



**HAL**  
open science

# Etude du rôle de la végétation dans le cycle biogéochimique du magnésium : Approche isotopique

Bolou Emile Bolou Bi

► **To cite this version:**

Bolou Emile Bolou Bi. Etude du rôle de la végétation dans le cycle biogéochimique du magnésium : Approche isotopique. Sciences de la Terre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10077 . tel-01748320

**HAL Id: tel-01748320**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748320>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de Nancy-Université en Géosciences**

par

**BOLOU BI Bolou Emile**

# Etude du rôle de la végétation dans le cycle biogéochimique du magnésium : approche isotopique

soutenue publiquement le 23/10/2009 devant le jury composé de :

<b>M. François CHABAUX</b>	Professeur, Université Louis Pasteur	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Louis A. DERRY</b>	Associate Professor, Cornell University	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Corinne LEYVAL</b>	Directeur de Recherche, LIMOS	<b>Directrice de thèse</b>
<b>Mme Anne POSZWA</b>	Maître de conférences, Nancy université	<b>Co-directrice de thèse</b>
<b>Mme Nathalie VIGIER</b>	Chargé de Recherche, CRPG	<b>Co-directrice de thèse</b>
<b>M. Etienne DAMBRINE</b>	Directeur de Recherche, INRA	<b>Examineur</b>
<b>M. Jean Dominique MEUNIER</b>	Directeur de Recherche, CEREGE	<b>Examineur</b>
<b>M. Albert YAO-KOUAME</b>	Professeur, Université de Cocody-Abidjan	<b>Examineur</b>



LIMOS

Laboratoire des Interactions Microorganismes-  
Minéraux-Matière Organique dans les Sols,  
Nancy-Université, Faculté des Sciences et Techniques  
Boulevard des Aiguillettes, BP 70-239  
F-54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex

15 rue Notre Dame des Pauvres F-54501  
VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex

*A mes parents,*

*A Clarisse,*

# Remerciements

*A la fin de ce travail de thèse, je ne cesse de me ressasser le long chemin parcouru durant ces 4 années!! Années durant lesquelles les premiers moments de joie et d'excitation des premiers résultats ont fait place au fur et à mesure à des moments de doute et de remise en question. Mais, comme le dit un proverbe de la Côte d'Ivoire "Qui s'instruit sans agir et sans douter, laboure sans semer". Il a fallu donc tenir bon jusqu'à la production de ce mémoire.*

*Je tiens donc à adresser toute ma gratitude à mes directrices de thèse, à Corinne Leyval, pour avoir accepté de diriger ce travail, à Anne Poszwa et Nathalie Vigier, pour leur confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail. Je les remercie pour leur soutien et pour m'avoir fait partager leur expérience. Enfin, je leur adresse toute ma reconnaissance, pour leur patience (car je sais que j'ai été parfois tête en l'air), leur disponibilité et leur participation à la rédaction des articles.*

*Mes remerciements s'adressent à Ms. Etienne Dambrine, Louis Derry, François Chabaux, Jean-Dominique Meunier et Yao-Kouamé Albert qui, malgré leurs emplois du temps chargés, se sont intéressés à ce travail et ont accepté de le juger. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.*

*Un travail de thèse s'inscrivant dans une équipe, un laboratoire, je remercie très chaleureusement tous les membres des deux laboratoires qui se reconnaîtront dans ce travail. Merci à tous les thésards et thésardes des laboratoires ! Un grand merci à Hervé Marmier, pour les analyses chimiques au LIMOS et je me dois de rendre hommage à Delphine Yéghichyan, au CRPG, dont la porte de la salle d'analyse ne m'a jamais été fermée. Merci Delphine ! Je remercie également Philippe Telouk à l'ENS, de Lyon, pour avoir sacrifié certains de ses weekends sur l'autel de la science pour m'assister dans les analyses isotopiques ! Et Je n'oublie pas Jean-Pierre Boudot, au LIMOS, pour les campagnes d'échantillonnage. Dommage que je n'ai jamais pu monter en raquette ! Il faut croire que durant toutes ces années la nature a été clémente à mon égard !*

*Un grand merci au personnel administratif des deux laboratoires, Aurélie, Odile et Catherine au CRPG et Dominique, Chantal et Laetitia, au LIMOS, pour leur efficacité et gentillesse. J'exprime également toute ma reconnaissance au professeur Jacques Berthelin sans lequel ma venue, que dis-je notre venue à Jeanne et moi, en France n'aurait pas été possible, au Gouvernement de la République de Côte d'Ivoire, qui m'a accordé une bourse d'étude pour mon séjour en France pendant la période de la thèse.*

*Je n'aurai garde d'oublier ma seconde famille dans les Vosges, les famille Parisse (Fabien, Alexandra, Camille et Louane) à Vincey, Valette (Frédéric, Mickaëlle, Maxime, Cécile et Axel) à Nomexy, et Martine Balland, à la Verrerie de Portieux, pour les agréables moments, ces weekends extraordinaires passés ensemble et la légende continue ! Je remercie très chaleureusement la famille Devisme, Jeanne (ma jumelle dans les études en France), au petit Simon (mon homonyme!!!) et Olivier (le seul et authentique ivoirien "francisé") pour leur soutien et leur aide, à la famille Louvel (Brice et Elsa) qui n'ont jamais hésité à nous inviter en Normandie, de même qu'à la rue des Carmes à Nancy, pour partager de bons moments! Je remercie également tous mes amis de la diaspora ivoirienne, les familles Gballet, Koffi, Adou et Traoré, de même qu'à Cheick Jean-Jacques et Isabelle, Merci à vous !*

*Enfin, je ne saurais terminer ces propos sans dire un grand merci à ma fée, avec qui, pour moi tout devient possible et qui m'a accompagné durant toute ma thèse. Spéciale dédicace à toi ma tendre épouse Clarisse, MPC, pour ton soutien, ta patience et tes encouragements dans les moments les plus difficiles !*

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION GENERALE

<b>I. Contexte général de l'étude</b> .....	1
<b>II. Références bibliographiques</b> .....	7

## CYCLE CONTINENTAL DU MAGNESIUM ET DE SES ISOTOPES

<b>I. Généralités sur le magnésium</b> .....	9
I-1. Propriétés et distribution du magnésium .....	9
I-2. Système isotopique du magnésium .....	11
I-2.1. Généralités sur les isotopes.....	11
I-2.2. Abondance des isotopes naturels du Mg .....	12
I-2.3. Théorie des fractionnements des isotopes stables .....	13
I-2.3.1. Notations .....	13
I-2.3.2. Mode de fractionnement des isotopes stables et application au Mg	14
<i>Fractionnement isotopique à l'équilibre</i> .....	16
<i>Fractionnement isotopique cinétique</i> .....	18
<i>Applications au magnésium</i> .....	19
<b>II. Cycle biologique du magnésium</b> .....	20
II-1. Prélèvement racinaire.....	20
II-1.1. De la solution du sol à la surface racinaire .....	21
II-1.2. De la surface racinaire à l'intérieur de la racine .....	21
II-1.2.1 Migration des cations de la surface racinaire aux sites d'absorption .....	22
II-1.2.2. Passage des cations à travers la membrane cellulaire des racines .....	22
II-1.2.3 Rôle de l'adsorption dans le prélèvement racinaire des cations .....	24
II-2. Translocation, distribution et rôles physiologiques du Mg .....	27
II-2.1. Translocation et distribution du Mg .....	27
II-2.2. Rôles physiologiques du Mg dans la plante .....	29
II-2.3. Effet des cations sur le cycle interne du Mg .....	30
II-3. Restitution du Mg des plantes .....	31
<b>III. Variation naturelles des compositions isotopiques du Mg des roches continentales aux rivières</b> .....	34
III-1. Estimation de la composition isotopique de la croûte continentale .....	34
III-2. Des roches continentales aux rivières .....	36
III-2.1. Rôle de l'altération des minéraux et de la lithologie .....	36
III-2.2. Premières estimations du fractionnement isotopique du Mg lors de la croissance de plante .....	39
III-3. Des rivières aux océans .....	41
<b>IV. Références bibliographiques</b> .....	43

## PROCEDURES ET DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES

Introduction .....	48
<b>I. Mesures des compositions isotopiques du magnésium</b> .....	<b>49</b>
I-1. Analyse isotopique par MC ICP-MS .....	49
I-1.1. Principe général de fonctionnement .....	49
I-1.2. Résolution et interférences .....	53
I-1.3 Fractionnement instrumental .....	54
<b>II. Séparation chimique du Magnésium</b> .....	<b>57</b>
II-1. Chimie séparative des isotopes du Mg .....	57
II-2. Développement de la chimie séparative du Mg des échantillons de plantes et de roches granitiques .....	60
<b>III. Protocole de chimie : "Magnesium Isotope composition of natural Reference Materials"</b> .....	<b>66</b>
Abstract .....	67
French abstract .....	67
Introduction .....	68
Samples and analytical methods .....	69
Reference materials .....	69
Samples digestion procedure .....	69
Ion exchange chromatographic separation .....	69
Major and trace element analyses .....	71
Magnesium isotopes measurements .....	71
Results and Discussion .....	72
Total procedure blank, Mg fraction purity and chemistry yield .....	72
Reproducibility and accuracy .....	74
Magnesium isotope analyses of new reference materials .....	77
<i>Continental crust silicates: diorite and granite</i> .....	77
<i>Weathering products: soil (TILL1) and river water (SRM 640)</i> .....	77
<i>Plants and organic matter</i> .....	78
Conclusion .....	79
Acknowledgements .....	79
References .....	79
<b>IV. Systèmes expérimentaux des cultures des plantes</b> .....	<b>82</b>
IV-1 Composition de la solution nutritive et choix des plantes .....	82
IV-2 Stérilisation des graines et tests de germination .....	84
IV-3 Cultures sur substrats solides .....	85
IV-3.1. Culture avec des sources de Mg minérales facilement altérables .....	85
IV-3.2. Culture avec des sources minérales silicatées .....	87
IV-4. Cultures hydroponiques .....	87
<b>V. Conclusion</b> .....	<b>89</b>
<b>VI. Références bibliographiques hors article</b> .....	<b>90</b>



## DETERMINATION DES FRACTIONNEMENTS ISOTOPIQUES DU MAGNESIUM LORS DE LA CROISSANCE EXPERIMENTALE DES PLANTES

<b>I. Résumé de l'étude</b> .....	92
I-1. Contexte et objectifs de l'étude .....	92
II-2. Matériel et méthodes .....	92
I-3. Principaux résultats .....	93
<b>II. "Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth"</b> .....	94
Abstract .....	95
1. Introduction .....	96
2. Materials and Methods .....	98
2.1. Plants, material and growth conditions .....	98
2.1.1. Hydroponic cultures .....	99
2.1.2. Mineral cultures .....	100
2.1.3. Root immersion in pure Mg solution .....	100
2.2. Chemical analysis and Mg isotope measurements .....	101
3. Results .....	101
3.1. Plant growth and magnesium concentration .....	101
3.2. Mg isotope compositions .....	106
4. Discussion .....	109
4.1. Root level processes .....	111
4.2. Shoot level processes .....	114
4.3. Implications for Mg biogeochemical cycle.....	116
5. Conclusion .....	118
Acknowledgements .....	119
6. References .....	120

## ROLE DE LA VEGETATION SUR LES COMPOSITIONS ISOTOPIQUES DU MAGNESIUM DES EAUX ET DES SOLS DANS LE BASSIN VERSANT DU VAL DE SENONES

<b>I. Résumé de l'étude</b> .....	128
I-1. Contexte et objectifs de l'étude .....	128
II-2. Matériel et méthodes .....	129
I-2.1. Site d'étude .....	129
I-2.1. Echantillonnage et analyse .....	129
I-3. Résultats .....	130
I-3.1. Plantes .....	130
I-3.1. Sols, solutions de sol et ruisseau .....	131
<b>II. "Magnesium and strontium isotope systematics in the Senones catchment (Vosges Mountains): role of vegetation"</b> .....	132
1. Introduction .....	133
2. Materials and Methods .....	134

2.1. Site description .....	135
2.2. Sampling and analytical techniques .....	136
2.2.1. Rock, soil and extraction of the exchangeable Mg .....	136
2.2.2. Bulk precipitations, soil solutions and stream water.....	136
2.2.3. Vegetation .....	137
2.2. Magnesium separation procedure and isotope measurements .....	137
2.2.5. Strontium separation procedure and isotope measurements .....	138
3. Results .....	138
3.1. Soil profile and bedrock .....	138
3.1.1. Mineralogy, major elements and Sr.....	138
3.1.2. Exchangeable fractions .....	141
3.1.3. Mg and Sr isotope compositions.....	144
3.2. Water samples .....	144
3.2.1. Precipitations.....	144
3.2.2. Soil solutions .....	147
3.2.3. Streamwater .....	148
3.3. Vegetation .....	149
3.3.1. Spruce .....	149
3.3.2. Grass and organic layer .....	152
4. Discussion .....	152
4.1. Role of vegetation .....	153
4.1.1. Mg isotope systematic in plants .....	153
4.1.2. Effect of Mg biocycling on soil solution and bulk soil Mg isotope compositions .....	155
4.2. Effect of weathering process on Mg isotope composition of soil .....	156
4.3. Streamwater .....	157
5. Conclusion .....	159
Acknowledgements.....	160
6. References.....	160

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

<b>I. Synthèse des résultats obtenus</b> .....	165
<b>II. Comparaison avec les autres systèmes isotopiques "non traditionnels"</b> .....	167
<b>III. Conclusions générales et perspectives</b> .....	173
<b>IV. Références bibliographiques</b> .....	176

## ANNEXES

*Annexe 1 : Liste des figures et liste des tableaux*

*Annexe 2 : Analyse des plantes*

*Annexe 3 : Analyse des sols*

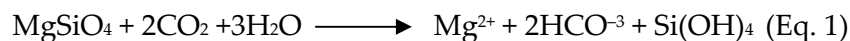
*Annexe 4 : Article 1*

*Annexe 2 : Article 2*

# **Introduction Générale**

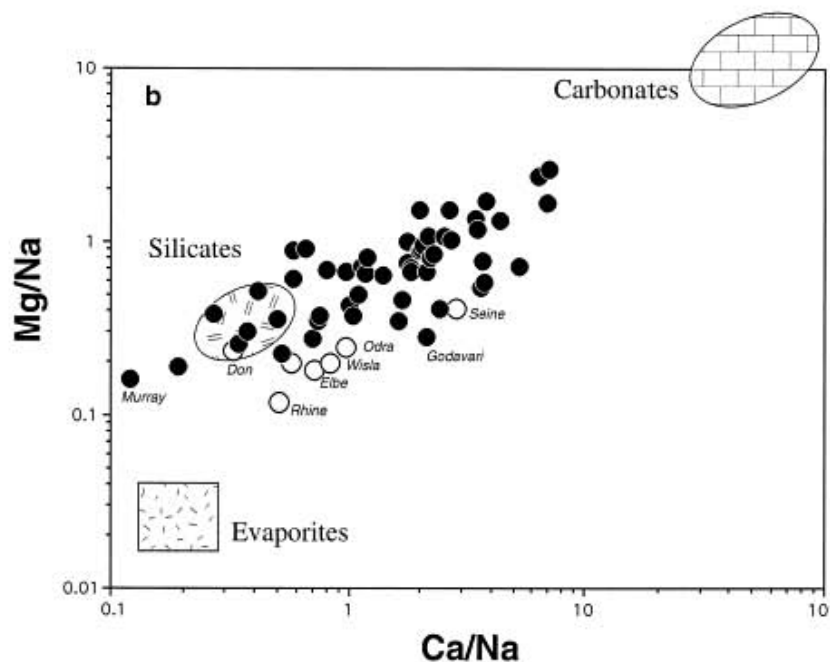
## I. Contexte général et objectifs de la thèse

La connaissance des cycles biogéochimiques globaux des éléments, notamment celui du carbone, est essentielle pour comprendre et prédire l'évolution des climats au cours des temps géologiques. Le cycle du carbone est intimement lié à celui d'autres éléments chimiques. Au niveau planétaire, la composition de l'atmosphère en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est naturellement contrôlée par l'équilibre entre un apport continu de ce gaz et une consommation de celui-ci, pendant les diverses étapes de son cycle biogéochimique. Sur les continents, l'altération et l'érosion des silicates de magnésium (Mg) et de calcium (Ca) sont des mécanismes qui influent directement sur le cycle du carbone. En effet, l'altération de ces silicates consomme du CO<sub>2</sub>, et libère ces cations selon la réaction type suivante :



Les cations issus de ces réactions d'altération sont exportés, sous forme dissoute ou particulaire, vers les océans où ils s'accumuleront dans les sédiments sous forme de carbonates. Sur une importante échelle de temps, cette séquence peut être considérée comme un puits du CO<sub>2</sub> atmosphérique, participant ainsi à la régulation du climat de la Terre.

Le transfert des cations issus de l'altération des roches est réalisé via les fleuves vers les océans. Les déterminations qualitative et quantitative des flux de cations dissous et ceux exportés sous forme particulaire par les fleuves sont donc importantes pour estimer les taux d'altération, et modéliser le CO<sub>2</sub> consommé. A l'échelle mondiale, les fleuves drainent différentes roches sources de Mg et de Ca. De nombreuses études géochimiques ont ainsi cherché à déterminer la proportion relative de chacune des sources aussi bien à une échelle locale que mondiale (ex. Berner *et al.*, 1983; Gaillardet *et al.*, 1999; Krishnaswami and Singh, 1998; Noh *et al.*, 2009; Quade *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008). Ces études utilisent classiquement comme méthodes les rapports de concentrations en éléments (normalisés au sodium (Na)) ou des isotopes du strontium. Les sources mises en évidence sont essentiellement les silicates continentaux et les carbonates (Figure 0-1) (ex. Berner *et al.* 1983 ; Gaillardet *et al.* 1999). Dans ces études, la contribution potentielle de la biomasse continentale est négligée. Plus généralement, l'impact des plantes sur les flux de Mg et Ca n'est pas ou très peu quantifié. Pourtant, les plantes constituent, à plus d'un titre, un des principaux acteurs de la régulation du climat à travers des mécanismes directs (incorporation du CO<sub>2</sub> dans la biomasse par la photosynthèse) et indirects (augmentation du taux d'altération des roches).



**Figure 0-1** : Exemple de détermination des sources carbonatées, silicatées et d'évaporites altérées dans les plus grands bassins mondiaux (Gaillardet *et al.* 1999)

Les plantes captent le gaz carbonique pour leur croissance à travers les stomates à la surface de leurs feuilles. A ce titre, la photosynthèse est un mécanisme également considéré comme puits de CO<sub>2</sub>. Ainsi, les plantes, depuis leur apparition au Silurien, stockent le carbone du CO<sub>2</sub> absorbé dans leur biomasse. Des études montrent à travers des modèles que le stock de carbone dans la biomasse végétale terrestre a augmenté de 0 à 700 GT au cours des temps géologiques (ex. Peng *et al.*, 1998 ; Otto *et al.* 2002). Ces études concluent donc que cette augmentation du stockage de CO<sub>2</sub> dans les plantes est liée à l'augmentation de la biomasse végétale depuis l'apparition des végétaux jusqu'à nos jours où elle atteint 740 x 10<sup>9</sup> t.

Parallèlement, cette augmentation de la biomasse végétale continentale contribue à la consommation du CO<sub>2</sub> de l'atmosphère, car elle accroît le taux d'altération des silicates et induit une libération plus importante des cations (ex. Andrews *et al.*, 2008; Berner *et al.*, 2003; Moulton *et al.*, 2000). L'apparition des plantes vasculaires (fin Dévonien) coïncide avec une baisse du CO<sub>2</sub> atmosphérique (Berner et Kothaval, 2001). La principale caractéristique des plantes vasculaires est le développement des racines dans les milieux de croissance. L'enracinement profond provoque la fracturation mécanique des roches. Ceci entraîne une augmentation de la surface spécifique d'attaque et de dissolution des roches par les eaux acides, ainsi que des zones de circulation préférentielle de l'eau. Indirectement, l'altération chimique des minéraux est donc accentuée. Des effets biochimiques directs sont aussi constatés lors du développement des racines. En symbioses avec les microorganismes

(mycorhize, rhizobium), les racines excrètent des protons, des acides organiques et des chélates (ex. Dakora et Phillips, 2002; Haynes, 1990; Hinsinger, 1998; Marschner *et al.*, 1986). Ces substances acides contribuent alors à l'altération des minéraux et à la libération des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes. Une partie des cations libérés est ainsi absorbée, puis stockée dans la biomasse végétale. Ces cations sont progressivement restitués au sol la dégradation plus ou moins rapide, et complète des litières. Par ce jeu du prélèvement, stockage et recyclage plus ou moins différé des éléments, on peut s'attendre à un impact des plantes sur le cycle des cations à l'échelle d'un sol ou d'un bassin versant. Toutefois, l'estimation dans les rivières des flux des cations issus du recyclage par la végétation demeure très complexe. En effet, les cations issus de la dégradation de la litière passent en solution sous forme soluble. Ils sont alors difficilement dissociables des cations solubles provenant des autres sources ultimes (minéraux primaires et secondaires, apports atmosphériques).

La géochimie isotopique, basée sur la mesure et l'interprétation des variations fines de compositions isotopiques des éléments chimiques, est un outil majeur en développement, aussi bien pour la compréhension des processus biogéochimiques que pour la détermination de l'origine des éléments. L'utilisation des isotopes du Sr permet, par exemple, dans un écosystème forestier (1) de déterminer les contributions respectives de chaque source ultime aux cations des eaux et des plantes (ex. Blum *et al.*, 2008; Drouet *et al.*, 2005; Drouet *et al.*, 2007; Poszwa *et al.*, 2003) et (2) de mettre en évidence des processus biologiques comme une altération ou un recyclage spécifique (Poszwa *et al.*, 2004). Dans l'étude des cycles globaux des cations, l'utilisation des isotopes a connu de grandes avancées technologiques, et on est désormais capables de mesurer, de façon précise, les compositions d'isotopes stables d'éléments chimiques de la croûte continentale et de la végétation (Si, Ca, Mg, Fe, Zn).

Parmi ces éléments dont on peut caractériser la signature isotopique, le magnésium (Mg) est un élément très intéressant pour trois raisons principales :

- (1) en effet, tel que développé dans les paragraphes précédents, son cycle biogéochimique à une échelle globale, est intimement lié à celui du carbone ;
- (2) il est présent en quantité très variable dans un certain nombre de minéraux primaires et secondaires, et n'est pas sensible aux conditions d'oxydoréduction ;
- (3) c'est un élément nutritif pour les organismes vivants, essentiel pour la croissance des plantes. Il est incorporé dans les végétaux en tant qu'élément structurant de la chlorophylle et des pectines, ou en tant qu'élément fonctionnel dans l'activité photosynthétique, l'activation et le transfert des enzymes du métabolisme énergétique.

Il possède trois isotopes stables  $^{24}\text{Mg}$  ;  $^{25}\text{Mg}$  et  $^{26}\text{Mg}$ , avec une différence de masse relative importante (de 8%). La dynamique du Mg au cours de son cycle biogéochimique est contrôlée par des processus bio-physicochimiques. Lorsque le Mg dissous, issu de l'altération des minéraux, n'est pas assimilé par les plantes, il est soit intégré dans des phases minérales secondaires, soit drainé par les eaux vers les fleuves et les océans. Il a été récemment démontré que les compositions isotopiques du Mg de divers échantillons (ex. carbonates, silicates, eaux) sont significativement différentes. Ainsi, leur utilisation a récemment permis de contraindre et quantifier certains processus biogéochimiques associés à son cycle (ex. Galy *et al.*, 2002; Tipper *et al.*, 2006a et b; Tipper *et al.*, 2008; Brenot *et al.*, 2008 ; Black *et al.*, 2008). Cependant, aucune de ces études ne prend réellement en compte l'éventuel rôle de la végétation sur les fractionnements isotopiques observés au cours de l'altération des phases silicatées.

**Le principal objectif de la thèse a donc été de tester les isotopes du Mg comme traceurs de processus associés à la présence et à l'activité des végétaux terrestres et susceptible d'influencer les flux de Mg dans les sols et les eaux.**

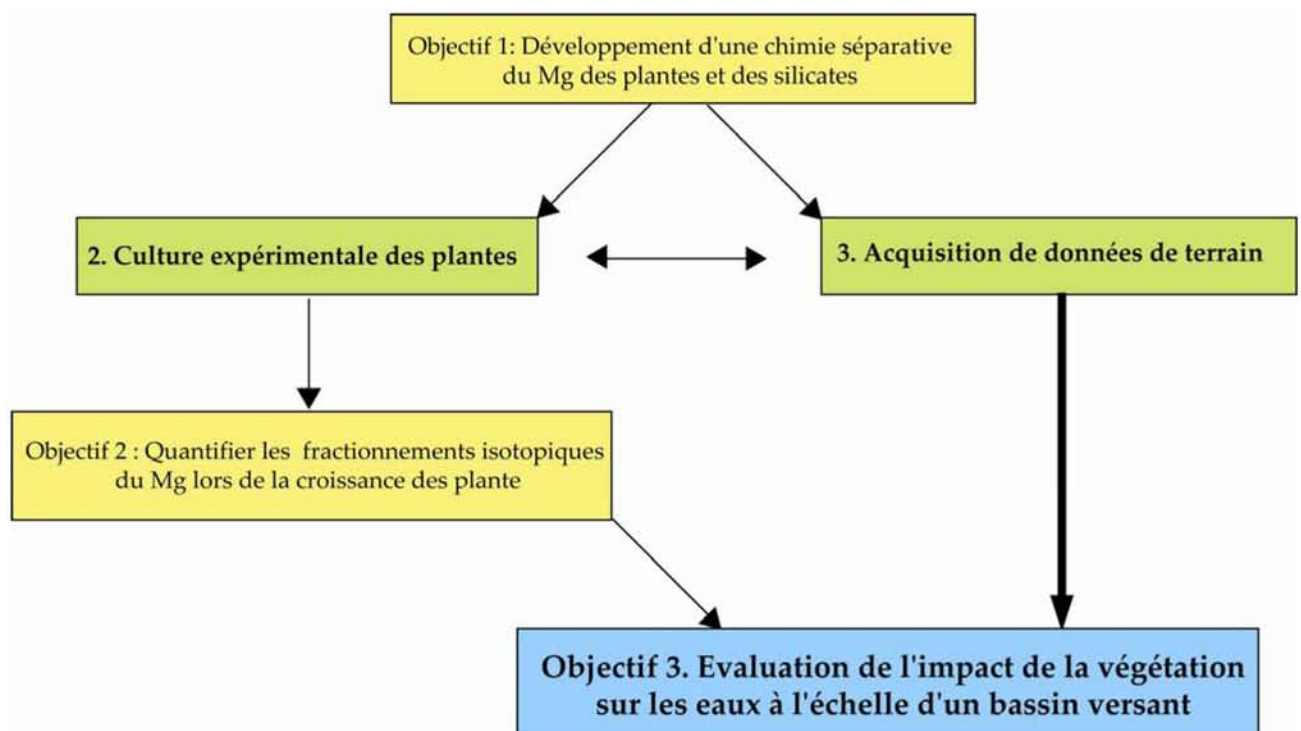
Pour atteindre cet objectif, certaines contraintes analytiques ou scientifiques ont amené à découper cette étude en un certain nombre d'étapes successives essentielles. La démarche scientifique adoptée au cours de ce travail de thèse est résumée par la Figure 0-2.

(1) Les mesures des isotopes du Mg sont réalisées sur une fraction pure de Mg. Ceci nécessite, préalablement, une séparation chimique du Mg de l'échantillon. Avant le début de ce travail de thèse, les procédures publiées étaient généralement adaptées aux échantillons carbonatés et à l'eau de mer. Ces procédures étaient inadéquates pour la purification rapide du Mg d'échantillons de roches riches en alcalins et de plantes. **Le premier objectif de ce travail de thèse a donc été de développer une technique de séparation des isotopes du Mg adaptée pour une large gamme d'échantillons dont les plantes**, de valider cette technique sur des standards internationaux, et de proposer de nouveaux matériaux de référence pour les plantes, sols et roches typiques de la croûte continentale.

(2) Les études d'écosystèmes complexes sur le terrain ont certains inconvénients. Elles nécessitent souvent un échantillonnage et un nombre de mesures conséquents, et l'interprétation des résultats est parfois difficile, car les mécanismes mis en jeu sont nombreux. Ainsi, pour déconvoluer les différents signaux, les systèmes expérimentaux, plus simples, paraissent idéaux. Ils permettent également de tester l'existence de fractionnements isotopiques mesurables lors de processus ciblés. **Le deuxième objectif de la thèse a donc été**

d'investiguer le fractionnement isotopique du Mg lors de la croissance de plantes, d'identifier quels mécanismes les provoquent, et de voir si ces fractionnements variaient selon l'espèce de plante et la disponibilité en Mg dans le milieu nutritif.

(3) Un site monolithologique (sol sur grès), instrumenté depuis quelques années pour un suivi de la qualité biologique et chimique de ses eaux de surface, a été étudié. Sur une parcelle située en haut du bassin versant de Senones (Vosges, France), les compositions isotopiques du Mg ont été mesurées dans divers échantillons (plantes, horizons de sols, solutions de sol et eaux du ruisseau à l'exutoire). **L'objectif de cette étude était de confirmer les résultats expérimentaux et d'étudier l'impact des fractionnements biologiques sur le milieu, à l'échelle d'un sol et d'un bassin versant.**



**Figure 0-2 :** Représentation schématique de la démarche scientifique et des objectifs spécifiques de ce travail de thèse.

Le présent mémoire de thèse, qui rend compte des résultats du travail réalisé, s'organise en quatre chapitres, correspondant aux principaux objectifs définis. La première partie intitulée "**Cycle continental du Mg et de ses isotopes**", aborde les différents aspects de la problématique de la thèse. L'état des connaissances sur le système isotopique du Mg y est synthétisé, de même que le cycle biologique du Mg dans la plante. Puis, sont présentées et discutées les connaissances actuelles sur les variations des compositions isotopiques du Mg lors de son passage des roches aux eaux de surface et aux océans.



