV}$  concentrations in the rhizosphere compared to the adjacent bulk soil. The results also revealed that Zn speciation was dominated by  $Zn^{2+}$  and Zn-org complexes, with generally higher proportions of  $Zn^{2+}$  in the most acidic and near-neutral samples as well as in rhizosphere soils. Moreover, multivariate statistical analyses allowed the quantification of microbial effect on Zn as well as the identification of statistical links among variables. The results indicated that the microorganisms exerted a stronger influence on Zn speciation in the rhizosphere of trembling aspens than in the bulk soils. Statistical analyses conducted on rhizosphere further indicated that the influence of microbial activity on Zn is a consequence of their impact on solution pH following the assimilation of nitrogen and of the microbial mineralization of roots that supply Zn to the rhizospheric solution. These informations contributed to improve our understanding on the Zn biogeochemistry in the rhizosphere of forest soils. However, key questions remain regarding the precise identification of the microbial communities

and biogeochemical processes involved. The role of microbes on the mechanism of Zn uptake by root should also be clarified.

## 7.6 Supplementary data

### 7.6.1 Supplementary data 1



**Figure 7.6.** Comparison of the electrochemically-labile concentration of Zn ( $Zn_{DPASV}$ ) measured by differential pulse anodic stripping voltammetry with the sum of  $Zn^{2+}$  and of the inorganic complexes of Zn (Zn-inorg) modeled by MINEQL+ 4.5. For modeling purposes, readers are referred to section 7.2.5.

## PARAGRAPHE DE LIAISON D

Le chapitre huit<sup>4</sup> est le dernier des trois chapitres documentant la spéciation des métaux et l'influence de l'activité microbienne sur la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers. Ce chapitre se concentre sur l'Al et permet d'améliorer les connaissances de la biogéochimie de ce métal dans la rhizosphère. L'intérêt porté à l'Al dans ce chapitre est lié au caractère ubiquiste de cet élément qui fait en sorte qu'il est présent en concentration trace dans la solution de sol, alors qu'ils abondent dans la phase solide du sol (Tableau 4.1). Malgré cette faible abondance dans la phase liquide des sols, les formes biodisponibles d'Al peuvent induire des réponses toxiques chez les plantes et les microorganismes (Joner *et al.*, 2005; Ma, 2005). La spéciation de l'Al dans la rhizosphère ainsi que les mécanismes régulant les formes biodisponibles de ce métal sont peu connus alors que ce microenvironnement est la principale voie d'entrée d'Al dans les plantes. La compréhension de la biogéochimie de l'Al dans la rhizosphère est donc essentielle afin de pouvoir évaluer adéquatement le potentiel toxique de ce métal par rapport aux plantes.

---

<sup>4</sup> Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F. Interactions between aluminum speciation and microbial activity in the rhizosphere of forest soils, *European Journal of Soil Science*, soumis le 8 septembre 2008.



## **CHAPITRE 8. Interactions between aluminum speciation and microbial activity in the rhizosphere of forest soils**

---

### **8.1 Introduction**

Among metals, aluminum (Al) is the third most common constituents of soil minerals and is thus of special interest because of its ubiquity in soil environments. Indeed, while it abounds in the solid phase of soil, Al remains largely insoluble and is generally present at trace concentration levels in soil solutions (Hendershot *et al.*, 1996). The biogeochemistry of Al is recognized to be mostly controlled by soil pH, which regulates the concentration and speciation of Al in the soil solution through its impact on processes such as mineral dissolution or precipitation, ion exchange reactions and metal complexation by organic compounds (McHale *et al.*, 2007; Hendershot *et al.*, 1996; Lindsay, 1979). The complexation of Al by dissolved organic compounds was also shown to mobilize or immobilize Al, to control Al speciation in solution (Vance *et al.*, 1996) and was recognized as the main factor controlling the concentration of dissolved Al in organic horizons of forest soils (McHale *et al.*, 2007; Cronan *et al.*, 1986). This process however has a smaller impact on the behaviour of Al in the mineral horizons of forest soils.

The consequences of the close links existing between the biogeochemistry of Al and pH were clearly observable in poorly buffered forest ecosystems receiving acidic precipitation. Indeed, the lowering of soil pH due to acidic deposition increased the solubility and the bioavailability of Al and eventually led to the migration of Al towards aquatic ecosystems (McHale *et al.*, 2007). Other studies showed that Al was taken up by trees and sequestered in the biomass (Martin *et al.*, 2004), despite the fact that Al has no known metabolic or biological functions. The increased uptake of Al produced Al toxicity which disrupted the health status of plants, principally by decreasing root elongation (Kidd and Proctor, 2000) or by interfering with calcium uptake by roots (Ma, 2005).

The transfer of Al from the soil to plants mostly occurs in the rhizosphere. Because of the action of roots and of their associated microorganisms, this highly dynamic microenvironment controls the abundance, distribution and bioavailability of elements around roots and their subsequent uptake by plants. The understanding of the biogeochemical behaviour of Al in the rhizosphere is thus fundamental to predict its transfer to plants and to accurately evaluate potential Al toxicity (Courchesne *et al.*, 2008). In the rhizosphere of forest soils, the accumulation of total Al in the solid and liquid phases was observed compared to the bulk component, (Séguin *et al.*, 2005, 2004; Turpault *et al.*, 2005; Dieffenbach and Matzner, 2000; Göttlein *et al.*, 1999). To the contrary, Al depletion in the liquid phase of the rhizosphere of Norway and red spruces was also reported (Dieffenbach and Matzner, 2000; Smith et Pooley, 1989). However, very few data are available on the speciation of dissolved Al in the rhizosphere, in comparison to work reporting total Al concentrations. Using capillary electrophoresis, Dieffenbach and Matzner (2000) compared free-ion Al ( $\text{Al}^{3+}$ ) in the rhizosphere of Norway spruce in the presence or absence of mycorrhiza. They first observed that  $\text{Al}^{3+}$  was depleted in the rhizosphere without mycorrhiza due to the increased complexation of Al by the organic compounds released by roots in the rhizosphere. On the other hand, an enrichment in  $\text{Al}^{3+}$  was observed in rhizosphere with mycorrhiza, a trend that was related to the acidification of the rhizosphere. This latter observation was in-line with studies from Göttlein *et al.* (1999) and Turpault *et al.* (2005). Moreover, a study that measured and modeled Al speciation in the rhizosphere of a Douglas fir stand found that Al was mostly complexed with organic ligands in organic horizons and to inorganic ligands ( $\text{F}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ ) in mineral soil horizons (Turpault *et al.*, 2005). Clearly, more data are needed to improve our understanding of the biogeochemical behaviour of Al in the rhizosphere and to better assess the risks associated to Al mobility in forested environments.

The role of root activity on the bioavailability of metals has been extensively investigated because the uptake and excretion of ions, redox reactions and the release of root exudates were all identified as key processes influencing elemental mobility in the rhizosphere (Hinsinger, 2001). Compared to the influence of root activity, the role of the microbial community of the rhizosphere on the bioavailability and speciation of Al was

neglected. This is surprising considering the higher microbial activity measured in the rhizosphere than in the bulk soils (Phillips and Fahey, 2006) and because of the demonstration, in other environments, of microbial influences on the availability and speciation of metals (Newman and Banfield, 2002). Although recent studies revealed that ectomycorrhizas could either mobilize or immobilize Al (Meharg, 2003; Landeweert *et al.*, 2001), very few information is available on the specific effects of the microbial community of the rhizosphere on Al chemistry. We submit that the largely unknown extent of the influence of microbial processes on Al should be investigated to better understand the overall role of the rhizosphere on Al biogeochemistry in forest soils.

Therefore, the objectives of this study were: 1) to determine the liquid-phase speciation of Al in the rhizosphere and bulk components of pH-contrasted forest soils, 2) to quantify the contribution of microbial and chemical variables to Al speciation in rhizosphere and bulk soils and 3) to identify the main microbial variables influencing the liquid-phase speciation of Al in the rhizosphere. The approach used to gain new insights on the role of microorganisms on Al speciation was to combine, under field conditions, the direct measurements of Al species, the geochemical modeling of Al speciation and the use of multivariate statistical tools to establish relationships among variables.

## **8.2 Materials and Methods**

### **8.2.1 Field sites**

To answer the research objectives, two sampling campaigns were performed. Soils were first sampled in August 2004 in the Rouyn-Noranda (RN) area, Canada (48° 14'N, 79° 01'W) at three sites located respectively at 0.5, 2 and 8 km downwind from the Horne's smelter (identified as RN 1 to 3, respectively). The soils sampled were developed in fine-textured post-glacial lake sediments and were classified as Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998). Soils were also sampled in August 2005 in the Monteregian (MTG) area, Canada at three sites located near a cement plant (site MTG 1; 45° 16'N, 73° 28'W), a steel-work plant (site MTG 2; 45° 51'N, 73° 13'W) and along an airport strip (site MTG 3; 45° 31'N, 73° 23'W). The soils were formed in clay deposits

of the Champlain sea and were classified as Luvisols (Soil Classification Working Group, 1998).

The soils sampled were predominantly composed of silt- and clay-size materials, except at sites RN 1 and MTG 2 where coarser textures were observed. At all sites, the clay mineralogy was dominated by quartz, chlorite, vermiculite and chlorite-vermiculite intergrades (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008). In both sampling areas, the forest canopy was dominated by white birch (*Betula papyrifera*), trembling aspen (*Populus tremuloides*) and sugar maple (*Acer saccharum*), with yellow birch (*Betula alleghaniensis*) and balsam fir (*Abies balsamea*) also present in the RN area. Climatic differences (up to 4.6 °C and 132 mm of precipitation higher in MTG area) are observed on an annual basis between the sampling areas. This contrast was in part controlled by sampling soils in August, when climatic differences between sampling areas were at minimum (less than 3.4 °C). Finally, the soils differed between areas with respect to pH and to the nature of their respective parent materials. These spatial differences induced contrasts in dissolved Al concentration and speciation between the two sampling areas.

### **8.2.2 Sampling of soil components**

At each of the six sampling sites, three young trembling aspens (*Populus tremuloides* Michx.) were carefully uprooted. The trembling aspens were selected because they abound in the two sampling areas and were the only tree species presents at all the sampling sites. The rhizosphere and bulk components were sampled in the B horizons of each soil and only the fine roots (< 2 mm in diameter) were collected. The separation of the rhizospheric and bulk components was performed in the field by gently shaking the roots. The soil material that fell down from the root was viewed as the bulk soil, whereas the material that stayed attached to the roots was considered as rhizosphere soil. More details on the soil separation procedure are found in (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008).

### **8.2.3 Microbial analyses**

Soils were first sieved at 2 mm and stored at 4 °C in the dark under field-moist conditions. Most microbial analyses were conducted during the first month following

sampling with maximum storage duration of less than three months. For bulk soil samples, analyses were triplicated whereas analyses on rhizosphere samples were duplicated due to mass shortage. The data validation for microbial analyses was ensured by using an internal soil control and certified water samples (NWRI, Burlington, Canada) as external quality controls for instrumentation. Total microbial biomass C and N, identified as TMBC and TMBN respectively, were obtained at field-moist conditions using the fumigation-extraction technique described by Voroney *et al.* (2008). However, at sites MTG 1 to 3, TMBC and TMBN values were strongly affected by the low water content of the rhizospheric soils (< 10 % w/w) at the moment of sampling. Consequently, for these sites, where enough rhizosphere soil masses were available, soil water contents were adjusted to the level of the other rhizosphere soil materials and TMBC and TMBN were re-measured after an incubation time of two hours at room temperature. Functional information about the maximal potential active microbial biomass C (AMBC) were obtained at 50 % of soil water content (w/w) using the substrate-induced respiration technique (Anderson and Domsch, 1978). Data on the mineralization process and on the nitrogen cycle were obtained by measuring the enzymatic activity of the intracellular and extracellular urease using the method of Kandeler and Gerber (1988). Finally, the enzymatic activity of the active microbial community was obtained by measuring the dehydrogenase with the TTC method (Tabatabai, 1994). For a complete description of the microbial analyses used in this paper, the reader is referred to (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008).

#### **8.2.4 Chemical analyses**

After the microbial analyses and before performing the chemical analyses, the soils were air-dried and sieved at 0.5 mm. Chemical analyses were conducted on water extracts to mimic the conditions found in the soil solution. Water extracts were obtained using a 1:10 soil-solution ratio, two hours of shaking, 15 minutes of centrifugation at 1400 g and filtration through 0.45- $\mu\text{m}$  cellulosic membranes. To insure that the Al speciation measurements were made on fresh solutions, two distinct extraction series were performed. The data produced by these two distinct extracts series were combined and interpreted together. The similarity of the two water extract series was evaluated by

comparing their respective pH values. The comparison revealed no statistical differences between the two extractions ( $p > 0.10$  with the Wilcoxon signed-ranks test) and, consequently, we considered the water extracts as similar. All the bulk soil samples were extracted in triplicates, whereas the rhizosphere samples extractions were generally duplicated when enough soil was available. The data validation was ensured using two soil controls (soil RN 0.5 A and C from Séguin *et al.* (2004)) and certified water samples (NWRI, Burlington, Canada). All glasswares and plastic materials were acid washed with 20 %  $\text{HNO}_3$ .

On the first series of water extractions and before filtration, we measured pH using a pH electrode with calomel reference (Accumet) on a Fisher Accumet pH meter (825 MP). After filtration, we measured major cations ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ ) and anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) by ion chromatography (Waters), water-soluble organic carbon (WSOC) with a Shimadzu TOC analyzer and total water-soluble aluminum ( $\text{Al}_{\text{WS}}$ ), calcium ( $\text{Ca}_{\text{WS}}$ ), copper ( $\text{Cu}_{\text{WS}}$ ), magnesium ( $\text{Mg}_{\text{WS}}$ ) and zinc ( $\text{Zn}_{\text{WS}}$ ) using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES).

The second batch of water extractions aimed at measuring pH and labile Al ( $\text{Al}_{\text{labile}}$ ). The technique of Lalande and Hendershot (1986) was used to determine  $\text{Al}_{\text{labile}}$ . This technique uses an organic ligand (8-hydroxyquinoline) that complexes Al and that is easily measured by colorimetry. The optimization of the Al complexation reaction was insured by adjusting the pH of the sample to 5.0. The 15-s reaction time insured that only the uncomplexed or weakly inorganically-complexed Al would react with the 8-hydroxyquinoline. Briefly, 25.0 ml of water extract, 1.00 ml of sodium acetate buffer (1.00 M) and 1 ml of 0.8 % 8-hydroxyquinoline were added to a borosilicate tube. The tube was shaken for 15 seconds and 5.00 ml of butyl acetate was added to stop the complexing reaction and to extract the newly formed Al-quinolate complex. The concentrations of Al (interpreted as  $\text{Al}_{\text{labile}}$ ) were measured at 395 nm with a spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 1); the 600 nm wavelength was also used to correct for iron interference (James *et al.*, 1983).

Total recoverable Al ( $Al_{TR}$ ) in soil was measured by acid digestion with the modified US EPA (1998) method and a CEM MDS-2000 microwave system. The digestion was made using nitric and hydrochloric acids (all trace metal grade) at an average temperature of 173 °C for 20 minutes and the  $Al_{TR}$  was analyzed on an atomic absorption spectrophotometer (AAS; Varian AA-1475). The solid-phase organic carbon (SPOC) was also determined according to the modified Walkley-Black method (Skjemstad and Baldock, 2008).

### 8.2.5 Geochemical modelling of Al speciation

To complement the  $Al_{TR}$ ,  $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$  measurements, the concentrations of  $Al^{3+}$ , Al complexed with inorganic (Al-inorg) and organic (Al-org) ligands were calculated using the software MINEQL+ v.4.5 (Schecher and McAvoy, 2003). This speciation software was chosen after a comparison with the speciation package WHAM 6. For our soil samples, the result of this comparison was that MINEQL+ 4.5 provided a more realistic modeling of metal speciation than WHAM 6 (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2007). The modelling of Al speciation was performed using pH, total water-soluble metals, major cations, inorganic anions as well as organic ligands as input data. All these variables were measured directly except for the composition of dissolved organic ligands which was estimated based on a review of the literature. Four scenarios were defined to contrast the composition of organic ligands between soil components (bulk vs rhizosphere) and soil pH levels (acidic vs near-neutral). Fulvic, humic and acetic acids were used as organic ligands in the model and the conditional association constants in MINEQL+ v.4.5 were updated. The modelling was performed at 25°C, in closed systems, without taking into account the solid phases and using the Debye-Hückel equation for activity corrections. A complete description of the modelling procedure and validation is found in Cloutier-Hurteau *et al.* (2007).

### 8.2.6 Statistical analyses

For each variable, the normality of the datasets was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. If necessary, square root or logarithmic transformations were applied to variables, to achieve a normal distribution. The differences between the rhizosphere and

bulk components or between the RN and the MTG areas for a given variable were assessed using the non-parametric Wilcoxon signed-ranks test and the non-parametric Mann-Whitney test, respectively. Due to small sample numbers, variables were considered significant at a level of  $\alpha \leq 0.10$ . These statistical tests were performed with the SPSS 16.0 software for Windows<sup>®</sup> (SPSS, Chicago, IL, USA).

To interpret as accurately as possible the relationships between microbial, chemical and Al variables, the variability associated to environmental differences between the sampling areas and the sampling sites was evaluated. Consequently, the spatial component of our sampling design was considered in the statistical analyses by creating a binary variable representing the two sampling areas and a variable representing the various sampling sites.

As a first step towards this, a partition of the variance of measured Al variables ( $Al_{ws}$  and  $Al_{labile}$ ) was performed for both soil components to discriminate the contribution of microbial, chemical and spatial variables. The partition of the variance is derived from partial redundancy analysis (RDA) (Legendre and Legendre, 1998) and was calculated using the function *varpart* available in the vegan library of the R language free software (<http://www.r-project.org/>). Based on results of the partition of the variance, targeted RDA analysis was performed exclusively on rhizosphere samples, to evaluate the influences of microbial and chemical variables on Al speciation. The CANOCO 4.5 software for Windows<sup>®</sup> (ter Braak and Smilauer, 1998) was used to run the RDA. The  $Al_{ws}$  and  $Al_{labile}$  concentrations were the variables introduced as response variables whereas the microbial, chemical and spatial variables were used as explanatory variables. To identify correlations among variables, a type-2 scaling was used in the RDA. The significance of explanatory variables as well as the canonical axes were tested using a Monte-Carlo permutation test (10 000 simulations) performed under full model by constraining the permutation of objects within a sampling area (Legendre and Legendre, 1998). Due to small sample numbers, variables or axes were considered significant at a level of  $\alpha \leq 0.10$ .