Le second chapitre traite des **aspects analytiques développés** au cours de ce travail. La précision et la validité analytique des mesures des rapports isotopiques du Mg des échantillons sont apparues à la fois comme une clé de la réussite et essentiels pour l'acquisition de l'ensemble des données. Une grande partie des travaux a donc été consacrée au développement d'une chimie séparative du Mg. Elle présente, après une description précise du développement de la chimie séparative, le protocole analytique retenu sous la forme d'un article publié à *Geostandards and Geoanalytical Research*, 2009, Volume 33, pp. 95-109, sous le titre de "*Magnesium isotope compositions of natural reference materials*". Puis, ce chapitre traite du développement et de l'optimisation des cultures et des dispositifs de croissance expérimentale de plantes, utilisés pour la suite de la thèse.

Le troisième chapitre, intitulé "**Détermination des fractionnements isotopiques du Mg lors de la croissance expérimentale des plantes**", aborde la quantification des fractionnements isotopiques du Mg lors de la croissance, en conditions contrôlées, de deux espèces végétales. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article accepté pour publication à la revue *Geochimica et Cosmochimica Acta*.

Le quatrième chapitre traite **du rôle de la végétation sur la composition isotopique des eaux et des sols dans un petit bassin versant mono lithologique du Val de Senones (Vosges)**. Il présente et discute des compositions isotopiques du Mg des compartiments des sols, des plantes et des eaux en milieu naturel, à l'échelle d'un bassin versant. Les résultats sont également présentés sous forme d'un manuscrit qui devra faire l'objet d'une publication.

Les principaux résultats sont synthétisés dans la conclusion générale. Parallèlement, les applications possibles et les limites de cette approche isotopique, suggérées par les résultats obtenus, sont discutées et comparées à d'autres systèmes isotopiques. Enfin quelques perspectives sont proposées.

Des annexes complètent le document. Ce sont la liste des figures et tableaux (Annexe 1), les données d'analyses des plantes (Annexe 2), des sols et roches (Annexe 3) et deux articles dans lesquels je suis impliqué, et qui sont en lien avec la thématique développée dans cette thèse (Annexe 4 et 5). Le premier est la synthèse des travaux réalisés au LIMOS par Balland Clarisse et traite des mécanismes d'altération des silicates par les bactéries par divers approches dont les isotopes du Mg. Le second publiée dans *Soil Biology & Biochemistry* synthétise des travaux réalisés pendant mon DEA à l'INRA de Montpellier. Il traite de la variabilité des espèces végétales dans l'excrétion de protons lors de leur croissance en relation avec l'altération des phosphates dans les sols.

## II. Références bibliographiques

- Andrews, M. Y., Ague, J. J., and Berner, R. A., 2008. Weathering of soil minerals by angiosperm and gymnosperm trees. *Mineral Mag* 72, 11-14.
- Berner, E. K., Berner, R. A., and Moulton, K. L., 2003. Plants and mineral weathering: present and past. *Treatise on Geochemistry* 5, 169-188.
- Berner, R. A. and Kothaval, Z., 2001. GEOCARB III: A revised model of atmospheric CO<sub>2</sub> over Phanerozoic Time. *American Journal of Science* 301, 182-204.
- Berner, R. A., Lasaga, A. C., and Garrels, R. M., 1983. The carbonate-silicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *Am J Sci* 283, 641-683.
- Black, J. R., Epstein, E., Rains, W. D., Yin, Q. Z., and Casey, W. H., 2008. Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental Science Technology* 42, 7831-7836.
- Blum, J., Dasch, A., Hamburg, S., Yanai, R., and Arthur, M., 2008. Use of foliar Ca/Sr discrimination and <sup>87</sup>Sr/<sup>86</sup>Sr ratios to determine soil Ca sources to sugar maple foliage in a northern hardwood forest. *Biogeochemistry* 87, 287-296.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J., and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Dakora, F. D. and Phillips, D. A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245, 35-47.
- Drouet, T., Herbauts, J., Gruber, W., and Demaiffe, D., 2005. Strontium isotope composition as a tracer of calcium sources in two forest ecosystems in Belgium. *Geoderma* 126, 203-223.
- Drouet, T., Herbauts, J., Gruber, W., and Demaiffe, D., 2007. Natural strontium isotope composition as a tracer of weathering patterns and of exchangeable calcium sources in acid leached soils developed on loess of central Belgium. *European Journal of Soil Science* 58, 302-319.
- Gaillardet, J., Dupré, B., Louvat, P., and Allègre, C. J., 1999. Global silicate weathering and CO<sub>2</sub> consumption rates deduced from the chemistry of large rivers. *Chemical Geology* 159, 3-30.
- Galy, A., Bar-Matthews, M., Halicz, L., and O'Nions, R. K., 2002. Mg isotopic composition of carbonate: insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters* 201, 105-115.
- Haynes, R. J., 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126, 247-264.
- Hinsinger, P., 1998 How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64, 225-265.
- Krishnaswami, S. and Singh, S., 1998. Silicate and carbonate weathering in the drainage basins of the Ganga-Ghaghara-Indus head waters: Contributions to major ion and Sr isotope geochemistry. *Journal of Earth System Science* 107, 283-291.
- Marschner, H., Römheld V., Horst W. J., and Martin P., 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149, 441-456.
- Moulton, K. L., West, J., and Berner, R. A., 2000. Solute flux and mineral mass balance approaches to the quantification of plant effects on silicate weathering. *American Journal of Science* 300, 539-570.

- Noh, H., Huh, Y., Qin, J., and Ellis, A., 2009. Chemical weathering in the Three Rivers region of Eastern Tibet. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 1857-1877.
- Otto, D., Rasse, D., Kaplan, J., Warnant, P., and Francois, L., 2002. Biospheric carbon stocks reconstructed at the Last Glacial Maximum: comparison between general circulation models using prescribed and computed sea surface temperatures. *Global and Planetary Change* 33, 117-138.
- Peng, C. H., Guiot, J., and Van Campo, E., 1998. Estimating changes in terrestrial vegetation and carbon storage: using palaeoecological data and models. *Quaternary Science Reviews* 17, 719-735.
- Poszwa A, Wickman T, Dupouey JL, Helle G, Schleser G, Ferry B, Dambrine E, Breda N (2003) : A retrospective isotopic study of spruce forest decline in the Vosges Mountains (France). *Water Air Soil Pollution* 3 : 201-222
- Poszwa, A., Ferry, B., Dambrine, E., Pollier, B., Wickman, T., Loubet, M., and Bishop, K., 2004. Variations of Ca and Sr concentrations and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  isotopic ratio variation in boreal forest ecosystems: Role of biocycling and depth of root uptake. *Biogeochemistry* 67, 1-20.
- Quade, J., English, N., and DeCelles, P. G., 2003. Silicate versus carbonate weathering in the Himalaya: a comparison of the Arun and Seti River watersheds. *Chemical Geology* 202, 275-296.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2006a. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters* 247, 267-279.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Tipper, E. T., Galy, A., Gaillardet, J., Bickle, M. J., Elderfield, H., and Carder, E. A., 2006b. The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters* 250, 241-253.
- Wu, L., Huh, Y., Qin, J., Du, G., and van Der Lee, S., 2005. Chemical weathering in the Upper Huang He (Yellow River) draining the eastern Qinghai-Tibet Plateau. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 5279-5294.
- Wu, W., Xu, S., Yang, J., and Yin, H., 2008. Silicate weathering and  $\text{CO}_2$  consumption deduced from the seven Chinese rivers originating in the Qinghai-Tibet Plateau. *Chemical Geology* 249, 307-320.

**Cycle continental du magnésium et  
de ses isotopes**

# Introduction

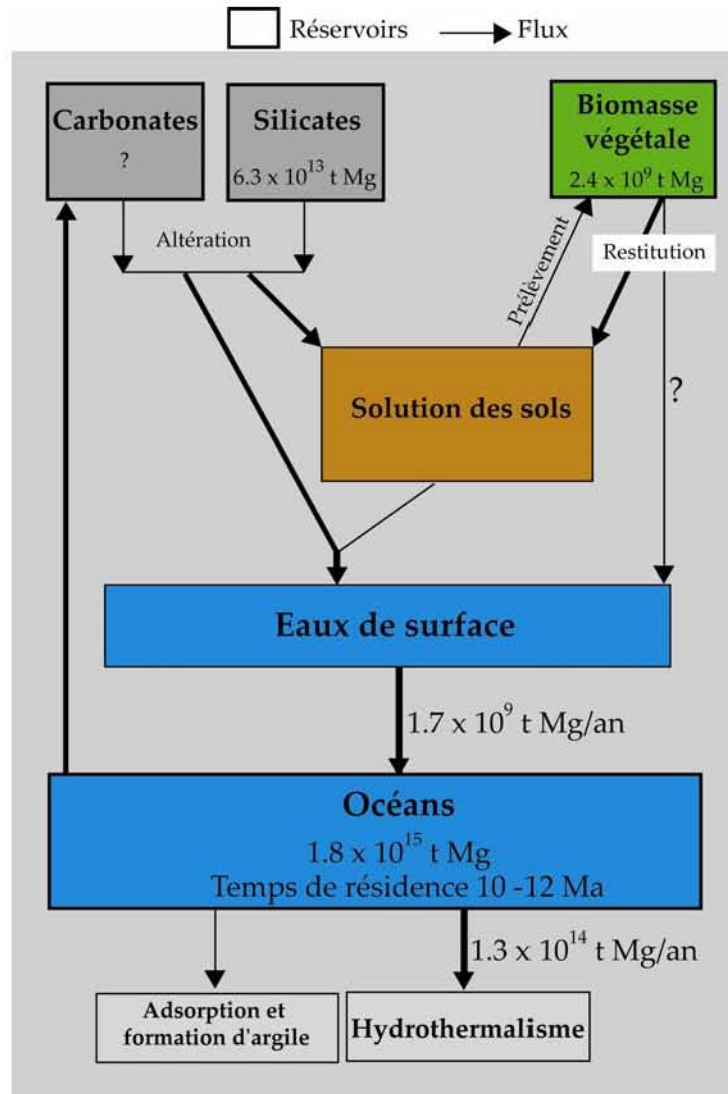
Le magnésium est un élément essentiel au fonctionnement des écosystèmes naturels via son cycle géochimique et biologique. La détermination précise de ses sources dans les eaux de surface demeure un challenge, du fait de sa relation directe avec le cycle du carbone. Il possède trois isotopes susceptibles de fractionner lors des processus de basses températures. Des études récentes montrent que ses isotopes pourraient alors être un outil prometteur, aidant à la caractérisation (1) des sources du Mg dans les eaux de surface et (2) de certains processus biogéochimiques impliquant le Mg dans les milieux naturels. Ce chapitre, séparé en trois parties, réalise une synthèse des travaux effectués sur le Mg dans les compartiments géochimiques et biologiques. La première partie concerne un rappel sur l'élément Mg, ses isotopes et la théorie de fractionnement des isotopes stables. Puis dans une seconde partie, est décrit le cycle biologique du Mg dans les plantes, en mettant en exergue les processus biologiques encore mal contraints. La troisième partie traite de la connaissance actuelle des signatures isotopiques du Mg des principaux réservoirs à la surface des continents, de même que de leurs variations au cours des processus géochimiques, en particulier au cours de l'altération des roches et du transport.

## I. Généralités sur le magnésium et ses isotopes

### I-1. Propriétés chimiques et distribution du magnésium

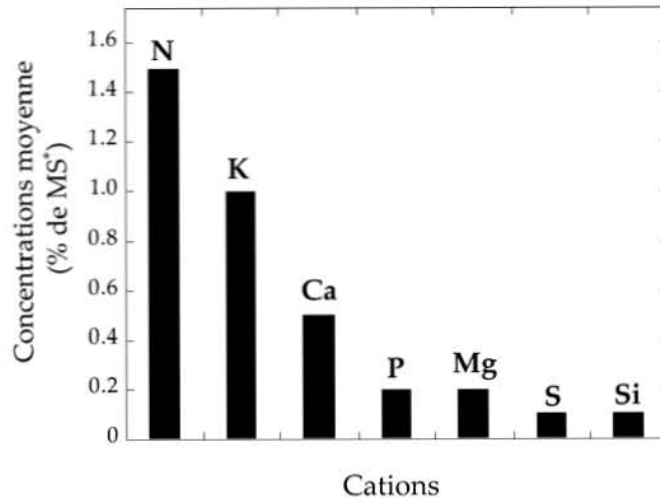
Dans la classification géochimique des éléments, le magnésium, de symbole Mg, est un alcalino-terreux. Il a pour numéro atomique 12, une masse atomique de 24,305 et une structure électronique  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2$ . De ce fait, le Mg tend à perdre deux électrons pour atteindre la configuration de l'argon. Il forme ainsi un ion de charge +2 et de degré d'oxydation invariablement égale à +II. Le magnésium est un élément à caractère lithophile entraînant son incorporation préférentielle dans les minéraux cardinaux de la croûte continentale et du manteau. C'est le huitième élément chimique de la croûte continentale (avec 2.1% de sa masse). Le Mg se répartit dans différents types de roches. Le pourcentage de MgO varie de 6% à 34% dans les roches ultrabasiques, et de 0.30% à 2% dans les roches acides. La réserve totale de Mg dans les roches silicatées de la croûte continentale est estimée à  $6.3 \times 10^{13}$  t. Le magnésium est également présent dans des minéraux sédimentaires tels que les carbonates, qui constituent la seconde source du Mg des eaux de surface. Lors de l'altération des minéraux, une large partie du Mg est drainé par les fleuves aux océans. La concentration du Mg varie de ~1 ppm à 50 ppm dans les eaux de surface (rivières fleuves et lacs). Dans ces eaux, le Mg est majoritairement présent sous la forme dissoute et ionique.

C'est sous cette forme soluble que le Mg est préférentiellement transporté aux océans selon un flux annuel de  $1.7 \times 10^9$  t (Figure I-1). Avec une composition moyenne de Mg de 1290 ppm, le Mg est le 2<sup>ème</sup> cation le plus abondant dans les océans où son temps de résidence est estimé à 10 -12 Ma. La réserve totale des océans est de  $\sim 1.8 \times 10^{15}$  t de Mg, ce qui en fait le principal réservoir de Mg sur Terre (Figure I-1).



**Figure I-1** : Cycle biogéochimique terrestre du Mg. Les représentations des réservoirs ne sont pas proportionnelles et les flux sont issus des travaux de Berner *et al.* (1983), excepté celui de la biomasse qui a été calculé sur la base de composition moyenne de 0.2% de Mg dans la plante.

Le magnésium est également un élément abondant dans les autres compartiments terrestres, notamment dans les végétaux où il représente le 3<sup>ème</sup> métal le plus important par gramme de matière sèche (MS) après le K et le Ca avec  $\sim 0.2\%$  de la MS (ex. Epstein et Bloom, 2005) (Figure I-2). La biomasse végétale mondiale constitue, avec  $2.4 \times 10^9$  t, le troisième réservoir du Mg à la surface des continents.

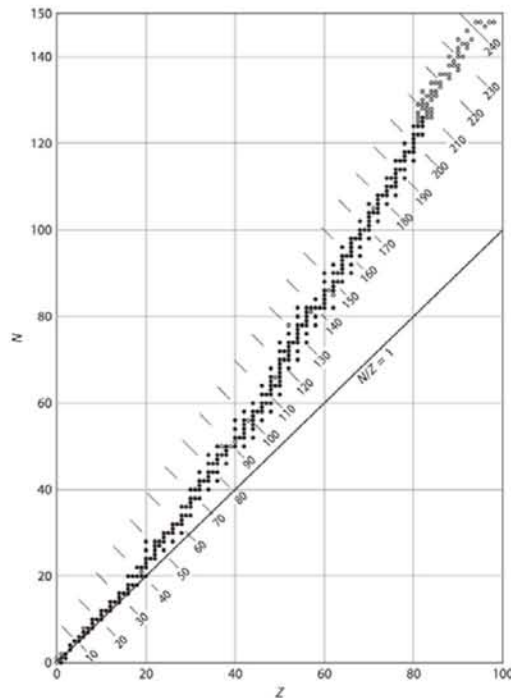


**Figure I-2** : Compositions moyennes en % de matière sèche (\*) des éléments nutritifs des plantes à l'exception du C, O et H qui représentent 45%, 45% et 6% de MS (d'après Epstein et Bloom, 2005).

## I-2. Isotopes du magnésium

### I-2.1 Généralités sur les isotopes

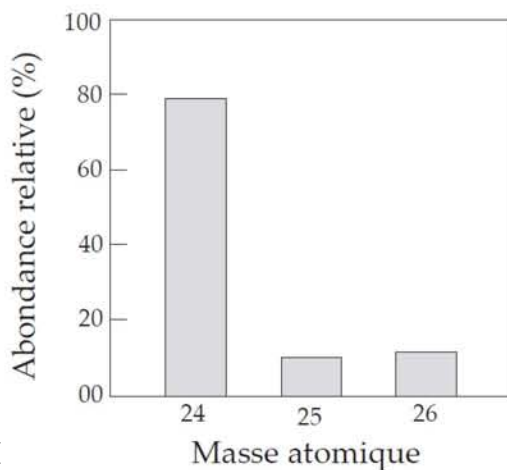
Les isotopes d'un élément donné contiennent un nombre identique de protons ( $Z$ ) et d'électrons, mais un nombre de neutrons ( $N$ ) différent. Ils ont des propriétés chimiques similaires car ils possèdent la même configuration électronique et le même rayon ionique. Par contre, leurs propriétés physico-chimiques peuvent différer à cause de leur différence de masse. Les isotopes sont soit stables, soit radioactifs. On parle d'isotopes radioactifs quand les noyaux des atomes se transforment spontanément en d'autres noyaux, et émettent des particules ou des rayonnements, à la différence des isotopes stables. Sur les ~3000 éléments connus, seuls environ 300 ont des noyaux stables (ex. Hoefs, 2004). L'une des caractéristiques des isotopes stables est le fait qu'ils se répartissent étroitement autour de la courbe de stabilité illustrée sur la figure I-3. Pour les nombres de masse pouvant atteindre 40, le nombre de protons est égale au nombre de neutrons. Les éléments s'alignent alors sur la droite  $N/Z=1$ . Pour les plus grandes valeurs de  $Z$ , la force nucléaire ne parvient pas à maintenir la cohésion du noyau face à la répulsion électrique des protons. La courbe de stabilité s'écarte de la droite  $N/Z=1$  car, pour stabiliser le noyau, plus de neutrons que de protons sont nécessaires. Sur ces 300 éléments stables, seuls 21 ont un isotope unique. Tous les autres sont un mélange d'au moins deux isotopes, avec souvent une abondance plus importante d'un des isotopes ( $\sim > 70\%$ ) par rapport aux autres. Les isotopes stables ont une multitude d'application allant de la pétrologie à la biologie. Le développement de la géochimie des isotopes stables est lié à celui de la spectrométrie de masse, et les avancées récentes dans ce domaine ont permis d'élargir le champ d'investigation à plusieurs métaux, dont le magnésium.



**Figure I-3 :** Représentation du nombre de protons (Z) en fonction du nombre de neutrons (N) (ex. Hoefs, 2004).

### I-2.2 Abondance des isotopes naturels du Mg

Le magnésium possède trois isotopes naturels stables ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  et  $^{26}\text{Mg}$ ) dont les abondances relatives ont été estimées pour la première fois en 1921, par Dempster. Les estimations ont été améliorées par White et Cameron (1948) et Catanzaro *et al.*, (1966). Ces dernières mesures sont présentées comme la meilleure estimation des abondances des isotopes du Mg (IUPAC, 2003). Les abondances sont de 78.992% de  $^{24}\text{Mg}$ , 10.003% de  $^{25}\text{Mg}$  et 11.005% de  $^{26}\text{Mg}$  (Figure I.4). Il existe également plus d'une dizaine d'isotopes radioactifs de courte durée de vie, dont les plus utilisés sont le  $^{28}\text{Mg}$  (durée de vie de 20,91 h) et le  $^{27}\text{Mg}$  (9,46 min), en particulier en agriculture et en médecine.



Isotope	Masse atomique (amu)	Abondance atomique (%)
$^{24}\text{Mg}$	23.985042	78.992±0.075
$^{25}\text{Mg}$	24.985839	10.003±0.009
$^{26}\text{Mg}$	25.982593	11.005±0.019

**Figure I-4 :** Abondances relatives des isotopes naturels stables du magnésium d'après White et Cameron (1948), Catanzaro *et al.* (1966).

I



## 2.3 Théorie des fractionnements des isotopes stables

### I-2.3.1 Notations

Pour une meilleure compréhension des concepts présentés, il convient de préciser quelques conventions relatives à la notation des fractionnements isotopiques. La composition isotopique représente généralement le rapport de l'isotope lourd au plus léger, pour un élément chimique donné. Les rapports isotopiques absolus étant difficiles à mesurer avec exactitude, et les variations naturelles des compositions isotopiques étant très faibles, McKinney *et al.* (1950) ont introduit la notion de delta "δ". Ce delta exprime, en pour mille, l'écart relatif entre le rapport isotopique de l'élément chimique dans l'échantillon et celui d'un standard de référence. En d'autres termes, la notation "δ" définit une relation explicite entre l'abondance d'un isotope dans un échantillon et son abondance dans la référence : si  $\delta > 0$ , il y a plus d'isotope lourd dans l'échantillon que dans la référence ; si  $\delta < 0$ , il y a moins d'isotope lourd dans l'échantillon que dans la référence. Plus récemment, la convention internationale de Davos en 2009 a adopté le principe selon lequel la notation  $\delta$  désigne le rapport de l'isotope lourd sur celui de l'isotope léger, pour tous les systèmes isotopiques étudiés. Ainsi, dans le cas du Mg, le delta est donné par la relation :

$$\delta^{26}\text{Mg} = \left( \frac{\left( \frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{Echantillon}}}{\left( \frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}}} - 1 \right) \times 10^3 \quad (\text{Eq. 2})$$

Le standard pour l'étude du magnésium utilisé jusqu'à une date récente fut le SRM980 développé par NIST (Catanzaro *et al.*, 1966). Toutefois, des analyses réalisées dans six laboratoires ont montré que ce standard, vendu sous forme de petits morceaux métalliques, présente une hétérogénéité isotopique avec une variation de plus de 8.2‰, largement supérieure aux incertitudes analytiques actuelles (~0.1‰) (Galy *et al.*, 2001). A l'issue de ces travaux, un nouveau standard homogène, le DSM3 (en solution), a été développé et préconisé pour la normalisation des analyses des compositions isotopiques du Mg (Galy *et al.*, 2003). Toutes les compositions isotopiques de Mg mesurées, relativement au SRM980, sont désormais rapportées à ce nouveau standard selon l'équation suivante :

$$\delta^x\text{Mg}_{\text{DSM3}}^{\text{échantillon}} = \delta^x\text{Mg}_{\text{SRM980}}^{\text{échantillon}} + \delta^x\text{Mg}_{\text{DSM3}}^{\text{échantillon}} + 0.001 \times \delta^x\text{Mg}_{\text{SRM980}}^{\text{échantillon}} \times \delta^x\text{Mg}_{\text{DSM3}}^{\text{SRM980}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Entre deux composés (a et b) liés par un processus naturel (par exemple, entre un réactif a et un produit b au cours d'une réaction chimique) et dont les rapports isotopiques

sont connus, il est possible de définir un fractionnement isotopique dont le coefficient  $\alpha$  est donné par la relation :

$$1000\ln(\alpha) \sim (\alpha_{a-b} - 1) * 1000 = \delta_a - \delta_b \approx \Delta_{a-b} \text{ (Eq. 4)}$$

Ce coefficient de fractionnement est le quotient des rapports isotopiques dans les deux composés a et b. Dans le cas d'un système à trois isotopes (ex. le Mg), les coefficients sont :

$$\alpha_{a-b}^{25/24} = \frac{\left(\frac{^{25}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_a}{\left(\frac{^{25}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_b} \text{ (Eq. 6.1)} \text{ et } \alpha_{a-b}^{26/24} = \frac{\left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_a}{\left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_b} \text{ (Eq. 5.2)}$$

Ces deux coefficients de fractionnement isotopique sont liés par l'équation suivante :

$$\alpha_{a-b}^{25/24} = \left(\alpha_{a-b}^{26/24}\right)^\beta \text{ (Eq. 6)} \text{ ou } \beta = \frac{\ln\left(\alpha_{a-b}^{25/24}\right)}{\ln\left(\alpha_{a-b}^{26/24}\right)} \text{ (Eq. 6.1)}$$

Cette relation est appelée la loi de fractionnement dépendant de la masse.

### I-2.3.2 Mode de fractionnement des isotopes stables et application au Mg

Les différences des propriétés physico-chimiques des isotopes d'un élément induisent des fractionnements isotopiques, c'est-à-dire un changement de la composition isotopique d'un composé au cours de certains processus. Les fractionnements isotopiques reflètent les effets de la mécanique quantique et résultent d'une différence d'énergie de vibration entre des atomes de masse différente (ex. Criss, 1999 ; Hoefs, 2004). Selon la mécanique quantique, l'énergie d'une molécule diatomique est restreinte à des niveaux discrets d'énergie. En reportant l'énergie d'une molécule diatomique en fonction de la distance entre les atomes, le niveau énergétique minimal du système quantique n'est pas identique à celui prédit par la courbe théorique (Figure I-3), mais correspond à une énergie que possède le système. Cette énergie est dépendante des mouvements de vibration des atomes et est décrite par l'équation :

$$E_{vib} = \frac{1}{2} h \nu \text{ (Eq. 7)}$$

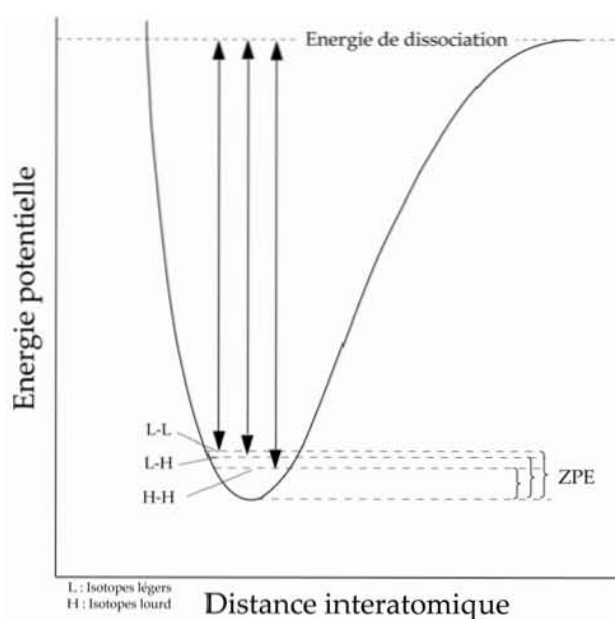
où  $h$  est la constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}$ ), et  $\nu$  la fréquence de vibration ( $\text{s}^{-1}$ ) :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k'}{\mu}} \text{ (Eq. 7.1)}$$

avec  $k'$  la constante de force dépendant de la configuration électronique, et  $\mu$  la masse réduite égale (en considérant le système quantique comme un oscillateur harmonique) à :

$$\mu = \frac{1}{1/m_1 + 1/m_2} \text{ (Eq. 7.2)} \text{ (} m_1 \text{ et } m_2 \text{ étant les masses atomiques 1 et 2).}$$

La différence entre l'énergie du système au niveau minimal et celle définie par la courbe théorique correspond à l'énergie au point zéro, et est notée ZPE (Zero Point Energy). Ainsi, les atomes du système vibrent continuellement, avec une énergie correspondante à la ZPE. Cette énergie est donc dépendante de la fréquence de vibration, comme le montre l'Eq. 7.1, qui est inversement proportionnelle à la racine carrée de la masse de l'atome. Dès lors, les ZPE des molécules composées d'isotopes lourds et légers d'un même élément sont différents, de même que l'énergie de dissociation des liaisons chimiques. L'énergie nécessaire à la rupture d'une liaison chimique est donc plus élevée pour les liaisons impliquant des isotopes lourds que pour celles impliquant les isotopes légers (Figure I-5) (ex. Hoefs, 2004 ; O'Neil, 1986).

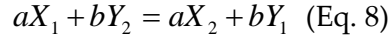


**Figure I-5** : Variation de l'énergie potentielle (kJ / mol) d'un système formé par deux atomes d'hydrogène en fonction de la distance interatomique (nm). La différence d'énergie entre cette énergie minimale et le puits de la courbe d'énergie potentielle est notée ZPE (Zero Point Energy). Les flèches indiquent l'énergie, en kJ / mol, nécessaire pour dissocier les atomes (d'après O'Neil, 1986).

Ces différences d'énergie de vibration et de rupture (type de liaison) sont à l'origine des différences de comportement des isotopes au cours des réactions chimiques et des processus physico-chimiques. Pour un élément à plus de deux isotopes, la probabilité d'un fractionnement isotopique est d'autant plus importante que la différence de masse entre l'isotope majoritaire et l'isotope rare est grande (~8% entre les isotopes  $^{26}\text{Mg}$  et  $^{24}\text{Mg}$ , 13% entre  $^{18}\text{O}$  et  $^{16}\text{O}$ , alors qu'il n'est que de 2% entre le  $^{88}\text{Sr}$  et  $^{86}\text{Sr}$ ). Des fractionnements isotopiques sont donc préférentiellement attendus pour les éléments légers du tableau périodique. Il est à noter que le type de liaison (ionique, covalente, etc.) joue également un rôle. Généralement, on classe les fractionnements isotopiques en deux catégories : les fractionnements isotopiques à l'équilibre, et les fractionnements isotopiques cinétiques. Lorsque des informations suffisantes sur les énergies de liaison des atomes sont disponibles, ces fractionnements peuvent être décrits et estimés mathématiquement.