To perform statistical analyses (partition of the variance and RDA), a complete database was needed. However, gaps existed in the rhizosphere database, notably for microbial variables and, to a lesser extent, for some chemical variables (Tables 8.1 to 8.3). In this context, a series of actions were undertaken. First, we considered filling the gaps in the database. For variables and sampling sites where we had data for two out of the three trees, e.g. TMBC at site RN 1, the mean value was used for the third tree. This procedure takes into account the intra-site variability, has no effect on the measured inter-sites variability and is widely used in ecology (Legendre and Legendre, 1998). Secondly, the rhizospheric samples of site MTG 2 were suppressed from the statistical analyses because the TMBC and TMBN measurements were strongly affected by the low water content of the rhizosphere at this site and, because no correction could be applied due to mass shortage (Table 1). Furthermore, site RN 3, dehydrogenase and  $F^-$  variables were suppressed from statistical analyses because several data were missing (Table 8.1 and 8.3). In the case of concentrations below our detection limits, for  $Al_{labile}$ ,  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$  at sites MTG 1 and 3, we used values representing the detection limit to fill the gaps. This procedure allowed us to integrate  $Al_{labile}$ ,  $NH_4^+$  and  $NO_3^-$  in the statistical analyses without compromising the interpretation, because the general trend and the inter-sites variability were maintained. Consequently, partition of the variance and RDA were performed on sites RN 1 and 2 as well as MTG 1 and 3 using TMBC, TMBN, AMBC, urease as well as all the chemical variables presented in Tables 8.2 to 8.3, except  $F^-$  concentration.

**Tableau 8.1.** Mean microbial properties of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Sites	TMBC <sup>a</sup> μg C g <sup>-1</sup>		TMBN <sup>a</sup> μg N g <sup>-1</sup>		AMBC <sup>a</sup> μg C g <sup>-1</sup>		Dehydrogenase μg TPF g <sup>-1</sup>		Urease μg NH <sub>4</sub> -N g <sup>-1</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>										
<b>RN 1a</b>	603	- <sup>b</sup>	136	-	513	728	31.8	41.6	49.4	-
<b>RN 1b</b>	531	989	101	194	384	700	15.4	51.2	39.4	68.7
<b>RN 1c</b>	508	958	103	183	422	717	22.8	52.4	43.9	70.5
<b>RN 2a</b>	349	930	83.4	149	308	700	15.4	44.3	23.6	55.1
<b>RN 2b</b>	507	-	125	-	382	738	20.3	62.2	37.2	-
<b>RN 2c</b>	506	1060	111	185	345	694	20.2	44.7	30.7	69.5
<b>RN 3a</b>	483	1210	124	242	402	752	19.7	65.8	47.4	85.9
<b>RN 3b</b>	412	-	99.3	-	418	636	14.5	59.5	37.3	-
<b>RN 3c</b>	473	-	107	-	340	652	18.4	85.5	37.6	-
<b>Monteregian area</b>										
<b>MTG 1a</b>	804	1170	86.5	96.0	291	630	7.30	-	34.2	85.5
<b>MTG 1b</b>	1120	1440	136	67.7	562	-	1.50	-	56.9	90.7
<b>MTG 1c</b>	189	250	25.7	32.7	218	553	7.20	-	20.7	25.4
<b>MTG 2a</b>	547	323	110	-	352	732	41.7	-	47.1	80.0
<b>MTG 2b</b>	691	213	140	105	293	-	48.6	-	31.6	60.5
<b>MTG 2c</b>	605	515	120	82.1	263	600	49.4	-	38.6	56.7
<b>MTG 3a</b>	1050	1540	172	201	496	1340	10.1	-	81.0	132
<b>MTG 3b</b>	416	1010	64.3	171	324	1180	15.4	-	31.4	95.8
<b>MTG 3c</b>	1270	1630	245	219	731	1260	18.5	-	102	147

a TMBC = total microbial biomass C; TMBN = total microbial biomass N; AMBC = active microbial biomass C.

b No data available because of mass shortage.

**Tableau 8.2.** Mean pH values and cations concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Samples	pH <sup>a</sup>		Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		Ca <sub>ws</sub> <sup>b</sup>		Mg <sub>ws</sub> <sup>b</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>												
RN 1a	5.04	5.00	26.9	61.3	14.0	30.4	37.3	115	39.3	36.6	18.7	22.5
RN 1b	5.03	4.97	22.9	36.7	12.9	19.0	40.1	84.8	48.7	39.6	16.7	17.1
RN 1c	4.97	4.96	24.9	48.6	12.0	19.0	36.9	97.7	40.0	39.9	16.8	16.6
RN 2a	5.50	5.43	35.2	56.3	9.60	19.7	9.87	55.5	20.1	31.7	16.7	15.7
RN 2b	5.31	5.39	38.1	43.6	9.38	20.5	22.7	103	22.2	29.1	15.2	20.9
RN 2c	5.37	5.21	34.6	28.7	7.91	12.4	46.6	141	29.8	27.8	18.0	19.6
RN 3a	5.26	5.39	50.7	43.6	9.51	16.7	28.3	82.1	18.8	32.0	25.8	36.0
RN 3b	5.53	5.25	53.6	47.7	8.60	21.7	20.5	96.7	13.8	30.8	16.0	31.2
RN 3c	5.54	5.39	48.1	41.9	10.4	15.8	29.5	85.2	13.4	25.6	16.7	34.3
<b>Monteregian area</b>												
MTG 1a	6.85	7.11	78.5	64.1	4.95	< dlm <sup>c</sup>	11.0	38.2	231	392	54.7	65.2
MTG 1b	6.63	6.71	127	101	9.58	1.86	11.2	72.3	338	548	87.6	101
MTG 1c	6.90	6.98	56.9	68.4	2.10	< dlm	9.55	14.2	143	250	37.2	54.2
MTG 2a	7.10	7.19	39.1	67.0	11.2	12.5	11.2	70.4	216	307	62.2	95.1
MTG 2b	7.07	7.14	34.3	38.0	4.96	2.79	6.83	10.2	236	292	51.7	59.5
MTG 2c	6.91	6.86	41.1	62.6	8.87	6.40	10.0	34.3	192	249	44.4	65.0
MTG 3a	5.37	5.39	132	135	9.22	2.36	20.7	68.9	67.8	77.6	48.4	50.0
MTG 3b	5.85	5.63	88.1	95.0	1.09	2.30	9.29	35.1	61.7	95.0	44.9	50.2
MTG 3c	5.39	5.28	86.1	103	0.84	6.59	24.1	61.1	58.2	83.5	37.9	49.2

a pH measured in a 1:10 soil:water extract.

b Ca<sub>ws</sub> = total water-soluble Ca; Mg<sub>ws</sub> = total water-soluble Mg.

c Below the detection limit of the method (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.50 µmol L<sup>-1</sup>).

**Tableau 8.3.** Mean solid-phase and water-soluble organic carbon, and anions<sup>a</sup> concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Samples	SPOC <sup>b</sup> g kg <sup>-1</sup>		WSOC <sup>b</sup> mg L <sup>-1</sup>		Cl <sup>-</sup>		F <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>												
<b>RN 1a</b>	17.3	- <sup>c</sup>	31.1	95.3	8.84	24.1	< dlm <sup>d</sup>	< dlm	8.45	4.33	55.7	59.3
<b>RN 1b</b>	18.0	24.2	27.3	71.4	9.03	28.5	< dlm	< dlm	7.13	2.49	83.7	69.6
<b>RN 1c</b>	16.3	22.7	22.1	67.5	12.7	33.4	< dlm	< dlm	8.34	3.29	74.7	84.4
<b>RN 2a</b>	13.2	-	21.9	76.8	3.96	16.0	< dlm	< dlm	23.4	25.4	21.6	26.2
<b>RN 2b</b>	15.3	25.0	60.3	78.6	9.99	22.3	< dlm	< dlm	16.8	6.21	17.5	38.4
<b>RN 2c</b>	17.0	24.0	64.6	71.8	5.89	30.3	< dlm	< dlm	62.2	5.58	13.3	43.0
<b>RN 3a</b>	11.9	-	67.5	86.1	6.25	13.8	< dlm	< dlm	4.52	4.50	8.85	23.9
<b>RN 3b</b>	11.3	-	62.1	83.5	11.0	16.5	< dlm	< dlm	2.06	5.33	9.27	33.1
<b>RN 3c</b>	11.0	24.0	62.6	76.8	7.97	11.4	< dlm	< dlm	5.46	3.55	7.86	24.3
<b>Monteregian area</b>												
<b>MTG 1a</b>	29.9	55.9	61.4	84.3	21.2	54.2	5.22	< dlm	35.8	< dlm <sup>d</sup>	71.7	70.0
<b>MTG 1b</b>	-	-	78.4	129	56.8	63.7	-	-	55.3	< dlm	175	120
<b>MTG 1c</b>	10.7	19.8	40.4	57.3	18.5	83.7	39.7	< dlm	7.30	< dlm	30.6	33.9
<b>MTG 2a</b>	28.9	44.3	40.4	59.4	36.4	94.0	37.0	< dlm	129	49.6	60.8	68.8
<b>MTG 2b</b>	25.4	26.9	48.7	49.8	15.4	64.0	172	216	107	4.97	29.7	36.2
<b>MTG 2c</b>	25.7	-	44.8	56.2	29.3	63.6	34.9	< dlm	82.4	37.5	50.4	77.9
<b>MTG 3a</b>	28.2	52.0	54.5	98.9	43.1	76.9	< dlm	< dlm	85.9	< dlm	73.9	53.6
<b>MTG 3b</b>	19.8	-	41.4	84.9	14.7	43.7	< dlm	< dlm	47.9	11.5	54.0	33.3
<b>MTG 3c</b>	31.1	44.1	57.2	91.6	21.2	84.9	< dlm	< dlm	82.1	80.2	61.4	50.8

a The anion PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> was not included because concentrations were below the detection limit of the method (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> = 1.00 µmol L<sup>-1</sup>).

b SPOC = Solid-phase organic carbon; WSOC = water-soluble organic carbon.

c No data available because of mass shortage.

d Below the detection limit of the method (F<sup>-</sup> = 5.00 µmol L<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 0.50 µmol L<sup>-1</sup>).

## 8.3 Results

### 8.3.1 Microbial and chemical variables

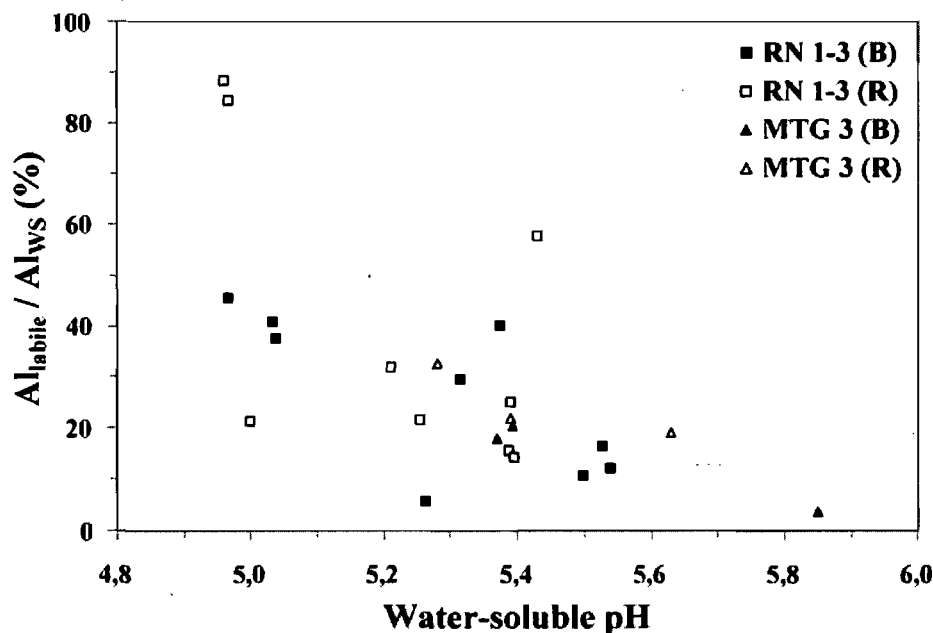
Microbial analyses showed that TMBC values ranged from 213 to 1630  $\mu\text{g C g}^{-1}$ , TMBN from 25.7 to 245  $\mu\text{g N g}^{-1}$  and AMBC from 218 to 1340  $\mu\text{g C g}^{-1}$  (Table 8.1). The dehydrogenase activity varied between 1.50 and 85.5  $\mu\text{TPF g}^{-1}$  whereas urease covered the range 20.7 to 147  $\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1}$ . For almost all the trees sampled, the values of microbial variables were systematically higher at site MTG 3. The soil pH in water extract varied from 4.96 to 7.19 with acidic pH measured at the RN sites and at site MTG 3 while near-neutral pH values were observed at sites MTG 1 and 2 (Table 8.2). The SPOC and the WSOC contents varied between 10.7 and 55.9  $\text{g C kg}^{-1}$  and 21.9 and 129  $\text{mg C L}^{-1}$ , respectively. Finally, the concentrations of solutes in the soil water extracts covered up to two orders of magnitude (Tables 8.2 and 8.3). For most soil properties, samplings sites represented the dominant axis of variation. Contrasts between soil components were also observed as shown by the general enrichment of the rhizosphere in microbial variables, SPOC, WSOC,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}_{\text{WS}}$ ,  $\text{Mg}_{\text{WS}}$  and  $\text{Cl}^-$  (Tables 8.1 to 8.3). The rhizosphere was however depleted in  $\text{NO}_3^-$  and no clear trends existed for pH,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ . A complete description of these results is found in Cloutier-Hurteau *et al.* (2008).

### 8.3.2 Al speciation in forest soils

Measured  $\text{Al}_{\text{TR}}$ ,  $\text{Al}_{\text{WS}}$  and  $\text{Al}_{\text{labile}}$  as well as calculated  $\text{Al}^{3+}$ , Al-inorg and Al-org concentrations are presented in Table 8.4. Except for  $\text{Al}_{\text{TR}}$ , all the Al variables showed higher concentrations at RN than at MTG sites. This trend was controlled by the more acidic pH observed at RN as demonstrated in Figure 8.1, where the proportion of  $\text{Al}_{\text{WS}}$  present as  $\text{Al}_{\text{labile}}$  is plotted. Furthermore, the chemical speciation of Al was strongly dominated by Al-inorg complexes, in particular by the Al-OH ion pairs (Figure 8.2). The remaining Al fraction was equally distributed between  $\text{Al}^{3+}$  and Al-org complexes, except in the most acidic soils where  $\text{Al}^{3+}$  exceeded Al-org. The distribution of Al species was also regulated by soil pH. Indeed, the relative proportion of Al-inorg complexes increased sharply with pH leading, in near-neutral pH sites like MTG 1 and

2, to conditions where almost all the Al was complexed by inorganic ligands. Inversely, the proportion of  $\text{Al}^{3+}$  increased with decreasing pH and  $\text{Al}^{3+}$  became the second dominant Al species at a pH close to 5.0. For the Al-org complexes, higher relative proportions were observed in acidic soils compared to near-neutral soils.

Comparing soil components revealed a systematic enrichment in  $\text{Al}_{\text{labile}}$  in the rhizosphere compared to the bulk soil (Table 8.4). On the other hand,  $\text{Al}_{\text{TR}}$ ,  $\text{Al}_{\text{WS}}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , Al-inorg and Al-org concentrations were either enriched or depleted in the rhizosphere. Moreover, in acidic soils, higher proportions of  $\text{Al}^{3+}$  and of Al complexes with the  $\text{OH}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  ligands were generally detected in the rhizosphere compared to the bulk soil (Figure 8.2). This trend could be related to the slight acidification of the rhizosphere occurring in these soils (Table 8.2). To the contrary, the Al-org complexes followed no clear trend as a function of soil components since both increases and decreases occurred (Figure 8.2).



**Figure 8.1.** Fraction of total water-soluble Al ( $\text{Al}_{\text{WS}}$ ) present as labile Al ( $\text{Al}_{\text{labile}}$ ) plotted as a function of solution pH. The  $\text{Al}_{\text{labile}}$  was measured by the 15-s reaction with 8-hydroxyquinoline technique at a pH of 5.0. Objects are discriminated according to sampling areas (RN = Rouyn-Noranda and MTG = Monteregian) and soil components (B = bulk soil and R = rhizosphere soil).

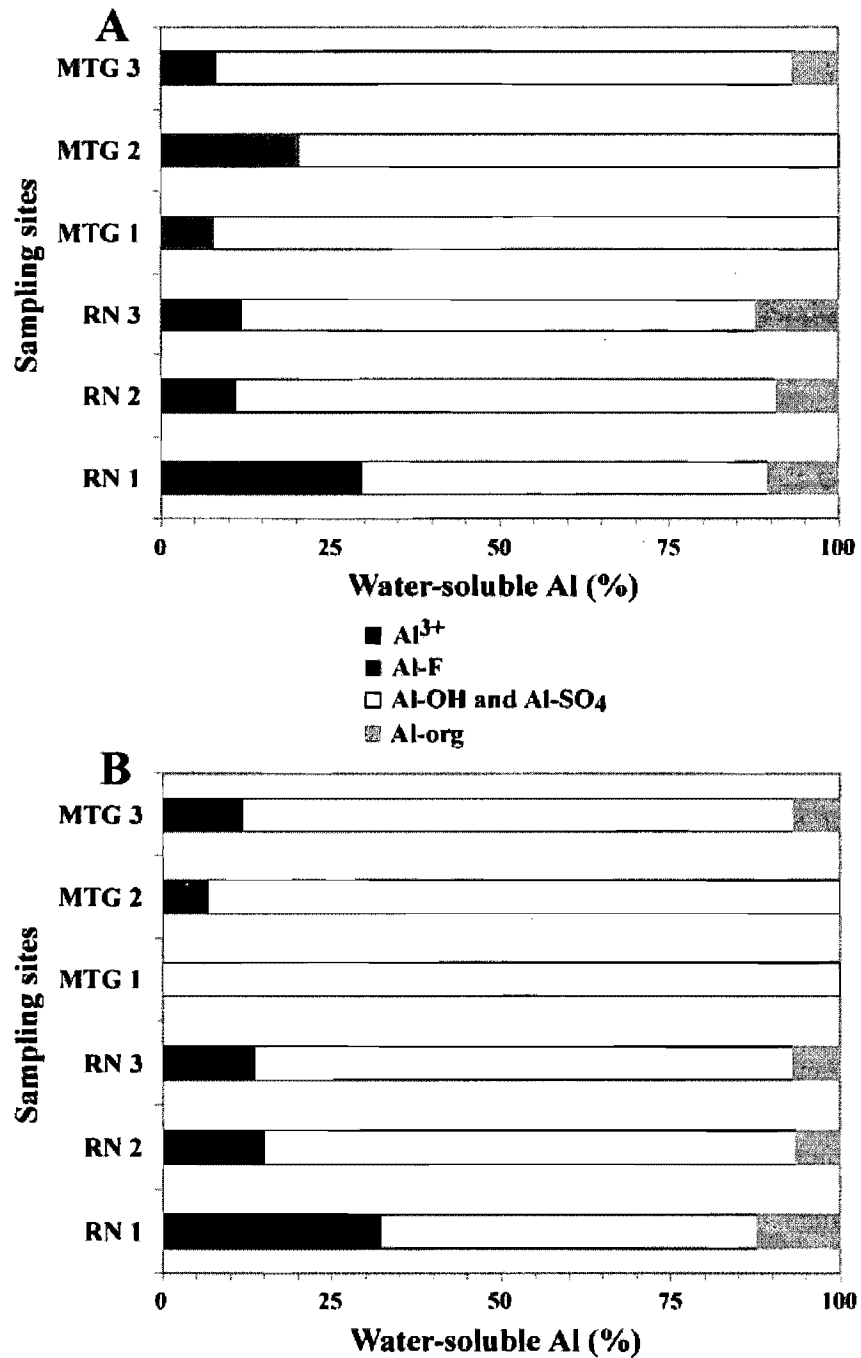
**Tableau 8.4.** Mean measured ( $Al_{TR}$ ,  $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$ ) and modeled ( $Al^{3+}$ ,  $Al$ -inorg and  $Al$ -org) Al concentrations in the water extract of the bulk and the rhizosphere (R) soils at each site.

Sites	$Al_{TR}^a$ g kg <sup>-1</sup>		$Al_{WS}^a$		$Al_{labile}^a$		$Al^{3+a, b}$ μmol L <sup>-1</sup>		$Al$ -inorg <sup>a, b</sup>		$Al$ -org <sup>a, b</sup>	
	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R	Bulk	R
<b>Rouyn-Noranda area</b>												
<b>RN 1a</b>	26.9	26.7	50.0	87.9	18.8	18.7	14.5	28.7	30.1	49.0	5.43	10.2
<b>RN 1b</b>	28.3	21.1	34.1	28.3	13.6	23.9	9.22	9.01	21.3	15.6	3.61	3.66
<b>RN 1c</b>	24.6	22.3	36.7	26.2	16.7	23.0	11.8	8.26	21.5	14.6	3.36	3.30
<b>RN 2a</b>	29.2	33.9	37.0	24.4	4.13	14.1	3.21	2.70	32.6	20.2	1.23	1.46
<b>RN 2b</b>	31.5	32.3	24.4	52.4	7.22	13.1	3.42	6.60	17.5	42.8	3.49	3.02
<b>RN 2c</b>	30.4	30.6	30.5	57.8	12.2	18.4	3.68	11.0	23.0	42.5	3.81	4.34
<b>RN 3a</b>	43.1	37.8	60.4	68.0	3.48	10.6	9.64	8.22	41.3	55.4	9.46	4.41
<b>RN 3b</b>	37.3	37.3	21.6	39.2	3.42	8.45	1.43	7.15	18.5	28.3	1.68	3.73
<b>RN 3c</b>	40.1	35.0	25.6	69.0	3.20	9.40	1.81	8.78	21.7	56.0	2.09	4.19
<b>Monteregian area</b>												
<b>MTG 1a</b>	65.5	63.9	10.4	31.0	< dlm <sup>c</sup>	< dlm	< 0.1	< 0.1	10.4	31.0	< 0.1	< 0.1
<b>MTG 1b</b>	73.6	65.7	9.88	-	< dlm	< dlm	< 0.1	-	9.88	-	< 0.1	-
<b>MTG 1c</b>	51.9	53.1	16.5	13.0	< dlm	< dlm	< 0.1	< 0.1	16.5	13.0	< 0.1	< 0.1
<b>MTG 2a</b>	17.3	15.5	7.02	5.33	< dlm	< dlm	< 0.1	< 0.1	7.02	5.33	< 0.1	< 0.1
<b>MTG 2b</b>	19.2	18.1	11.9	7.33	< dlm	< dlm	< 0.1	< 0.1	11.9	7.33	< 0.1	< 0.1
<b>MTG 2c</b>	18.8	16.9	6.58	33.1	< dlm	< dlm	< 0.1	< 0.1	6.58	33.1	< 0.1	< 0.1
<b>MTG 3a</b>	50.9	56.3	19.2	37.0	3.45	8.11	2.42	4.84	14.8	29.3	1.98	2.87
<b>MTG 3b</b>	43.2	45.3	27.6	27.9	1.02	5.32	0.54	1.55	26.7	25.5	0.36	0.86
<b>MTG 3c</b>	48.1	44.6	23.4	23.9	4.77	7.81	2.71	4.17	18.3	17.4	2.40	2.34

a  $Al_{TR}$  = total-recoverable Al;  $Al_{WS}$  = water-soluble Al;  $Al_{labile}$  = labile Al measured by 15-s reaction with 8-hydroxyquinoline;  $Al^{3+}$  = free-ion Al;  $Al$ -inorg = inorganic Al complexes (Al-F, Al-OH and Al-SO<sub>4</sub> compounds);  $Al$ -org = organic Al complexes (Al-acetate, Al-fulvate and Al-humate compounds).

b Al species calculated using the model MINEQL+ 4.5. For details on the modeling, readers are referred to section 8.2.5 of this paper and to chapter five.

c Below the detection limit of the method ( $Al_{labile} = 1.00 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

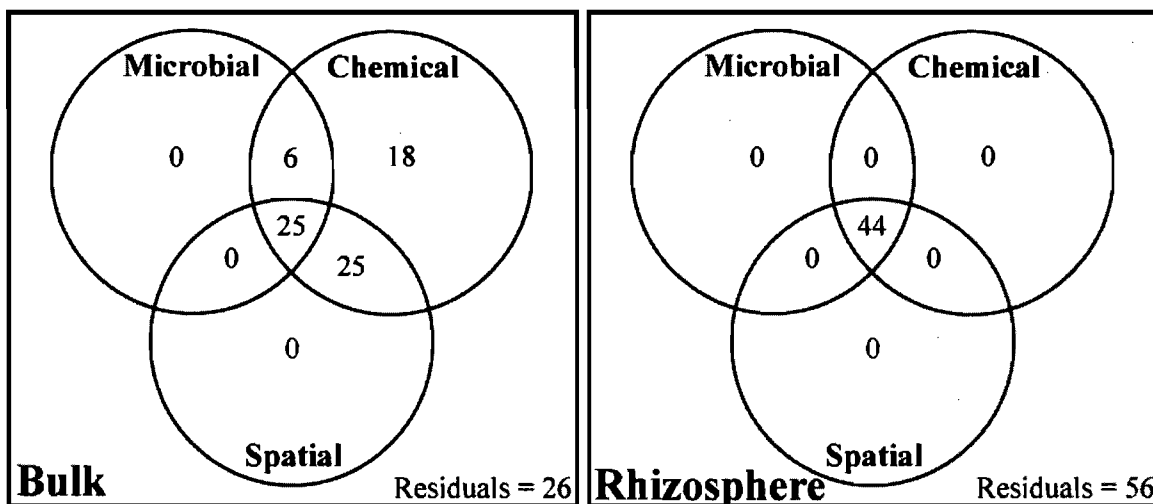


**Figure 8.2.** Mean cumulative fractions of total water-soluble Al in the bulk (A) and rhizosphere (B) at each sampling sites in the Rouyn-Noranda (RN) and Monteregian (MTG) areas. Refer to Table 8.4 for codes of Al species.

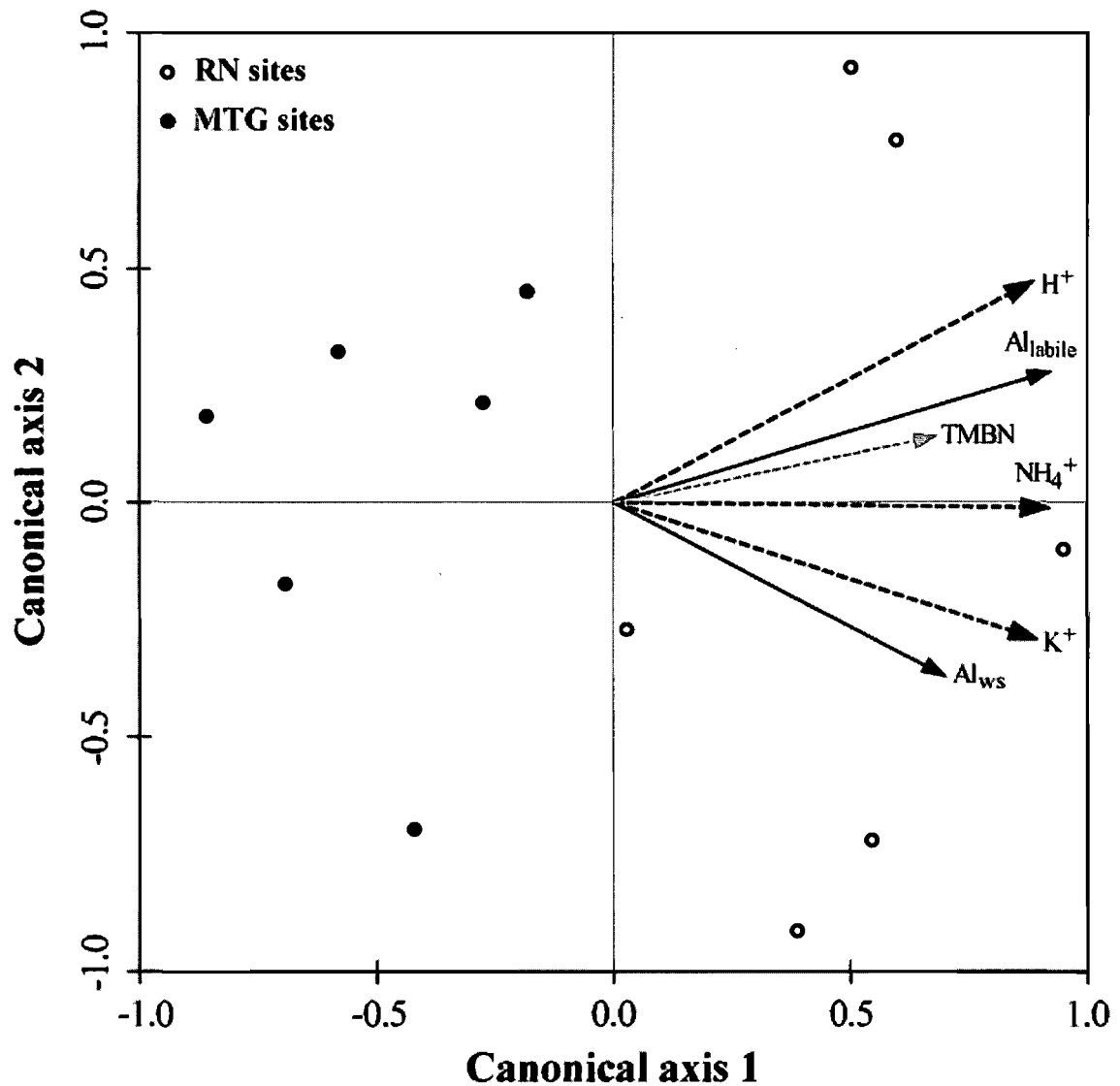


### 8.3.3 Influence of chemical and microbial variables on $Al_{WS}$ and $Al_{labile}$ concentrations

The partition of the variance of the measured Al variables ( $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$ ) between microbial, chemical and spatial variables is presented for both soil components in Figure 8.3. For bulk samples, microbial, chemical and spatial variables respectively explained 31, 74 and 50 % of the adjusted variance of Al variables whereas the unexplained variance totalled 26 %. Here, the variance in Al species was almost exclusively controlled by chemical variables ( $p < 0.01$ ). The overall contribution of chemical variables also involved the joint actions of spatial (25 %), microbial (6 %) and of microbial plus spatial variables (25 %). For rhizosphere samples, the adjusted variance in Al variables was completely controlled by the combined action of microbial, chemical and spatial variables up to a level of 44 % (Figure 8.3). As much as 56 % of the Al variance was unexplained by the three groups of variables considered in this study.



**Figure 8.3.** Venn diagram of the partition of the variation of  $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$  for the two soil components. The rectangles represent the total variance of Al variables and each circle is associated to a given group of explaining variables. The adjusted  $r^2$  (expressed in %) of the variance of Al variables for each surface of the Venn diagram are presented and were obtained from equations described in Legendre and Legendre (1998). Zones defined by the intersection between circles represent a fraction of the variance of Al that is jointly explained by different groups of variables whereas the residuals refer to the unexplained variance of Al variables.



**Figure 8.4.** Redundancy analysis ordination biplot of rhizospheric samples representing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Al variables. Full black arrows refer to response variables, dashed black arrows represent significant explanatory variables controlling the variation of Al response variables and dashed grey arrows represent collinear explanatory variables not compiled in the RDA analysis. The combination of all canonical axes explained 44 % of the adjusted variance of Al variables and was statistically significant ( $p < 0.01$ ). See Tables 8.1, 8.2 and 8.4 for variable codes.

To improve our understanding of rhizosphere processes and of their influence on Al speciation, we produced RDA analysis describing the total influence of microbial and chemical variables on the distribution of Al variables in the rhizospheric samples of both areas (Figure 8.4). The RDA revealed that microbial and chemical variables explained a significant fraction, up to 44 %, of the variance of  $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$  ( $p < 0.01$ ). Among the explanatory variables tested,  $H^+$ ,  $K^+$  and  $NH_4^+$  concentrations were significantly related to Al variables. The TMBN was also related to Al and  $NH_4^+$  but suffered from collinearity with other significant explanatory variables. Therefore, TMBN was not included in the RDA, but was rather integrated in the biplot as a passive variable, to better represent the dynamics of the system. Finally, TMBN and  $H^+$  concentration were preferentially related to  $Al_{labile}$  whereas,  $K^+$  concentration was better linked to  $Al_{WS}$ .

## 8.4 Discussion

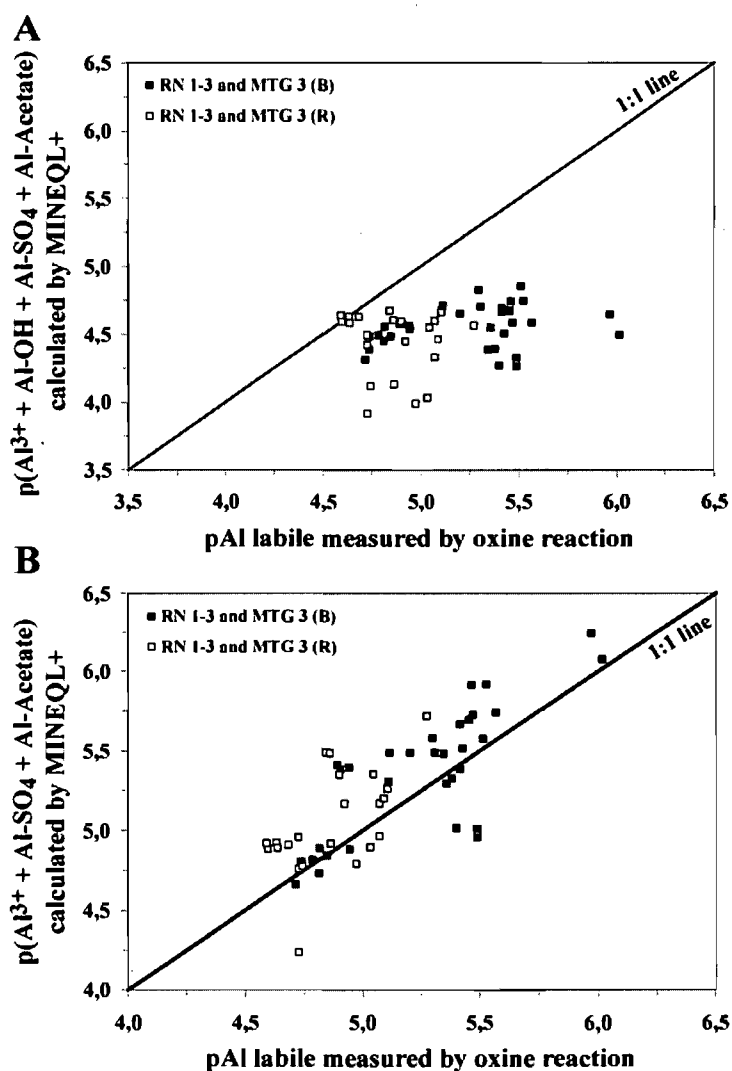
### 8.4.1 Al speciation in the rhizosphere of forest soils

Al speciation differed sharply between sampling areas, an observation that was associated to pH which is well known for impacting significantly on Al solubility and speciation (McHale *et al.*, 2007; Lindsay, 1979). Therefore, a decreasing pH led to an increase concentration of  $Al_{WS}$  as well as a higher proportion of  $Al_{labile}$  and  $Al^{3+}$ . The inverse trend contributed to increase the proportion of Al-inorg, in particular the Al-OH complexes (Table 8.4; Figures 8.1 and 8.2). Furthermore, modeling with MINEQL+ showed that the higher concentration of  $Al_{labile}$  in acidic soils was directly related to the increased  $Al^{3+}$  concentration. The literature indicates that the  $Al_{labile}$  measured by the 8-hydroxyquinoline technique corresponds to monomeric inorganic Al species which, in turn, include  $Al^{3+}$ , Al-OH and Al-SO<sub>4</sub> complexes as well as Al bound to weak organic ligands (Bloom and Erich, 1996; Luster *et al.*, 1993; James *et al.*, 1983). Validation of this observation for our soils was assessed by comparing the  $Al_{labile}$  concentration with the Al speciation data obtained with MINEQL+. Large discrepancies existed between measured  $Al_{labile}$  and the sum of calculated monomeric inorganic Al species (Figure 8.5). The exclusion of Al-SO<sub>4</sub> or Al-acetate complexes from the sum of monomeric inorganic Al compounds did not significantly improve the prediction of  $Al_{labile}$  whereas a much better fit was obtained when Al-OH complexes were excluded (Figure 8.5). In this case,

the differences between measured and calculated data were almost always less than 0.5 order of magnitude, with a maximum reaching up to 0.65 order of magnitude. Two reasons could be invoked to explain the discrepancies between  $Al_{labile}$  measurements and the modeled monomeric inorganic Al in our soils. Firstly, the 8-hydroxyquinoline technique was generally assessed on samples having pH values lower than 5.0 (Hodges, 1987; Lalande and Hendershot, 1986; James *et al.*, 1983; Bloom *et al.*, 1978). To the contrary, our samples had solution pH values ranging from 5.0 to 7.2. At a pH above 5.0, which is the case for the majority of our samples, Al atoms and the hydroxyl ligands tend to form Al-hydroxy polymers (Luster *et al.*, 1993). This polymeric Al form has slow kinetics (hours to days) for both formation and dissociation reactions, thus explaining the incapacity of the fast 8-hydroxyquinoline method to measure these polymeric forms of Al (Bloom and Erich, 1996). This is particularly true for our weakly acidic soil samples where large concentrations of Al-OH complexes were calculated and where low  $Al_{labile}$  concentrations were measured (Table 8.4 and Figure 8.2). Secondly, the discrepancies between measured  $Al_{labile}$  and modeled monomeric inorganic Al could also result from the potential overestimation of the formation of Al complexes with OH ligands by MINEQL+. This overestimation may derive from the non-inclusion of competition in the simulation since competing cations, such as iron, were not analyzed and included in the model.