## Fractionnement isotopique à l'équilibre

Le fractionnement isotopique à l'équilibre apparaît lors des réactions chimiques ou physiques faisant intervenir des réactions d'échange isotopique et un équilibre thermodynamique. Les isotopes se redistribuent de sorte à minimiser l'énergie libre du système. On considère la réaction d'échange isotopique typique :



où 1 et 2 font référence aux isotopes légers et lourds contenus dans les molécules X et Y. La constante d'équilibre de la réaction peut être déduite du modèle d'Urey (1947) ou de l'équation de Bigeleisen et Mayer (1947) comme étant le rapport des fonctions de partition  $Q$  tel que :

$$K_{eq} = \frac{\left( \frac{Q_{X_2}}{Q_{X_1}} \right)}{\left( \frac{Q_{Y_2}}{Q_{Y_1}} \right)} \quad (\text{Eq. 9})$$

Dans ce cas, le facteur de fractionnement, entre les deux composés (X et Y) considérés, noté  $\alpha_{X-Y}$  est égal à la constante d'équilibre  $K_{eq}$  (cf. Hoef, 2004). La fonction de partition  $Q$  totale du système en équilibre thermodynamique est le produit des fonctions de partitions correspondantes aux mouvements auxquels les molécules sont sujettes (rotation, translation et vibration), tel que :

$$Q_{tot} = Q_{rot} Q_{trans} Q_{vib} \quad (\text{Eq. 10})$$

Les fractionnements isotopiques sont essentiellement fonction des mouvements de vibrations. La fonction de partition vibrationnelle des mouvements de molécules polyatomiques est donnée par la relation simplifiée suivante :

$$Q_{vib} = \prod_i^{3n-6} \frac{e^{-h\nu_i/2kT}}{1 - e^{-h\nu_i/kT}} = \prod_i^{3n-6} \frac{e^{-\mu_i/2}}{1 - e^{-\mu_i}} \quad \text{avec } \mu_i = \frac{h\nu_i}{kT} \quad (\text{Eq. 11})$$

Toutefois, l'expression totale de la fonction de partition prend en compte les contributions de la translation et de la rotation. De plus dans l'expression de la constante d'équilibre, seuls les rapports des fonctions de partition interviennent, d'où la relation suivante, qui peut être déduite après simplification :

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{s_1}{s_2} \left( \frac{m_{2i}}{m_{1i}} \right)^{3/2} \prod_i^{3n-6} \frac{\mu_{2i}}{\mu_{1i}} \frac{e^{-\mu_{2i}/2}}{1 - e^{-\mu_{2i}}} \frac{1 - e^{-\mu_{1i}}}{e^{-\mu_{1i}/2}} \quad (\text{Eq. 12})$$

Dans cette équation,  $s$  et  $m$  représentent respectivement le nombre de symétrie et la masse de l'isotope échangé entre les deux composés. Bigeleisen et Mayer (1947) définissent une fonction  $f$  tel que l'Eq. 12 devienne :

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{s_1}{s_2} \left( \frac{m_{2i}}{m_{1i}} \right)^{\frac{3}{2} \sum_i (3n-6)} \prod_i f \quad (\text{Eq. 13})$$

où  $f = \frac{\mu_{2i}}{\mu_{1i}} \frac{e^{-\mu_{2i}/2}}{1 - e^{-\mu_{2i}}} \frac{1 - e^{-\mu_{1i}}}{e^{-\mu_{1i}/2}}$  (Eq. 13.1) et le rapport  $\frac{s_1}{s_2}$  s'annulant, la constante d'équilibre peut donc s'écrire :

$$K_{eq} = \frac{f_X}{f_Y} = \alpha_{X-Y} \quad (\text{Eq. 14})$$

dans lequel  $f_X$  et  $f_Y$  sont les composantes quantiques des fonctions de partitions des composés en équilibre (cf. Wetson, 1999; Young et Galy, 2002). Pour de hautes températures la fonction  $f$  peut s'écrire selon Wetson, (1999) :

$$f = 1 + \frac{1}{24} (\mu_{1i}^2 - \mu_{2i}^2) \quad (\text{Eq. 15})$$

En considérant les mouvements de vibrations similaires à ceux d'un oscillateur harmonique et en combinant les Eq. 5.1, 5.2 et 13, on obtient alors l'approximation suivante (cf. Urey, 1947 ; Bigeleisen, 1955) :

$$f_i = 1 + \frac{1}{24} \left( \frac{h}{kT} \right)^2 \left( \frac{1}{m_{1i}} - \frac{1}{m_{2i}} \right) \sum_i \frac{k'_i}{4\pi^2} \quad (\text{Eq. 16})$$

D'après l'Eq. 12,  $\ln \alpha_{X-Y} = \ln f_X - \ln f_Y$  (Eq. 16.1) et en remplaçant les fonctions  $f$  par leurs valeurs correspondantes, l'Eq. 14 devient :

$$\ln \alpha_{X-Y}^{2/1} = \frac{1}{24} \left( \frac{h}{kT} \right)^2 \left( \frac{1}{m_1} - \frac{1}{m_2} \right) \sum_i \frac{k'_{ia}}{4\pi^2} - \frac{k'_{ib}}{4\pi^2} \quad (\text{Eq. 17})$$

Ainsi pour un système à trois isotopes tel que le Mg ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  et  $^{26}\text{Mg}$ ), il est possible de déduire similairement pour les paires d'isotopes ( $^{25}/^{24}$  et  $^{26}/^{24}$ ), les équations équivalentes à l'Eq. 17 :

$$\ln \alpha_{X-Y}^{25/24} = \frac{1}{24} \left( \frac{h}{kT} \right)^2 \left( \frac{1}{m_{24}} - \frac{1}{m_{25}} \right) \sum_i \frac{k'_{ia}}{4\pi^2} - \frac{k'_{ib}}{4\pi^2} \quad (\text{Eq. 17.1})$$

$$\ln \alpha_{X-Y}^{26/24} = \frac{1}{24} \left( \frac{h}{kT} \right)^2 \left( \frac{1}{m_{24}} - \frac{1}{m_{26}} \right) \sum_i \frac{k'_{ia}}{4\pi^2} - \frac{k'_{ib}}{4\pi^2} \quad (\text{Eq. 17.2})$$

Les rapports des Eq. 17.1 et 17.2 donnent :

$$\frac{\ln \alpha_{X-Y}^{25/24}}{\ln \alpha_{X-Y}^{26/24}} = \frac{\left( \frac{1}{m_{24}} - \frac{1}{m_{25}} \right)}{\left( \frac{1}{m_{24}} - \frac{1}{m_{26}} \right)} \quad (\text{Eq. 18}), \text{ et en posant que } \beta_{eq} = \frac{\left( \frac{1}{m_{24}} - \frac{1}{m_{25}} \right)}{\left( \frac{1}{m_{24}} - \frac{1}{m_{26}} \right)} \quad (\text{Eq. 18.1}),$$

on retrouve ainsi la loi du fractionnement isotopique dépendant de la masse  $\alpha_{25/24} = \left(\alpha_{26/24}\right)^{\beta_{eq}}$ . En remplaçant les valeurs correspondantes des masses des isotopes du Mg dans l'Eq. 18.1, le coefficient  $\beta$  est calculé à 0.520998 dans le cas d'un fractionnement isotopique à l'équilibre.

### *Fractionnement isotopique cinétique*

L'équilibre n'est généralement pas atteint entre les molécules au cours de nombreuses réactions. Elles sont alors unidirectionnelles, et le produit est au fur et à mesure isolé du milieu. Le fractionnement isotopique qui résulte de telles réactions est qualifié de cinétique. Les principaux processus entraînant ce type de fractionnement isotopique sont les phénomènes de transport (par exemple la diffusion) et/ou des processus biologiques (par exemple l'assimilation de l'azote dans les complexes organiques). Lors du fractionnement cinétique, les isotopes légers sont systématiquement avantagés par leur vitesse et se concentrent alors dans les produits.

Par des simplifications, il est également possible de montrer que ce fractionnement est dépendant de la masse. Selon la théorie de la cinétique des gaz, toutes les molécules possèdent la même énergie cinétique à une température donnée. Pour un élément ayant trois isotopes notés 1, 2 et 3 (de l'isotope léger à l'isotope lourd), l'énergie cinétique de chaque isotope est :

$$E_{cin} = \frac{1}{2} m_1 v_1^2 = \frac{1}{2} m_2 v_2^2 = \frac{1}{2} m_3 v_3^2 \quad (\text{Eq. 19})$$

où  $m$  est la masse et  $v$  est la vitesse des atomes. L'une des conséquences directes de cette théorie est la loi de diffusion de Graham qui stipule que le rapport des vitesses d'une paire d'isotopes d'un même élément est égal à la racine carrée des masses moléculaires équivalentes :

$$\frac{v_2}{v_1} = \sqrt{\frac{m_1}{m_2}} \quad (\text{Eq. 20})$$

Selon la loi de Graham, le coefficient de fractionnement cinétique entre deux composés a et b peut être assimilé au rapport des vitesses, soit :

$$\alpha_{x-y}^{z/1} = \frac{v_2}{v_1} = \sqrt{\frac{m_1}{m_2}} \quad (\text{Eq. 21}), \text{ d'où } \ln(\alpha_{x-y}^{z/1}) = \ln\left(\frac{v_2}{v_1}\right) = \frac{1}{2} \ln\left(\frac{m_1}{m_2}\right) \quad (\text{Eq. 22})$$

Les rapports de facteurs de fractionnement donnent donc :

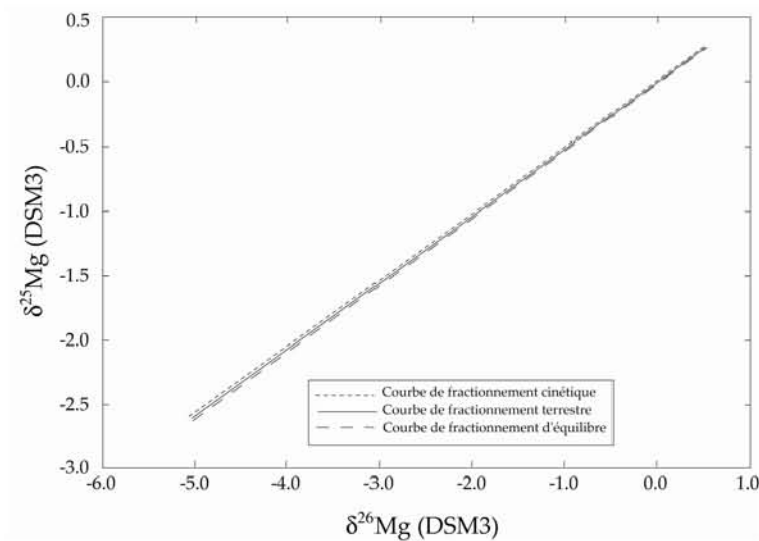
$$\ln(\alpha_{x-y}^{21}) = \ln\left(\frac{v_2}{v_1}\right) = \ln\left(\frac{m_1}{m_2}\right) = \beta \quad (\text{Eq. 23})$$

$$\ln(\alpha_{x-y}^{31}) = \ln\left(\frac{v_3}{v_1}\right) = \ln\left(\frac{m_1}{m_3}\right) = \beta$$

Le facteur  $\beta$  est ainsi estimé à 0.511007 pour le cas du fractionnement cinétique des isotopes du Mg.

### Applications au Mg

De façon simplifiée, sur une faible gamme de composition isotopique, tout point sur la droite des fonctions  $\delta^{25}\text{Mg} = \beta \times \delta^{26}\text{Mg}$  traduit un fractionnement isotopique dépendant de la masse. Les échantillons naturels terrestres analysés définissent une droite qui passe entre celle du fractionnement isotopique à l'équilibre et celle correspondant au fractionnement cinétique (Figure I-6). Galy *et al.* (2002) estiment que le facteur  $\beta$  correspondant à la régression de l'ensemble des échantillons terrestres analysés est de 0.516.



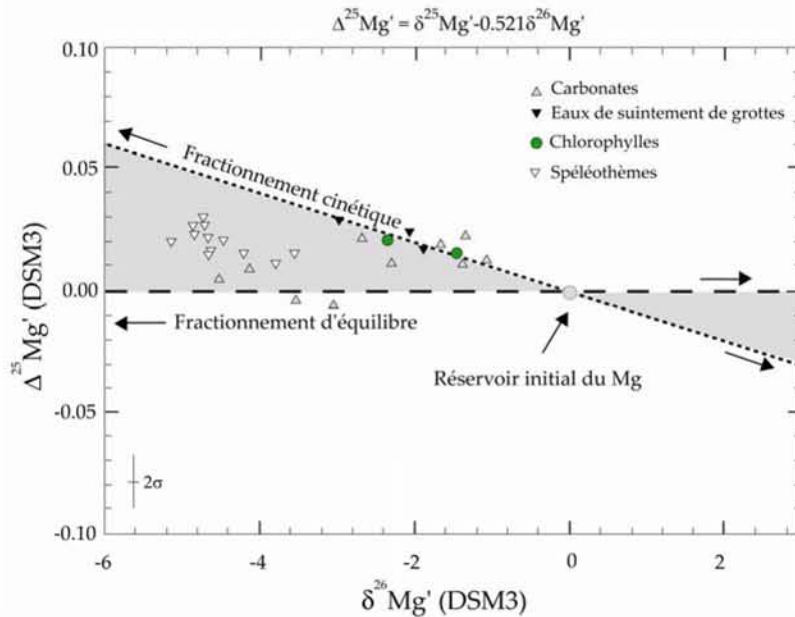
**Figure I-6** : Courbes des fractionnements isotopiques du Mg. Ces courbes sont calculées sur la base de la relation  $\delta^{25}\text{Mg} = \beta \delta^{26}\text{Mg}$  avec  $\beta$  égal à 0.511 et 0.521 et 0.516.

Cependant, au regard de la faible différence entre les pentes des droites, Young et Galy (2004) ont introduit, similairement au système isotopique de l'oxygène, les notations de  $\delta'$  et  $\Delta'$  avec :

$$\delta^x \text{Mg}' = 10^3 \times \ln\left(\frac{\delta^x \text{Mg} + 10^3}{10^3}\right) \quad (\text{Eq.24}) \quad \text{et} \quad \Delta^{25}\text{Mg}' = \delta^{25}\text{Mg}' - 0.521\delta^{26}\text{Mg}' \quad (\text{Eq. 25})$$

La distribution des compositions isotopiques des échantillons dans le diagramme  $\Delta'$  vs.  $\delta'$  permet d'accéder plus précisément au mode de fractionnement isotopique du Mg subit par un échantillon donné (Figure I-7). Dans ce diagramme, la plupart des échantillons analysés

par Young et Galy (2004) se situent entre les deux droites extrêmes (cinétique et équilibre), impliquant probablement plusieurs étapes de fractionnement de type et de magnitude différents.



**Figure I-7** : Description des fractionnements isotopiques dépendant de la masse suivis par des échantillons (cas de quelques échantillons naturels) (d'après Young et Galy, 2004).

Cette thèse concerne en grande partie les signatures isotopiques des plantes, et implique donc l'étude du rôle de certains processus biologiques sur ces signatures. Le report des données dans ce type de diagramme devrait nous permettre de mieux déterminer le mode de fractionnement des isotopes du Mg lors de leurs transferts dans les plantes

## II. Cycle biologique des cations et spécificité du magnésium

Dans l'optique de mieux cerner les processus clés responsables des signatures isotopiques des plantes, une synthèse non exhaustive du cycle biologique du Mg et de ses différentes étapes est réalisée dans cette partie.

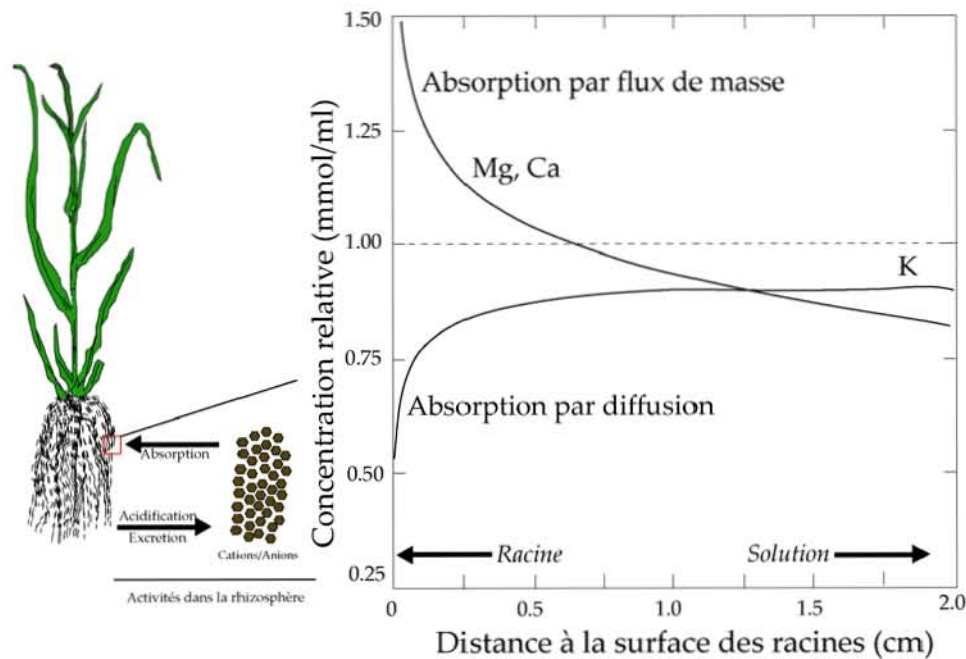
### II-1. Prélèvement racinaire

Le prélèvement racinaire des cations à partir des solutions de sols est un processus en deux grandes étapes. La première étape est le transport des cations de la solution du sol à la surface des racines. La seconde correspond au passage des ions de la surface des racines vers la partie interne des plantes.



### II-1.1. De la solution du sol à la surface racinaire

Trois modes de transport gouvernent le flux de cations. Il s'agit du flux de masse d'eau, de l'interception par les racines et de la diffusion. Le flux de masse correspond au mouvement des cations dans les sols, entraînés vers la racine par le flux d'eau absorbé, résultant de la transpiration foliaire (Barber, 1995). C'est le mécanisme majeur du transport du Mg et du Ca de la solution du sol à la surface des racines, avec une contribution largement supérieure aux besoins des plantes (Oliver and Barber, 1966). Ce phénomène induit alors une rétention de ces cations à la surface des racines (Figure I-8). L'interception décrit le transport par lequel les racines, lors de leur croissance, atteignent les cations adsorbés à la surface des colloïdes. Le troisième mode de transport est la diffusion, mode de transport prédominant pour K. Au contraire du flux de masse, ce transport induit une baisse de concentration du K dans le voisinage immédiat de la racine (Figure I-8).



**Figure I-8** : Concentration relative des cations dans la solution du sol en fonction de la distance à la surface de la racine. Tout rapport supérieur à 1 indique l'accumulation des éléments nutritifs dans la rhizosphère (d'après Kelly *et al.*, 1991).

### II-1.2. De la surface racinaire à l'intérieur de la racine

Cette étape se déroule en deux phases. Elle comprend une phase de migration des cations à partir de la surface de la racine jusqu'aux sites d'absorption et le passage de ceux-ci à travers la membrane cellulaire.

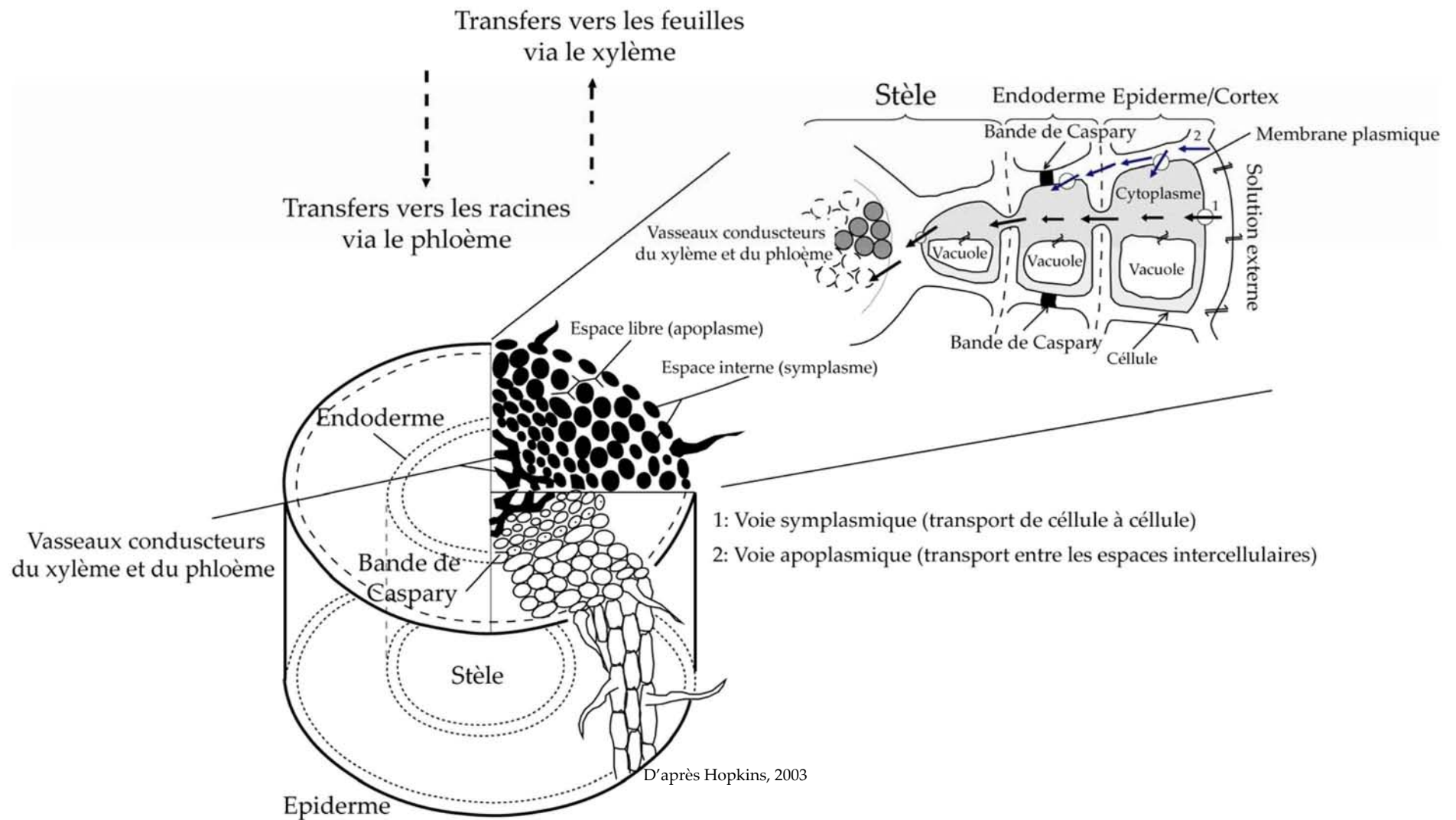
### **II-1.2.1. Migration des cations de la surface racinaire aux sites d'absorption**

A partir de la surface racinaire, les cations atteignent, soit directement les sites d'absorption des cellules de l'épiderme, soit ceux de l'endoderme, après leur migration dans l'espace libre extracellulaire (transport apoplasmique) (Figure I-9). Le transport apoplasmique est stoppé au niveau de la bande de Caspary, bande constituée d'un mélange complexe de composés hydrophobes, d'acides gras et d'alcools. La présence de cette bande de Caspary représente une barrière physique, et réduit la possibilité aux cations de passer de l'endoderme à la stèle sans devoir traverser la membrane cellulaire (Bücking *et al.*, 2002). Dans le cas spécifique du magnésium, Kuhn *et al.*, (2000) et Ferguson (1978) montrent que le Mg atteint préférentiellement les sites d'absorption par la voie apoplasmique.

Le transport apoplasmique se fait par le processus d'adsorption-échange avec des groupements acides (carboxyles, phosphoryles, phénoliques, etc.) des polysaccharides et des gommes polyuroniques des racines. Les groupements acides confèrent aux racines un comportement de polyacide faible leur permettant d'agir comme une résine échangeuse d'ions. L'adsorption des cations se fait par des liaisons électrostatiques avec les groupements acides, en remplacement des ions H<sup>+</sup>. Ce processus d'échange entre les cations de la solution et les ions H<sup>+</sup> des groupements acides induit une baisse du pH de l'ordre de 2 à 3 unités dans l'environnement immédiat des racines (rhizosphère), par rapport à la solution globale. Toutefois, il est à souligner que la baisse du pH dans la rhizosphère n'est pas exclusivement imputable au processus d'échange H<sup>+</sup>-cations. Elle est aussi due à l'excrétion d'acides organiques et de protons. L'excrétion de protons correspond à une réponse due au passage des cations à travers la membrane plasmique, pour maintenir l'équilibre ionique dans les cellules racinaires.

### **II-1.2.2. Passage des cations à travers la membrane cellulaire des racines**

L'absorption des cations se fait en relation étroite avec le gradient potentiel électrochimique (cf. Hopkins, 2003). Lorsque le passage se fait suivant le sens du gradient, l'absorption est dite passive et se fait par diffusion grâce à des canaux ioniques incorporés dans la membrane cellulaire. La diffusion peut être facilitée par des transporteurs sélectifs vis-à-vis des cations qu'ils font entrer ou sortir de la cellule. Dans le cas contraire, c'est une absorption active, due à des pompes transmembranaires nécessitant, pour leur fonctionnement, une hydrolyse de l'Adénosine TriPhosphate (ATP), la source d'énergie métabolique des cellules biologiques.



**Figure I-9** : Coupes transversale et longitudinale d'une racine décrivant les mouvements des cations de la solution externe aux vaisseaux conducteurs de la plante. : Sites d'absorption (voir texte).

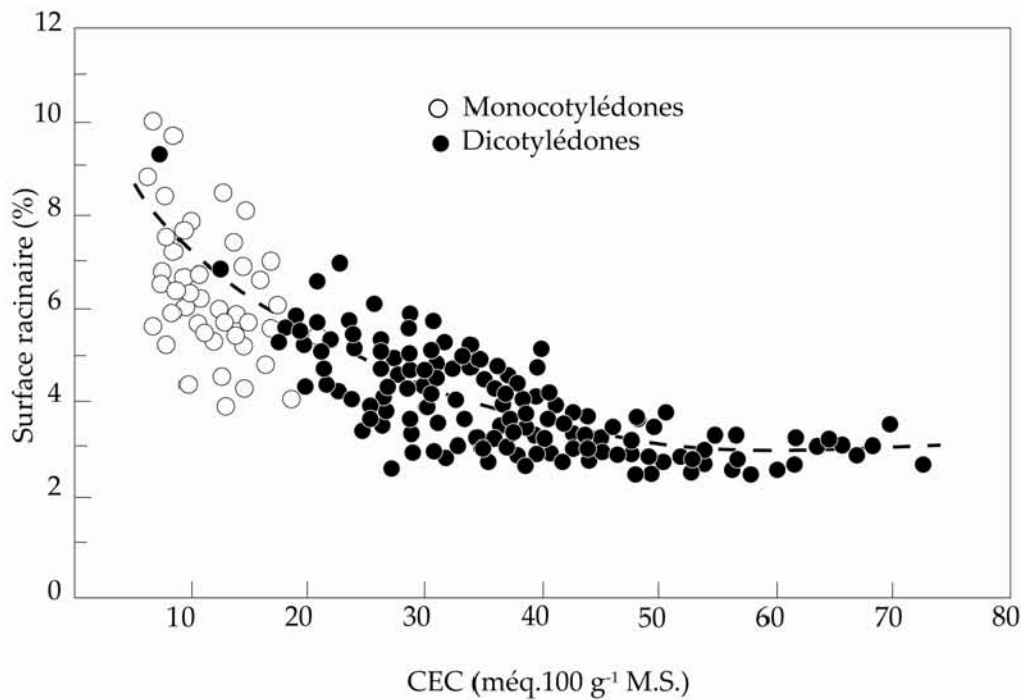
L'absorption du Ca se fait par des canaux ioniques ( $rCa$ ) alors que celle du K se fait à la fois par des canaux et des transporteurs selon les conditions de croissance des plantes. Dans le cas du Mg, malgré de nombreuses études réalisées (ex. Kelly et Barber, 1991; Komai, 1962; Leggett et Gilbert, 1969; Maas et Ogata, 1971; Macklon et Sim, 1976; Rengel et Robinson, 1989; Stok *et al.*, 1981). Le mécanisme d'absorption du Mg est encore débattu. Les premières études de Komai (1962), Leggett et Gilbert (1969), Maas et Ogata (1971), et plus récemment, celles de Rengel et Robinson (1989) et de Kelly et Barber (1991) suggèrent qu'il s'agit d'un processus actif, discontinu, consommant de l'énergie. Cependant, aucun transporteur correspondant n'est connu à ce jour (Shaul *et al.*, 2002).

Pour Macklon et Sim (1976) puis Stok *et al.* (1981), l'absorption du Mg serait plutôt un processus purement passif. Macklon et Sim (1976) suggèrent l'existence d'une protéine échangeuse d'ions contrôlant le passage du Mg dans les cellules racinaires. Très récemment, la présence d'une telle protéine échangeuse d'ions ( $Mg^{2+}/H^+$ ) a été confirmée dans les cellules racinaires de l'hévéa et d'*Arabidopsis* (Amalou *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2001; Shaul, 2002). Toutefois, cette enzyme est localisée dans la membrane des vacuoles et non dans la membrane plasmique, suggérant qu'elle ne serait pas impliquée dans le passage du Mg de la solution extérieure à travers les racines.

Enfin, pour certains auteurs, le Mg passerait de la solution du sol à l'intérieur des racines à travers les canaux ioniques spécifiques au Ca, qui seraient également perméables à d'autres cations mono- et divalents, dont le Mg (Pinero et Tester, 1997, 1995 ; White, 2000). La réelle implication de ces canaux ioniques dans l'absorption du Mg n'est cependant toujours pas clairement définie.