The general enrichment of the rhizosphere in  $Al_{ws}$  compared to the associated bulk soils agreed well with previous studies conducted in the field on forested sites (Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Göttlein *et al.*, 1999). These results indicated that the uptake of Al by trees proceeded at a generally lower rate than that of Al transport to the rhizosphere (Göttlein *et al.*, 1999). In the case of  $Al_{labile}$  and  $Al^{3+}$ , an enrichment of the rhizosphere generally occurred, in agreement with the studies of Turpault *et al.* (2005) and Göttlein *et al.* (1999). Furthermore, and despite the strong affinity of Al for organic matter (Cronan *et al.*, 1986), our results clearly showed that Al was mostly complexed to inorganic anions in both soil components. In A and B horizons, Turpault *et al.* (2005) demonstrated that the potential Al ligands shifted from organic to inorganic compounds as the concentration of WSOC decreased rapidly with depth in forest soils. This WSOC

depletion process with depth also occurred at the RN and MTG sites and most likely explained the high proportion of Al complexed to inorganic ligands in our B horizon soil samples. Moreover, even if the rhizosphere was enriched in WSOC compared to the bulk soil (Table 8.3), increased proportions of Al-org complexes in the rhizosphere were only reported for the soil samples presenting the largest WSOC differences between soil components, for example in samples RN 1a-c and RN 2a.



**Figure 8.5.** Comparison of the labile Al measured by the 15-s reaction of 8-hydroxyquinoline with Al species modeled by MINEQL+ 4.5. Two scenarios were used to represent the modeled species. The first summed  $\text{Al}^{3+}$ , Al-OH, Al-SO<sub>4</sub> and Al-acetate complexes (A), while the second scenario integrated only  $\text{Al}^{3+}$ , Al-SO<sub>4</sub> and Al-acetate complexes (B). For details on modeling, readers are referred to section 8.2.5.

#### 8.4.2 Influence of microbial and chemical variables on $Al_{WS}$ and $Al_{labile}$ concentrations in rhizospheric forest soils

The partition of the variance of Al variables differed markedly between soil components (Figure 8.3). This was first emphasized by a shift towards an increased influence of microbial variables on Al variables from the bulk to the rhizosphere soil. These results were attributed to the higher microbial biomass and activity observed in the rhizosphere compared to bulk soil (Table 8.1). This shift also involved an increase in the joint influence of microbial, chemical and spatial variables on Al speciation in the rhizosphere compared to bulk samples, reflecting the role of spatial differences between sampling sites on rhizosphere properties. To our knowledge, these are the first results to quantify the relationships existing between microbial variables and Al speciation in water extracts of the rhizosphere.

The second difference in the partition of the variance of Al between soil components was associated to a sharp increase of the unexplained variance in the rhizosphere compared to bulk component (Figure 8.3). This observation clearly differed from the results obtained for copper on the same dataset (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008). The high unexplained variance might be associated to our limited characterization of the soil solid phase which is known to impact significantly on the biogeochemistry of Al (McHale *et al.*, 2007). Indeed, the work of Séguin *et al.* (2005) conducted at the soil-root interface of RN soils found that mineral weathering produces antagonistic effects on Al biogeochemical behaviour. On the one hand, the precipitation of Al as secondary oxides occurred whereas, on the other hand, weathering of other Al-bearing minerals supplied Al to the soil solution. More data on the properties and processes of the solid phase could help to improve the explanation of Al variance observed in the rhizosphere relative to the bulk soil, because the weathering process proceed at a faster rate in this microenvironment compared to the bulk soil (Séguin *et al.*, 2005).

The RDA analyses allowed us to identify significant relationships between microbial and Al variables in the rhizosphere. Because a field study always has an uncontrolled component and because differences existed between sampling areas and soil components

(Tables 8.1 to 8.4), one as to be cautious when interpreting such statistical relationships in order to identify the biological and chemical processes at play. Working hypotheses were thus submitted to explain the links between variables. A full test of these hypotheses should however involve experiments conducted under controlled conditions.

The key role of pH on Al variables was confirmed by the RDA analysis. Accordingly, soil pH was recognized as the primary variable explaining the rhizospheric variation of  $Al_{labile}$  concentrations between sampling areas (Figures 8.4). The link between pH and the concentrations of  $Al_{WS}$  was however much weaker. The influence of pH on  $Al_{labile}$  in the rhizosphere appeared to be regulated in part by the uptake of nitrogen by microorganisms, as suggested by the correlations between  $H^+$  or  $Al_{labile}$  and TMBN (Figures 8.4). The nature of the nitrogen form taken up by microorganisms as well as by roots was widely recognized has one of the main process controlling the rhizospheric pH (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Hinsinger *et al.*, 2003). The process of  $NH_4^+$  uptake favours the acidification of the rhizosphere whereas the absorption of  $NO_3^-$  consumes acidity. Based on the lower TMBN values of the MTG soils, the microbial assimilation of nitrogen was shown to be higher in the rhizosphere of the RN than the MTG soils (Table 8.1). This trend could also indicate that the microbial communities in the MTG area suffered from nitrogen limitation. Consequently, the higher microbial assimilation of nitrogen in the RN soils induced a larger microbial influence on water-soluble pH and, thus, on  $Al_{labile}$  in this area compared to the MTG area. This is visible in the rhizosphere of RN, where an acidification induced in part by the microbial assimilation of  $NH_4^+$  contributed to increase the concentration of  $Al_{labile}$  in the rhizosphere compared to both the associated bulk soils and to the MTG soils.

The RDA analysis presented in Figure 8.4, pointed to the fact that the distribution of  $Al_{WS}$  was more closely related to the concentrations of dissolved  $K^+$  and  $NH_4^+$  than to the variables  $H^+$  and TMBN. The higher concentrations of  $K^+$  and  $NH_4^+$  in the rhizosphere at RN were attributed to the presence of K-feldspars and of micas in the clay-size fractions of soils as well as to the lower pH measured in this area compared to the MTG soils (Cloutier-Hurteau *et al.*, 2008). Moreover, the behaviour of  $Al_{WS}$  in the mineral horizons of forest soils was shown to be controlled by reactions occurring

between the mineral surfaces and the soil solution (McHale *et al.*, 2007; Hendershot *et al.*, 1996). In this context, we submit that the strong statistical links existing between  $Al_{WS}$  and  $K^+$  or  $NH_4^+$  reflected processes of elemental mobilization occurring at the interface between the solid and liquid phases of the rhizosphere soils. The processes involved were probably pH-dependent, as suggested by the correlations involving all these variables and the  $H^+$  ion concentration (Figure 8.4). They were only slightly controlled by TMBN variable. Consequently, we hypothesized that mineral weathering, ion exchange or sorption reactions on mineral surfaces mostly regulated the concentration of  $Al_{WS}$  in rhizosphere soils.

## 8.5 Conclusions

Our field study documented the chemical speciation of Al in the rhizosphere and bulk component of contrasted forest soils. The results showed that the rhizosphere is generally enriched in  $Al_{WS}$  and  $Al_{labile}$  compared to the adjacent bulk soil and that the speciation is mostly dominated by Al-OH complexes and  $Al^{3+}$ . The Al speciation, in both soil components, is largely controlled by chemical variables. Among the chemical variables involved, pH appeared to be the dominant variable controlling the behaviour of Al. However, the contribution of microbial properties to the explanation of Al variables in the rhizosphere significantly increased compared to the associated bulk soil. The results further suggested that microbial activity increased the concentration of  $Al_{labile}$  in the rhizosphere of the B horizon of forest soil through their effect on solution pH following the assimilation of nitrogen. On the other hand, the concentration of  $Al_{WS}$  in the rhizosphere were only slightly related to  $H^+$  and TMBN but appeared to be strongly controlled by interfacial chemical reactions, such as minerals weathering or sorption reactions. This study is one of the first attempts at quantifying and identifying the role of the microbial community of the rhizosphere on Al behaviour and distribution. The results clearly revealed that the rhizospheric microorganisms, as a whole, exerted a significant effect on the speciation of Al in the rhizosphere. However, the specific role of microorganisms on Al speciation in the rhizosphere remains misunderstood. Further investigations, under controlled conditions, will be needed to confirm the occurrence and nature of these processes. In particular, the identification of the microbial species



involved and of the interactions between microorganisms, soil particles and roots will be needed to improve our understanding of the microbial processes impacting on Al speciation in the rhizosphere.

## CHAPITRE 9. Principales conclusions

---

Les données sur le Cu, Zn et Al présentées dans les chapitres cinq à huit permettent de répondre aux trois objectifs de la thèse qui sont : (1) de documenter la spéciation des métaux dans la rhizosphère et la matrice de sols forestiers, (2) de quantifier l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux dans la rhizosphère et la matrice de sols forestiers, et (3) d'identifier les variables d'origine microbienne influençant la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers. L'interprétation de ces données a aussi permis d'émettre des hypothèses de recherche quant aux mécanismes microbiens et chimiques agissant sur la spéciation des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers. Le présent chapitre effectue, dans un premier temps, un rappel des principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse puis il compare le comportement biogéochimique du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère de sols forestiers. Par la suite, le caractère novateur de ce travail, ses limites et les pistes de recherches futures sont exposés.

### 9.1 Synthèse des résultats et comparaison entre les métaux

Documenter la spéciation des métaux dans la matrice et la rhizosphère de sols forestiers est le premier objectif de cette thèse. Afin d'atteindre cet objectif, la spéciation du Cu, Zn et Al a été obtenue à l'aide de mesures directes (concentrations totale et réactive dans des extraits à l'eau) et de simulations numériques (modélisation de la forme ionique libre et des formes ioniques complexées aux anions inorganiques et organiques). Le portrait de spéciation obtenu par modélisation a été établi par le logiciel MINEQL+ 4.5. Le choix de ce logiciel a été effectué suite à une comparaison avec un autre logiciel de spéciation, WHAM 6, qui utilise une approche de modélisation différente (Chapitre cinq). Les calculs de spéciation ont nécessité l'utilisation des propriétés chimiques mesurées sur les extraits à l'eau ainsi que l'établissement de scénarios représentant, en accord avec la littérature, la composition de la MOD. Les calculs de spéciation du Cu ont, par la suite, pu être validés suite à une comparaison avec les données de  $\text{Cu}^{2+}$  mesurées par électrode spécifique (Chapitre cinq). Les résultats montrent que les

concentrations de métaux mesurées sont généralement supérieures dans la région de RN comparativement aux sols de MTG ainsi que dans la rhizosphère par rapport à la matrice du sol. Les résultats de spéciation donnent aussi lieu à des différences marquées entre métaux (Tableau 9.1). Ainsi, le Cu a une spéciation largement dominée par des formes complexées à la MOD, alors que le Zn et l'Al présentent une spéciation plus variée. La spéciation du Zn est ainsi dominée par la forme ionique libre et les formes organiques tandis que l'Al est principalement présent sous des formes complexées à des anions inorganiques et sous la forme ionique libre.

**Tableau 9.1.** Moyennes des résultats de spéciation obtenus pour le Cu, Zn et Al.

Formes chimiques des métaux	Cu	Zn	Al
	----- % -----		
<b>Ion libre</b>	< 14	34 - 74	≤ 33
<b>Complexées aux anions inorganiques</b>	< 2	< 2	55 - 100
<b>Complexées aux anions organiques</b>	86 - 100	9 - 66	≤ 14

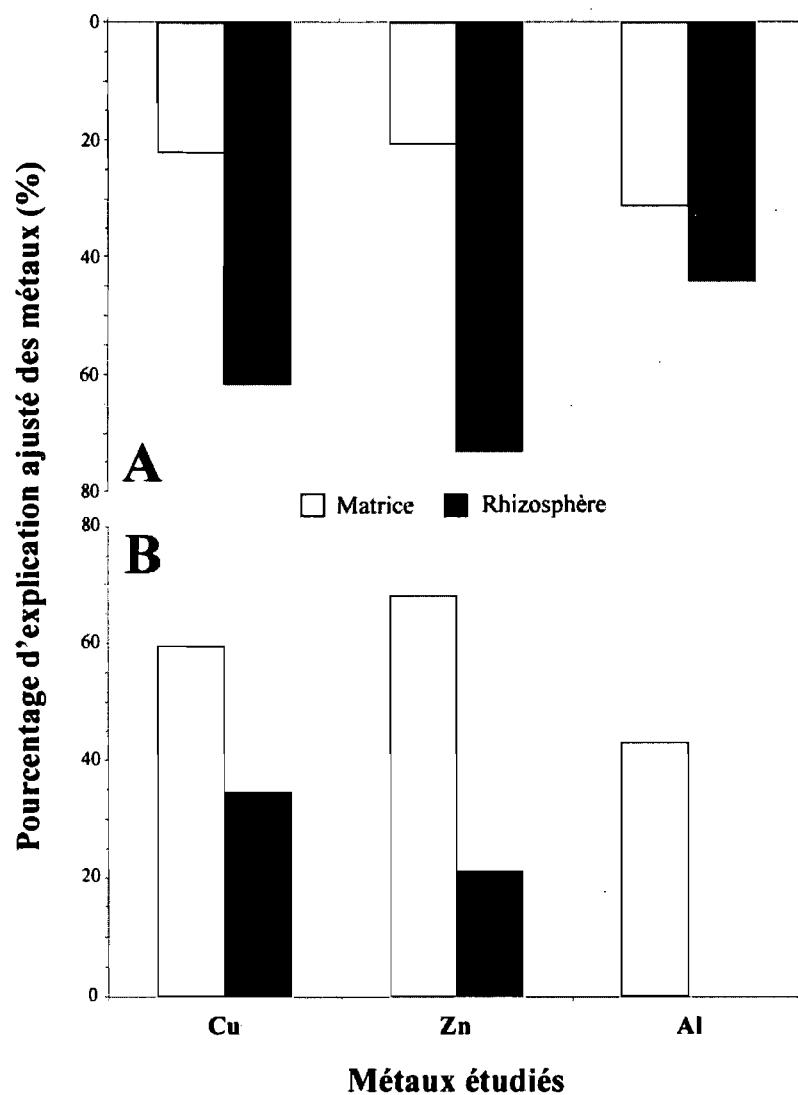
L'effet du pH sur la concentration, la spéciation et le comportement biogéochimiques des métaux est clairement visible dans cette étude. Dans un premier temps, cet effet s'observe sur les concentrations de métaux qui sont plus élevées dans les sols acides de RN que dans ceux plus alcalins de MTG. Les conditions acides prévalant dans les sols de RN s'expliquent, d'une part, par la légère acidité naturelle du matériel parental et d'autre part, par l'importante quantité de composés atmosphériques acides déposés sur ces sols (Séguin *et al.*, 2004). Contrairement aux sols de RN, les sols de MTG sont faiblement acides à neutres puisqu'ils se sont développés sur un matériel parental d'origine marine plus riche en carbonates et qu'ils ne sont pas situés à proximité d'une source ponctuelle libérant d'importantes quantités de métaux ou de composés acides dans son environnement immédiat. Deuxièmement, le pH engendre des différences de spéciation entre le Cu, Zn et Al, différences qui sont le résultat de sensibilité variable de ces métaux face à l'acidité (Tableau 9.1). En se basant sur les résultats de spéciation obtenus dans cette étude et sur le fait que la forme ionique libre et les formes ioniques liées à l'anion OH<sup>-</sup> sont jugées fortement dépendantes du pH (Sauvé, 2002; Sauvé *et al.*, 2000a; Lindsay, 1979), la sensibilité des métaux face au pH suit la séquence suivante :

Zn = Al > Cu. La spéciation du Zn est dominée par la forme ionique libre alors que celle de l'Al est principalement dominée par des complexes inorganiques de type Al-OH, reflétant la forte sensibilité de ces métaux face au pH (Tableau 9.1). En ce sens, les différences de pH observées entre les régions d'échantillonnage et entre les compartiments du sol se traduisent par des variations de spéciation importantes pour ces deux métaux, variations qui sont généralement en accord avec les études précédentes (McHale *et al.*, 2007; Lindsay, 1979). En comparaison, le Cu est peu sensible aux variations marquées de pH puisque sa spéciation est peu régulée par la forme ionique libre (Sauvé *et al.*, 1997). Ainsi, seulement de faibles variations de spéciation sont observées entre les sols couvrant une large gamme de pH (Tableau 9.1).

Les différences de spéciation entre métaux sont aussi influencées par le contenu en MO. Parmi les métaux étudiés, Cu et Zn sont ceux dont la spéciation est la plus influencée par la MO comme en témoigne l'abondance de complexes organométalliques (Tableau 9.1). En ce qui concerne Al, les conditions de complexation par des anions organiques semblent défavorables puisque sa spéciation est dominée par les formes inorganiques (Tableau 9.1). Ce résultat concernant l'Al est surprenant sachant que ce métal est reconnu dans la littérature pour avoir une forte affinité pour la MO (Vance *et al.*, 1996; Cronan *et al.*, 1986). Une explication possible de ce résultat provient du fait que l'étude actuelle est menée dans des horizons B de sols forestiers. Dans ces horizons minéraux, les anions inorganiques sont généralement présents en plus grande concentration que les anions organiques parce que la phase solide y est dominée par les minéraux, amorphes ou cristallins, parce qu'elle contient peu de MO et parce que l'essentiel de la MOD a été adsorbé dans l'horizon B supérieur, typiquement un Bh. Dans ces circonstances, la compétition entre anions pour complexer l'Al ne favorisera pas les ligands organiques, mais plutôt les ligands inorganiques (McHale *et al.*, 2007; Turpault *et al.*, 2005).