### **II-1.2.3. Rôle de l'adsorption dans le prélèvement racinaire des cations**

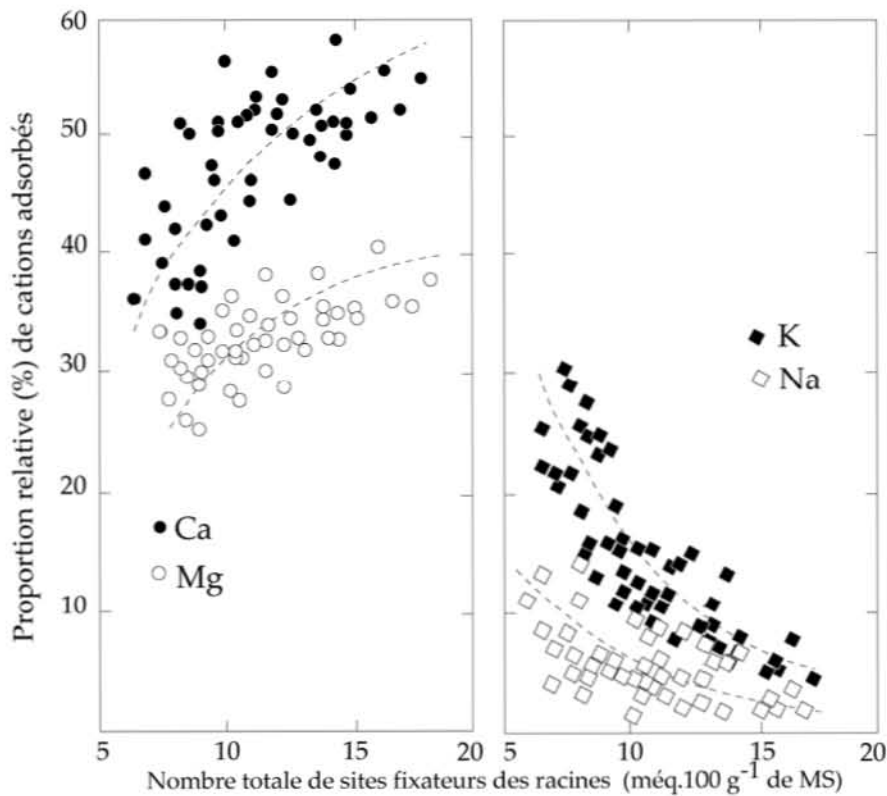
Malgré ces divergences sur le(s) mécanisme(s) d'absorption du Mg, diverses études s'accordent sur le fait que l'adsorption du Mg dans l'apoplasme des racines joue un rôle clé et déterminant sur les quantités de Mg dans les organes foliaires. A la surface des racines et au cours de leur migration dans l'apoplasme, les cations vont s'adsorber sur les groupements acides des racines. La quantité de cations adsorbés rend compte de la capacité d'échange cationique (CEC) des racines (Dufey *et al.*, 1985 ; Wacquant, 1974). Cette grandeur, par exemple, permet de distinguer les espèces monocotylédones (graminées), avec de faibles CEC racinaires (moins de 20 meq.100g<sup>-1</sup> de matière sèche (M.S.)), des espèces dicotylédones, avec des CEC plus élevées (Figure I-10) (Wacquant, 1974).



**Figure I-10** : Comparaison de la capacité d'échange cationique des racines des espèces dicotylédones et monocotylédones (de Waquant, 1974). M.S : Matière sèche

Ces différences de CEC proviendraient, selon les travaux de Whitehead *et al.* (1979), de la qualité et de la quantité des composés biochimiques (acides uroniques) composant les parois cellulaires des racines. En effet, Crooke *et al.* (1960) et Haynes (1980) indiquent que dans les parois des espèces dicotylédones, les acides uroniques se trouvent essentiellement sous forme de composés pectidiques. Dans les racines des monocotylédones, ces acides sont constitués de molécules d'hémicelluloses polyuroniques, séparées par de longues chaînes d'autres groupements acides. La distance entre les groupements carboxyles des hémicelluloses est alors plus grande que celle des groupements carboxyles de la pectine. Ainsi, la densité des sites acides fixateurs, et donc la CEC, sont plus faibles dans une racine de graminée que dans celle d'une dicotylédone.

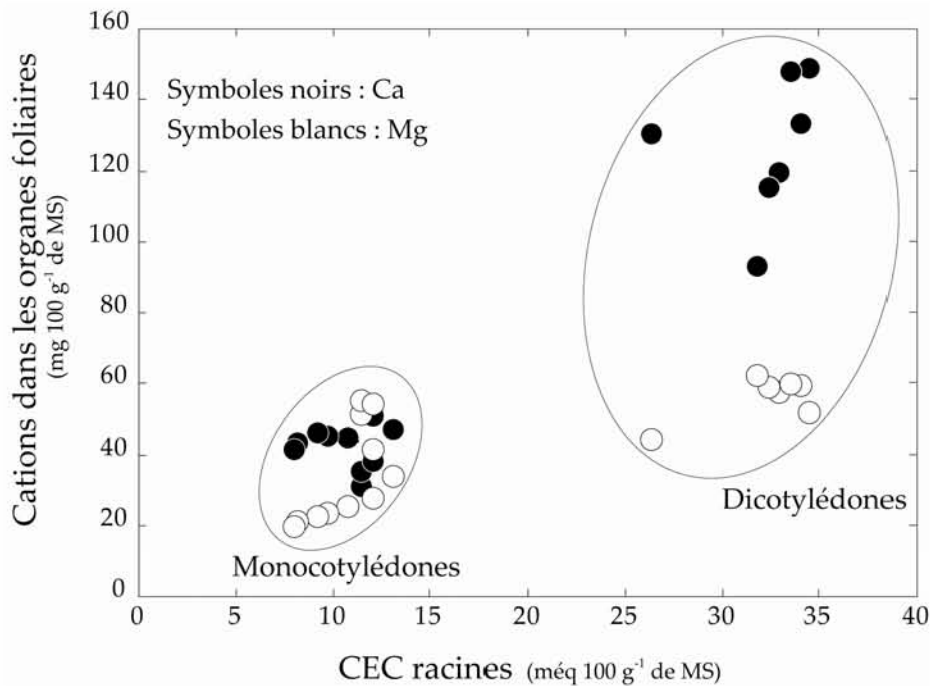
Cependant, quelle que soit l'espèce végétale, l'affinité des cations pour les sites fixateurs des racines décroît avec la charge du cation suivant l'ordre  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ . La proportion des cations divalents (Ca, Mg) adsorbés augmente proportionnellement avec le nombre total de sites fixateurs, indépendamment des espèces végétales, au contraire des cations monovalents (K, Na) (Figure I-11). Les raisons de ces différences sont encore mal contraintes.



**Figure I-11** : Relation entre la capacité d'échange cationique des racines d'espèces végétales et la proportion de cations présents dans les feuilles (Wacquant, 1974). M.S: Matière sèche.

La quantité de cations adsorbés dans l'apoplasme pourrait constituer un réservoir de cations pour la nutrition des plantes. Diverses études ont alors cherché à établir les relations existant entre la quantité de cations adsorbés sur les racines et leurs proportions dans les plantes (Mane *et al.*, 1970; Ram, 1980; Wacquant, 1974; Woodward *et al.*, 1984). Elles montrent l'existence d'une relation positive entre la quantité de cations adsorbés et celle présente dans les plantes (Figure II-12), suggérant que les dicotylédones, ayant des CEC racinaires plus élevées que les monocotylédones, concentrent plus de cations divalents dans leurs parties foliaires.

Le transfert du Mg et des cations des racines aux feuilles est un processus interne à la plante, désigné sous le nom de translocation. Il est associé à la distribution du Mg dans les différents compartiments des plantes.



**Figure I-12 :** Relation entre la capacité d'échange cationique des racines et la concentration en Mg et Ca dans les feuilles de diverses espèces dicotylédones et monocotylédones. Les figurés noirs désignent le Ca et les figurés blancs désignent le Mg.

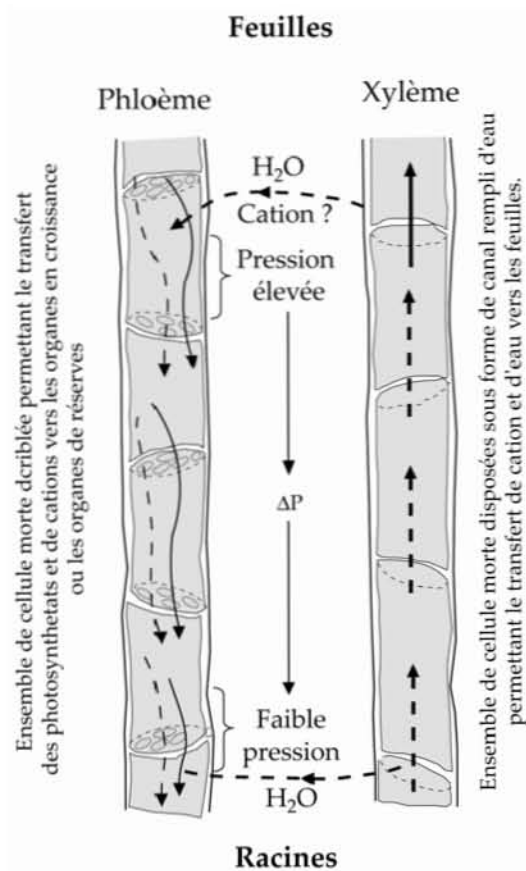
## II-2. Translocation, distribution et rôle physiologique du Mg

Dans le cytoplasme des cellules racinaires de la stèle, le magnésium migre à travers les connexions symplasmiques jusqu'aux vaisseaux conducteurs du xylème (Figure I-9). Le xylème est constitué de cellules mortes disposées de sorte à former des tubes remplis d'eau. Une fois dans le xylème, le Mg y serait alors "déchargé" grâce à des pompes, similaires à celles impliquées dans le passage du Mg à travers la membrane cellulaire (Wilkinson *et al.*, 1990). Cependant, aucune pompe de transfert du Mg dans les vaisseaux du xylème n'est connue à ce jour. Une fois dans les vaisseaux conducteurs du xylème, le Mg est transféré vers les cellules cibles des différents compartiments de la plante (Figure I-13).

### II-2.1. Translocation et distribution du Mg

Le transfert du Mg dans les vaisseaux du xylème se fait sous forme ionique ou/et sous forme de complexes organiques (ex. Bradfield, 1976 ; Kirkby et Mengel, 1976 ; Schell, 1997). Le transfert du Mg vers les feuilles se fait sous le contrôle de la transpiration foliaire qui conditionne alors la teneur en Mg dans les organes des plantes (Aloni *et al.*, 1998). De ce fait, la quantité de Mg est en général supérieure dans les organes de transpiration (feuilles) par rapport aux racines et aux tiges. Cependant, divers autres paramètres comme l'espèce végétale, les conditions environnementales et le rôle physiologique du Mg dans l'organe

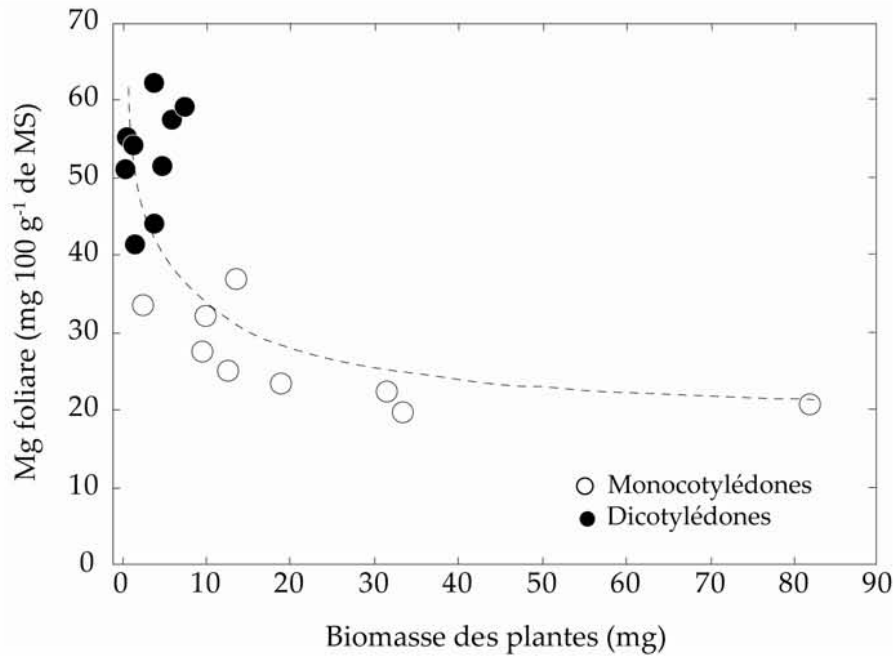
cible, influent sur la distribution et le stockage du Mg dans les différents compartiments de la plante.



**Figure I-13** : Mouvements et interactions des cations et des molécules d'eau dans les vaisseaux conducteurs du xylème et du phloème des plantes vasculaires.

Les études de Wilkinson *et al.* (1990), Courtois *et al.* (2003) et Scott et Robson (1991 et 1990) montrent que la quantité de Mg prélevée par les espèces dicotylédones est supérieure à celle des monocotylédones, bien que ces dernières produisent en moyenne plus de biomasse (Figure I-14). Les monocotylédones accumulent 70 à 90% du Mg prélevé dans les parties aériennes (feuilles), alors que les dicotylédones allouent en moyenne 60% du Mg prélevé à la partie foliaire. Dans les deux cas, une partie du Mg des feuilles sera transférée aux organes reproducteurs, aux fruits (gousse et graine) ou aux organes en croissance et de stockage (racine) (Courtois *et al.*, 2002). Les travaux de Moraghan *et al.* (2006) sur des génotypes de haricots suggèrent que la répartition du Mg dans la plante peut également varier au sein d'une même espèce.





**Figure I-14** : Magnésium prélevé et stocké dans les feuilles en fonction des biomasses produites.

La variation de la quantité de Mg transférée aux organes reproducteurs et aux graines semble être influencée par les conditions environnementales, notamment la biodisponibilité du Mg dans le milieu de croissance des plantes. Les travaux de Grimme (1983) et Scott et Robson (1990 et 1991) montrent que le Mg des parties aériennes est préférentiellement transféré aux graines lorsque l'apport et/ou la biodisponibilité en Mg du sol est faible. En revanche, lorsque l'apport en Mg du sol est supérieur aux besoins des plantes, il est accumulé dans les organes végétatifs. La proportion relativement élevée du Mg dans les fruits révèle sa mobilité dans le phloème, comparé à certains cations comme le Ca. Cette mobilité permet, en condition de déficience de Mg, de transférer une partie du stock de Mg des organes âgés vers les organes jeunes en croissance et dans les racines (Laing *et al.*, 2000; Marschner, 1986). La direction et l'intensité du transport dans le phloème sont corrélées à la translocation des anions et des molécules organiques, tels que le malate, le citrate, et surtout celles associées aux phosphates sous forme de complexes Mg-ATP (Kirkby et Mengel, 1976). L'affinité entre le Mg et les complexes organiques ainsi que les différents mouvements du Mg dans la plante indiquent que le Mg joue un rôle physiologique clé dans la plante.

## II-2.2. Rôle physiologique du Mg dans la plante

Le magnésium est un cation essentiel à certaines fonctions biochimiques des cellules végétales et au fonctionnement général de la plante. Le rôle physiologique du Mg le plus connu est celui lié à sa présence dans les chloroplastes, où il intervient dans la stabilité de leur structure. Il est l'atome central des molécules de chlorophylles (Figure I-15).



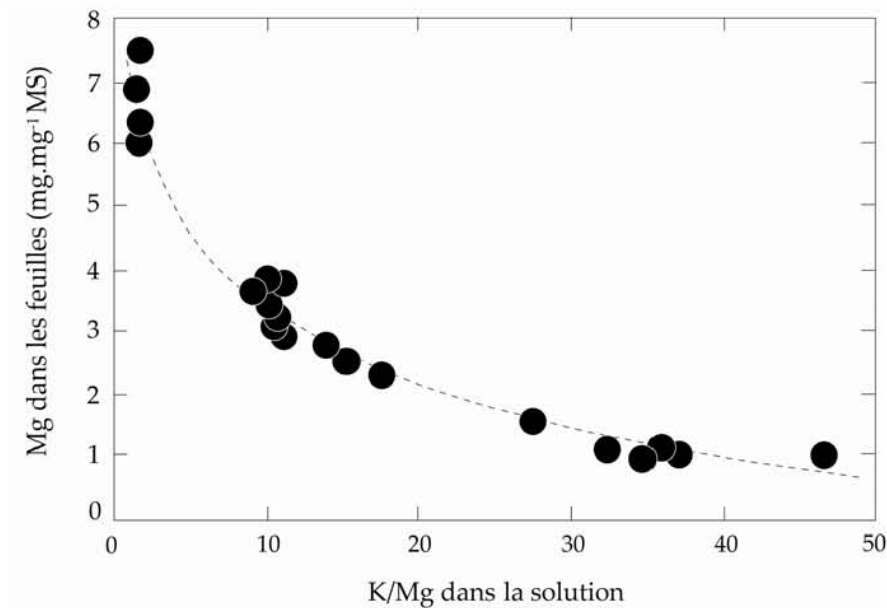


Figure I-16 : Influence du K sur l'absorption et la translocation du Mg dans les plantes.

### II-3 Restitution du Mg des plantes

Après une période de stockage plus ou moins longue dans la plante, le Mg, comme tous les autres cations, est restitué au sol sous forme solide (litière) et soluble (pluiolessivats). Les pluiolessivats sont définis comme la fraction des précipitations collectées sous la canopée. Les connaissances sur la chimie de ces pluiolessivats se sont beaucoup améliorées depuis les études sur le dépérissement forestier.

Dans les feuilles, le Mg est présent dans le cytoplasme des cellules sous la forme soluble et complexée. Lorsque les cellules foliaires sont en contact avec des solutions acides ou riches en  $NH_4^+$ , il se produit un échange entre le Mg foliaire soluble et les ions  $H^+$  /  $NH_4^+$  contenus dans les précipitations. Le passage des précipitations à travers la canopée modifie alors leur composition chimique par rapport à celle des précipitations directes. Ainsi, diverses études observent que la concentration en Mg, ainsi que celle d'autres cations (Ca et K), peuvent augmenter de plus de 50% entre les pluies et les pluiolessivats. Cependant, les modifications des concentrations pluie/pluiolessivat varient fortement selon l'espèce, l'âge des peuplements et la période de l'année considérée (Amezaga *et al.*, 1997; De Schrijver *et al.*, 2007).

Le mécanisme d'échange entre les cations et les ions  $H^+$  au niveau des feuilles permet ainsi de tamponner une partie des précipitations acides. Cependant, dans les conditions expérimentales, la corrélation entre la perte foliaire de Mg et le pH des eaux de pluie n'a pas

été clairement démontrée. En effet, les résultats de Mitterhuber *et al.* (1989) indiquent que seul 0.01% du Mg des aiguilles d'épicéa est extrait par échange au contact de solutions à pH très acides (2.75). De même, De Schrijver *et al.* (2007) observent que quelque soit le pH de la pluie incidente, une faible fraction de Mg (12 à 15%) des pluviollessivats proviendrait des feuilles. Dès lors, la grande différence entre la composition des précipitations directes et des pluviollessivats pourrait être interprétée comme étant le résultat du « lavage » et de la solubilisation des dépôts secs atmosphériques captés à la surface des feuilles (Atteia and Dambrine, 1993 ; Ruoho-Airola *et al.*, 2003 ). Ces dépôts proviendraient de deux principales sources : (1) les sels marins, dont la proportion dans les dépôts atmosphériques diminue en s'éloignant des côtes, (2) les particules minérales ou biologiques continentales, dont la proportion est d'autant plus forte que les côtes sont lointaines (Armbruster *et al.*, 2002).

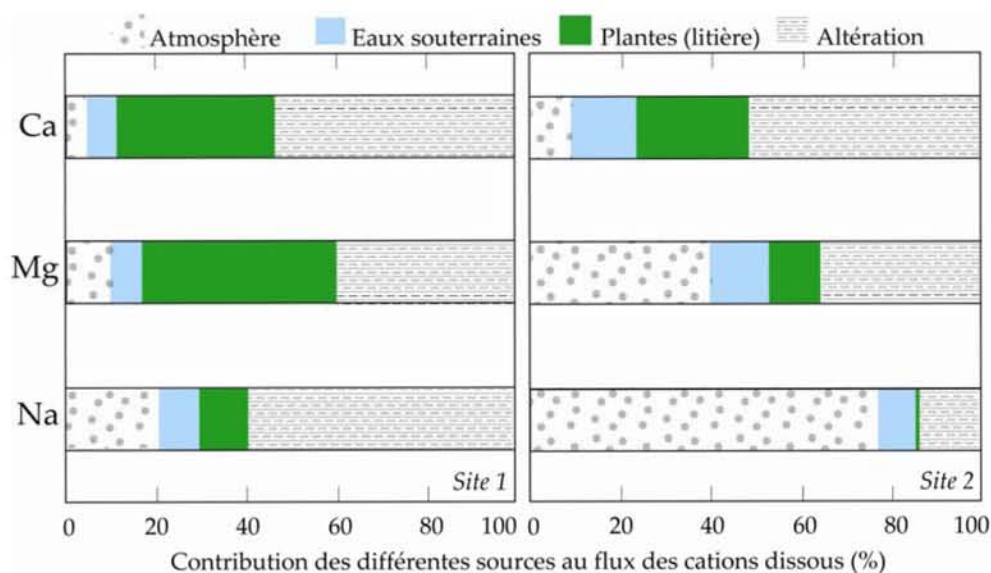
La restitution du Mg par les litières (dégradation des racines mortes, chute, puis minéralisation des feuilles et des branches...) représente la seconde forme de restitution du Mg des plantes au sol. Dans les écosystèmes forestiers naturels, cette voie est la plus importante de restitution du Mg, les chutes de litières atteignant par exemple 60 à 90% des restitutions totales. Dans ces mêmes écosystèmes peu anthropisés, la chute de litière ne représente que 40 à 50% de la restitution totale de K (Cole and Rapp, 1981 ; Johnson, 1992 ; Tian *et al.*, 1992; Ukonmaanaho et Starr, 2001). La production et la vitesse de dégradation de la litière déterminent la quantité de cations issus des plantes. Ces deux paramètres sont fonction de la nature et de la quantité de litière produite, de l'espèce végétale, de l'âge des espèces et du climat (Feger, 1997; Ranger *et al.*, 2003) (Tableau I-1). Une faible dégradation de la litière sous climat froid entraîne une accumulation de la litière dans les sols, et la production d'acides organiques conduisant à une acidification du milieu. Au contraire, une dégradation rapide de la litière sous les climats tempérés entraîne une importante libération des éléments dans le milieu sous une forme facilement disponible (ionique) (Feger, 1997).

**Tableau I-1** : Quantité et temps de résidence du magnésium dans la litière de forêts sous les principaux climats terrestres (Données issues de Feger, 2007).

Région	Type	Flux de litière kg.ha.an <sup>-1</sup>	Flux de Mg kg.ha.an <sup>-1</sup>	Temps de résidence années
Forêt boréale	Résineux	322	0.3	455
	Feuillus	2645	9.7	14.2
Forêt tempérée	Résineux	4377	5.6	12.9
	Feuillus	5399	11	3.4
Forêt Méditerranéenne	-	3842	9	2.2

La dégradation de la litière produit des substances humiques dont les concentrations en cations majeurs (K, Mg et Ca) sont faibles comparées à celles des tissus actifs (ex. Berg et

Staaf, 1980; Staaf et Berg, 1982 ; Blair, 1988). Les cations issus de la dégradation plus ou moins rapide des litières et des pluviollessivats passent dans les solutions du sol ou s'adsorbent sur le complexe d'échange des sols. Ils deviennent de nouveau directement assimilables par les plantes. Ces deux pools de cations échangeables et solubles sont en équilibre chimique et sont susceptibles d'être lixiviiés vers les horizons profonds des sols ou hors des profils de sol. Les cations issus de la minéralisation de la litière (flux de « recyclage » issus des végétaux) peuvent constituer une source non négligeable alimentant les eaux de surface, notamment lorsque les roches drainées sont pauvres en cations majeurs alcalins et alcalino-terreux. Cependant, très peu d'études ont estimées les flux de cations dissous dans les eaux (en particulier de Mg) provenant de la végétation. Récemment, Zakharova *et al.* (2007) ont estimé que la contribution de la dégradation de la litière végétale aux flux du Mg et Ca dissous dans les rivières variait de 5% à 40% (Figure I-17).



**Figure I-17** : Contribution (en %) de différents réservoirs au flux annuel de cations dissous dans une rivière typique d'une région boréale (en Russie) (d'après Zakharova *et al.* 2007).

Dans les écosystèmes naturels, la détermination de la contribution des sources biologiques des cations reste complexe (ex. Zakharova *et al.*, 2007). Cette contribution des plantes étant liée à leur cycle biologique interne, il semble justifié d'utiliser des outils sensibles aux mécanismes ayant lieu lors des différentes étapes de ce cycle. Dans cette optique, le traçage isotopique apparaît comme un outil précieux, d'autant plus que son champ d'application s'est élargi avec les progrès techniques qui permettent la mesure précise des rapports isotopiques de divers cations majeurs (dont le Mg) dans les plantes.

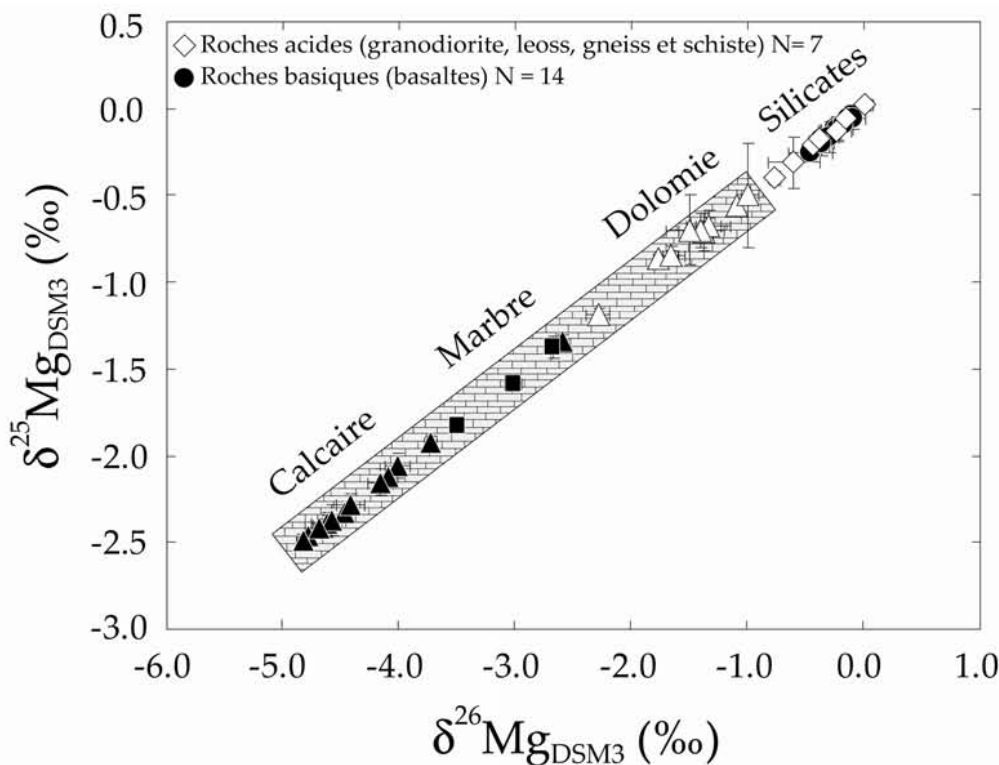
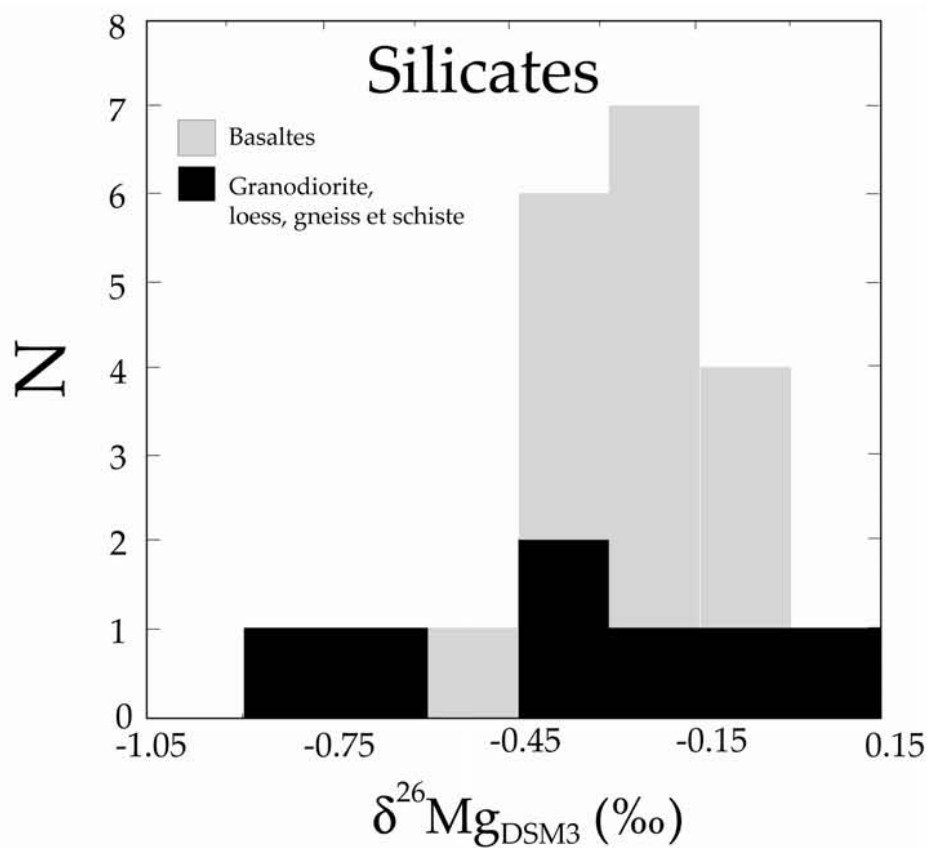
### III. Les signatures isotopiques du Mg des roches continentales aux océans

#### III-1. Estimation de la composition isotopique de la croûte continentale

La croûte continentale supérieure a une nature essentiellement granitique et granodioritique. Elle comprend également des intrusions basiques provenant de magmas mantelliques et des roches sédimentaires. La composition moyenne en pourcentage massique de l'ensemble des roches de la croûte continentale est de 4.7% MgO, mais cette composition varie selon les auteurs de 2% à 5% (Rudnick and Gao, 2003). Les données sur les compositions isotopiques en Mg des roches de la croûte continentale sont encore limitées et très parcellaires. Elles ne concernent à ce jour qu'un loess (Young et Galy, 2004), un gneiss, un granodiorite (Tipper *et al.*, 2006a), un schiste (Teng *et al.*, 2007), des basaltes continentaux (Teng *et al.*, 2007; Wiechert et Halliday, 2006; Young et Galy, 2004), une diorite (Brenot *et al.*, 2008) et un granite (cette étude, cf. chapitre II). Les compositions isotopiques de ces roches varient de -0.75‰ à 0.03‰ pour les roches acides et de -0.46‰ à -0.09‰ pour les roches basiques (Figure I-18).