Bien que la spéciation diffère entre les métaux Cu, Zn et Al, les conditions prévalant dans la rhizosphère favorisent un enrichissement systématique des formes de métaux les plus réactives ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}_{\text{DPASV}}$ ,  $\text{Al}_{\text{labile}}$ ) comparativement à la matrice du sol (Chapitres six à huit). Cette observation est indépendante du métal puisque la même tendance est notée pour des métaux ayant des comportements biogéochimiques distincts. Cette

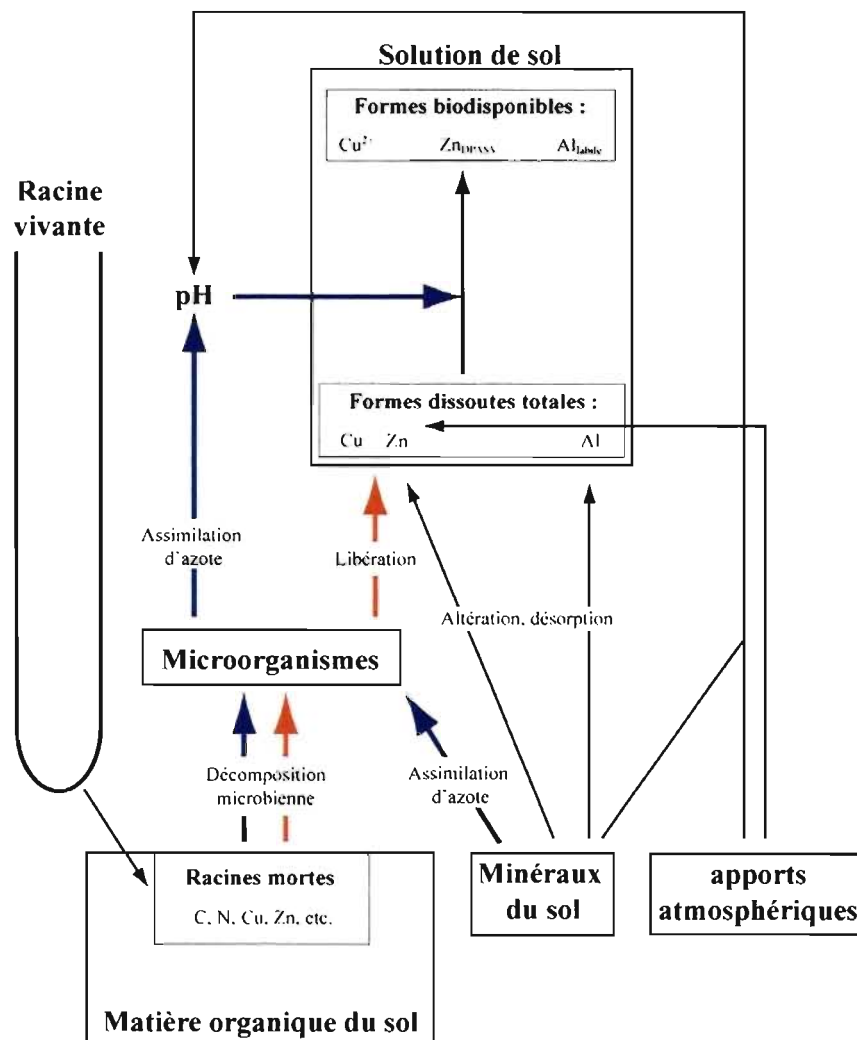
tendance systématique peut être induite par des mécanismes racinaires, microbiens ou édaphiques actifs dans la rhizosphère. L'atteinte des deuxième et troisième objectifs de cette thèse contribue à éclairer le fonctionnement de la rhizosphère, puisque ces objectifs quantifient et documentent l'effet des microorganismes de ce microenvironnement sur les formes chimiques les plus réactives de Cu, Zn et Al. Ainsi, dans un premier temps, les résultats statistiques révèlent que les variables microbiennes expliquent, pour chacun des métaux et des compartiments du sol, une fraction significative des formes chimiques de métaux mesurées. De plus, l'explication associée aux variables microbiennes est systématiquement plus haute dans la rhizosphère que dans la matrice du sol (Figure 9.1a). Ce dernier résultat est en accord avec les tendances observées précédemment qui soulignent que l'interface sol-racine est enrichie en microorganismes comparativement à la matrice (Phillips et Fahey, 2006; Paul et Clark, 1996). L'augmentation de l'influence des variables microbiennes sur les métaux dans la rhizosphère semble se produire au détriment de l'effet exclusif attribué aux variables chimiques ainsi que de l'effet combiné des variables chimiques et spatiales sur les métaux. En effet, une diminution de l'explication associée à ces composantes est observée dans la rhizosphère comparativement à la matrice du sol (Figure 9.1b). Néanmoins, les analyses statistiques menées sur chacun des métaux révèlent que l'influence totale attribuée aux variables chimiques augmente dans la rhizosphère. Cette observation s'explique par le fait qu'une plus grande proportion de l'explication associée aux variables chimiques dans ce microenvironnement s'effectue conjointement avec les variables microbiennes (Chapitres six à huit). Cette affirmation rejoint les études qui ont montré que les microorganismes influencent la biogéochimie des métaux en modifiant les propriétés physico-chimiques de leur environnement (Chen *et al.*, 2005; Fomina *et al.*, 2005, 2004; Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Newman et Banfield, 2002). Ces résultats montrent donc que la prise en compte de l'action des microorganismes est essentielle afin de prédire adéquatement la spéciation des métaux dans la rhizosphère. Ainsi, les futurs modèles conceptuels décrivant le comportement des métaux dans la rhizosphère devront mieux intégrer les interactions que les microorganismes ont avec le sol et les racines.



**Figure 9.1.** Pourcentage d'explication de la distribution des concentrations en Cu ( $Cu_{WS}$  et  $Cu^{2+}$ ), Zn ( $Zn_{WS}$  et  $Zn_{DPASV}$ ) et Al ( $Al_{WS}$  et  $Al_{labile}$ ) dans les deux compartiments du sol. L'effet total des variables microbiennes (A) et l'effet total des variables chimiques excluant l'effet conjoint avec les variables microbiennes (B) sont présentés dans cette figure.

Dans les sols rhizosphériques étudiés, des différences quant à la magnitude de l'effet microbien sont observées. Les résultats montrent, dans la rhizosphère, que l'influence des microorganismes sur la spéciation des métaux suit l'ordre suivant :  $Zn > Cu > Al$  (Figure 9.1a). Selon cette hiérarchisation, Cu et Zn sont les métaux les plus influencés par l'activité microbienne de la rhizosphère. Parallèlement à cette constatation, ces métaux sont aussi ceux dont la spéciation est la plus fortement liée à la MO. Ces informations suggèrent que l'activité microbienne dans la rhizosphère influence la mobilité du Cu et Zn par le biais d'un mécanisme où intervient la MO. Les analyses de laboratoire et statistique présentées aux Chapitres cinq et six tendent à montrer que la mise en solution du Cu et Zn dans la rhizosphère, et dans une moindre mesure leur spéciation, sont associées à la décomposition de la MO, principalement celle des racines mortes. À ce sujet, des études antérieures suggèrent que les racines fines des arbres ont tendance à coloniser les microsites déjà enrichis en éléments nutritifs dans les environnements pauvres en nutriments, comme le sont généralement les forêts tempérées du nord-est de l'Amérique du Nord (Hodge, 2004; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). À ce titre, les macropores développés par les générations précédentes de racines constituent des microsites de choix pouvant être colonisés par les racines puisqu'ils procurent un milieu de croissance aisée, en plus d'être enrichis en éléments nutritifs et en MO provenant de la décomposition des racines mortes (Gobran *et al.*, 1999; Schottelndreier et Falkengren-Grerup, 1999). En raison de ce phénomène, la décomposition des racines mortes est l'une des principales sources de MO dans la rhizosphère de sols forestiers. Cette source de MO a le potentiel d'alimenter régulièrement ce microenvironnement puisque les racines fines d'arbres ont généralement une durée de vie variant entre trois et 72 mois (Ostonen *et al.*, 2005; Matamala *et al.*, 2003; Tierney et Fahey, 2002; Fahey et Hughes, 1994). Outre la MO, la décomposition des racines libère aussi divers nutriments comme l'azote, des cations majeurs ainsi que des métaux qui alimenteront la solution de sol de la rhizosphère (Figure 9.2 – flèches rouges). Les relations statistiques observées dans cette étude suggèrent que les concentrations totales en Cu et Zn des extraits à l'eau sont en partie régulées par ce mécanisme. Toutefois, aucune preuve directe dans cette étude ne permet d'établir que la décomposition des racines libère des quantités importantes de métaux. Néanmoins, les relations statistiques sont appuyées par des données de concentrations de

Cu et Zn mesurées dans les racines du peuplier faux-tremble ainsi que par des travaux récents réalisés à Sudbury et à Rouyn-Noranda qui soulignent l'importance de ce mécanisme sur l'apport de métaux aux sols dans les écosystèmes forestiers (Johnson et Hale, 2008; Johnson *et al.*, 2003). Des études approfondies menées en milieux contrôlés seront toutefois nécessaires pour valider l'étendue de l'effet de ce mécanisme.



**Figure 9.2.** Modèle conceptuel représentant les deux mécanismes microbiens (flèches bleues et rouges) et les principaux mécanismes chimiques (flèches noires) identifiés dans cette étude et qui influencent la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère du peuplier faux-tremble.



En lien avec le mécanisme précédent, les analyses statistiques effectuées dans le cadre de cette thèse suggèrent que les conditions de pH dans la rhizosphère sont partiellement régies par l'activité microbienne. L'étude a aussi montré qu'il s'agit du principal mécanisme par lequel les microorganismes influencent la solubilité et la spéciation du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère de sols forestiers. D'après la longueur des vecteurs de la variable  $H^+$  dans les RDA présentées aux chapitres six à huit, ce mécanisme microbien a une influence plus marquée sur Zn et Al que sur Cu. Ce résultat est en accord avec les données de spéciation présentées précédemment qui montraient que les comportements biogéochimiques de Zn et Al sont plus sensibles au pH que celui de Cu. L'influence des microorganismes sur le pH de la rhizosphère est régulée par la quantité et la forme de N assimilée par les microorganismes (Figure 9.2 – flèches bleues). L'assimilation de N par les microorganismes s'accompagne de la libération, dans la solution de sol de la rhizosphère, d'ions de charge et de polarité comparables à la forme de N ( $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ ) absorbée. Les ions ainsi libérés sont généralement  $H^+$  ou  $OH^-$  qui exercent un contrôle sur le pH de la solution de sol (Deneux-Mustin *et al.*, 2003; Hinsinger *et al.*, 2003). Dans cette étude, la magnitude de l'influence microbienne sur le pH de la rhizosphère ne peut pas être quantifiée. Néanmoins, les résultats, tout comme ceux d'autres études, semblent indiquer que les microorganismes ont un effet non négligeable sur le pH, bien qu'il soit admis que cet effet est généralement plus faible que l'influence qu'exercent le matériel parental et les plantes sur cette propriété (Fomina *et al.*, 2004; Hinsinger *et al.*, 2003; Marschner, 1998; Marschner et Römheld, 1996).

## 9.2 Originalité de la thèse

Depuis une vingtaine d'années, les études portant sur la rhizosphère ont considérablement augmenté en raison de la reconnaissance de l'importance de cette interface sur les plantes, les cycles biogéochimiques des éléments ainsi que sur les risques écologiques associés aux transferts d'éléments toxiques du sol vers les plantes (Courchesne *et al.*, 2008; Hinsinger *et al.*, 2005; McClain *et al.*, 2003). Les travaux antérieurs ont permis d'améliorer considérablement notre compréhension de la rhizosphère sans pour autant que cette interface livre tous ces secrets. La thèse actuelle procure, par son approche scientifique distincte et par le type de données présentées, de

nouvelles connaissances permettant une meilleure compréhension du fonctionnement de la rhizosphère. Elle génère aussi sa part d'interrogations.

Tout d'abord, ce travail se distingue de la majorité des travaux menés sur la rhizosphère par l'approche scientifique utilisée. À ce sujet, l'intérêt porté aux écosystèmes forestiers et plus principalement aux arbres constitue une des originalités de cette thèse puisqu'encore très peu d'études rhizosphériques sont menées dans ces écosystèmes. Ainsi, les propriétés physiques, chimiques, biologiques ainsi que les mécanismes actifs dans la rhizosphère de milieux forestiers sont encore très peu documentés. En dressant un portrait quasi-exhaustif, des propriétés des sols de la rhizosphère sous le peuplier faux-tremble, cette thèse livre une caractérisation unique de la rhizosphère des milieux forestiers. Par ailleurs, les études rhizosphériques portant sur les métaux sont généralement menées en laboratoire, là où les conditions environnementales sont contrôlées et où l'échantillonnage de la rhizosphère est plus facilement effectué. L'information sur les mécanismes rhizosphériques fournie par ces études est donc précise et peut-être obtenue à une échelle très fine. Toutefois, ces travaux de laboratoire sont peu représentatifs de la complexité du terrain et leur potentiel de généralisation est limité (Madsen, 2005; Gobran *et al.*, 1999). À l'inverse, l'échantillonnage de la rhizosphère sur le terrain est rarement effectué bien que cette approche fournisse des données de grande qualité ayant comme avantage de refléter la réalité. Dans ces conditions, le fait que l'étude actuelle intègre un échantillonnage de la rhizosphère sur le terrain pour des sols forestiers ayant des propriétés chimiques et biologiques variées et présentant un spectre de concentration en métaux constitue l'un des éléments d'originalité de ce travail. Finalement, l'utilisation de statistiques multivariées est une autre caractéristique unique de ce travail. En effet, ces outils statistiques sont encore peu répandus dans les études en pédologie, malgré leur utilisation généralisée dans les domaines de l'écologie et de la géologie depuis plusieurs années. L'environnement de la rhizosphère est éminemment complexe en raison des nombreuses interactions existant entre les phases du sol, les racines et les microorganismes. Dans ces circonstances, la présente thèse montre que les analyses statistiques multivariées peuvent fournir des informations précieuses et profitables menant à une meilleure compréhension de ce microenvironnement. Dans ce projet, les traitements statistiques multivariés ont tout

particulièrement permis de quantifier l'effet des microorganismes sur les métaux et d'identifier les liens complexes existant entre les métaux et les variables chimiques et biologiques.

L'originalité de cette thèse tient aussi aux types de données présentées. Ainsi, dans un premier temps, la documentation complète (formes mesurées et calculées) de la spéciation des métaux dans la phase liquide de sols rhizosphériques forestiers s'avère unique. En effet, de nombreuses contraintes analytiques n'avaient pas permis jusqu'à ce jour une quantification aussi complète de la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère. Ces données sont d'un grand intérêt puisque la fraction dissoute de ce microenvironnement constitue la principale voie d'entrée des métaux dans les plantes. Comme l'information relative à la spéciation des métaux a été obtenue pour trois métaux de comportements biogéochimiques différents et pour des sols rhizosphériques de propriétés physico-chimiques contrastées, les résultats présentent donc un potentiel de généralisation considérable. Finalement, la mise en évidence du rôle exercé par les microorganismes de la rhizosphère sur la spéciation du Cu, Zn et Al demeure l'un des apports les plus importants de cette thèse. En effet, dans les études rhizosphériques passées et présentes, les mécanismes microbiens ont été négligés en comparaison aux mécanismes racinaires. Ceci s'explique, d'une part, par des contraintes techniques de mesure de l'activité microbienne à l'interface sol-racine et d'autre part, par une action générale des microorganismes perçue comme moins importante que celle des racines. Les travaux de cette thèse contribuent à corriger ce biais puisqu'ils révèlent que les microorganismes exercent un contrôle significatif sur la spéciation des métaux dans la solution de sol de la rhizosphère. L'acquisition de ces nouvelles connaissances a des répercussions importantes sur les modèles conceptuels décrivant la rhizosphère qui n'offrent à ce jour qu'une place limitée aux microorganismes. D'après l'étude actuelle, cette place devrait être augmentée puisque l'activité microbienne régule de nombreux mécanismes physico-chimiques contrôlant la mobilité des métaux.

### 9.3 Limites de l'étude

Bien que ce travail soit basé sur une approche méthodologique solide et qu'il fournisse des données à la fois nouvelles et utiles à la compréhension du comportement des métaux dans la rhizosphère de sols forestiers, certaines lacunes en limitent la portée. Tout d'abord, bien que la majorité des variables environnementales soient demeurées constantes entre les sites d'échantillonnages, certaines variables présentent néanmoins des différences inter-sites importantes. Tel que démontré dans les chapitres six à huit, ces différences spatiales entre les sites d'échantillonnages régulent fortement le comportement du Cu, Zn et Al dans la rhizosphère, en influençant les propriétés chimiques et biologiques du sol. Ce résultat souligne que les relations observées entre les métaux et les variables explicatives sont structurées dans l'espace et que l'interprétation des relations statistiques doit tenir compte de cette réalité. Or, l'intégration de la dimension spatiale complique l'interprétation des relations statistiques puisque la mosaïque spatiale des milieux naturels est le résultat d'un ensemble de facteurs environnementaux. Toutefois, dans le projet actuel, les sites d'échantillonnages ont été sélectionnés de sorte que seulement certains facteurs environnementaux bien identifiés puissent différer entre les régions d'échantillonnages (p. ex. nature du matériel parental et apports atmosphériques de métaux). Cet état de fait restreint donc l'explication des différences spatiales entre les régions d'échantillonnages à ces facteurs. Néanmoins, en raison de cette influence spatiale, l'intensité et la polarité des relations statistiques observées entre les métaux et les propriétés biologiques et chimiques des sols peuvent être affectées. Pour cette raison, plusieurs interprétations sont possibles pour expliquer les liens existant entre les métaux et les propriétés des sols dans cette étude. En conséquence, les interprétations avancées dans cette thèse sont parfois présentées sous la forme d'hypothèses plutôt que comme des certitudes. Toutefois, afin que cette thèse propose les interprétations les plus justes possibles, les hypothèses retenues se sont appuyées sur les analyses statistiques de base ainsi que sur deux types d'informations complémentaires. Premièrement, la dimension spatiale a pu être éliminée de certaines analyses statistiques en produisant des analyses séparées pour chacune des deux régions d'échantillonnages ou en introduisant des covariables contrôlant les différences spatiales (voir chapitres six et sept). Cette approche permet une interprétation plus simple des relations statistiques. Deuxièmement, les hypothèses

proposées s'appuient aussi sur des données complémentaires acquises dans le cadre de ce projet (p. ex. contenu en métaux dans les racines) ainsi que sur des connaissances récentes proposées dans la littérature. L'indépendance et la convergence de ces informations confèrent une forte crédibilité aux hypothèses présentées dans ce travail. Néanmoins, les hypothèses proposées dans cette thèse devront maintenant être testées et plus complètement validées par le biais d'études menées en milieux contrôlés et ce, avant que l'on puisse confirmer l'importance de ces mécanismes dans la rhizosphère.