Bien que les roches granitiques représentent à elles seules ~ 80% de la masse de la croûte continentale supérieure, très peu d'analyses sont disponibles quant à leur distribution spatiale pour permettre l'estimation de la composition isotopique moyenne de la croûte continentale supérieure. L'estimation de cette composition moyenne est rendue plus complexe, car la valeur de  $\delta^{26}\text{Mg}$  du schiste (des roches métamorphiques en général) peut être intimement liée à l'environnement géologique local. Quoi qu'il en soit, les valeurs des compositions isotopiques des roches silicatées sont significativement supérieures à celles des roches carbonatées et évaporitiques (Figure I-19). Cette systématique suggère alors que le cheminement du Mg des roches silicatées aux roches sédimentaires induit des variations naturelles des compositions isotopiques du magnésium. Ce cheminement du Mg se fait à travers les processus d'altération chimique, d'érosion, du transport des produits de ces processus par les eaux de surface, et de leurs précipitations dans les océans sous forme de carbonates (biogéniques ou inorganiques).

**Figure I-18** : Compositions isotopiques du magnésium des roches silicatées. Compilation de données de la littérature (d'après Brenot *et al.*, 2008; Galy *et al.*, 2002; Pogge von Strandmann *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2007; Tipper *et al.*, 2006a; Young et Galy, 2004).



**Figure I-19** : Signatures isotopiques du magnésium des roches silicatées aux roches carbonatées (d'après Brenot *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2004; Galy *et al.*, 2002; Pogge von Strandmann *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2007; Tipper *et al.*, 2006; Young et Galy, 2004).

## III-2. Des roches continentales aux rivières

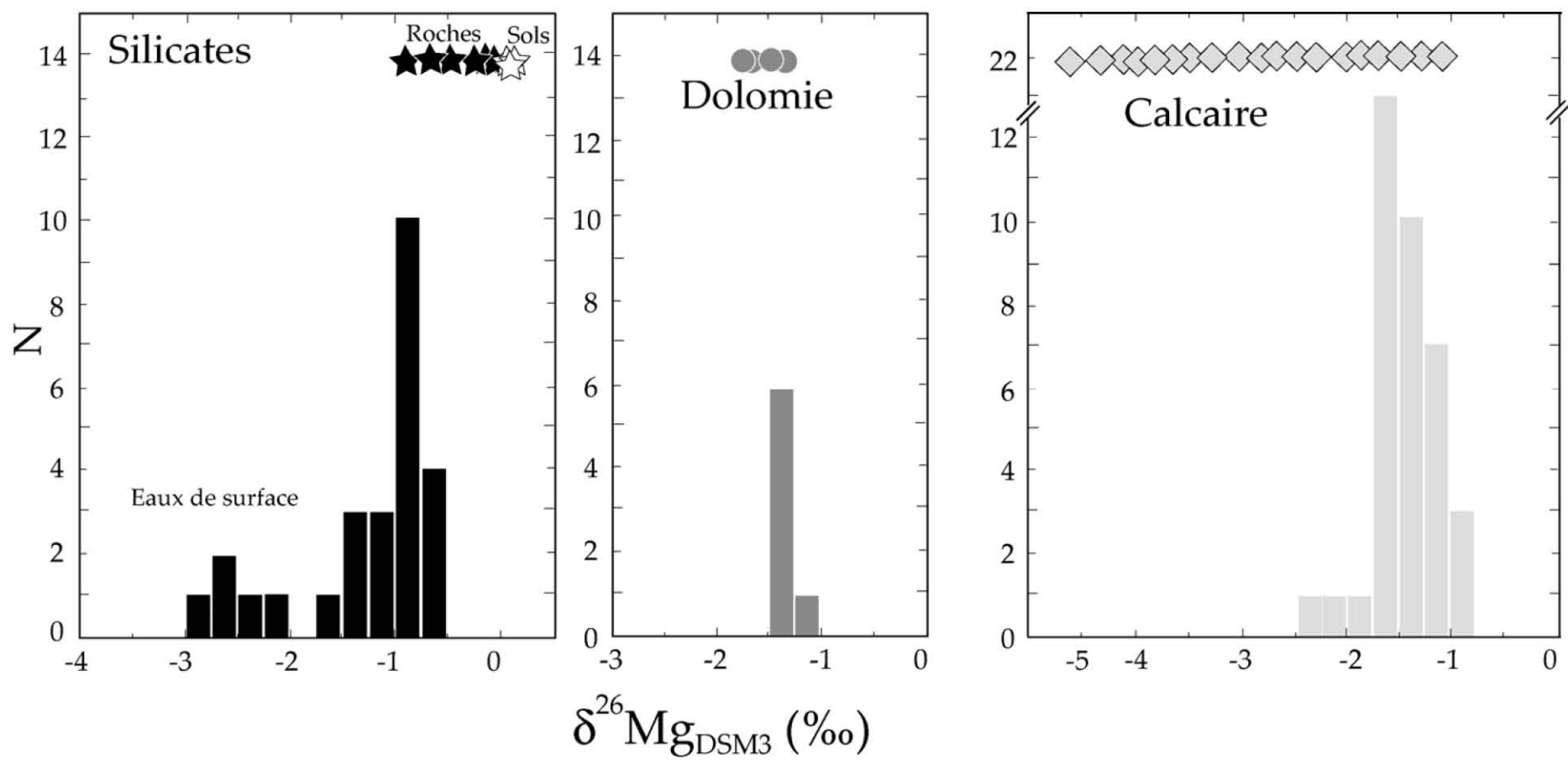
### III-2.1. Rôle de l'altération des roches et de la lithologie

Récemment, De Villiers *et al.* (2005), Tipper *et al.* (2006a), Brenot *et al.* (2008) et Pogge Von Strandmann *et al.* (2008) ont réalisé une série d'études sur le fractionnement des isotopes du magnésium lors des processus d'altération dans des bassins versants, à la fois monolithologiques et à lithologies mixtes. Ces études montrent que les compositions isotopiques des eaux sont systématiquement différentes de celles des roches drainées, notamment dans les bassins versants silicatés (Figure I-20A). Pour les eaux drainant les bassins carbonatés, aucun fractionnement isotopique du Mg n'est à ce jour mis en évidence (Figure I-20B, C).

A l'exception des basaltes, l'altération des roches silicatées induit des signatures isotopiques différentes entre les roches initiales, les eaux et les sols, avec un départ préférentiel des isotopes légers dans les eaux et une rétention préférentielle des isotopes lourds dans les sols. Tipper *et al.* (2006a et b) observent, dans le Sud du Tibet, que le  $\delta^{26}\text{Mg}$  du sol total est de  $-0.03\text{‰}$ , significativement plus élevé que celui de la roche mère ( $-0.42\text{‰}$ ). Parallèlement, les eaux de surface qui drainent les bassins versants silicatés ont des compositions isotopiques plus légères que celles des roches mères. Brenot *et al.* (2008) rapportent également, dans l'Est de la France, des fractionnements isotopiques du Mg lors de l'altération des roches, avec une libération préférentielle des isotopes légers en solution.

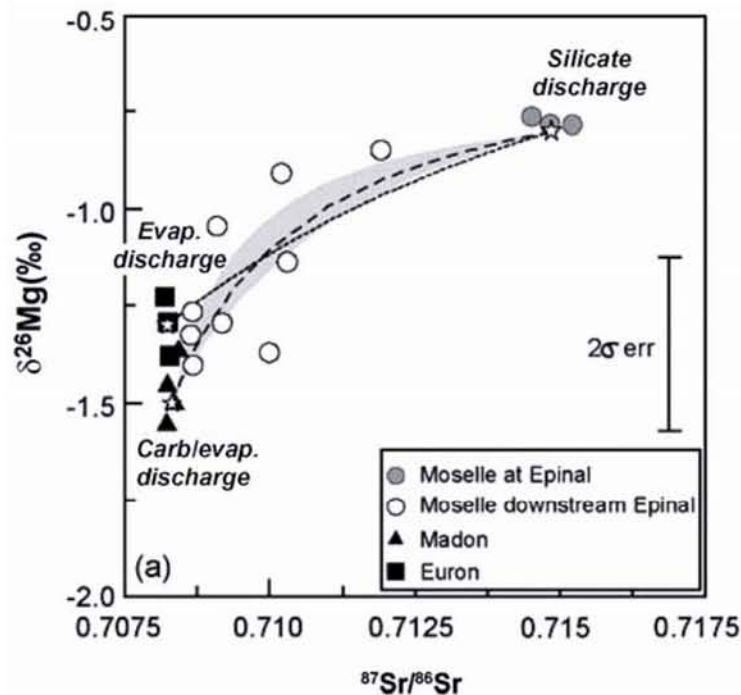
A l'échelle du bassin versant, la comparaison des compositions isotopiques des rivières indique clairement que sur les bassins carbonatés, plus de 75% des eaux ont des valeurs de  $\delta^{26}\text{Mg} < -1\text{‰}$ , alors que sur les silicates, plus de 50% des eaux ont des valeurs de  $\delta^{26}\text{Mg} > -1\text{‰}$ . Ainsi, pour Brenot *et al.* (2008), la lithologie du bassin versant aurait un rôle primordial dans les variations des signatures isotopiques du Mg des rivières. En effet, le bassin de la Moselle, à lithologie mixte (carbonates et silicates), se prête bien à l'étude du rôle de la lithologie sur les fractionnements isotopiques du Mg. Par l'analyse de la composition des eaux à différents points représentatifs des différentes lithologies, ces auteurs observent que les rivières drainant les carbonates ont des valeurs de  $\delta^{26}\text{Mg}$  significativement inférieures de  $0.6\text{‰}$  par rapport à celle des rivières drainant les bassins silicatés ( $-1.2\text{‰}$  à  $-0.7\text{‰}$ ). En couplant le système isotopique du Mg à celui du Sr, Brenot *et al.* (2008) démontrent qu'il est possible de déconvoluer les différentes sources du Mg à l'échelle de ce bassin versant (Figure I-21).





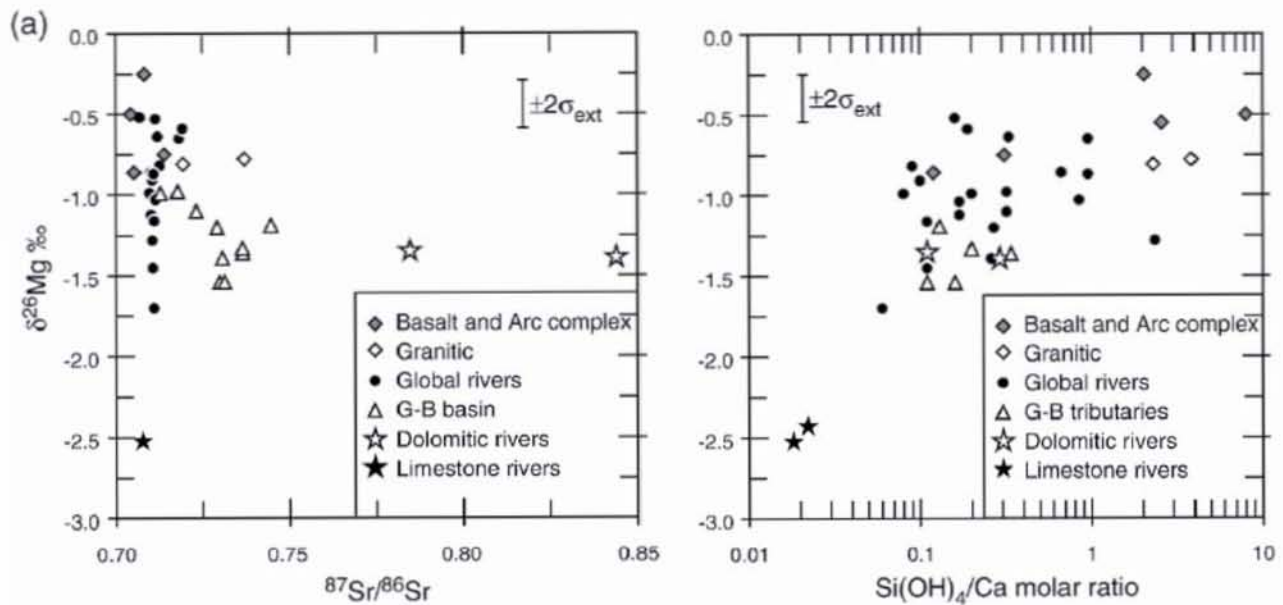
**Figure I-20 :** Relation entre les compositions isotopiques du Mg des roches et des rivières de bassins monolithologiques (d'après De Villiers *et al.* 2005 ; Tipper *et al.* 2008 et Brenot *et al.* 2008).

Les eaux drainant les silicates ont à la fois les rapports  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  et les valeurs de  $\delta^{26}\text{Mg}$  les plus élevées ( $\delta^{26}\text{Mg} = -1.2\text{‰}$  à  $-0.7\text{‰}$ ), au contraire des eaux drainant les carbonates et évaporites ( $\delta^{26}\text{Mg} = -1.6\text{‰}$  à  $-1.2\text{‰}$ ). Ainsi, dans le diagramme de mélange, la composition isotopique des eaux se répartit entre les carbonates, évaporites et silicates dont la contribution est estimée à  $\sim 70\%$  du Mg dissous de la Moselle.



**Figure I-21** : Diagramme de  $\delta^{26}\text{Mg}$  vs  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  pour la caractérisation des sources du Mg dans les eaux de surface du bassin de la Moselle échantillonnées en des points représentatifs des lithologies du bassin (d'après Brenot *et al.*, 2008).

Par contre, pour Tipper *et al.* (2006b ; 2008), les signatures isotopiques en Mg des eaux ne seraient pas le reflet d'un simple mélange de sources. Pour ces auteurs, les signatures isotopiques en Mg des fleuves, à une échelle plus large, sont indépendantes de celles de la lithologie. Ceci serait due d'une part, à la grande variabilité de la composition des carbonates (3‰) (Figure I-19) et, d'autre part au fait que l'altération des silicates produirait des eaux dont la composition isotopique est incluse dans la gamme de celle de la dolomie. Cette assertion est corroborée par l'analyse de 45 fleuves échantillonnés à travers le monde pour lesquelles ils rapportent une gamme de variation de 2.5‰, et par l'utilisation de diverses méthodes de traçage de source démontrant qu'il n'existerait pas de relation entre la lithologie et la composition isotopique en Mg de ces eaux (Figure I-22).



**Figure I-22 :** Diagramme de  $\delta^{26}\text{Mg}$  vs  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  et  $\text{Si}(\text{OH})_4/\text{Ca}$  pour la caractérisation des sources du Mg dans les eaux de surface (d'après Tipper *et al.*, 2008).

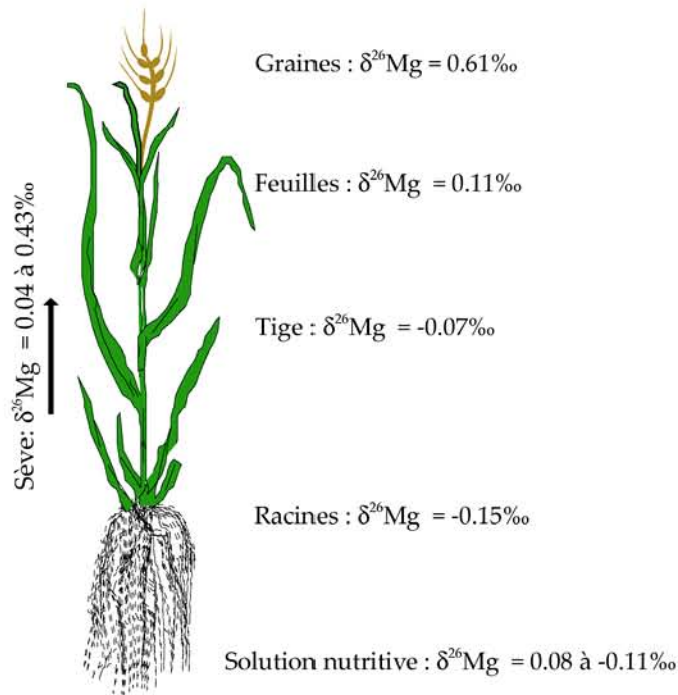
Les différents travaux présentés ci-dessus indiquent que les isotopes du Mg fractionnement au cours des processus d'altération. Cependant, ils font tous l'impasse sur l'effet de la végétation. Les travaux de Zakharova *et al.* (2007) soulignent l'importance du recyclage des cations par la végétation comme source potentielle des cations dissous dans certaines rivières. Cela pose la question du rôle de la végétation lors de l'acquisition des signatures isotopiques des rivières.

### III-2.2. Premières estimations du fractionnement isotopique du Mg lors de la croissance de plante.

A ce jour, aucune étude n'a investigué en milieu naturel les compositions isotopiques du Mg au cours de son cycle biogéochimique continental. Seul les fractionnements isotopiques du Mg lors de processus physiologiques (synthèse de la chlorophylle) et de la croissance expérimentale de plante (blé) ont été documentés (Black *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2007 ; Ra et Kitagawa, 2007). Ces études indiquent que la synthèse de la molécule de la chlorophylle s'accompagne d'un fractionnement des isotopes du Mg, mais le sens de ce fractionnement reste débattu.

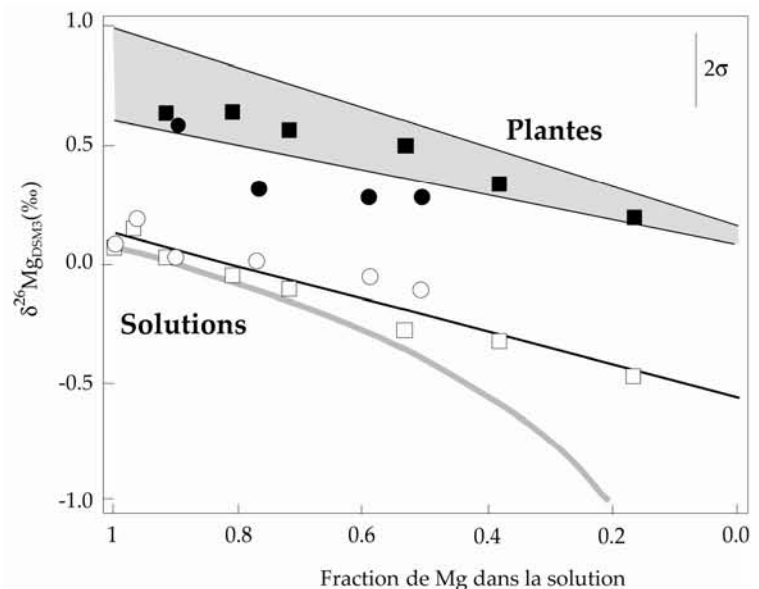
En ce qui concerne les végétaux supérieurs, la première estimation des fractionnements isotopiques du Mg associée à leur cycle de croissance a été réalisée avec du blé cultivé en conditions hydroponiques (Black *et al.*, 2008). Les principaux résultats sont reportés sur la figure I-23. Le calcul de la composition moyenne de la plante totale indique un

enrichissement en isotope lourds de 0.28‰ par rapport à la solution initiale. Le suivi de la composition isotopique en Mg de cette solution nutritive au cours du temps confirme ce résultat (Figure I-24). Pour Black *et al.* (2008), cet enrichissement en isotopes lourds de la plante serait lié à un fractionnement isotopique à l'équilibre ( $\alpha = 1.00068$ ) au niveau des racines.



**Figure I-23** :  $\delta^{26}\text{Mg}$  mesurés dans les différentes parties d'un blé cultivé en conditions expérimentales (d'après Black *et al.*, 2008).

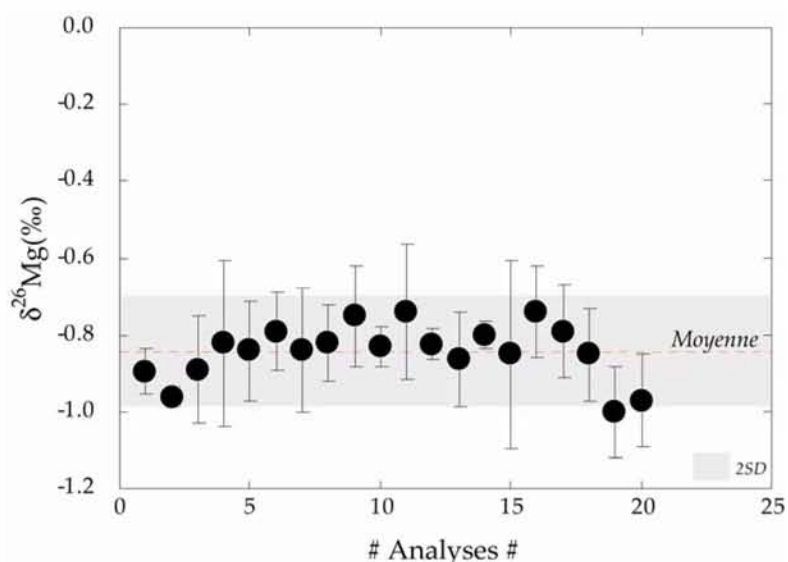
**Figure I-24** : Simulations des processus de fractionnement isotopique du Mg lors de la croissance du blé en culture hydroponique. Les courbes des modèles ont été réalisées avec un fractionnement isotopique  $\Delta$  de 0.7‰. La courbe du processus de fractionnement à l'équilibre est celle qui reproduit au mieux les données mesurées (d'après Black *et al.*, 2008).



Ces premières observations restent à valider d'une part, en milieu naturel et, d'autre part, sur d'autres espèces végétales. Le rôle de la croissance des plantes, de la disponibilité du Mg dans le milieu de croissance (ou du type de lithologie source), ainsi que de l'âge des plantes sur les fractionnements du Mg restent eux aussi à déterminer.

### III-3. Des rivières aux océans

Le magnésium issu de l'altération des roches et/ou du recyclage par la végétation est transporté aux océans, essentiellement sous la forme d'ions  $Mg^{2+}$ . Les eaux de surface ont une concentration moyenne de  $4 \mu g.ml^{-1}$ , avec cependant une large variation de  $< 1$  à  $50 \mu g.ml^{-1}$  suivant la nature de la roche drainée (ex. Gaillardet *et al.*, 1999; Livingstone, 1963; Meybeck, 1979). Le flux global annuel de Mg des eaux de surface à l'océan est de  $3.2 \times 10^8$  t (Livingstone, 1963). La composition isotopique moyenne de ce flux de Mg à l'océan est estimée à  $1.09\text{‰}$  à partir de l'analyse de 45 fleuves, dont les 16 plus grands fleuves mondiaux (hors-mis le Danube) (Tipper *et al.*, 2008). Dans les océans, les analyses des eaux de surface (0 m), (Figure I-25), de même que les profils en profondeur (Tableau I-2) indiquent une composition isotopique moyenne statistiquement invariable et égale à  $-0.83\text{‰} \pm 0.14\text{‰}$ , confirmant l'homogénéité isotopique en Mg des océans.

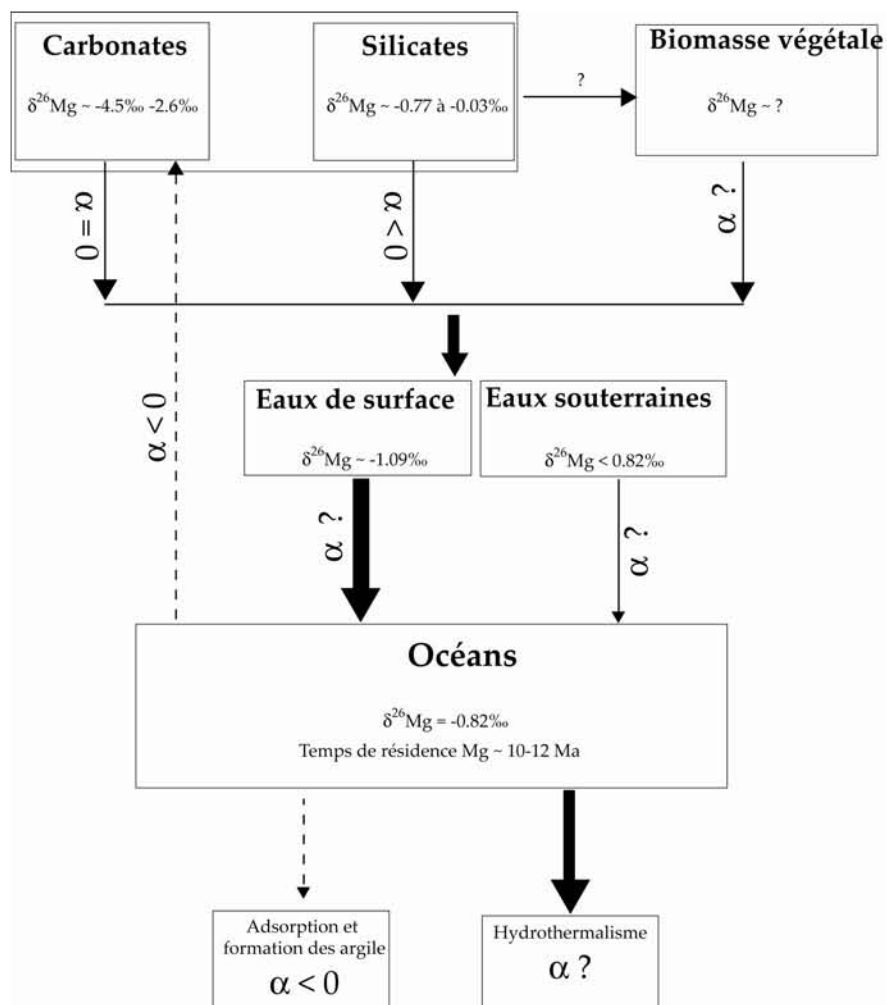


**Figure I-25 :** Composition isotopique de l'eau de mer. Données issues de la littérature (d'après Carder *et al.*, 2005 (cité de Pearson *et al.*, 2005); Chang *et al.*, 2004; Pearson *et al.*, 2005; Ra et Kitagawa, 2007; Tipper *et al.*, 2006; Wombacher *et al.*, 2006; Young et Galy 2004).

Profondeur (m)	$\delta^{26}Mg$ (1)	$\delta^{26}Mg$ (2)
50	nd	-0.73
600	nd	-0.84
1000	-0.69	-0.84
2000	-0.77	nd
2600	nd	-0.79
3000	-0.86	nd
4000	-0.73	nd
5800	nd	-0.86
Moyenne	<b>-0.76</b>	<b>-0.81</b>
$2\sigma$	<b>0.15</b>	<b>0.11</b>

**Tableau I-2 :** Analyse de profils des océans. (1) Ra et Kitagawa dans l'océan Pacifique et (2) de Villiers *et al.* (2005) dans l'océan Atlantique et la mer Méditerranée. Les données de De Villiers *et al.* (2005) ont été calculées et converties par rapport au DSM3, en considérant que la valeur moyenne de l'eau de mer ( $-0.82\text{‰}$ ).

La composition isotopique du Mg des océans est supérieure à celle du flux de Mg des fleuves aux océans, estimée à  $-1.09\text{‰}$ . Cette différence, selon De Villiers *et al.* (2005) et Tipper *et al.* (2006b) serait due à un fractionnement isotopique du Mg dans les océans lors de la précipitation des carbonates, notamment de la dolomie, responsable d'au moins 9% du flux sortant de Mg dans les océans. La formation de la dolomie serait associée à la circulation hydrothermale. Ceci n'est vrai que si l'océan est dans un état stationnaire (cf. Tipper *et al.*, 2006b). Cependant, ces auteurs n'excluent pas des déséquilibres dans les compositions isotopiques du Mg entre les flux entrants et sortants du Mg des océans. Pour de Villiers *et al.* (2005) tout déséquilibre de  $\sim 0.25\text{‰}$  des compositions isotopiques du flux Mg total entrant dans les océans, pourrait expliquer cette différence. Dans ces conditions, l'une des possibilités est que la valeur estimée pour les rivières mondiales ( $-1.09\text{‰}$ ) n'est pas représentative à long terme (à cause de perturbations liées à la dernière glaciation par exemple, cf. Vance *et al.*, 2009), ou bien à cause d'un rôle important des estuaires ou eaux souterraines (Pogge van Strandman *et al.*, 2008).



**Figure I.26** : Cycle global du Mg avec une estimation des  $\delta^{26}\text{Mg}$  moyens lorsqu'ils ont été estimés dans la littérature (d'après Tipper *et al.*, 2006b).

## IV. Références bibliographiques

- Aloni, R., Enstone, D. E., and Peterson, C. A., 1998. Indirect evidence for bulk water flow in root cortical cell walls of three dicotyledonous species. *Planta* 207, 1-7.
- Amalou, Z., Gibrat, R., Trouslot, P., and d'Auzac, J., 1994. Solubilization and Reconstitution of the  $Mg^{2+}/2H^{+}$  Antiporter of the Lutoid Tonoplast from *Hevea brasiliensis* Latex. *Plant Physiol.* 106, 79-85.
- Amezaga, I., Gonzalez Arias, A., Domingo, M., Echeandia, A., and Onaindia, M., 1997. Atmospheric Deposition and Canopy Interactions for Conifer and Deciduous Forests in Northern Spain. *Water, Air, & Soil Pollution* 97, 303-313.
- Armbruster, M., MacDonald, J., Dise, N. B., and Matzner, E., 2002. Throughfall and output fluxes of Mg in European forest ecosystems: a regional assessment. *Forest Ecology and Management* 164, 137-147.
- Atteia, O. and Dambrine, E., 1993. Dynamique d'éléments traces dans les précipitations sous le couvert de 2 pessières peu polluées de Suisse romande. *Ann. For. Sci.* 50, 445-459.
- Barber, S. A., 1995. *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*. Wiley-Interscience; 2 edition, Hoboken.
- Berg, B. and Staaf, H., 1980. Decomposition rate and chemical changes of Scots pine needle litter. II. Influence of chemical composition. In: Persson, T. (Ed.), *Structure and Function of Northern Coniferous Forests - An Ecosystem Study*, Stockholm.
- Bigeleisen, J. and Mayer, M. G., 1947. Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *Journal of Chemical Physics* 15 261-267
- Black, J. R., Yin, Q.-z., and Casey, W. H., 2006. An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 4072-4079.
- Black, J. R., Yin, Q. Z., Rustad, J. R., and Casey, W. H., 2007 Magnesium isotopic equilibrium in chlorophylls. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8690-8691.
- Black, J. R., Epstein, E., Rains, W. D., Yin, Q. Z., and Casey, W. H., 2008. Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental Science Technology* 42, 7831-7836.
- Blair, J., 1988. Nutrient release from decomposing foliar litter of three tree species with special reference to calcium, magnesium and potassium dynamics. *Plant and Soil* 110, 49-55.
- Bradfield, E. G., 1976. Calcium complexes in the xylem sap of apple shoots. *Plant and Soil* 44, 495-499.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J., and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Bücking, H., Kuhn, A. J., Schröder, W. H., and Heyser, W., 2002. The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *J. Exp. Bot.* 53, 1659-1669.
- Catanzaro, E. J., Murphy, T. J., Garner, E. L., and Shields, W. R., 1966. Absolute isotope abundance ratios and atomic weights of magnesium. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 70a, 453-458.
- Chang, V. T. C., Williams, R. J. P., Makishima, A., Belshaw, N. S., and O'Nions, R. K., 2004. Mg and Ca isotope fractionation during  $CaCO_3$  biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 79-85.

- Cole, D. W. and Rapp, M., 1981. Elemental cycling in forest ecosystems. In: Reichle, D., E. (Ed.), *Dynamic Properties of Forest Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Courtois, D., Kastenmayer P., Clough J., Vigo M., Sabatier M., and Arnaud M.J., 2003. Magnesium enrichment and distribution in plants. *Isotopes in Environmental Health Studies* 39, 273-279
- Criss, R. E., 1999. *Principles of Stable Isotope Distribution* Oxford University Press, New York, Oxford.
- Crooke, W. M., Knight, A. H., and Macdonald, I. R., 1960. Cation exchange properties and pectin content of storage-tissue disks. *Plant and Soil* 13, 55-67.
- Dempster, A. J., 1921. Positive Ray Analysis of Lithium and Magnesium. *Physical Review* 18, 415.
- De Schrijver, A., Geudens, G., Augusto, L., Staelens, J., Mertens, J., Wuyts, K., Gielis, L., and Verheyen, K., 2007. The effect of forest type on throughfall deposition and seepage flux: a review. *Oecologia* 153, 663-674.
- De Villiers, S., Dickson, J. A. D., and Ellam, R. M., 2005. The composition of the continental river weathering flux deduced from seawater Mg isotopes. *Chemical Geology* 216, 133-142.
- Dufey, J. E., Amory, D. E., and Braun, R., 1985 Propriétés électriques et sélectivité d'échange ionique des racines. *Pédologie* 35, 231-249.
- Epstein, E. and Bloom, A. J., 2005. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Sinauer Associates Inc., U.S.
- Feger, K. H., 1997. Biogeochemistry of Mg in forest ecosystems, *Magnesium Deficiency in Forest Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ferguson, I. B., 1978. Radial Movement of Calcium and Magnesium to the Xylem in Roots of *Zea mays*. *Australian Journal of Plant Physiology* 5, 433-442. .
- Gaillardet, J., Dupré, B., Louvat, P., and Allègre, C. J., 1999. Global silicate weathering and CO<sub>2</sub> consumption rates deduced from the chemistry of large rivers. *Chemical Geology* 159, 3-30.
- Galy, A., Bar-Matthews, M., Halicz, L., and O'Nions, R. K., 2002. Mg isotopic composition of carbonate: insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters* 201, 105-115.
- Galy, A., Belshaw, N. S., Halicz, L., and O'Nions, R. K., 2001. High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 208, 89-98.
- Galy, A., Yoffe O., Janney P.E., Williams R.W., Cloquet C., Alard O., Halicz L., Wadwha M., Hutcheon I.D., Ramon E., and J., C., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and new reference materials for magnésium isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18, 1352-1356.
- Grimme, H., 1983. Aluminium Induced Magnesium Deficiency in Oats. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 146, 666-676.
- Haynes, R., 1980. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: Their role in ion accumulation by plants. *The Botanical Review* 46, 75-99.
- Hibbs, R. F. and Redmond, J. W., 1948. Natural Abundance Measurements on Potassium and Magnesium *Other Information: Orig. Receipt Date: 30-JUN-49*.
- Hoefs, J., 2004. *Stable isotope geochemistry*. Springer-Verlag, Edition: 5, Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.
- Hopkins, W. G., 2003 *Physiologie végétale*. De Boeck.



- IUPAC, 2003. Atomic weights of the elements: Review 2000 (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 75, 683–800.
- Johnson, D. W., 1992. Effects of forest management on soil carbon storage. *Water, Air, & Soil Pollution* 64, 83-120.
- Kelly, J. M. and Barber, S. A., 1991. Magnesium uptake kinetics in loblolly pine seedlings. *Plant and Soil* 134, 227-232.
- Kirkby, E. A. and Mengel, K., 1976. The role of magnesium in plant nutrition. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 139, 209-222.
- Komai, Y., 1962. Studies on the Absorption of cations by barley roots with special references to magnesium. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture, Serie B, Agriculture and biology* 14, 99-126.
- Kuhn, A. J., Schröder, W. H., and Bauch, J., 2000. The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210, 488-496.
- Laing, W., Greer, D., Sun, O., Beets, P., Lowe, A., and Payn, T., 2000. Physiological impacts of Mg deficiency in *Pinus radiata*: growth and photosynthesis. *New Phytologist* 146, 47-57.
- Leggett, J. E. and Gilbert, W. A., 1969. Magnesium Uptake by Soybeans. *Plant Physiology* 44, 1182-1186.
- Li, L., Tutone, A. F., Drummond, R. S. M., Gardner, R. C., and Luan, S., 2001. A Novel Family of Magnesium Transport Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2761-2775.
- Livingstone, D. A., 1963. Chemical composition of rivers and lakes. *US Geological Survey Professional Paper* 440 G, 1–63.
- Maas, E. V. and Ogata, G., 1971. Absorption of Magnesium and Chloride by Excised Corn Root. *Plant Physiology* 47, 357-360.
- Macklon, A. E. S. and Sim, A., 1976. Cortical cell fluxes and transport to the stele in excised root segments of *Allium cepa* L. *Planta* 128, 5-9.
- Mane, V., Savant, N., and Shingte, A., 1970. Relationship between cation exchange capacity of roots and mineral composition of plant tops as influenced by age. *Plant and Soil* 33, 113-119.
- Marschner, H., 1986. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, New York.
- McKinney, C. R., McCrea, J. M., Epstein, S., Allen, H. A., and Urey, H. C., 1950. Improvements in Mass Spectrometers for the Measurement of Small Differences in Isotope Abundance Ratios. *Review of Scientific Instruments* 21, 724-730.
- Mengel, K. K., Ernest A., Kosegarten, H., and Appel, T., 2001. *Principles of plant nutrition*. Springer-Verlag, Edition: 5, Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.
- Merhaut, D., 2006. Magnesium. In: Barker, A. V. and Pilbeam, D. J. Eds.), *Handbook of Plant Nutrition*. CRC Press.
- Meybeck, M., 1979 Concentration des eaux fluviales en éléments majeurs et apports en solution aux océanes. *Revue de Géographie Physique et Géologie dynamique* 21, 215-246.
- Mitterhuber, E., Pfan, H., and Kaiser, W. M., 1989. Leaching of solutes by the action of acidic rain: a comparison of efflux from twigs and single needles of *Picea abies* (L. Karst.). *Plant, Cell and Environment* 12, 93-100.
- Moraghan, J. T., Etchevers, J. D., and Padilla, J., 2006. Contrasting accumulations of calcium and magnesium in seed coats and embryos of common bean and soybean. *Food Chemistry* 95, 554-561.
- O'Neil, J. R., 1986. Theoretical and experimental aspects of isotopic fractionation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 16, 1-40.

- Oliver, S. and Barber, S. A., 1966. An Evaluation of the Mechanisms Governing the Supply of Ca, Mg, K, and Na to Soybean Roots (*Glycine max*). *Soil Sci Soc Am J* 30, 82-86.
- Pearson N. J., Griffin W. L., Alard O. and O'Reilly S. Y. (2006) The isotopic composition of magnesium in mantle olivine: Records of depletion and metasomatism. *Chemical Geology* 226, 115-133.
- Pineros, M. and Tester, M., 1995. Characterization of a voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-selective channel from wheat roots. *Planta*, 478–488.
- Pinero, M., . and Tester, M., 1997. Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. *Journal of Experimental Botany* 48, 551–577.
- Pogge von Strandmann, P. A. E., Burtonn K. W., James, R. H., van Calsteren, P., and Gislason, S. R., Sigfússon, B.,, 2008. The influence of weathering processes on riverine magnesium isotopes in a basaltic terrain. *Earth and Planetary Science Letters* 276, 187-197.
- Ra, K. and Kitagawa, H., 2007. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 817-821.
- Ram, L., 1980. Cation exchange capacity of plant roots in relation to nutrients uptake by shoot and grain as influenced by age. *Plant and Soil* 55, 215-224.
- Ranger, J., Gerard, F., Lindemann, M., Gelhaye, D., and Gelhaye, L., 2003. Dynamics of litterfall in a chronosequence of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco) stands in the Beaujolais mounts (France). *Ann. For. Sci.* 60, 475-488.
- Rengel, Z. and Robinson, D. L., 1989. Competitive Al<sup>3+</sup> Inhibition of Net Mg<sup>2+</sup> Uptake by Intact *Lolium multiflorum* Roots : I. Kinetics. *Plant Physiol.* 91, 1407-1413.
- Rudnick, R. L. and Gao, S., 2003. Composition of the Continental Crust. In: Holland, H. D. and Turekian, K. K. Eds.), *Treatise on Geochemistry -The Crust*. Elsevier-Pergamon, Oxford.
- Ruoho-Airola, T., Alaviippola, B., Salminen K., and Varjoranten, R., 2003 An investigation of base cation deposition in Finland. *Boreal Environment Research*, 8, 83-95..
- Schell, J., 1997. Interdependence of pH, malate concentration, and calcium and magnesium concentrations in the xylem sap of beech roots. *Tree Physiol* 17, 479-483.
- Scott, B. and Robson, A., 1991. Distribution of magnesium in wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to supply. *Plant and Soil* 136, 183-193.
- Scott, B. J. and Robson, A. D., 1990. Distribution of magnesium in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in relation to supply. *Australian Journal of Agricultural Research* 41, 499–510.
- Shaul, O., 2002. Magnesium transport and function in plants:. the tip of the iceberg. *Biometals* 15, 309-323.
- Staaf, H. and Berg, B., 1982. Accumulation and release of plant nutrients in decomposing Scots pine needle litter. Long-term decomposition in a Scots pine forest II. *Canadian Journal of Botany* 8, 1561–1568.
- Stok, B. P., Tànczos, O. G., Kähr, M., Stuiver, C. E. E., Pieter, A. K., and Kuiper, J. C., 1981. Transport of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> stimulated adenosine triphosphatase activity in oat roots as affected by mineral nutrition. *Physiologia Plantarum* 52, 115-123.
- Teng, F.-Z., Wadhwa, M., and Helz, R. T., 2007. Investigation of magnesium isotope fractionation during basalt differentiation: Implications for a chondritic composition of the terrestrial mantle. *Earth and Planetary Science Letters* 261, 84-92.
- Tian, G., Kang B., T., and Brussard, L., 1992. Effects of chemical composition on N, Ca and Mg release during incubation of leaves from selected agroforestry and fallow plant species. *Biogeochemistry* 16, 103–119.

- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2006a. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters* 247, 267-279.
- Tipper, E. T., Galy, A., Gaillardet, J., Bickle, M. J., Elderfield, H., and Carder, E. A., 2006b. The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters* 250, 241-253.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Ukonmaanaho, L. and Starr, M., 2001. The Importance of Leaching from Litter Collected in Litterfall Traps. *Environmental Monitoring and Assessment* 66, 129-146.
- Urey, H. C., 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society* 562-581.
- Vance, D., Teagle, D. A. H., and Foster, G. L., 2009. Variable Quaternary chemical weathering fluxes and imbalances in marine geochemical budgets. *Nature* 458, 493-496.
- Wacquart, J. P., 1974. Recherches sur les propriétés d'adsorption cationique des racines (rôle physiologique et importance écologique), Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- White, J. R. and Cameron, A. E., 1948. The Natural Abundance of Isotopes of Stable Elements. *Physical Review* 74, 991.
- White, P. J., 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465, 171-189.
- Whitehead, D. C., Buchan, H., and Hartley, R. D., 1979. Composition and decomposition of roots of ryegrass and red clover. *Soil Biology and Biochemistry* 11, 619-628.
- Wiechert, U. and Halliday, A. N., 2006. Non-chondritic magnesium and the origins of the inner terrestrial planets. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, A700-A700.
- Wilkinson, S., Welch, R., Mayland, H., and Grunes, D., 1990. Magnesium in plants: uptake, distribution, function and utilization by man and animals. *Metal Ions in Biological Systems* 26, 33-56.
- Willows, R. D., 2007. Chlorophyll Synthesis. In: Wise, R. R. and Hooper, J. K. Eds.) *The Structure and Functions of plastids, advances in photosynthesis and Respiration*. Springer Netherlands.
- Wombacher, F., Eisenhauer A., Heuser A., and Weyer S., 2006. Magnesium stable isotope compositions in biogenic CaCO<sub>3</sub>. *Geophysical Research abstracts* 8, **A06353**.
- Woodward, R., Harper, K., and Tiedemann, A., 1984. An ecological consideration of the significance of cation-exchange capacity of roots of some Utah range plants. *Plant and Soil* 79, 169-180.
- Young, E. D. and Galy, A., 2004. The Isotope Geochemistry and Cosmochemistry of Magnesium. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 55, 197-230.
- Zakharova, E. A., Pokrovsky, O. S., Dupré, B., Gaillardet, J., and Efimova, L. E., 2007. Chemical weathering of silicate rocks in Karelia region and Kola peninsula, NW Russia: Assessing the effect of rock composition, wetlands and vegetation. *Chemical Geology* 242, 255-277.
- Zhong, W., Schobert, C., and Komor, E., 1993. Transport of magnesium ions in the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 190, 114-119.

**Procédures et développements  
analytiques**

## Introduction

Le développement analytique de la mesure des compositions isotopiques du Mg est très récent, car lié aux progrès analytiques en spectrométrie de masse. Les premières mesures de compositions isotopiques du Mg d'échantillons terrestres ont été effectuées par TIMS sur des carbonates (Daughtry *et al.*, 1962), des standards de roches et d'eau de mer (Shima, 1964) et sur une large gamme d'échantillons (carbonates, silicates et plantes) (Catanzaro and Murphy, 1966b). Ces premières études concluent à l'absence de variations des compositions isotopiques du Mg dans la limite des erreurs analytiques (~0.1% à 0.5%). Le développement des spectromètres de masse à multicollection couplés à une torche à plasma, rend désormais possible la détection et les interprétations des fractionnements isotopiques du Mg des échantillons naturels, avec de meilleures précisions sur les mesures (~0.1‰), largement inférieures aux amplitudes des variations isotopiques (~5‰). L'utilisation des spectromètres de masse à multicollection nécessite au préalable une purification du Mg des échantillons. Ce chapitre présente toute la procédure analytique de la détermination des compositions isotopiques du Mg, ainsi que les expériences d'optimisation de la croissance des plantes qui ont été développés au cours de cette thèse.

La première partie de ce chapitre décrit brièvement le principe général de fonctionnement des deux spectromètres de masse utilisés (L'Isoprobe et le Nu Plasma). Puis, sont présentées et décrites les grandes étapes d'une session de mesure des compositions isotopiques du Mg. Les sessions analytiques sont précédées de la purification du Mg. Ainsi, les chimies séparatives du Mg publiées avant le début de cette thèse seront passées en revue et discutées en insistant sur leurs spécificités et les difficultés rendant impossible leurs applications à certains types d'échantillons (ex. plantes et silicates alcalins). Enfin, les principaux résultats d'une nouvelle procédure analytique de purification du Mg adaptée à une large gamme d'échantillons sont présentés sous la forme d'un article technique publié à GGR (Bolou-Bi *et al.*, 2009).

Dans la seconde partie de ce chapitre, les tests d'optimisation de la croissance des plantes sont détaillés pour des cultures sur des substrats minéraux ou des cultures hydroponiques. Les tests ont été réalisés avec deux espèces végétales et divers type de substrats. Puis, une solution nutritive a été mise au point afin de permettre une croissance maximale des plantes. Tous ces tests ont été réalisés dans le but d'optimiser l'étude du fractionnement isotopique du Mg lors de la croissance expérimentale de plantes.

# I. Mesure des compositions isotopiques du magnésium

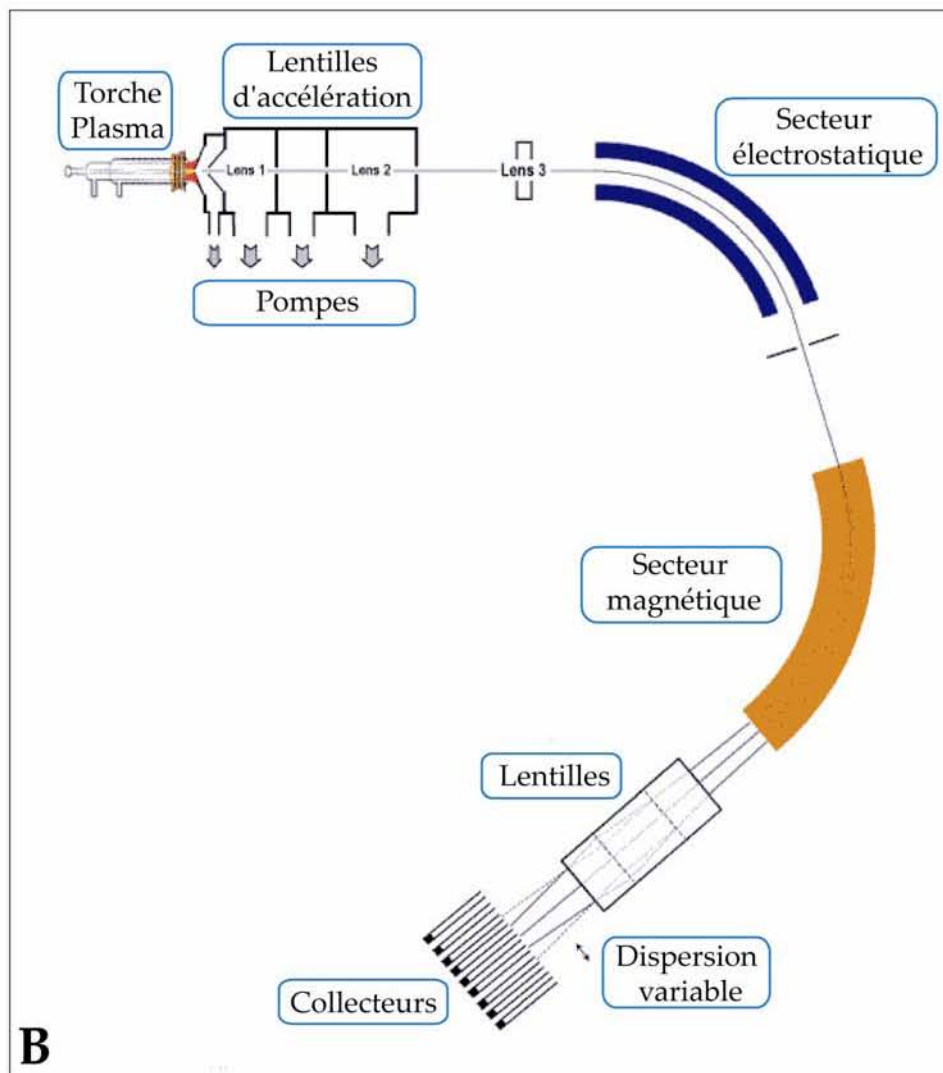
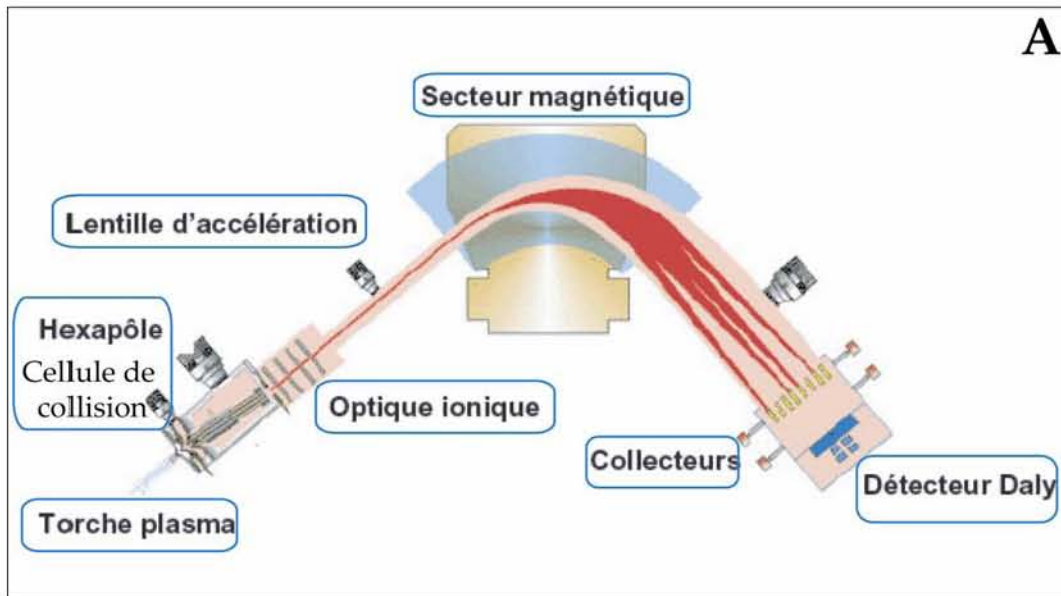
## I-1. Analyse isotopique par MC ICP-MS

Les spectromètres de masse à source plasma à couplage inductif et à multicollecion (MC ICP-MS) présentent de nombreux avantages par rapport aux spectromètres de masse à thermo-ionisation (TIMS). Ils offrent une meilleure reproductibilité, une fréquence d'analyse isotopique plus importante, une amélioration de la sensibilité et l'analyse d'une diversité d'éléments chimiques beaucoup plus large, même à des concentrations très basses. C'est Gray et Compston (1974) et Houk *et al.* (1980) qui furent les premiers à coupler un plasma de haute fréquence et un spectromètre de masse. La spectrométrie de masse à multicollecion est basée sur une technique récente, combinant une ionisation efficace grâce au plasma à argon et les avantages de la multicollecion simultanée des données. Cette technique de multicollecion permet d'éliminer les problèmes liés au balayage et à l'acquisition séquentielle des données (Walder and Freedman, 1992). Le MC ICP-MS est devenu l'instrument privilégié de l'analyse d'un grand nombre d'éléments, avec des limites de détection inférieures au pour mille (‰).

### I-1.1. Principe général de fonctionnement

Les deux spectromètres utilisés dans ce travail de thèse sont l'Isoprobe (GV Instrument) basé au CRPG à Nancy (Figure II-1A) et le Nu Plasma 1700 (Nu Instruments) basé à l'ENS à Lyon (Figure II-1B). Ces MC ICP-MS comportent 4 principaux ensembles : un système d'introduction de l'échantillon, la source à plasma, un analyseur et une série de collecteurs. Ces ensembles sont complétés par un système informatique pour l'acquisition, le traitement des données et le contrôle des paramètres techniques.

Les échantillons sont introduits dans les spectromètres par aspiration de la solution à l'aide d'un passeur automatique ASX-100 (Cetac Technologies). Pour l'Isoprobe, l'échantillon est aspiré vers un nébuliseur en téflon qui transforme la solution en aérosol. La taille des aérosols est contrôlée par la chambre cyclonique de sorte que seules les gouttelettes de taille  $< 10\mu\text{m}$  soient introduites dans le plasma. Dans le cas du Nu Plasma, l'échantillon issu du nébuliseur est introduit dans un système de désolvation (DSN-100) avant son introduction dans le plasma. Ce système a l'avantage d'augmenter la sensibilité du signal et de réduire les effets d'interférences d'autres éléments. Les atomes sont ensuite ionisés dans le plasma d'argon à une température de 7000 °C.



**Figure II-1** : Schéma simplifié des spectromètres de masse utilisés pour les mesures des compositions isotopiques du magnésium : (A) Isoprobe basé au CRPG à Nancy et (B) Nu Plasma basé à l'ENS à Lyon.

Le plasma est un gaz ionisé produit en utilisant un champ électrique de haute fréquence induit par un générateur à courant alternatif. Il est électriquement neutre et constitué d'ions positifs d'argon et d'électrons en quantités égales. Les atomes entrent en collision avec les ions d'argon entraînant ainsi leur ionisation. Dans le plasma, il est possible d'ioniser tout élément dont la première énergie d'ionisation est inférieure à celle de l'argon (15.76 eV). A la température du plasma, plus de 80% des éléments sont ionisés à plus de 75%. Le magnésium a une énergie d'ionisation de 7.76 eV ; ainsi, 90% du Mg est ionisé dans le plasma.

Les éléments ionisés sont accélérés et focalisés à travers une série de cônes par un gradient de potentiel électrique avant d'atteindre la fente d'entrée de l'analyseur. Un vide doit être maintenu le long de la trajectoire du faisceau d'ions de manière à éviter la dispersion des ions à cause d'interactions avec des molécules de gaz résiduel présent dans le spectromètre (Rehkämper *et al.*, 2001). L'analyseur est un secteur magnétique dont la traversée par les ions permet de séparer ceux-ci sur la base de leur rapport masse/charge. En effet, les ions en provenance de la source ont des énergies cinétiques telle que :

$$E_c = \frac{1}{2}mv_0^2 \text{ (Eq. II-1), avec } m \text{ la masse et } v, \text{ la vitesse de la particule.}$$

Dans un espace limité à un secteur d'angle  $\alpha$  où règne le champ magnétique, la particule chargée est soumise à une force telle que  $F = qVB$  (Eq. II-2) où  $q$  est la charge de la particule,  $V$  est la tension d'accélération et  $B$  représente le champ magnétique. Cette particule suivra une trajectoire circulaire de rayon  $r$  de sorte que :

$$Br = \frac{m}{q}v_0 \text{ (Eq. II-3)}$$

Des équations (1) et (3), est déduite la relation suivante :

$$\frac{m}{q} = \frac{(Br)^2}{2V} \text{ (Eq. II-4).}$$

Si  $B$ ,  $V$  et  $q$  sont constants, les ions suivront des trajectoires avec des rayons proportionnels à leur masse, permettant ainsi de les séparer.

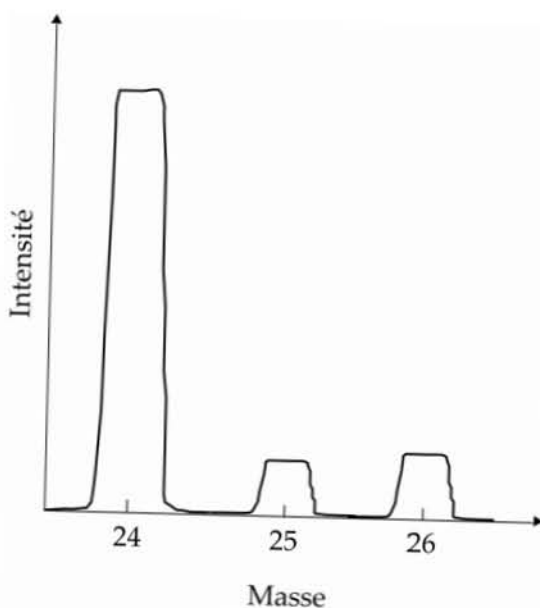
Dans le secteur magnétique, les ions possèdent une dispersion en énergie cinétique, induite par exemple par l'hétérogénéité des potentiels d'accélération acquis lors du processus d'ionisation dans le plasma (ex. Fontaine *et al.*, 2001). Ainsi, les ions ne sont plus déviés uniquement sur la base de leur masse, mais également suivant ce potentiel. Pour y remédier, différentes techniques sont employées et appliquées dans les deux types de spectromètres.



Dans le cas de l'Isoprobe, à la sortie de la source, le faisceau d'ions est dirigé dans une chambre de collision, de type hexapole, avant son entrée dans l'analyseur. Dans cette chambre, les interactions entre le faisceau d'ions et le gaz de collision permettent alors de réduire la dispersion d'énergie. Les ions n'ayant pas la bonne énergie ne passent pas ce filtre. La chambre de collision permet également de supprimer les probables interférences isobariques et polyatomiques. Pour l'analyse du Mg, le gaz de collision dans l'hexapole est l'hélium injecté avec un flux de  $10 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Dans le cas du Nu Plasma, une double focalisation permet de réduire la dispersion énergétique. En effet, un champ électrostatique est placé avant le champ magnétique de l'analyseur. Ce champ électrostatique est disposé dans l'espace de manière à ce que l'effet de dispersion en énergie du champ magnétique annule l'effet de déflexion indépendant de la masse induit par le passage des ions dans le champ électrostatique. Seuls les ions ayant donc la bonne énergie passent alors au travers des deux champs. Ces deux techniques permettent alors d'optimiser la trajectoire des ions jusqu'aux collecteurs.