Deuxièmement, l'échantillonnage de la rhizosphère sur le terrain présente aussi certains désavantages. En effet, bien que la méthode utilisée dans cette thèse soit éprouvée (Courchesne *et al.*, 2006; Turpault *et al.*, 2005; Séguin *et al.*, 2004; Arocena *et al.*, 1999; Gobran et Clegg, 1996), elle permet néanmoins une séparation incomplète des sols rhizosphériques et matriciels. Ainsi, cette technique peut mener à une certaine contamination du sol rhizosphérique par de la matrice du sol (Hinsinger *et al.*, 2005). Cette contamination peut être marquée même si seulement une faible quantité de matrice de sol est intégrée à la rhizosphère, étant donné le faible volume occupé par ce microenvironnement. Ce type de contamination diminue évidemment le contraste existant sur le terrain entre ces deux compartiments du sol. Dans le projet actuel, les différences entre les propriétés de la rhizosphère et de la matrice sont généralement marquées et dans certains cas significatifs. Il n'y a donc aucune raison de croire que la séparation incomplète des compartiments de sol provoque une contamination importante du sol de la rhizosphère par des particules de la matrice. Néanmoins, il y a tout lieu de penser que les différences des propriétés des sols observées entre la rhizosphère et la matrice dans cette étude sous-estiment les différences réelles existant entre ces compartiments sur le terrain (Hinsinger *et al.*, 2005). Les différences mesurées sont donc minimales et seraient augmentées si les deux compartiments du sol pouvaient être plus efficacement séparés.

Le faible nombre d'échantillons représente la troisième limite de ce travail. Cette contrainte a une incidence directe sur la puissance des analyses statistiques effectuées et sur le pouvoir de généralisation de l'étude. Cependant, deux raisons principales expliquent pourquoi le nombre d'échantillons est limité dans ce travail. Tout d'abord, la

préparation d'un échantillon de rhizosphère pour les premières analyses de laboratoire nécessite de quatre à cinq jours de travail à un opérateur expérimenté. La durée de la préparation des échantillons s'explique par la grande minutie nécessaire lors du prélèvement des racines et du sol rhizosphérique sur le terrain. Il en va de même pour la séparation du sol et des racines dans le laboratoire. De plus, la caractérisation précise de l'activité biologique de sols échantillonnés sur le terrain impose que l'entreposage des sols dans le laboratoire soit de courte durée. Selon les normes de l'*American Society for Microbiology* (ASM), l'entreposage doit aussi s'effectuer sous les conditions d'humidité du terrain, à la noirceur, à 4 °C et ce, pour une période souhaitable d'un mois (van Elsas *et al.*, 2002). Ces conditions d'entreposage permettent d'obtenir des données qui reflètent le mieux possible la réalité du terrain. En considérant ces deux aspects, il apparaît clairement qu'il est impossible de procéder à une campagne importante d'échantillonnage de la rhizosphère sans des ressources humaines considérables. Il a néanmoins été possible d'atteindre pour ce projet un nombre d'arbres échantillonnés qui représente un compromis acceptable entre les contraintes d'échantillonnage et la qualité de l'information extraite des échantillons de sol. La justesse de cette affirmation est confirmée par les différents résultats obtenus dans cette thèse qui sont nets et soutenus par les analyses statistiques.

Finalement, le faible volume occupé par la rhizosphère dans les sols fait en sorte que les masses de sols rhizosphériques récoltées sont souvent faibles. Dans ces circonstances, un nombre restreint d'analyses de laboratoire peut être effectué sur ces sols, limitant ainsi la caractérisation pouvant être faite de ce microenvironnement et possiblement la compréhension des mécanismes qui y sont actifs. Afin de limiter cette contrainte, l'échantillonnage des sols rhizosphériques a été réalisé sur des sols forestiers de texture fine. Dans ce type de sol, le volume de sol influencé par la racine et qui adhère à celle-ci est supérieur à ce que l'on obtient dans les sols plus sableux. Ceci s'explique, entre autre, par la formation d'un plus grand nombre d'agrégats dans les sols de texture plus fine. Cette décision a permis de récolter des masses de sols secs de rhizosphère variant généralement entre 18 et 75 g et dont deux échantillons ont même atteint 81 et 95 g. Dans ces circonstances, il a été possible de caractériser, dans la rhizosphère de sols forestiers, la spéciation de trois métaux, la quasi-totalité des propriétés chimiques

majeures du sol et certaines des variables biologiques les plus instructives. Comparativement aux autres études menées sur la rhizosphère et plus spécialement celles s'étant concentrées sur les métaux présents dans la fraction dissoute du sol, la présente étude offre donc une caractérisation beaucoup plus exhaustive de la rhizosphère.

#### **9.4 Perspectives futures**

Les résultats présentés dans ce travail sont uniques et suggèrent que l'impact des microorganismes sur les mécanismes rhizosphériques régulant la spéciation des métaux est plus important qu'on le croyait préalablement. En conséquence, et afin de bonifier notre compréhension du comportement des métaux dans la rhizosphère, les résultats de cette thèse ont entraîné la formulation de trois nouvelles avenues de recherche. Premièrement, il convient de continuer à documenter la spéciation des métaux dans la rhizosphère pour différentes espèces de plantes, de couvert végétal et d'utilisation du sol en raison du peu de données disponibles. De plus, une caractérisation fine des complexes organométalliques présents dans la rhizosphère est essentielle, en particulier au niveau de l'identification de ces complexes et de la mesure de leur aptitude à se dégrader et à libérer des formes biodisponibles de métaux. Cette avenue est d'autant plus prometteuse pour des métaux comme le Cu dont la spéciation est fortement contrôlée par la MOD.

Deuxièmement, les résultats associés à cette thèse montrent l'importance du rôle que les mécanismes microbiens jouent sur la spéciation des métaux dans la rhizosphère des sols forestiers. Cette thèse ne livre cependant pas toutes les informations concernant ces mécanismes. Ainsi, une validation de l'importance de ces mécanismes dans différents écosystèmes, sous différentes espèces végétales et pour des sols variés s'impose. De plus, une démonstration détaillée du fonctionnement de ces mécanismes doit être effectuée. Une attention particulière devrait être accordée à l'identification des principales espèces microbiennes responsables des changements de spéciation des métaux. Par cette action, les efforts de recherche se concentreraient sur les espèces microbiennes d'intérêts facilitant, du même coup, la compréhension du mode d'action de ces microorganismes sur les métaux. De plus, une connaissance fine des interactions se

développant entre les racines et les microorganismes, de leur influence sur les métaux ainsi qu'une délimitation spatiale précise des zones de la rhizosphère où les microorganismes transforment les métaux permettrait aussi de mieux compléter ce portrait.

Enfin, l'étude actuelle devrait servir à stimuler la recherche dans le domaine de l'étude des risques pour les humains et les écosystèmes. En effet, il s'agit de l'un des grands défis de la recherche menée sur les métaux de la rhizosphère en raison de l'intérêt croissant des consommateurs pour le traçage alimentaire, la consommation d'aliment de qualité et pour les questions environnementales. Ainsi, il convient de savoir comment les conditions s'établissent dans la rhizosphère, notamment le contrôle exercé par l'activité microbienne, influent sur le prélèvement et l'accumulation des métaux dans les plantes (Courchesne *et al.*, 2008). L'intérêt pour ces questions s'explique par la possibilité que des transferts trop importants de métaux de la rhizosphère vers les plantes provoquent, pour les plantes comestibles, des problèmes de santé chez les humains consommant ces végétaux et, pour les plantes non comestibles, des perturbations environnementales importantes des écosystèmes. L'acquisition de ces connaissances sur le cycle biogéochimique des métaux permettra de mieux identifier les milieux à risques et de protéger plus efficacement les humains et les écosystèmes contre les excédents de métaux dans l'environnement.



## Bibliographie

---

1. Aastrup M., Iverfeldt A., Bringmark L., Kvarnas H., Thunholm B., Hultberg H. (1995) Monitoring of heavy metals in protected forest catchments in Sweden, *Water Air and Soil Pollution*, 85 (2): 755-760.
2. Adhikari M., Chakrabarti G., Hazra G. (1977) Measurement of stability constant of humic acid metal complexes, *Agrochimica*, 21: 134-139.
3. Aiking H., Stijnman A., van Garderen C., van Heerikhuizen H., van't Riet J. (1984) Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* nctc 418 growing in continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (2): 374-377.
4. Almas A.R., McBride M.B., Singh B.R. (2000) Solubility and lability of cadmium and zinc in two soils treated with organic matter, *Soil Science*, 165 (3): 250-259.
5. Amellal N., Burtin G., Bartoli F., Heulin T. (1998) Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing pantoea agglomerans strain and its effect on rhizosphere soil aggregation, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 3740-3747.
6. Anderson J.P.E., Domsch K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 10: 215-221.
7. April R., Keller D. (1990) Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States - mineralogic studies of the rhizosphere, *Biogeochemistry*, 9 (1): 1-18.
8. Arocena J.M., Glowa K.R. (2000) Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (hook.) nutt.) as revealed by soil solution composition, *Forest Ecology and Management*, 133 (1-2): 61-70.
9. Arocena J.M., Glowa K.R., Massicotte H.B., Lavkulich L. (1999) Chemical and mineral composition of ectomycorrhizosphere soils of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (hook.) nutt.) in the Ae horizon of a luvisol, *Canadian Journal of Soil Science*, 79 (1): 25-35.
10. Baath E. (1989) Effects of heavy-metals in soil on microbial processes and populations - a review, *Water Air and Soil Pollution*, 47 (3-4): 335-379.
11. Bengough A.G., Mullins C.E. (1990) Mechanical impedance to root growth: a review of experimental techniques and root growth responses, *Journal of Soil Science*, 41: 341-358.
12. Benizri E., Dedourge O., Dibattista-Leboef C., Piutti S., Nguyen C., Guckert A.

- (2002) Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure, *Applied Soil Ecology*, 21 (3): 261-265 .
13. Bennisse R., Labat M., Elasli A., Brhada F., Chandad F., Lorquin J., Liegbott P.P., Hibti M., Qatibi A.I. (2004) Rhizosphere bacterial populations of metallophyte plants in heavy metal-contaminated soils from mining areas in semiarid climate, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20 (7): 759-766.
  14. Bergkvist B. (1987) Soil solution chemistry and metal budgets of spruce forest ecosystems in S-Sweden, *Water Air and Soil Pollution*, 33 (1-2): 131-154.
  15. Bergkvist B., Folkesson L., Berggren D. (1989) Fluxes of Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, and Ni in temperate forest ecosystems - a literature review, *Water Air and Soil Pollution*, 47 (3-4): 217-286.
  16. Berthelin J., Munier-Lamy C., Leyval C. (1995) Effect of microorganisms on mobility of heavy metals in soils. In: Huang P.M., Berthelin J., Bollag J.-M., McGill W.B., Page A.L. (Eds.). *Environmental impact of soil component interactions: metals, other inorganics, and microbial activities*, CRC Press, Boca Raton, 3-17.
  17. Bloom P.R., Erich M.S. (1996) The quantitation of aqueous aluminum. In: Sposito G. (Ed.). *The environmental chemistry of aluminum*, Second edition, CRC Press, New York, 1-38.
  18. Bloom P.R., Weaver R.M., McBride M.B. (1978) The spectrophotometric and fluorometric determination of aluminum with 8-hydroxyquinoline and butyl acetate extraction, *Soils Science Society of America Journal*, 42: 713-716.
  19. Bowen G.D., Rovira A.D. (1991) The rhizosphere : the hidden half of the hidden half. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi V. (Eds.). *Plant roots: the hidden half*, Marcel Dekker, New York, 641-669.
  20. Brierley C.L. (1990) Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters, *Geomicrobiology Journal*, 8 (3-4): 201-223.
  21. Brimecombe M.J., De Leij F.A., Lynch J.M. (2001) The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (Eds.). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, New York, 95-140.
  22. Bruand A., Cousin I., Nicoullaud B., Duval O., Begon J.C. (1996) Backscattered electron scanning images of soil porosity for analyzing soil compaction around roots, *Soil Science Society of America Journal*, 60 (3): 895-901.
  23. Chaignon V., Hinsinger P. (2003) A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil, *Journal of Environmental Quality*, 32 (3): 824-833.
  24. Chaignon V., Sanchez-Neira I., Herrmann P., Jaillard B., Hinsinger P. (2003)

- Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area, *Environmental Pollution*, 123 (2): 229-238.
25. Chander K., Brookes P.C. (1991) Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 23 (10): 909-915.
  26. Chaperon S., Sauvé S. (2007) Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 39 (9): 2329-2338.
  27. Chen Y.X., Wang Y.P., Lin Q., Luo Y.M. (2005) Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*, *Environment International*, 31 (6): 861-866.
  28. Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F. (2008) Influence of microorganisms on Cu speciation in the rhizosphere of forest soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 40 (9): 2441-2451.
  29. Cloutier-Hurteau B., Sauvé S., Courchesne F. (2007) Comparing WHAM 6 and MINEQL+ 4.5 for the chemical speciation of  $\text{Cu}^{2+}$  in the rhizosphere of forest soils, *Environmental Science & Technology*, 41 (23): 8104-8110.
  30. Corti G., Agnelli A., Cuniglio R., Sanjurjo M.F., Cocco S. (2005) Characteristics of rhizosphere soil from natural and agricultural environments. In: Huang P.M., Gobran G.R. (Eds.). *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*, Elsevier, Amsterdam, 57-128.
  31. Courchesne F., Gobran G.R. (1997) Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand, *Soil Science Society of America Journal*, 61 (4): 1245-1249.
  32. Courchesne F., Turmel M.-C. (2005) Mass balance of organic carbon in the soils of forested watersheds from northeastern North America. In: Tremblay A., Varfalvy L., Roehm C., Garneau M. (Eds.). *Greenhouse gas emissions - fluxes and processes*, Springer, Berlin, 383-420.
  33. Courchesne F., Cloutier-Hurteau B., Turmel M.C. (2008) Relevance of rhizosphere research to the ecological risk assessment of trace metals in soils, *Human and Ecological Risk Assessment*, 14 (1): 54-72.
  34. Courchesne F., Kruyts N., Legrand P. (2006) Labile zinc concentration and free copper ion activity in the rhizosphere of forest soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (3): 635-642.
  35. Courchesne F., Séguin V., Dufresne A. (2001) Solid phase fractionation of metals in the rhizosphere of forest soils. In: Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E. (Eds.). *Trace elements in the rhizosphere*, CRC Press, Boca Raton, 189-206.

36. Cronan C.S., Walker W.J., Bloom P.R. (1986) Predicting aqueous aluminum concentrations in natural-waters, *Nature*, 324 (6093): 140-143.
37. Curl E.A., Truelove B. (1986) *The rhizosphere*, Springer-Verlag, Berlin.
38. Czarnes S., Hallett P.D., Bengough A.G., Young I.M. (2000) Root- and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport, *European Journal of Soil Science*, 51 (3) : 435-443.
39. Dahlgren R.A. (1994) Soil acidification and nitrogen saturation from weathering of ammonium-bearing rock, *Nature*, 368 (6474): 838-841.
40. Dandurand L.-M.C., Knudsen G.R. (1997) Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere. In: Hurst C.J., Knudsen G.R. (Eds.). *Manual of environmental microbiology*, ASM Press, Washington, 391-399.
41. Degryse F., Broos K., Smolders E., Merckx R. (2003). Soil solution concentration of Cd and Zn can be predicted with CaCl<sub>2</sub> soil extract, *European Journal of Soil Science*, 54 (1): 149-157.
42. Deneux-Mustin S., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Laplace J., Leyval C. (2003) *Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol*, TEC & DOC, Paris.
43. Derome J., Nieminen T. (1998) Metal and macronutrient fluxes in heavy-metal polluted scots pine ecosystems in SW Finland, *Environmental Pollution* , 103 (2-3): 219-228.
44. Dexter A.R. (1987) Compression of soil around roots, *Plant and Soil*, 97 (3): 401-406.
45. Dieffenbach A., Matzner E. (2000) *In situ* soil solution chemistry in the rhizosphere of mature Norway spruce (*Picea abies* [L.] karst.) trees, *Plant and Soil*, 222 (1-2): 149-161.
46. Dinkelaker B., Romheld V., Marschner H. (1989) Citric-acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L), *Plant Cell and Environment*, 12 (3): 285-292.
47. Dormaar J.F. (1988) Effect of plant-roots on chemical and biochemical-properties of surrounding discrete soil zones, *Canadian Journal of Soil Science*, 68 (2): 233-242.
48. Drever J.I., Vance G.F. (1994) Role of soil organic acids in mineral weathering processes. In: Pittman E.D., Lewan M.D. (Eds.). *Organic acids in geological processes*, Springer-Verlag, New York, 138-161.
49. Dumontet S., Diné H., Lévesque P.E.N. (1992) The distribution of pollutant heavy-metals and their effect on soil respiration and acid-phosphatase-activity in

- mineral soils of the Rouyn-Noranda region, Quebec, *Science of the Total Environment*, 121: 231-245.
50. Dumontet S., Lévesque M., Mathur S.P. (1990) Limited downward migration of pollutant metals (Cu, Zn, Ni, and Pb) in acidic virgin peat soils near a smelter, *Water Air and Soil Pollution*, 49 (3-4): 329-342.
  51. Ehrlich H.L., Brierley C.L. (1990) *Microbial mineral recovery*, McGraw-Hill Publishing, New York.
  52. Environnement Canada (2008). *Archive météorologique du Canada*, [http://www.climate.weatheroffice.ec.gc.ca/climate\\_normals/index\\_f.html](http://www.climate.weatheroffice.ec.gc.ca/climate_normals/index_f.html), dernière visite: 13 août 2008.
  53. Essington M.E. (2004) *Soil and water chemistry: an integrative approach*, CRC Press, Boca Raton.
  54. Evans L.J. (1989) Chemistry of metal retention by soils - several processes are explained, *Environmental Science & Technology*, 23 (9): 1046-1056.
  55. Fahey T.J., Hughes J.W. (1994) Fine-root dynamics in a northern hardwood forest ecosystem, Hubbard Brook experimental forest, NH, *Journal of Ecology*, 82 (3): 533-548.
  56. Fein J.B., Fowle D.A., Wightman P.G., Yee N. (2001) The effects of bacterial cell wall adsorption on mass transfer in geologic systems: metal mobilities and mineral solubilities, *biogeochemistry of trace elements*, Guelph, Canada.
  57. Fleury C. (2007). *Biodisponibilité des métaux Cd, Mg, Mn et Zn dans la rhizosphère du bouleau jaune et de l'érable à sucre d'un sol forestier*, Université de Montréal, Montréal.
  58. Florence T.M. (1986) Electrochemical approaches to trace element speciation in waters: a review, *Analyst*, 111: 489-505.
  59. Fomina M.A., Alexander I.J., Colpaert J.V., Gadd G.M. (2005) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi, *Soil Biology & Biochemistry*, 37 (5): 851-866.
  60. Fomina M., Alexander I.J., Hillier S., Gadd G.M. (2004) Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi, *Geomicrobiology Journal*, 21 (5): 351-366.
  61. Fox T.R. (1995) The influence of low-molecular-weight organic acids on properties and processes in forest soils. In: McFee W.W., Kelly J.M. (Eds.). *Carbon forms and functions in forest soils*, SSSA, Madison, 43-62.
  62. Francis A.J., Dodge C.J. (1990) Anaerobic microbial remobilization of toxic metals coprecipitated with iron oxide, *Environmental Science & Technology*, 24 (3): 373-378.