Les collecteurs sont des cages de faraday, situées dans le plan de focalisation et permettent d'analyser simultanément plusieurs isotopes. Les collecteurs sont mobiles dans le spectromètre Isoprobe, permettant d'accommoder l'espacement inter-isotopique différent des masses à analyser. En frappant le fond des collecteurs, le faisceau d'ions produit un courant électrique mesuré à travers une résistance. La translation progressive du faisceau d'ions dans la fente de sortie située devant chaque collecteur permet de décrire le spectre de masse (Figure II-2). Par contre, dans le cas du Nu plasma, le dispositif de collection est fixe. Il faut alors ajuster un système de lentilles de focalisation ionique pour orienter les trajectoires de chaque ion afin que ces derniers atteignent le centre des collecteurs.



**Figure II-2** : Spectre de masse du magnésium. La largeur des pics est déterminée par la dimension des fentes d'entrée et de sortie, et par la dispersion en énergie du faisceau d'ions.

## I-1.2. Résolution et interférences

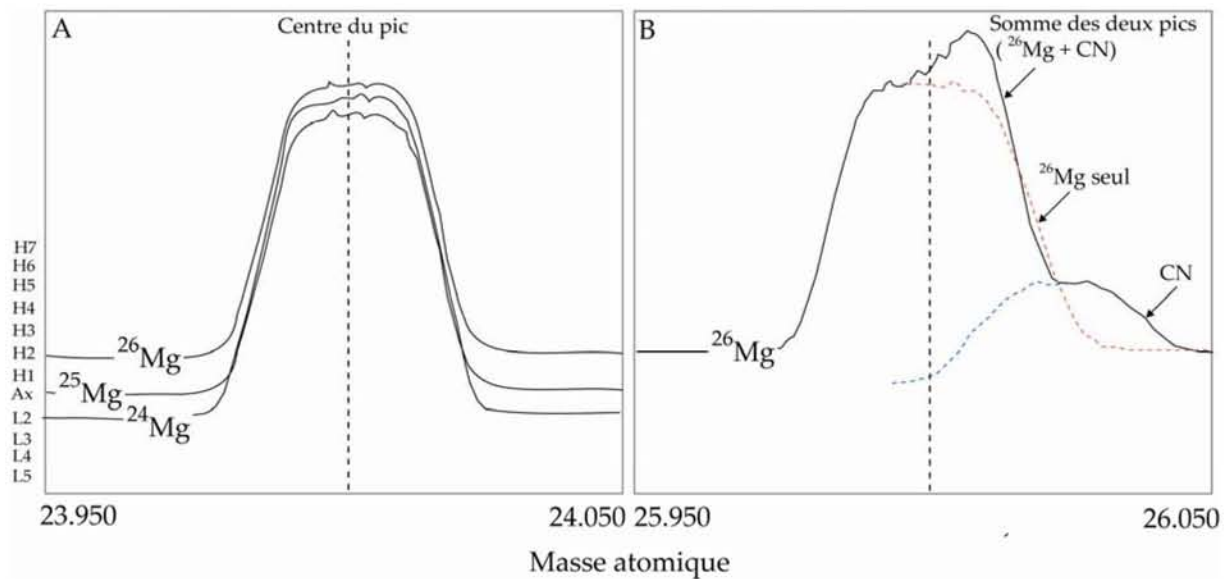
A partir du spectre de masse, il est possible d'évaluer la résolution de l'appareil qui correspond à sa capacité à distinguer des pics de masses différentes. La résolution croît avec le rayon de courbure du faisceau et décroît lorsque la largeur des fentes augmente. La résolution de l'appareil peut être augmentée en diminuant la largeur de la fente de sortie (cas du Nu Plasma) ou en améliorant la focalisation pour avoir un faisceau d'ion moins large et plus net (Isoprobe). Pour la mesure des isotopes, la résolution doit être telle que les pics soient bien séparés et identifiés. Cependant, les pics peuvent être très déformés à cause d'éléments interférents sur la masse à analyser (Figure II-3).

Les interférences spectrales constituent l'une des deux principales difficultés analytiques rencontrées lors de l'analyse des isotopes du Mg par MC ICP MS (ex. Galy *et al.*, 2001). Elles correspondent à la détection simultanée par l'appareil des masses de 2 espèces différentes. Les rapports  $m/z$  de ces espèces étant très proches, la résolution de l'appareil peut être trop faible pour les distinguer. Ces interférences peuvent être répertoriées en trois catégories résumées dans le tableau II-1 :

- **les interférences isobariques** correspondent aux éléments présentant des isotopes de même masse et dont les pics ne peuvent être résolus,
- **les interférences polyatomiques** sont issues de la formation des espèces moléculaires ioniques. Ces interférences résultent de la recombinaison entre des espèces présentes dans la matrice et/ou avec les ions du plasma. Des éléments constitutifs des produits utilisés pour la préparation des échantillons (O, H, N, Cl des acides et C, S des résines) peuvent participer à ces recombinaisons. Par exemple, le C et le N peuvent se recombinaison et former du C-N de masse 26 (Figure II-3).
- **les interférents divalents** peuvent se former dans le plasma. Ils correspondent aux éléments dont la masse est deux fois plus grande que la masse du magnésium.

**Tableau II-1** : Les interférents potentiels sur les isotopes du magnésium.

Type	Interférents
Isobarique	<i>Al, Na</i>
Polyatomiques	$^{12}\text{C}_2\text{H}^+$ , $^{12}\text{C}_2\text{H}_2^+$ , $^{12}\text{C}^+$ , $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^+$ , $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$ , $\text{NaH}^+$
Divalents	$^{48}\text{Ca}^{2+}$ , $^{48}\text{Ti}^{2+}$ , $^{50}\text{Ti}^{2+}$ , $^{50}\text{V}^{2+}$ , $^{50}\text{Cr}^{2+}$ , $^{52}\text{Cr}^{2+}$



**Figure II-3** : Effet de l'interférence du C-N de masse 26 sur le spectre du  $^{26}\text{Mg}$  obtenu avec l'Isoprobe. Pour l'analyse des rapports isotopiques du Mg, les cages de Faraday sont disposées de sorte à collecter simultanément les trois isotopes du Mg. Ces cages doivent être parfaitement alignées et le passage du faisceau devant la fente donne les pics normaux représentés sur la figure A, alors qu'en présence de C-N, le spectre de cette molécule contribue au spectre de la masse 26 (B).

La correction de la contribution de la plupart de ces interférences se fait alors classiquement au cours des séparations chimiques à l'aide des résines échangeuses d'ions (anions ou cations). Dans le cas des nos sessions d'analyse, les concentrations de  $^{27}\text{Al}$  et  $^{23}\text{Na}$  sont contrôlées afin de pouvoir déterminer leurs éventuelles contributions.

### II.1.3 Fractionnement instrumental

Le fractionnement isotopique instrumental présente la seconde difficulté lors des analyses isotopiques. Ce fractionnement résulte au cours de trois processus :

- (1) lors de l'expansion du plasma, sous l'effet de la pression, un nombre important de collisions a lieu entre les ions et l'argon, favorisant la perte des isotopes légers.
- (2) lors de l'extraction des ions par les cônes localisés à la sortie du plasma, les isotopes lourds sont concentrés vers le centre du plasma, tandis que les isotopes légers sont excentrés. Les isotopes lourds sont alors transmis préférentiellement dans l'analyseur, ce qui provoque un biais sur le rapport isotopique mesuré en leur faveur.
- (3) lors de l'accélération du faisceau d'ions à travers les lentilles de focalisation, les électrons sont alors éliminés, et seuls les ions positifs sont accélérés. Il se produit alors des répulsions électrostatiques entre ces ions, induisant un décentrage des isotopes légers du faisceau d'ions.

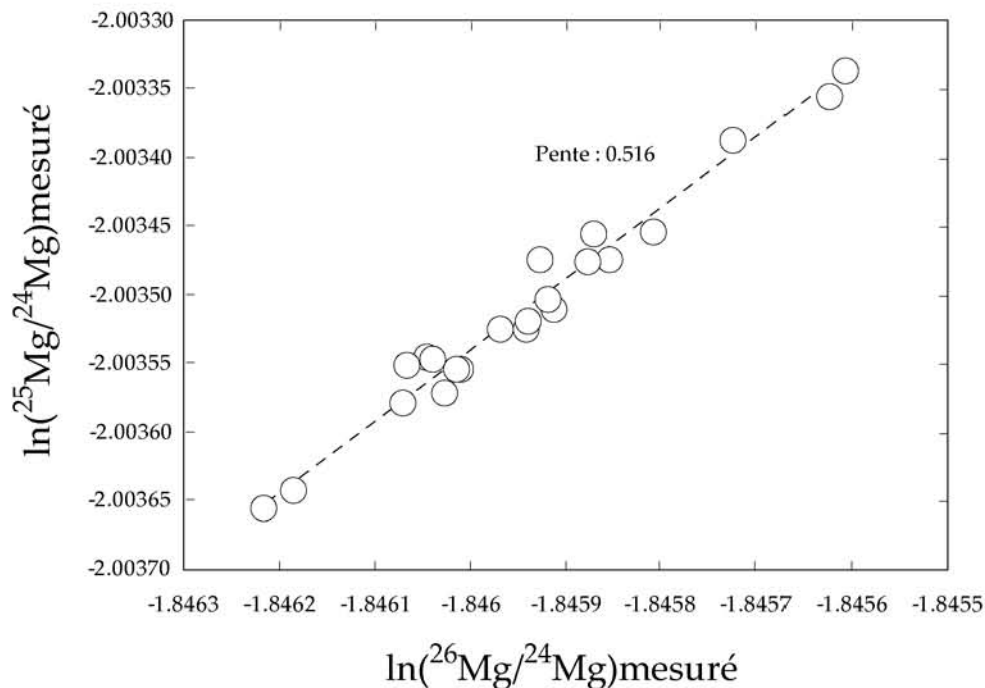
Le fractionnement instrumental total lors d'une session d'analyse est dépendant de la masse (ex. Galy *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2006). La relation entre les rapports  $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$  et  $^{25}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$  peut être utilisée pour corriger ce fractionnement instrumental :

$$\alpha_{\text{int}}^{25/24} = \frac{\left( \frac{^{25}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{mesuré}}}{\left( \frac{^{25}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{réel}}} \quad \text{et} \quad \alpha_{\text{int}}^{26/24} = \frac{\left( \frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{mesuré}}}{\left( \frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{réel}}} \quad (\text{Eq. II-5})$$

La relation théorique qui lie ces coefficients de fractionnement est donnée par la loi de fractionnement isotopique dépendant de la masse (cf. Chapitre 1) :

$$\alpha_{\text{int}}^{25/24} = \left( \alpha_{\text{int}}^{26/24} \right)^{\beta} \quad (\text{Eq. II-6}), \quad \text{avec } \beta, \text{ le coefficient de fractionnement de masse.}$$

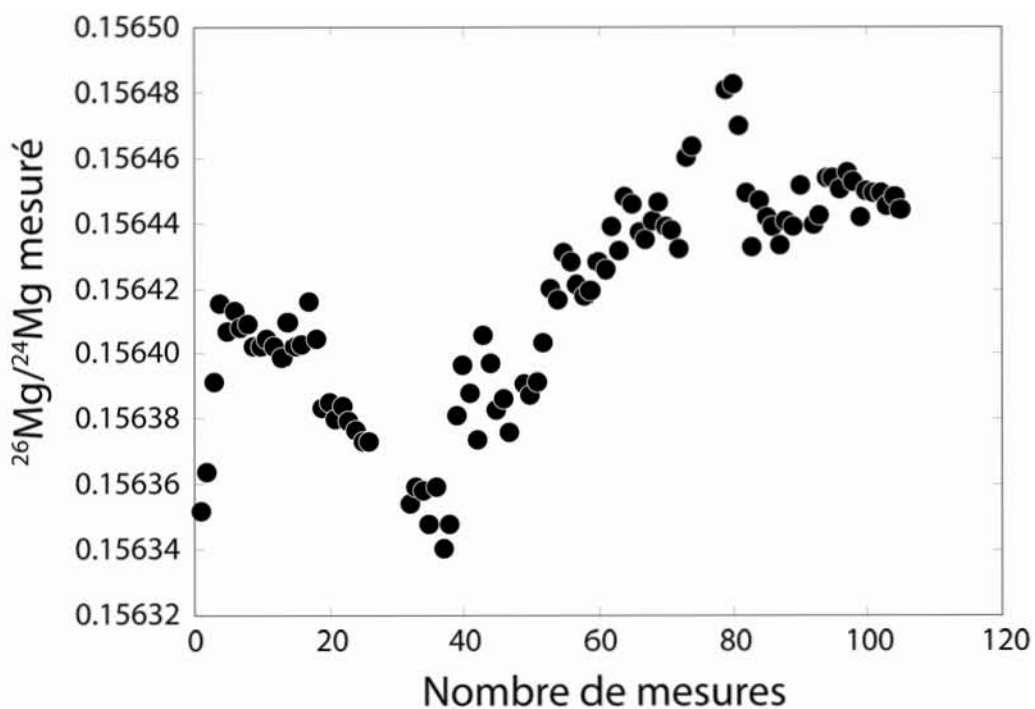
La détermination du coefficient  $\beta$  montre que le fractionnement instrumental est un fractionnement proche de l'équilibre (Figure II-4).



**Figure II-4** : Logarithmes népériens des rapports isotopiques du standard SRM980<sub>CRPG</sub> mesurés lors d'une session d'analyse sur le Nu Plasma. La pente de la droite donne la valeur de  $\beta$ , qui lie théoriquement les coefficients du fractionnement instrumental de masse.

Les coefficients de fractionnement obtenus au cours de nos sessions d'analyse sont en moyenne de 0.519 et 0.517, respectivement, pour l'Isoprobe et le Nu plasma. Ces coefficients sont similaires aux coefficients obtenus avec le Nu plasma par Galy *et al.* (2001) (0.518) et

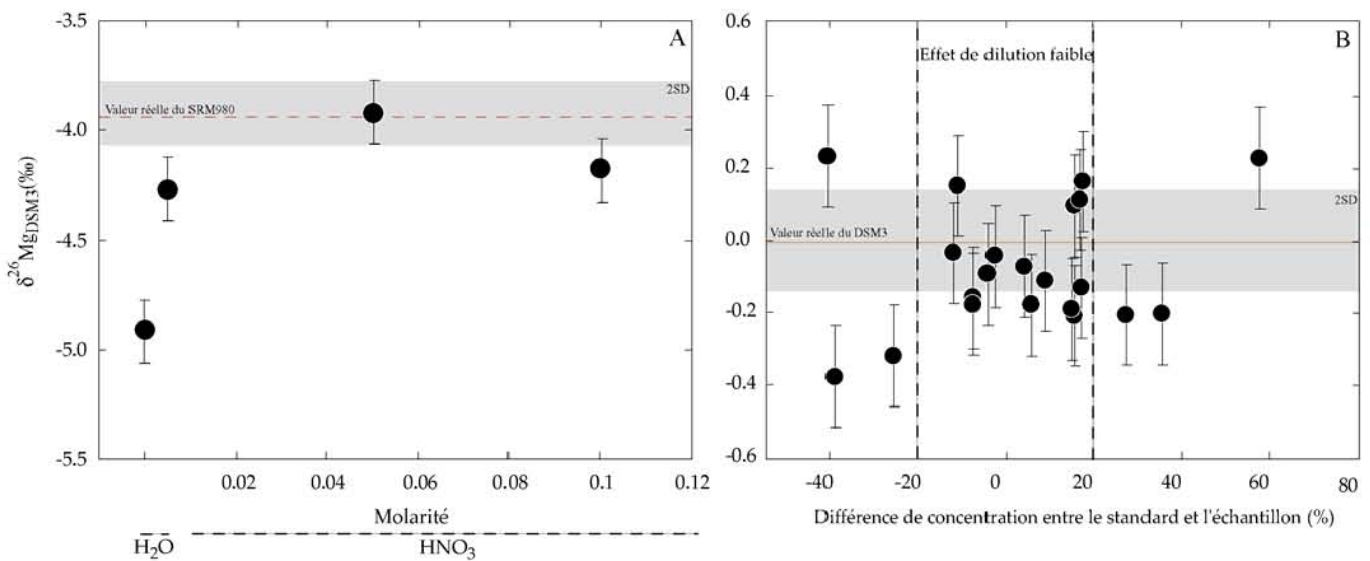
Pearson *et al.* (2006) (0.519). Toutefois, le fractionnement instrumental varie significativement au cours du temps pendant une session d'analyse (Figure II-5). Cette évolution dans le temps induit alors une variation des compositions isotopiques d'un échantillon entre le début et la fin d'une session d'analyse, supérieure aux incertitudes de mesures, et démontrant la nécessité de la correction de ce fractionnement instrumental par la technique dite de "Standard-sample bracketing". Cette technique consiste à analyser alternativement un standard interne (SRM980<sub>CRPG</sub>) et l'échantillon donné. En supposant que les variations du fractionnement isotopique instrumental au cours d'une même session sont linéaires sur une petite échelle de temps (Walder et Freedman, 1992), il est alors possible de corriger directement le rapport isotopique de l'échantillon du fractionnement isotopique instrumental. Cette correction est faite en normalisant le rapport isotopique de l'échantillon à la moyenne des rapports du standard encadrant l'échantillon. Au cours d'une analyse, une période de lavages avec de l'acide nitrique dilué (0.6M puis 0.05M), entre l'analyse du standard et celle de l'échantillon permet d'éviter les contaminations croisées.



**Figure II-5** : Variations des rapports isotopiques du standard SRM980<sub>CRPG</sub> mesurées au cours du temps avec le Nu Plasma.

Les échantillons et standards sont introduits dans les spectromètres sous forme de solution acide (HNO<sub>3</sub>, 0.05 M). Des tests réalisés avec le standard SRM980<sub>CRPG</sub> montrent qu'une différence entre les molarités de l'échantillon et celle du standard induit un biais sur la valeur vraie de la composition isotopique de l'échantillon (Figure II-6A). Il est impératif

d'avoir une faible différence entre les concentrations de l'échantillon et du standard. Cette différence ne doit pas excéder plus de 20% (Figure 6B).



**Figure II.6 :** (A) Variation de la composition isotopique du standard SRM980 en fonction de la molarité de la solution. (B) Variation de la composition isotopique du DSM3 en fonction de la différence de la concentration avec la solution du SRM980<sub>CRPG</sub>.

L'ensemble de la technique employée pour l'analyse des échantillons avec ces deux MC ICP-MS est décrit dans l'article technique inséré à la page 67 de ce chapitre. Le protocole a été validé sur onze matériaux de référence et trois solutions standard.

## II. Séparation chimique du Magnésium

En amont d'une session de mesure des rapports isotopiques, des traitements chimiques des échantillons s'imposent et constituent la principale technique de résolution des interférences liées à la matrice (Galy *et al.*, 2001 ; Wombacher *et al.*, 2009). Ces traitements chimiques consistent à séparer le Mg des autres éléments de la matrice afin d'obtenir une fraction monoélémentaire de Mg.

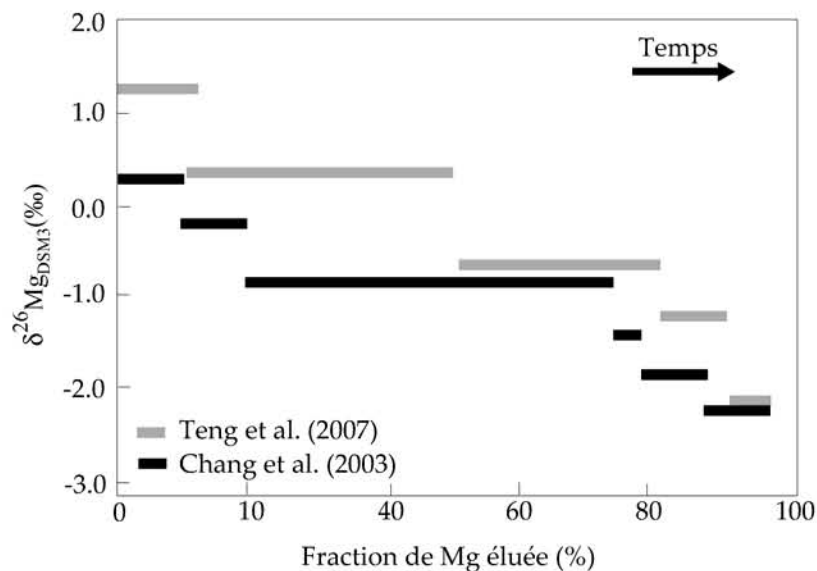
### II-1. Chimie séparative des isotopes du Mg

Plusieurs auteurs ont développé des procédures de séparation chimique et de purification du Mg (Tableau II-2). Excepté la chimie développée par Catanzaro et Murphy (1966), qui réalisent une double précipitation du Mg sous forme de composés organomagnésiens ; toutes les chimies séparatives du Mg utilisent la chromatographie ionique avec des résines échangeuses d'ions. La principale différence entre ces chimies réside

dans l'étape préliminaire réalisée avant l'élution du Mg de l'échantillon. On distinguera trois catégories de protocoles :

- **Catégorie 1** : Pas de préparation préliminaire spécifique (Black *et al.*, 2006 ; Chang *et al.*, 2003 ; Teng *et al.*, 2007).
- **Catégorie 2** : Séparation initiale du Ca, soit par précipitation avec de l'acide oxalique, soit par élution avec de l'acide bromique pour les échantillons très riches en Ca (Shima, 1964 ; Wombacher *et al.*, 2009).
- **Catégorie 3** : Extraction du Fe, Zn, Mn, l'Al et/ou des éléments réfractaires (Cr, Zr, Ti) de la matrice à l'aide d'une résine échangeuse d'anions (Tipper *et al.*, 2008 ; Wiechert et Halliday, 2007; Wombacher *et al.*, 2009).

Les étapes préliminaires sont suivies de l'élution du Mg, sur la base des différences des coefficients de partage des cations dans les acides sur des résines échangeuses de cations (AG50W-X8 ou -X12 des marques Dowex ou BioRad). Au cours de cette élution du Mg, il est primordial d'obtenir un rendement de ~ 100%. En effet, Chang *et al.* (2003) et Teng *et al.* (2007) ont démontré que l'élution du Mg sur la résine est susceptible d'induire un fractionnement isotopique du Mg avec une affinité préférentielle de l'isotope léger pour la résine (Figure II-7). Il en découle donc une migration préférentielle des isotopes lourds du Mg. Un processus similaire a été observé pour le Cu et le Zn (Maréchal, 1998).



**Figure II.7** : Fractionnement isotopique lors de l'élution et la séparation chimique du Mg par chromatographie ionique sur résine échangeuse d'ions (d'après Teng *et al.*, 2007) et Chang *et al.*, 2003).

Malgré cette multitude de techniques de séparation chimique du Mg, il est à noter qu'au début de ce travail, la chimie développée par Chang *et al.* (2003) était la seule publiée

**Tableau II-2** : Bilan des procédures de séparation chimique de Mg de différentes matrices pour analyse des rapports isotopiques d'échantillons terrestres.

Sources	Nature de l'échantillon	Validation de la chimie	Spectromètre	Séparation chimique du Mg	
				Chromatographie ionique	
				Etapas préliminaires	Type de résine (nombre de passage) et éluent
Shima (1964)	Roches silicatées, eau de mer	-	TIMS	(1) Précipitation du Ca par de l'oxalate, (2) précipitation du Mg avec Na et Al sous forme organique et (3) minéralisation	Dowex 50W-X12 (1) : Elution dans HCl
Catanzaro et Murphy (1966)	Carbonate, silicate, plantes	-	TIMS	Pas de chromatographie ionique Double précipitation du Mg sous forme de $MgC_{10}H_{14}O_8N_2 \cdot 6H_2O$ , puis minéralisation du complexe organique.	
Chang <i>et al.</i> (2003)	Carbonate	Solution synthétique	MC ICP-MS	-	Bio-Rad AG50W-X12 (2) Elution dans HCl
Black <i>et al.</i> (2006)	Matière organique	Solution synthétique	MC ICP-MS	-	Bio-Rad AG50W-X12 (1) : Elution dans $HNO_3$
Wiechert et Halliday (2007)	Basaltes, olivine, pyroxène	Solution synthétique	MC ICP-MS	Elution et extraction du Fe par la résine anionique Bio-Rad AG1-X8	Bio-Rad AG50W-X12 (2): Elution dans HCl
Teng <i>et al.</i> (2007)	Basaltes, olivine, schiste	Solution synthétique « Standard addition »	MC ICP-MS	Pas d'étape préliminaire	Bio-Rad AG1-X8 (3) : Elution dans $HNO_3$
Tipper <i>et al.</i> (2008)	Basalte, granodiorite, olivine	« Standard addition »	MC ICP-MS	Elution et extraction du Fe, Zn, Mn et Ti par HCl (9 M) puis d'Al, Ti et Zr par HF (0.5 M) (la résine anionique Bio-Rad AG1-X8)	Bio-Rad AG50W-X12 (2) Elution dans HCl
Wombacher <i>et al.</i> (2009)	Basaltes, Schiste Carbonates	Solution synthétique	MC ICP-MS	pas d'étape préliminaire Elution et extraction du Ca, Fe et Sr par utilisation successive de HCl (10M)-HBr (6.6M)-HCl (4M)	Bio-Rad AG50W-X8 (1) : procédure de séparation en 6 étape avec utilisation successive de HCl (0.4M)-HF (0.15 M)-Acétone (95%)-HCl (0.5M)-HCl (1M)-HCl (4M)



et développée exclusivement pour l'analyse de carbonates. Elle a été utilisée par Galy *et al.* (2002), puis par Tipper *et al.* (2006a ; 2006b) pour d'autres types d'échantillons sans que ne soit précisées les modifications. Pour l'analyse d'échantillons à matrice plus complexe, riches en Fe et en alcalins (plantes, granites et gnanodiorites), il était nécessaire de mettre au point une nouvelle chimie de séparation du Mg.

## II-2. Développement de la chimie séparative du Mg pour des échantillons de plantes et de roches granitiques

Le développement de l'analyse isotopique du Mg au CRPG a débuté avec les travaux de thèse de Brenot (2006) sur les eaux de la Moselle. Ces travaux ont permis de mettre au point une procédure permettant de séparer le Mg de la matrice d'un échantillon et de récupérer indépendamment les fractions de Li, et Ca de cet échantillon. Ce protocole repose sur l'utilisation de la résine cationique AG50W-X12. Il est inspiré des travaux de James and Palmer (2000) puis de ceux de Millot *et al.* (2004) pour la séparation du lithium.

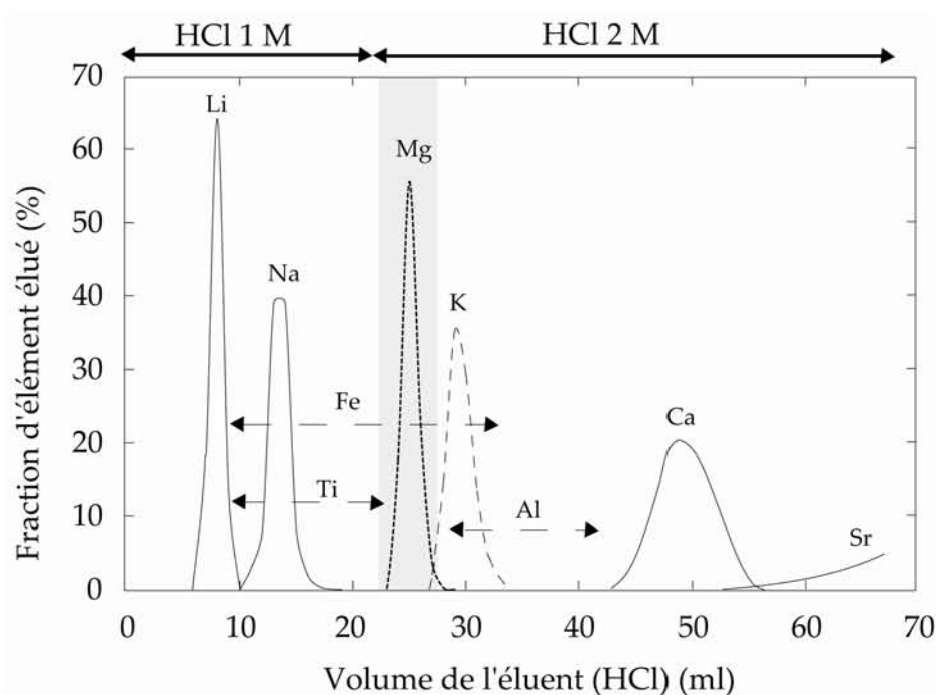
Le protocole utilise un volume de ~2,4 ml de la résine cationique AG50W-X12 préalablement lavée à l'eau ultrapure, et placée dans une colonne en Téflon® (6 mm de diamètre et 84 mm de hauteur). La capacité totale de la résine est de 6,6 milliéquivalents (meq) et la capacité effective de la résine de 0.5 meq. Cette résine a été calibrée en utilisant un échantillon de référence, l'eau de mer (IAPSO Standard Seawater Service) dopée en Al, Fe et Ti, et un basalte BEN (Geostandard, Nancy, France). La chimie séparative a été validée avec des eaux de rivières, SLRS-4 (NRC-CNRC, Canada) et des solutions synthétiques de compositions similaires à celles de rivières silicatées et carbonatées. Les rapports [El]/[Mg] de tous les échantillons utilisés sont listés dans le Tableau II-3 (Brenot *et al.*, 2006).

**Tableau II-3 :** Proportion en masse (ppm/ppm de Mg) des échantillons utilisés pour la calibration des résines et la validation de la chimie séparative développées par Brenot (2006).