63. Fukushima M., Hasebe K., Taga M. (1992) Effect of sodium dodecyl-sulfate on the measurement of labile copper(II) species by anodic-stripping voltammetry in the presence of humic-acid, *Analytica Chimica Acta*, 270 (1): 153-159.
64. Gadd G.M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation, *Geoderma*, 122 (2-4): 109-119.
65. Ge Y., Murray P., Hendershot W.H. (2000) Trace metal speciation and bioavailability in urban soils, *Environmental Pollution*, 107 (1): 137-144.
66. Gee G.W., Bauder J.W. (1994) Particle-size analysis. In: Klute A. (Ed.). *Methods of soil analysis - part 1: physical and mineralogical methods*, Soils Science Society of America, Madison, 383-411.
67. Gobat J.-M., Aragno M., Matthey W. (1998) *Le sol vivant*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
68. Gobran G.R., Clegg S. (1996) A conceptual model for nutrient availability in the mineral soil-root system, *Canadian Journal of Soil Science*, 76 (2): 125-131.
69. Gobran G.R., Clegg S., Courchesne F. (1999) The rhizosphere and trace element acquisition in soils. In: Selim H.M., Iskandar I.K. (Eds.). *Fate and transport of heavy metals in the vadose zone*, Lewis Publishers, New York, 225-250.
70. Gobran G.R., Clegg S., Courchesne F. (1998) Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems, *Biogeochemistry*, 42 (1-2): 107-120.
71. Göttlein A., Heim A., Matzner E. (1999) Mobilization of aluminium in the rhizosphere soil solution of growing tree roots in an acidic soil, *Plant and Soil*, 211 (1): 41-49.
72. Grayston S.J. (2000) Rhizodeposition and its impact on microbial community structure and function in trees, *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 40 (4): 27-36.
73. Grayston S.J., Vaughan D., Jones D. (1996) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability, *Applied Soil Ecology*, 5 (1): 29-56.
74. Gregorich E.G., Turchenek L.W., Carter M.R., Angers D.A. (2002) *Soil and environmental science dictionary*, CRC Press, Boca Raton.
75. Grierson P.F. (1992) Organic-acids in the rhizosphere of *Banksia integrifolia* L., *Plant and Soil*, 144: 259-265.
76. Guine V., Martins J., Gaudet J.P. (2003) Facilitated transport of heavy metals by bacterial colloids in sand columns, *Journal de Physique IV*, 107: 593-596.
77. Hamon R.E., Lorenz S.E., Holm P.E., Christensen T.H., Mcgrath S.P. (1995) Changes in trace-metal species and other components of the rhizosphere during growth of radish, *Plant Cell and Environment*, 18 (7): 749-756.

78. Heinrichs H., Mayer R. (1980) The role of forest vegetation in the biogeochemical cycle of heavy-metals, *Journal of Environmental Quality*, 9 (1): 111-118.
79. Helmke P.A. (2000) The chemical composition of soils. In: Sumner M.E. (Ed.). *Handbook of soil science*, CRC Press, Boca Raton, B3-B24.
80. Hemingway B.S., Sposito G. (1996) Inorganic aluminum-bearing solid phases. In: Sposito G. (Ed.). *The environmental chemistry of aluminum*, CRC Press, New York, 81-116.
81. Hendershot W.H., Courchesne F., Jeffries D.S. (1996) Aluminum geochemistry at the catchment scale in watersheds influenced by acidic precipitation. In: Sposito G. (Ed.). *The environmental chemistry of aluminum*, CRC Press, New York, 419-449.
82. Hendershot W.H., Lalande H., Duquette M. (2008) Soil reaction and exchangeable acidity. In: Carter M.R., Gregorich E.G. (Eds.). *Soil sampling and methods of analysis*, Second edition, CRC Press, Boca Raton.
83. Hiltner L. (1904) Über neuere erfahrungen und problem auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der grundungung und brache, *Arb. Dtsch. Landwirt Ges.*, 98: 59-78.
84. Hinsinger P. (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E. (Eds.). *Trace elements in the rhizosphere*, CRC Pres, Boca Raton, 25-41.
85. Hinsinger P. (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? chemical processes involved in the rhizosphere, *Advances in agronomy*, 64: 225-265.
86. Hinsinger P., Plassard C., Jaillard B. (2006) Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry, *Journal of Geochemical Exploration*, 88 (1-3): 210-213.
87. Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W. (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes, *New Phytologist*, 168 (2): 293-303.
88. Hinsinger P., Plassard C., Tang C.X., Jaillard B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review, *Plant and Soil*, 248 (1-2): 43-59.
89. Hodge A. (2004) The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients, *New Phytologist*, 162: 9-24.
90. Hodges S.C. (1987) Aluminum speciation - a comparison of five methods, *Soil Science Society of America Journal*, 51 (1): 57-64.
91. Hue N.V., Craddock G.R., Adams F. (1986) Effect of organic-acids on aluminum toxicity in subsoils, *Soil Science Society of America Journal*, 50 (1): 28-34.
92. Insam H. (2001) Developments in soil microbiology since the mid 1960s,

*Geoderma*, 100 (3-4): 389-402.

93. IUPAC (2001) *The IUPAC stability constants database*, Academic Software.
94. James B.R., Bartlett R.J. (2000) Redox phenomena. In: Sumner M.E. (Ed.). *Handbook of soil science*, CRC Press, Boca Raton, B-169-B194.
95. James B.R., Clark C.J., Riha S.J. (1983) An 8-hydroxyquinoline method for labile and total aluminum in soil extracts, *Soil Science Society of America Journal*, 47 (5): 893-897.
96. Jobbagy E.G., Jackson R.B. (2004) The uplift of soil nutrients by plants: biogeochemical consequences across scales, *Ecology*, 85 (9): 2380-2389.
97. Joergensen R.G. (2000) Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 32 (5): 647-652.
98. Johnson D., Hale B. (2008) Fine root decomposition and cycling of Cu, Ni, Pb, and Zn at forest sites near smelters in Sudbury, ON, and Rouyn-Noranda, Qc, Canada, *Human and Ecological Risk Assessment*, 14 (1): 41-53.
99. Johnson D., Macdonald D., Hendershot W., Hale B. (2003) Metals in northern forest ecosystems: role of vegetation in sequestration and cycling, and implications for ecological risk assessment, *Human and Ecological Risk Assessment*, 9 (4): 749-766.
100. Joner E.J., Eldhuset T.D., Lange H., Frostegard A. (2005) Changes in the microbial community in a forest soil amended with aluminium *in situ*, *Plant and Soil*, 275 (1-2): 295-304.
101. Jones D.L. (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review, *Plant and Soil*, 205 (1): 25-44.
102. Jones D.L., Dennis P.G., Owen A.G., Van Hees P.A.W. (2003) Organic acid behavior in soils - misconceptions and knowledge gaps, *Plant and Soil*, 248 (1-2): 31-41.
103. Jones Jr J.B., Case W.W. (1990) Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples. In: Westerman R.L. (Ed.). *Soil testing and plant analysis*, Third edition, SSSA, Madison, 389-427.
104. Kabata-Pendias A. (2001) *Trace elements in soils and plants*, third edition, CRC Press, Boca Raton.
105. Kaiser K., Guggenberger G., Haumaier L., Zech W. (2001) Seasonal variations in the chemical composition of dissolved organic matter in organic forest floor layer leachates of old-growth scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and european beech (*Fagus sylvatica* L.) stands in northeastern Bavaria, Germany, *Biogeochemistry*, 55 (2) : 103-143.



106. Kalbitz K., Solinger S., Park J.H., Michalzik B., Matzner E. (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review, *Soil Science*, 165 (4): 277-304.
107. Kandeler E., Gerber H. (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium, *Biology and Fertility of Soils*, 6 (1): 68-72.
108. Kandeler E., Kampichler C., Horak O. (1996) influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities, *Biology and Fertility of Soils*, 23 (3) : 299-306.
109. Kandeler E., Marschner P., Tschirko D., Gahoonia T.S., Nielsen N.E. (2002) Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize, *Plant and Soil*, 238 (2): 301-312.
110. 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): 355-364.
111. Kidd P.S., Proctor J. (2000) Effects of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* roth, *Journal of Experimental Botany*, 51 (347): 1057-1066.
112. Klose S., Tabatabai M.A. (1999) Urease activity of microbial biomass in soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 31 (2): 205-211.
113. Knight B., Zhao F.J., Mcgrath S.P., Shen Z.G. (1997) Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution, *Plant and Soil*, 197 (1): 71-78.
114. Krishnamurti G.S.R., Naidu R. (2002) Solid-solution speciation and phytoavailability of copper and zinc in soils, *Environmental Science & Technology*, 36 (12): 2645-2651.
115. Kurek E., Czaban J., Bollag J.-M. (1982) Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents, *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1011.
116. Lakshman S., Mills R., Patterson H., Cronan C. (1993) Apparent differences in binding-site distributions and aluminum(III) complexation for 3 molecular-weight fractions of a coniferous soil fulvic-acid, *Analytica Chimica Acta*, 282 (1): 101-108.
117. Lalonde H., Hendershot W.H. (1986) Aluminum speciation in some synthetic systems - comparison of the fast-oxine, pH 5.0 extraction and dialysis methods, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43 (1): 231-234.

118. Lambert J., Buddrus J., Burba P. (1995) Evaluation of conditional stability-constants of dissolved aluminum humic substance complexes by means of Al-27 nuclear-magnetic-resonance, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 351 (1): 83-87.
119. Landeweert R., Hoffland E., Finlay R.D., Kuyper T.W., van Breemen N. (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals, *Trends in Ecology & Evolution*, 16 (5): 248-254.
120. Legendre P., Legendre L. (1998) *Numerical ecology*, second edition, Elsevier Science, Amsterdam.
121. Legrand P., Turmel M.-C., Sauvé S., Courchesne F. (2005) Speciation and bioavailability of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in the rhizosphere of contaminated soils. In: Huang P.M., Gobran G.R. (Eds.). *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*, Elsevier, Amsterdam, 261-300.
122. Lepp N.W. (1992) Uptake and accumulation of metals in bacteria and fungi. In: Adriano D.C. (Ed.). *Biogeochemistry of trace metals*, Lewis Publishers, Boca Raton.
123. Leyval C., Berthelin J. (1991) Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of pine, *Soil Science Society of America Journal*, 55 (4): 1009-1016.
124. Leyval C., Joner E.J. (2001) Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In: Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E. (Eds.). *Trace elements in the rhizosphere*, CRC Press, Boca Raton, 165-185.
125. Likens G.E., Bormann F.H. (1995) *Biogeochemistry of a forested ecosystem*, Second edition, Springer-Verlag, New York.
126. Likens G.E., Driscoll C.T., Buso D.C., Siccama T.G., Johnson C.E., Lovett G.M., Fahey T.J., Reiners W.A., Ryan D.F., Martin C.W., Bailey S.W. (1998) The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook, *Biogeochemistry*, 41 (2): 89-173 .
127. Lin Q., Brookes P.C. (1999) An evaluation of the substrate-induced respiration method, *Soil Biology & Biochemistry*, 31 (14): 1969-1983.
128. Lindsay W.L. (1979) *Chemical equilibria in soils*, John Wiley & Sons, New York.
129. Lindsay W.L., Walthall P.M. (1996) The solubility of aluminum in soils. In: Sposito G. (Ed.). *The environmental chemistry of aluminum*, CRC Press, New York, 333-361.
130. Lombi E., Wenzel W.W., Gobran G.R., Adriano D.C. (2001) Dependency of phytavailability of metal on indigenous and induced rhizosphere processes: a review. In: Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E. (Eds.). *Trace elements in the rhizosphere*, CRC Press, Boca Raton, 165-185.

131. Lorenz S.E., Hamon R.E., Holm P.E., Domingues H.C., Sequeira E.M., Christensen T.H., Mcgrath S.P. (1997) Cadmium and zinc in plants and soil solutions from contaminated soils, *Plant and Soil*, 189 (1): 21-31.
132. Luster J., Yang A., Sposito G. (1993) On the interpretation of labile aluminum as determined by reaction with 8-hydroxyquinoline, *Soil Science Society of America Journal*, 57 (4): 976-980.
133. Lynch J.M. (1990) Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch J.M. (Ed.). *The rhizosphere*, John Wiley & Sons, New York, 1-10.
134. Ma J.F. (2005) Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24 (4): 267-281.
135. Macdonald J.D., Hendershot W.H. (2006) Modelling trace metal partitioning in forest floors of northern soils near metal smelters, *Environmental Pollution*, 143 (2): 228-240.
136. Machado A.A.S.C., Dasilva J.C.G.E., Maia J.A.C. (1994) Multiwavelength analysis of synchronous fluorescence-spectra of the complexes between a soil fulvic-acid and Cu(II), *Analytica Chimica Acta*, 292 (1-2): 121-132.
137. Madsen E.L. (2005) Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes, *Nature Reviews Microbiology*, 3 (5): 439-446.
138. Marschner H. (1998) Soil-root interface: biological and biochemical processes. In: Huang P.M. (Ed.). *Soil chemistry and ecosystem health*, SSSA Special Publication #52, Madison, 191-231.
139. Marschner H., Römheld V. (1996) Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi V. (Eds.). *Plant roots: the hidden half*, Second edition, Marcel Dekker, New York, 557-579.
140. Martin R.R., Naftel S.J., Macfie S., Skinner W., Courchesne F., Séguin V. (2004) Time of flight secondary ion mass spectrometry studies of the distribution of metals between the soil, rhizosphere and roots of *Populus tremuloides* Michx growing in forest soil, *Chemosphere*, 54 (8): 1121-1125.
141. Matamala R., Gonzalez-Meler M.A., Jastrow J.D., Norby R.J., Schlesinger W.H. (2003) Impacts of fine root turnover on forest NPP and soil C sequestration potential, *Science*, 302 (5649): 1385-1387.
142. McBride M.B. (1994) *Environmental chemistry of soils*, Oxford University Press, New York.
143. McBride M.B. (1989) Reactions controlling heavy metal solubility in soils, *Advances in Soil Science*, 10: 1-56.

144. McClain M.E., Boyer E.W., Dent C.L., Gergel S.E., Grimm N.B., Groffman P.M., Hart S.C., Harvey J.W., Johnston C.A., Mayorga E., McDowell W.H., Pinay G. (2003) Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems, *Ecosystems*, 6 (4): 301-312.
145. McGrath S.P. (2002) Bioavailability of metals to soil microbes. In: Allen H.E. (Ed.). *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants*, SETAC Press, New York, 69-87.
146. McGrath S.P., Shen Z.G., Zhao F.J. (1997) Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils, *Plant and Soil*, 188 (1): 153-159.
147. McHale M.R., Burns D.A., Lawrence G.B., Murdoch P.S. (2007) Factors controlling soil water and stream water aluminum concentrations after a clearcut in a forested watershed with calcium-poor soils, *Biogeochemistry*, 84 (3): 311-331.
148. Meers E., Unamuno V.R., Du Laing G., Vangronsveld J., Vanbroekhoven K., Samson R., Diels L., Geebelen W., Ruttens A., Vandegehuchte M., Tack F.M.G. (2006) Zn in the soil solution of unpolluted and polluted soils as affected by soil characteristics, *Geoderma*, 136 (1-2): 107-119.
149. Meharg A.A. (2003) The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations, *Mycological Research*, 107: 1253-1265.
150. Mertens J., Degryse F., Springael D., Smolders E. (2007) Zinc toxicity to nitrification in soil and soilless culture can be predicted with the same biotic ligand model, *Environmental Science & Technology*, 41 (8): 2992-2997.
151. Michalzik B., Kalbitz K., Park J.H., Solinger S., Matzner E. (2001) Fluxes and concentrations of dissolved organic carbon and nitrogen - a synthesis for temperate forests, *Biogeochemistry*, 52 (2): 173-205.
152. Miller R.M. (1995) Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils, *Environmental Health Perspectives*, 103: 59-62.
153. Moore T.R., Dalva M. (1997) Methane and carbon dioxide exchange potentials of peat soils in aerobic and anaerobic laboratory incubations, *Soil Biology & Biochemistry*, 29 (8): 1157-1164.
154. Mota A.M., Correia Dos Santos M.M. (1995) Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters: electrochemical methods. In: Tessier A., Turner D.R. (Eds.). *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, IUPAC Series, New York, 205-257.
155. Munier-lamy C., Adrian P., Berthelin J. (1991) Fate of organo-heavy metal-complexes of sludges from domestic wastes in soils - a simplified modelization, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 31-2: 527-538.

156. Newman D.K., Banfield J.F. (2002) Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems, *Science*, 296 (5570): 1071-1077.
157. Nguyen C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls, *Agronomie*, 23 (5-6): 375-396.
158. Nolan A.L., Lombi E., McLaughlin M.J. (2003a) Metal bioaccumulation and toxicity in soils - why bother with speciation?, *Australian Journal of Chemistry*, 56 (2-3): 77-91.
159. Nolan A.L., McLaughlin M.J., Mason S.D. (2003b) Chemical speciation of Zn, Cd, Cu, and Pb in pore waters of agricultural and contaminated soils using Donnan dialysis, *Environmental Science & Technology*, 37 (1): 90-98.
160. Nriagu J.O. (1989) A global assessment of natural sources of atmospheric trace-metals, *Nature*, 338 (6210): 47-49.
161. Osterberg R., Wei S.Q. (1999) Solution interaction of humic acids with calcium ions involves a two-phase system, *Acta Chemica Scandinavica*, 53 (11): 974-984.
162. Ostonen I., Lohmus K., Pajuste K. (2005) Fine root biomass, production and its proportion of npp in a fertile middle-aged Norway spruce forest: comparison of soil core and ingrowth core methods, *Forest Ecology and Management*, 212 (1-3): 264-277.
163. Palmer D.A., Bell J.L.S. (1994) Aluminum speciation and equilibria in aqueous-solution .4: a potentiometric study of aluminum acetate complexation in acidic nacl brines to 150-degrees C, *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 58 (2): 651-659.
164. Paul E.A., Clark F.E. (1996) *Soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, San Diego.
165. Pennanen T. (2001) Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH - a summary of the use of phospholipid fatty acids, biolog ® and <sup>3</sup>H-thymidine incorporation methods in field studies, *Geoderma*, 100 (1-2): 91-126.
166. Phillips R.P., Fahey T.J. (2006) Tree species and mycorrhizal associations influence the magnitude of rhizosphere effects, *Ecology*, 87 (5): 1302-1313.
167. Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (2001) The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (Eds.). *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Marcel Dekker, Marcel Dekker, New York, 1-17.
168. Powell H.K.J., Fenton E. (1996) Size fractionation of humic substances: effect on protonation and metal binding properties, *Analytica Chimica Acta*, 334 (1-2): 27-38.

169. Powell H.K.J., Town R.M. (1992) Solubility and fractionation of humic-acid - effect of ph and ionic medium, *Analytica Chimica Acta*, 267 (1): 47-54.
170. Prescott, Harley, Klein (1995) *Microbiologie*, De Boeck Université, Bruxelles.
171. R Foundation (2003). *R language*, <http://www.r-project.org>, v. 2.4.1, dernière visite: 5 septembre 2008.
172. Rachou J., Gagnon C., Sauvé S. (2007) Use of an ion-selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices, *Environmental Chemistry*, 4 (2): 90-97.
173. Read D.B., Gregory P.J. (1997) Surface tension and viscosity of axenic maize and lupin root mucilages, *New Phytologist*, 137 (4): 623-628.
174. Read D.B., Bengough A.G., Gregory P.J., Crawford J.W., Robinson D., Scrimgeour C.M., Young I.M., Zhang K., Zhang X. (2003) Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil, *New Phytologist*, 157 (2): 315-326.
175. Roane T.M., Pepper I.L., Miller R.M. (1996) Microbial remediation of metals. In: Crawford R.L., Crawford D.L. (Eds.). *Bioremediation: principles and applications*, Cambridge University Press, New York, 312-340.
176. Ryan D.K., Weber J.H. (1982) Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability-constants of fulvic-acid, *Analytical Chemistry*, 54 (6): 986-990.
177. Sandnes A., Eldhuset T.D., Wollebaek G. (2005) Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch, *Soil Biology & Biochemistry*, 37 (2): 259-269.
178. Sauvé S. (2003) The role of chemical speciation in bioavailability. In: Naidu R., Gupta V.V.S.R., Rogers S., Kookana R.S., Bolan N.S., Adriano D.C. (Eds.). *Bioavailability, toxicity and risk relationships in ecosystems*, Science Publishers, Enfield, 59-82.
179. Sauvé S. (2002) Speciation of metals in soils. In: Allen H.E. (Ed.). *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants*, SETAC Press, New York, 7-37.
180. Sauvé S., Hendershot W., Allen H.E. (2000a) Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter, *Environmental Science & Technology*, 34 (7): 1125-1131.
181. Sauvé S., McBride M., Hendershot W. (1998a) Soil solution speciation of lead (II): effects of organic matter and pH, *Soil Science Society of America Journal*, 62 (3): 618-621.
182. Sauvé S., McBride M.B., Hendershot W.H. (1995) Ion-selective electrode

- measurements of copper(II) activity in contaminated soils, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29 (3): 373-379.
183. Sauvé S., Cook N., Hendershot W.H., McBride M.B. (1996) Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils, *Environmental Pollution*, 94 (2): 153-157.
  184. Sauvé S., Dumestre A., McBride M., Hendershot W. (1998b) Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (8): 1481-1489.
  185. Sauvé S., McBride M.B., Norvell W.A., Hendershot W.H. (1997) Copper solubility and speciation of *in situ* contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter, *Water Air and Soil Pollution*, 100 (1-2): 133-149.
  186. Sauvé S., Norvell W.A., McBride M., Hendershot W. (2000b) Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions, *Environmental Science & Technology*, 34 (2): 291-296.
  187. Schecher W.D. (2001) *Thermochemical data used in MINEQL+ version 4.5*, Environmental Research Software, Hallowell, ME.
  188. Schecher W.D., McAvoy D.C. (2003) *MINEQL+ : a chemical equilibrium program for personal computers - user's manual*, Environmental Research Software, Hallowell, USA.
  189. Schecher W.D., McAvoy D.C. (1992) MINEQL+ - a software environment for chemical-equilibrium modeling, *Computers, Environment and Urban Systems*, 16 (1): 65-76.
  190. Schiewer S., Volesky B. (2000) Biosorption processes for heavy metal removal. In: Lovley D.R. (Ed.). *Environmental microbe-metals interactions*, ASM Press, Washington D.C., 329-362.
  191. Schottelndreier M., Falkengren-Grerup U. (1999) Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity, *Plant and Soil*, 209 (2): 297-309.
  192. Schwab A.P. (2000) The soil solution. In: Sumner M.E. (Ed.). *Handbook of soil science*, CRC Press, Boca Raton, B85-B122.
  193. Séguin V., Gagnon C., Courchesne F. (2004) Changes in water extractable metals, pH and organic carbon concentrations at the soil-root interface of forested soils, *Plant and Soil*, 260 (1-2): 1-17.
  194. Séguin V., Courchesne F., Gagnon C., Martin R.R., Naftel S.J., Skinner W. (2005) Mineral weathering in the rhizosphere of forested soils. In: Huang P.M., Gobran G.R. (Eds.). *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*, Elsevier, Amsterdam, 29-55.

195. Shen Y., Ström L., Jonsson J.A., Tyler G. (1996) Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus sylvatica* L) Cambisols determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique, *Soil Biology & Biochemistry*, 28 (9): 1163-1169.
196. Shoukry M.M., Khairy E.M., Saeed A. (1988) Ternary complexes of copper(II) involving diethylenetriamine and their role in the promotion of hydrolysis of alpha-amino-acid esters, *Transition Metal Chemistry*, 13 (5): 379-383.
197. Silver S. (1998) Genes for all metals - a bacterial view of the periodic table - the 1996 Thom award lecture, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20 (1): 1-12.
198. Skjemstad J.O., Baldock J.A. (2008) Total and organic carbon. In: Carter M.R., Gregorich E.G. (Eds.). *Soil sampling and methods of analysis*, Second edition, CRC Press, Boca Raton, 225-237.
199. Smith W.H. (1976) Character and significance of forest tree root exudates, *Ecology*, 57: 324-331.
200. Smith W.H., Pooley A.S. (1989) Red spruce rhizosphere dynamics - spatial-distribution of aluminum and zinc in the near-root soil zone, *Forest Science*, 35 (4): 1114-1124.
201. Smolders E., McLaughlin M.J. (1996a) Chloride increases cadmium uptake in swiss chard in a resin-buffered nutrient solution, *Soil Science Society of America Journal*, 60 (5): 1443-1447.
202. Smolders E., McLaughlin M.J. (1996b) Effect of Cl on Cd uptake by swiss chard in nutrient solutions, *Plant and Soil*, 179 (1): 57-64.
203. So L.M., Chu L.M., Wong P.K. (2003) Microbial enhancement of Cu<sup>2+</sup> removal capacity of *Eichhornia crassipes* (mart.), *Chemosphere*, 52 (9): 1499-1503.
204. Soil Classification Working Group (1998) *The canadian system of soil classification*, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa.
205. Solorzano L., Sharp J.H. (1980) Determination of total dissolved nitrogen in natural-waters, *Limnology and Oceanography*, 25 (4): 751-754.
206. Sparks D.L. (1995) *Environmental soil chemistry*, Academic Press, San Diego.
207. Sposito G. (1989) *The chemistry of soils*, Oxford University Press, New York.
208. Starr M., Lindroos A.J., Ukonmaanaho L., Tarvainen T., Tanskanen H. (2003) Weathering release of heavy metals from soil in comparison to deposition, litterfall and leaching fluxes in a remote, boreal coniferous forest, *Applied Geochemistry*, 18 (4): 607-613.
209. Ste-Marie C., Paré D. (1999) Soil, pH and n availability effects on net nitrification



- in the forest floors of a range of boreal forest stands, *Soil Biology & Biochemistry*, 31 (11): 1579-1589.
210. Steer J., Harris J.A. (2000) Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*, *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 869-878.
  211. Stephan C.H., Courchesne F., Hendershot W.H., McGrath S.P., Chaudri A.M., Sappin-Didier V., Sauvé S. (2008) Speciation of zinc in contaminated soils, *Environmental Pollution*, 155: 208-216.
  212. Strobel B.W. (2001) Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution - a review, *Geoderma*, 99 (3-4): 169-198.
  213. Strobel B.W., Hansen H.C.B., Borggaard O.K., Andersen M.K., Raulund-Rasmussen K. (2001) Composition and reactivity of doc in forest floor soil solutions in relation to tree species and soil type, *Biogeochemistry*, 56 (1): 1-26.
  214. Ström L. (1997) Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants, *Oikos*, 80 (3): 459-466.
  215. Ström L., Owen A.G., Godbold D.L., Jones D.L. (2001) Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates, *Soil Biology & Biochemistry*, 33 (15): 2125-2133.
  216. Swift M.J., Heal O.W., Anderson J.M. (1979) *Decomposition in terrestrial ecosystems*, University of California Press, Berkeley.
  217. Tabatabai M.A. (1994) Soil enzymes. In: Weaver R.W., Angle S., Bottomley P. (Eds.). *Methods of soil analysis : part 2- microbiological and biochemical properties*, SSSA #5, Madison , 775-833 .
  218. Tan H., Champion J.T., Artiola J.F., Brusseau M.L., Miller R.M. (1994) Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant, *Environmental Science & Technology*, 28 (13): 2402-2406.
  219. Tani M., Higashi T., Nagatsuka S. (1993) Dynamics of low-molecular-weight aliphatic carboxylic-acids (LACAs) in forest soils .1: amount and composition of LACAs in different types of forest soils in Japan, *Soil Science and Plant Nutrition*, 39 (3): 485-495.
  220. Tao S., Chen Y.J., Xu F.L., Cao J., Li B.G. (2003) Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil, *Environmental Pollution*, 122 (3): 447-454.
  221. Tao S., Liu W.X., Chen Y.J., Cao J., Li B.G., Xu F.L. (2005) Fractionation and bioavailability of copper, cadmium and lead in rhizosphere soil. In: Huang P.M., Gobran G.R. (Eds.). *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*, Elsevier, Amsterdam, 313-336.

222. Tarafdar J.C., Jungk A. (1987) Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus, *Biology and Fertility of Soils*, 3: 199-204.
223. ter Braak C. J. F., Smilauer P. (1998) *CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide : software for canonical community ordination*, v. 4.5, Biometris, Ithaca.
224. Tierney G.L., Fahey T.J. (2002) Fine root turnover in a northern hardwood forest: a direct comparison of the radiocarbon and minirhizotron methods, *Canadian Journal of Forest Research*, 32 (9): 1692-1697.
225. Tipping E. (2005) Modelling Al competition for heavy metal binding by dissolved organic matter in soil and surface waters of acid and neutral pH, *Geoderma*, 127 (3-4): 293-304.
226. Tipping E. (1998) Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances, *Aquatic Geochemistry*, 4 (1): 3-48.
227. Tipping E. (1994) WHAM - a chemical-equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site electrostatic model of ion-binding by humic substances, *Computers & Geosciences*, 20 (6): 973-1023.
228. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (3): 782-787.
229. Turpault M.P., Uterano C., Boudot J.P., Ranger J. (2005) Influence of mature douglas fir roots on the solid soil phase of the rhizosphere and its solution chemistry, *Plant and Soil*, 275 (1-2): 327-336.
230. Ukonmaanaho L., Starr M., Mannio J., Ruoho-Airola T. (2001) Heavy metal budgets for two headwater forested catchments in background areas of Finland, *Environmental Pollution*, 114 (1): 63-75.
231. US EPA (1998) Microwave assisted acid digestion for sediments and soil, SW 3051-A, Washington DC.
232. van Breemen N., Finlay R., Lundstrom U., Jongmans A.G., Giesler R., Olsson M. (2000) Mycorrhizal weathering: a true case of mineral plant nutrition?, *Biogeochemistry*, 49 (1): 53-67.
233. van Elsas J.D., Smalla K., Lilley A.K., Bailey M.J. (2002) Methods for sampling soil microbes. In: Hurst C.J. (Ed.). *Manual of environmental microbiology*, ASM Press, Washington, 505-515.
234. Van Hees P.A.W., Jones D.L., Finlay R., Godbold D.L., Lundstrom U.S. (2005) The carbon we do not see - the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review, *Soil Biology &*

*Biochemistry*, 37 (1): 1-13.

235. Vance G.F., Stevenson F.J., Sikora F.J. (1996) Environmental chemistry of aluminum-organic complexes. In: Sposito G. (Ed.). *The environmental chemistry of aluminum*, Lewis Publishers, New York, 169-220.
236. Vandenhooop M.A.G.T., Vanleeuwen H.P. (1993) Stripping voltammetry of heavy-metal-(bio) polyelectrolyte complexes .1: influence of supporting electrolyte, *Analytica Chimica Acta*, 273 (1-2): 275-287.
237. Violante A., Ricciardella M., Pigna M., Capasso R. (2005) Effects of organic ligands on the adsorption of trace elements onto metals oxides and organo-mineral complexes. In: Huang P.M., Gobran G.R. (Eds.). *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*, Elsevier, Amsterdam, 157-182.
238. Voigt A., Hendershot W.H., Sunahara G.I. (2006) Rhizotoxicity of cadmium and copper in soil extracts, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (3): 692-701.
239. Voroney R.P., Brookes P.C., Beyaert R.P. (2008) Soil microbial biomass C, N, P and S. In: Carter M.R., Gregorich E.G. (Eds.). *Soil sampling and methods of analysis*, Second edition, CRC Press, Boca Raton, 637-651.
240. Vulkan R., Zhao F.J., Barbosa-Jefferson V., Preston S., Paton G.I., Tipping E., Mcgrath S.P. (2000) Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils, *Environmental Science & Technology*, 34 (24): 5115-5121.
241. Wang X.P., Zabowski D. (1998) Nutrient composition of douglas-fir rhizosphere and bulk soil solutions, *Plant and Soil*, 200 (1): 13-20.
242. Wang Z.W., Shan X.Q., Zhang S.Z. (2002) Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils, *Chemosphere*, 46 (8): 1163-1171.
243. Wang C.M., Zhu B., Li H.L. (1999) Theoretical analysis and determination of the heterogeneous stability constant of copper(II) humic acids complex at chemically modified carbon paste electrode, *Electroanalysis*, 11 (3) : 183-187.
244. Weng L.P., Temminghoff E.J.M., Lofts S., Tipping E., Van Riemsdijk W.H. (2002) Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil, *Environmental Science & Technology*, 36 (22): 4804-4810.
245. Whiting S.N., De Souza M.P., Terry N. (2001) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*, *Environmental Science & Technology*, 35 (15): 3144-3150.
246. Whittaker R.H., Likens G.E., Bormann F.H., Eaton J.S., Siccama T.G. (1979) Hubbard Brook ecosystem study - forest nutrient cycling and element behavior, *Ecology*, 60 (1): 203-220.

247. Whittig L.D., Allardice W.R. (1994) X-ray diffraction techniques. In: Klute A. (Ed.). *Methods of soil analysis: part 1 - physical and mineralogical methods*, Soil Science Society of America, Madison, 331-362.
248. Wolf M., Teichmann G., Hoque E., Szymczak W., Schimmack W. (1999) Copper speciation in aqueous solutions of fulvic acid and related molecular weight distributions, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 363 (5-6): 596-599.
249. Yanai R.D., Majdi H., Park B.B. (2003) Measured and modelled differences in nutrient concentrations between rhizosphere and bulk soil in a Norway spruce stand, *Plant and Soil*, 257 (1): 133-142.
250. Young I.M. (1998) Biophysical interactions at the root-soil interface: a review, *Journal of Agricultural Science*, 130: 1-7.
251. Zhao L.Y.L., Schulin R., Nowack B. (2007) The effects of plants on the mobilization of Cu and Zn in soil columns, *Environmental Science & Technology*, 41 (8): 2770-2775.

**Annexe A - Autorisation de rédiger la thèse sous forme  
d'articles**

## **Annexe B - Permissions des éditeurs**

# JOURNAL PUBLISHING AGREEMENT

Elsevier Ltd

## YOUR DETAILS

Article: Influence of Microorganisms on Cu Speciation in the Rhizosphere of Forest Soils  
Corresponding author: Mr. Benoit Cloutier-Hurteau  
Journal: Soil Biology and Biochemistry  
Our Reference: SBB3926  
PII: S0038-0717(08)00195-8  
DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.06.006

## YOUR STATUS

I am one author signing on behalf of all co-authors of the manuscript

## FUNDING

The underlying research reported in the article was not funded by any of the listed funding bodies

## DATA PROTECTION

I do not wish to receive news, promotions and special offers about products and services from Elsevier Ltd and its affiliated companies worldwide.

## ASSIGNMENT OF PUBLISHING RIGHTS

I hereby assign to Elsevier Ltd the copyright in the manuscript identified above (government authors not electing to transfer agree to assign a non-exclusive licence) and any supplemental tables, illustrations or other information submitted therewith that are intended for publication as part of or as a supplement to the manuscript (the "Article") in all forms and media (whether now known or hereafter developed), throughout the world, in all languages, for the full term of copyright, effective when and if the article is accepted for publication. This transfer includes the right to provide the Article in electronic and online forms and systems.

## RETENTION OF RIGHTS FOR SCHOLARLY PURPOSES

I understand that I retain or am hereby granted (without the need to obtain further permission) rights to use certain versions of the Article for certain scholarly purposes, as described and defined below ("Retained Rights"), and that no rights in patents, trademarks or other intellectual property rights are transferred to the journal. The Retained Rights include the right to use the Pre-print or Accepted Authors Manuscript for Personal Use, Internal Institutional Use and for Scholarly Posting; and the Published Journal Article for Personal Use and Internal Institutional Use.

## AUTHOR WARRANTIES / ETHICS AND DISCLOSURE

I affirm the Author Warranties noted below, and confirm that I have reviewed and complied with the relevant Instructions to Authors, the Ethics in Publishing policy, and Conflicts of Interest disclosure. For further information see the journal home page or [elsevier.com](http://elsevier.com).

### Author warranties

The article I have submitted to the journal for review is original, has been written by the stated authors and has not been published elsewhere.

The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under review by this journal.

The article contains no libellous or other unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights of any other person or entity.

I have obtained written permission from copyright owners for any excerpts from copyrighted

works that are included and have credited the sources in my article.

If the article was prepared jointly with other authors, I have informed the co-author(s) of the terms of this publishing agreement and that I am signing on their behalf as their agent, and I am authorized to do so.

## FUNDING AGENCY REQUIREMENTS AND OTHER POLICIES

I have also been made aware of the journal's policies with respect to funding agency requirements such as the NIH 'PublicAccess' policy, and the rapid publication 'ArticlesInPress' service. See [elsevier.com](http://elsevier.com) for details.

For more information about the definitions relating to this agreement click [here](#).

**I have read and agree to the terms of the Journal Publishing Agreement.**

**12th June 2008**

T-copyright-v13/2008