Echantillons	Mg	Na	Al	K	Ca	Li	Ti	Rb	Sr	Fe
Eaux de mer (BCR-403)	1	8.3	0.03	0.3	0.3	0.0001	0.003	0.0001	0.01	0.2
Basalte (BEN)	1	0.2	0.30	0.1	1.3	0.0003	0.200	0.0006	0.02	0.4
Rivière (SLRS-4)	1	1.5	0.03	0.4	3.9	-	-	-	0.02	0.1
SMC(NIST-SRM980CRPG dopé)	1	5.0	0.00	0.5	5.0	0.5	0	0	0.20	0.0
SMS (NIST-SRM980CRPG dopé)	1	7.0	0.00	1.1	3.9	0	0	0	0.00	0.0

Les courbes d'élution correspondantes à cette chimie sont représentées dans la figure II-8. En faisant passer la molarité de l'éluant (HCl) de 1 M à 2 M, ce protocole permet de séparer les éléments chimiques (Li, Na, Mg, K, Ca) les uns à la suite des autres, avec des rendements

supérieurs à 99%. Pour la fraction de Mg éluée, le rendement est de ~100%, mais contient du K (~15%), du Fer (~60%) et des traces de Ti. Pour une purification complète du Mg, plusieurs passages de la fraction sur la résine étaient nécessaires (Tableau II-4, cas du potassium).



**Figure II-8** : Courbes d'élution des cations obtenues avec le protocole chimique développé par Brenot (2006) pour une séparation efficace du Mg de la matrice.

Ainsi, il a par exemple fallu au moins 5 à 6 passages sur la résine pour avoir une fraction monoélémentaire de Mg de certains échantillons (Tableau II-4). Ce protocole devient alors très fastidieux et nécessite plusieurs passages sur la résine pour l'analyse d'échantillons riches en K, Fe et en certains autres éléments en trace.

**Tableau II-4** : Nombre de passages sur colonne pour une purification complète d'un échantillon en fonction du rapport initial K/Mg. (\*) P (1, 2, etc.) désigne le nombre de passages sur la résine cationique.

Cations dans la solution initiale (µg)			Composition en K de la solution après passage sur colonne (µg)								
Mg	K	K/Mg	*P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	K/Mg
50	15	0.3	2.25	0.34	0.05	0.008	0.001	-	-	-	0.00002
50	3.5	0.07	0.53	0.08	0.01	0.002	0.0003	-	-	-	0.00001
50	20	0.4	3.00	0.45	0.07	0.010	0.002	0.0002	-	-	0.00000
50	25	0.5	3.75	0.56	0.08	0.013	0.002	0.0003	-	-	0.00001
50	55	1.1	8.25	1.24	0.19	0.028	0.004	0.0006	-	-	0.00001
50	500	10	75.00	11.25	1.69	0.253	0.038	0.006	0.001	0.0001	0.00000
50	1000	20	150.00	22.50	3.38	0.506	0.076	0.011	0.002	0.0003	0.00001
50	1500	30	225.00	33.75	5.06	0.759	0.114	0.017	0.003	0.0004	0.00001

Pour l'étude des roches silicatées acides et des plantes, dont les rapports [K, Mn, Zn, Ti]/[Mg] sont largement supérieurs à ceux des rivières, l'amélioration de ce protocole de chimie était nécessaire. La chimie séparative du Mg a été développée pour couvrir une plus large gamme d'échantillons et réduire le nombre de passage sur la colonne. Le protocole a ensuite été validée avec des solutions synthétiques ayant des rapports [Elt]/[Mg] élevés et identiques à ceux de l'eau de mer (pour le Na), des silicates alcalins et des plantes (pour le K, Zn, Ti) et des basaltes (pour le Fe et Mn). Cette chimie a été adaptée pour éliminer dans un premier temps les traces (Fe, Zn et Cu) des échantillons grâce à une résine anionique AG MP-1M avec l'HCl 7M (Masson, 2003 et Maréchal, 1998) et permettre ainsi une séparation plus rapide du K et Mn du Mg. Comme le montre le tableau II-5, cette première séparation donne des résultats satisfaisants. Elle permet effectivement de séparer ces éléments des majeurs avec un rendement en Mg de 96±8% dans la fraction finale.

**Tableau II-5** : Composition de la fraction finale lors de l'éluion des éléments sur la résine anionique AG MP-1M. La concentration des éléments a été mesurée à l'ICP Elan 6000 au SARM.

Elément	Solution initiale Concentration (ppb)	Solution éluée					
		Volume éluion					
		5.5 ml		2 ml		2 ml	
Concentration (ppb)	Concentration (ppb)	Fraction (%)	Concentration (ppb)	Fraction cumulée (%)	Concentration (ppb)	Fraction totale éluée (%)	
<b>Cu</b>	<b>59.8</b>	<b>0.0</b>	<b>0</b>	<b>0.02</b>	<b>0</b>	<b>0.01</b>	<b>0</b>
Cr	51.5	50.2	97	0.05	98	0.15	98
Sr	63.4	61.4	97	0.07	97	0.03	97
V	58.7	57.1	97	0.02	97	0.13	98
<b>Zn</b>	<b>61.1</b>	<b>0.22</b>	<b>0</b>	<b>0.17</b>	<b>1</b>	<b>0.02</b>	<b>1</b>
<b>Fe</b>	<b>49.3</b>	<b>0.0</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	<b>0</b>
Mn	63.9	59.1	92	0.24	93	0.39	93
Al	65.2	61.2	94	0.12	94	0.06	94
<b>Mg</b>	<b>59.0</b>	<b>56.5</b>	<b>96</b>	<b>0.14</b>	<b>96</b>	<b>0.05</b>	<b>96</b>
Na	66.0	62.1	94	0.69	95	0.15	95
Ca	288.4	127.4	44	64.7	67	10.39	70
K	64.6	76.5	118	1.20	120	0.36	121
Li	63.0	58.8	93	0.12	94	0.04	94

La fraction finale collectée à l'issue de cette première étape contient le Mg et les autres cations majeurs (Na, Ca, et K), mais également des éléments tels que le V, Cr, Mn et Ti. La séparation de ces éléments du Mg est réalisée avec la résine cationique AG50W-X12. Au regard du manque de données sur les coefficients de partage pour la résine AG50W-X12, nous avons utilisé les coefficients de partage précis des cations dans les acide HCl et HNO<sub>3</sub> à différentes molarités sur la résine cationique AG50W-X8 déterminés par les travaux de Strelow (1960) et de Strelow et Sandrop (1972). Ces travaux montrent que les rapports des

coefficients de partage entre le Mg et les autres éléments sont élevés aux faibles molarités d'acide (nitrique et chlorhydrique) (Tableau II-6). En fonction de la molarité de l'acide, les rapports des coefficients de partage indiquent que les éléments sont élués, soit avant le Mg (pour des rapports > 1), soit concomitamment que le Mg (pour des rapports = 1), soit après le Mg car plus retenus sur la résine (pour des rapports < 1). Pour de faibles molarités, les éléments tels que le V, Cr et Sr, de même que les majeurs monovalents (Na, Li, K) et trivalents (Al<sup>3+</sup>) pourraient, quelque soit l'acide, être séparés du Mg. Cependant, pour le Ti et le Mn, ils ne pourront être séparés du Mg que dans l'acide chlorhydrique, à une molarité de 0.5.

**Tableau II-6** : Rapport des coefficients de partage des éléments dans les acides nitrique et chlorhydrique sur la résine échangeuse de cations AG50W-X8 (Strelow, 1960 ; Strelow *et al.*, 1971).

Molarité	V <sup>5+</sup>	Ti	Al	Fe <sup>3+</sup>	Cr <sup>3+</sup>	Ca	Sr	Fe <sup>2+</sup>	Mn	Zn	K	Na	Li
<b>HNO<sub>3</sub></b>													
0.1	39.70	0.56	0.08	0.08	0.16	0.55	0.26	-	0.64	0.78	8.02	14.70	23.99
0.2	27.06	0.71	0.08	0.07	0.18	0.61	0.38	-	0.76	0.84	5.00	10.03	15.86
0.5	14.49	1.00	0.18	0.20	0.17	0.63	0.49	-	0.80	0.86	2.71	5.59	8.88
1	11.45	1.57	0.29	0.31	0.20	0.65	0.58	-	0.81	0.91	2.01	3.63	5.87
2	7.58	1.40	0.55	0.64	0.33	0.94	1.03	-	0.80	1.21	1.60	2.68	3.50
3	7.25	1.29	0.73	0.94	0.30	1.35	0.95	-	0.82	1.26	1.66	2.90	3.41
<b>HCl</b>													
0.1	123.74	0.17	0.21	0.19	1.52	0.54	0.37	1.06	0.77	0.93	16.23	33.08	52.12
0.2	75.71	1.78	0.28	0.16	2.02	0.67	0.50	0.70	0.87	1.04	8.28	18.73	28.04
<b>0.5</b>	<b>17.60</b>	<b>2.26</b>	<b>0.28</b>	<b>0.39</b>	<b>1.21</b>	<b>0.58</b>	<b>0.41</b>	<b>0.75</b>	<b>1.05</b>	<b>1.38</b>	<b>3.03</b>	<b>7.33</b>	<b>10.86</b>
1	19.08	1.77	0.35	0.59	0.79	0.50	0.35	0.94	1.04	1.31	1.52	3.56	5.48
2	8.86	1.68	0.50	1.19	0.78	0.51	0.35	0.66	1.03	1.68	0.84	1.72	2.48
3	17.50	1.46	0.74	0.97	0.73	0.48	0.35	0.77	0.90	1.46	1.00	-	-

Deux protocoles de chimie ont été testés en utilisant les acides nitrique et chlorhydrique à faibles molarités. Le choix des molarités, variant de 0.2 à 2M, s'est fait sur la base du coefficient de partage, et donc des volumes d'élution associés. En dessous de ces molarités, les volumes d'élution sont supérieurs à 500 ml. Les combinaisons retenues et testées sont : (1) HCl 1M + HNO<sub>3</sub> 0.2M + HCl 2M et (2) HCl 0.5 M + HCl (1M). Pour chaque fraction d'acide, les concentrations en éléments majeurs et éléments traces ont été mesurées au spectromètre de masse ICP-MS Elan 6000 au SARM (CRPG, Nancy).

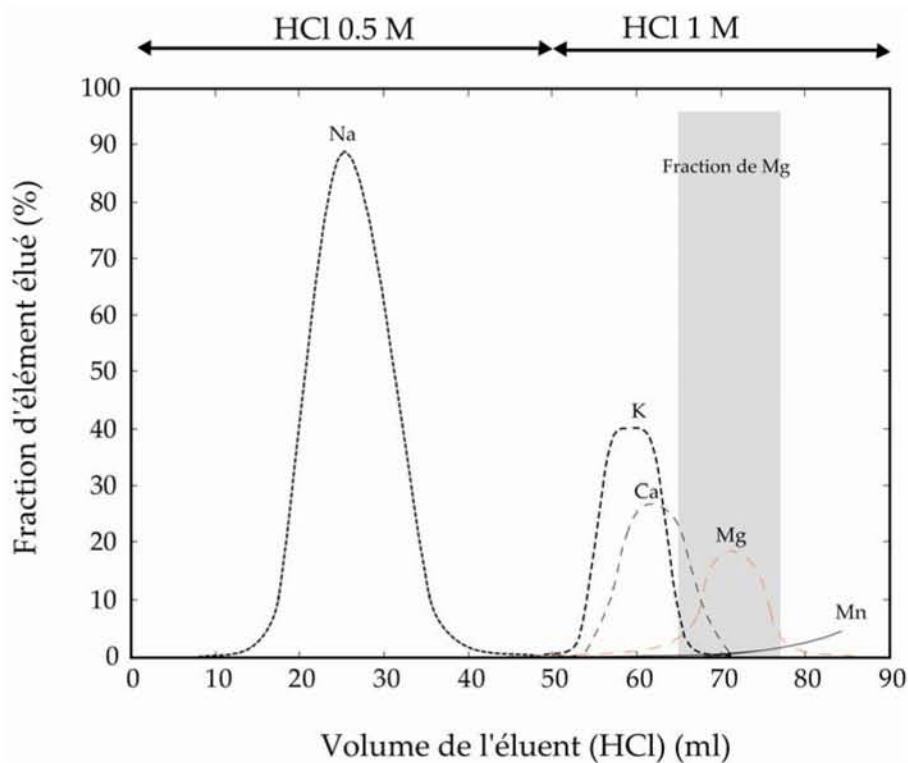
Les résultats sont donnés dans le Tableau II-7. Le premier protocole-test n'est pas efficace dans la séparation du Mg. En effet, dans les fractions finales de Mg récupérées, il y a toujours plus de ~15% de K et Ca. Les éléments en traces (Mn, Cr) n'ont pas été dosés au

cours de ces tests. Cependant, au regard du coefficient de partage de ces éléments, leurs présences seraient de plus de 50% dans les fractions finales de Mg.

**Tableau II-7** : Composition et rendements des éluats lors des protocole-tests de chimie séparative de Mg sur la résine cationique AG50W-X12, pour les test 1 (A) et test (B).

A: Test 1 : HCl (1M), HNO <sub>3</sub> (0.2M) puis HCl (2M)							
Acide		Fractions éluées					
Molarité	Volume (ml)	Al	Mg	Na	Ca	K	Li
HCl 1M	21.5	0	0	100	0	0	100
HNO <sub>3</sub> 0.2 M	30	0	0	0	0	3	0
	30	0	0	0	1	71	0
	1	0	0	0	4	12	0
	2	0	8	0	6	8	0
	3	0	53	0	6	2	0
	4	0	44	0	4	2	0
HCl 2M	5	0	3	0	2	0	0
	6	0	0	0	1	0	0
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0
	10	25	0	0	2	0	0
Fraction récupérée	-	0	108	0	14	24	0
B : Test 2 : HCl (1 M), HCl (0.5M) puis HCl (2M)							
Acide		Fractions éluées (%)					
Molarité	Volume (ml)	Al	Mg	Na	Ca	K	Li
HCl 1M	21.5	0	0	100	0	0	100
HCl 0.5	20	0	2	0	7	74	0
	10	0	6	0	20	25	0
	1	0	17	0	9	1	0
	2	0	49	0	9	1	0
	3	0	23	0	5	0	0
	4	0	1	0	7	0	0
HCl 2M	5	0	0	0	5	0	0
	6	0	0	0	7	0	0
	7	0	0	0	4	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
Fraction récupérée		0%	89%	0%	31%	3%	0%

Dans le deuxième protocole-test, l'acide chlorhydrique a été préféré à l'acide nitrique, du fait des différences des volumes d'éluion. Les molarités des éluions ont été fixées à 0.5 M puis 1 M, pour éviter un étalement des courbes d'éluion. Les courbes d'éluion obtenues montrent que ce protocole-test permet de séparer efficacement le Mg des autres éléments (Figure II-9). Lors de ce protocole, les éléments monovalents (Na, Li, K) ou ceux de valences supérieures à 2 (Al, Ti, V, Cr) sont efficacement séparés du Mg. Les cations monovalents sont élués les premiers, avec des rendements de ~100% (Na et Li) et ~95% (K). Les autres éléments (Al, Ti, V, Cr) sont au contraire retenus sur la résine à ces molarités de l'HCl. Seulement ~0.01% à 0.05% de ces éléments sont présentes dans la fraction finale de Mg.

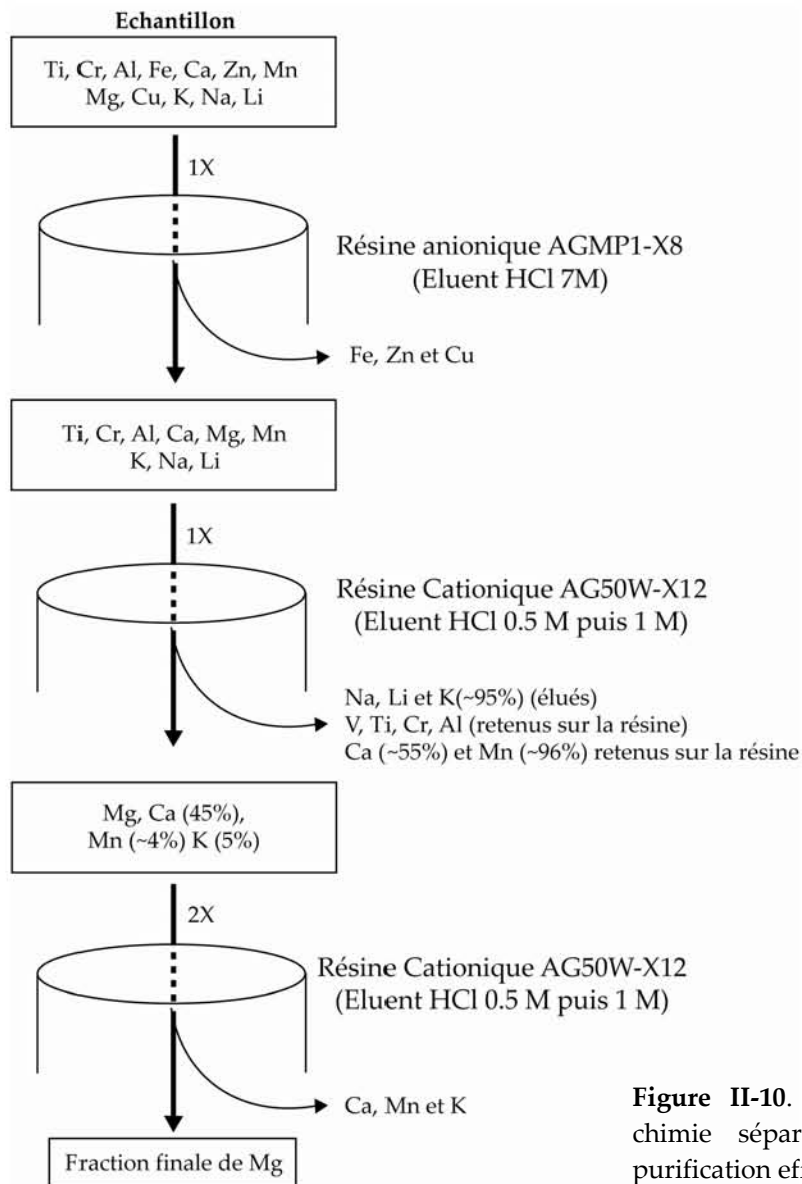


**Figure II-9** : Courbes d'éluion des cations avec de l'acide chlorhydrique de 0.5 M, puis 1 M.

En revanche, les cations divalents sont élués avec des proportions suffisamment élevées (~45% pour le Ca et ~4% Mn) pour induire des biais lors des mesures isotopiques du Mg. La fraction finale de Mg contient également ~5% de K. La fraction de Mg est alors repassée sur la résine à deux reprises, en utilisant la chimie séparative développée par Brenot *et al.* (2006). Ainsi, cette chimie permet de réduire le rapport K/Mg d'un échantillon de 10 à 0.5 après le deuxième passage sur la résine cationique. Au troisième passage, le rapport n'est plus que de 0.0075. Les éléments comme le Ca et le Mn sont également efficacement éliminés, et les rapports initiaux [Ca]/[Mg] et [Mn]/[Mg] de 10 par exemple passent respectivement à 0.0045 et 0.0004 au terme du troisième passage sur colonne.

Ces tests ont permis de valider une méthode analytique adaptée pour la mesure précise du rapport isotopique du Mg pour des échantillons très variés, notamment des échantillons dont les rapports de K/Mg, Zn/Mg, Mn/Mg et Ti/Mg sont largement supérieurs à 20 ppm/ppm. La figure II-10 résume ce protocole de chimie séparative du Mg. Le protocole de chimie séparative a permis d'aboutir à des fractions finales de Mg dans lesquelles les rapports molaires ( $\Sigma$ cations/Mg) mesurés sont inférieurs à 0.05. Cette valeur correspond au seuil défini par Galy *et al.* (2002) pour éviter tout biais dans la mesure des rapports isotopiques.

L'ensemble de la procédure développée a été validé pour onze matériaux de référence à matrices liquides et solides (eaux, roches et plantes) et un standard pur de Mg dopé avec divers éléments. Les rendements obtenus à l'issue de la séparation du Mg sont de  $100\pm 8\%$ . L'ensemble de cette technique et les principaux résultats sont présentés sous la forme d'un article publié à *Geostandards and Geoanalytical Research* en 2009.



**Figure II-10.** Résumé des différentes étapes de la chimie séparative du Mg développée pour une purification efficace et rapide du Mg de la matrice.

### III. Protocole de chimie : *"Magnesium Isotope composition of Natural Reference Materials"*

# Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials

Emile B. Bolou-Bi (1, 2)\*, Nathalie Vigier (1), Agnès Brenot (1, 3) and Anne Poszwa (2)

(1) CNRS-UPR 2300, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques, 15 rue Notre Dame des Pauvres, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

(2) CNRS-UMR 7137, Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols, Nancy-Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

(3) Now at: BRGM, Avenue C. Guillemin, BP 6009, 45060 Orléans, France

\* Corresponding author. e-mail: emile.boloubi@limos.uhp-nancy.fr

This study presents a chemical protocol for the separation of Mg that is particularly adapted to alkali-rich samples (granite, soil, plants). This protocol was based on a combination of two pre-existing methods: transition metals were first removed from the sample using an AG-MP1 anion-exchange resin, followed by the separation of alkalis (Na, K) and bivalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$ ) using a AG50W-X12 cation-exchange resin. This procedure allowed Mg recovery of  $\sim 100 \pm 8\%$ . The  $[\Sigma\text{cations}]/[\text{Mg}]$  molar ratios in all of the final Mg fractions were lower than 0.05. The Mg isotope ratios of eleven reference materials were analysed using two different MC-ICP-MS instruments (Isoprobe and Nu Plasma). The long-term reproducibility, assessed by repeated measurements of Mg standard solutions and natural reference materials, was 0.14‰. The basalt (BE-N), limestone (Cal-S) and seawater (BCR-403) reference materials analysed in this study yielded  $\delta^{26}\text{Mg}$  mean values of  $-0.28 \pm 0.08\%$ ,  $-4.37 \pm 0.11\%$  and  $-0.89 \pm 0.10\%$  respectively, in agreement with published data. The two continental rocks analysed, diorite (DR-N) and granite (GA), yielded  $\delta^{26}\text{Mg}$  mean values of  $-0.50 \pm 0.08\%$  and  $-0.75 \pm 0.14\%$ , respectively. The weathering products, soil (TILL-1) and river water (NIST SRM 1640), gave  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-0.40 \pm 0.07\%$  and  $-1.27 \pm 0.14\%$ , respectively. We also present, for the first time, the Mg isotope composition of bulk plant and organic matter. Rye flour (BCR-381), sea lettuce (*Ulva lactuca*) (BCR-279), natural hairgrass (*Deschampsia flexuosa*) and lichen (BCR-482) reference materials gave  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-1.10 \pm 0.14\%$ ,  $-0.90 \pm 0.19\%$ ,  $-0.50 \pm 0.22\%$  and  $-1.15 \pm 0.27\%$  respectively. Plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  values fell within the range defined by published data for chlorophylls.

*Cet article présente un protocole chimique pour la séparation de Mg, adapté à l'analyse isotopique d'échantillons riches en alcalin tels que les granites, sols et les plantes. Ce protocole se base sur la combinaison de deux méthodes: les éléments en traces ont été séparés de la matrice en utilisant la résine anionique AG<sup>®</sup> MP-M1, puis les alcalins (Na, K) et les cations bivalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$ ) ont été élués en utilisant la résine cationique AG<sup>®</sup> 50W-X12. Le rendement en Mg de cette procédure a été de  $100 \pm 8\%$ . Les rapports molaires ( $\Sigma\text{cations}/\text{Mg}$ ) mesurés dans les fractions finales sont inférieurs à 0.05. Les compositions isotopiques en Mg ont été déterminées pour onze matériaux de référence avec deux types de MC-ICP-MS (l'Isoprobe et le Nu Plasma). La reproductibilité globale à long terme, déterminée par la mesure isotopique de solutions standards et de matériaux de référence naturels, était de 0.14‰. Le basalte (BE-N), le calcaire (Cal-S) et l'eau de mer (BCR-403) avaient des  $\delta^{26}\text{Mg}$  moyens de  $-0.28 \pm 0.08\%$ ,  $-4.37 \pm 0.11\%$  et  $-0.89 \pm 0.10\%$  respectivement, en accord avec les données publiées. Les deux roches continentales analysées, la diorite (DR-N) et le granite (GA), avaient des  $\delta^{26}\text{Mg}$  moyens de  $-0.50 \pm 0.08\%$  et  $-0.75 \pm 0.14\%$ , respectivement. Les produits d'altération, le sol (TILL-1) et l'eau de rivière (NIST SRM 1640), sont caractérisés par des  $\delta^{26}\text{Mg}$  de  $-0.40 \pm 0.07\%$  et  $-1.27 \pm 0.14\%$ . Les compositions isotopiques en Mg de matériaux de référence organiques et de plantes sont présentées pour la première fois. Les graines de seigle (BCR-381), la laitue de mer (*Ulva lactuca*) (BCR-279), la graminée naturelle (*Deschampsia flexuosa*) et le lichen (BCR-482) ont des  $\delta^{26}\text{Mg}$  moyens de  $-1.10 \pm 0.14\%$ ,  $-0.90 \pm 0.19\%$ ,  $-0.50 \pm 0.22\%$  et  $-1.15 \pm$*



Keywords: magnesium isotopes, reference materials, ion chromatography, MC-ICP-MS.

**0.27‰ respectivement. Ces valeurs sont comprises dans la gamme publiée pour diverses chlorophylles.**

Mots-clés : isotopes du magnésium, matériaux de référence, chromatographie ionique, MC-ICP-MS.

Received 22 Oct 07 — Accepted 26 Nov 08

Magnesium (Mg) is a major element in the Earth's main reservoirs (lithosphere, hydrosphere and biosphere), and has three stable isotopes:  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  and  $^{26}\text{Mg}$  with relative abundances of 78.99, 10.00 and 11.01% respectively. It is involved in many surface processes that may induce Mg isotope fractionation, due to the large relative mass difference between  $^{24}\text{Mg}$  and  $^{26}\text{Mg}$  (8%), and between  $^{24}\text{Mg}$  and  $^{25}\text{Mg}$  (4%). Consequently, Mg isotopes may be a powerful tool for characterising some of these processes. However, measurements of mass dependant fractionations of Mg isotopes in terrestrial samples have been severely limited by high analytical uncertainties (see review by Young *et al.* 2002).

Recent advances in new generation mass spectrometers such as multiple collector-inductively coupled plasma-mass spectrometers (MC-ICP-MS) have allowed Mg isotope ratio measurements with a precision of  $\approx 0.10\%$  per amu or better (at the 2s level) (e.g., Galy *et al.* 2001, Chang *et al.* 2003, Pearson *et al.* 2006). Thus, Mg isotopes can now be used for investigating a wide range of geological and biological processes. Galy *et al.* (2002) reported a range for terrestrial samples of 4.13‰ for  $\delta^{26}\text{Mg}$ , where  $\delta^{26}\text{Mg} = (^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}) / (^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg})_{\text{RM}} - 1 \cdot 10^3$ . Later, Tipper *et al.* (2006a, b) showed that silicate soils have isotopic compositions heavier than their silicate parent rocks, and that the weighted mean Mg isotope composition of large river waters is lighter (-1.09‰) than seawater (-0.82  $\pm$  0.11‰). Chang *et al.* (2004) and Wombacher *et al.* (2006b) demonstrated that Mg isotopes fractionate during carbonate precipitation, with marine organisms acquiring a lighter Mg isotope composition than seawater. Ra and Kitagawa (2007) show that natural marine phytoplankton chlorophyll molecules are slightly enriched in heavier Mg isotopes relative to seawater. In contrast, Black *et al.* (2006) demonstrate that Mg isotope composition of chlorophyll-a extracted from experimentally grown cyanobacteria is depleted in heavy isotopes relative to the culture media.

These previous studies have underlined the requirement for a preliminary Mg purification step in order to

avoid matrix effects during high precision isotope determination by MC-ICP-MS (Galy *et al.* 2001). It is also necessary to completely recover the sample Mg because significant mass fractionation may otherwise occur during Mg separation (Chang *et al.* 2003). Typically, separation of Mg from samples is performed by ion-exchange chromatography using cation-exchange resins. The various published technical studies present Mg chemical separation procedures performed for specific samples: Chang *et al.* (2003) for seawater and carbonates, Black *et al.* (2006) for chlorophyll-a extract from cyanobacteria and Teng *et al.* (2007) mainly for basalts. The remaining studies using Mg isotope data (e.g., Young and Galy 2004, Tipper *et al.* 2006a, b) use a modified version of the technique of Chang *et al.* (2003) for analysing geological samples, but with little detail on the chemical procedure that was used. The reference materials used in order to validate these Mg chemical separation techniques comprised basic igneous rocks (basalt: BIR-1, BCR-1, BCR-2, BE-N; dunite: DTS-1), carbonates (Cal-S, JDo-1, JcP-1) and solutions (seawater and river water or Mg reference materials doped with various elements) (Chang *et al.* 2003, Bizzarro *et al.* 2005, Black *et al.* 2006, Brenot 2006, Wombacher *et al.* 2006a, Teng *et al.* 2007). At present there are no published values for reference materials highly enriched in K, Mn and Zn, such as rocks related to the continental crust, soils or plants.

We have developed a chemical procedure for Mg separation adapted to any type of terrestrial sample. For this, we combined and adapted two pre-existing ion chromatography methods, the first for separating transition metals (e.g., Maréchal *et al.* 1999, Mason 2003) and the second, from James and Palmer (2000), originally developed for rapid separation of lithium. Our Mg chemical separation method has been validated using the NIST SRM 980 Mg solution doped with various elements and a series of known reference materials (basalt, seawater and carbonate). We then present Mg isotope data for a number of other reference materials (granite, diorite, soil, river water, sea lettuce, lichen, rye flour) and a natural hairgrass.

## Samples and analytical method

### Reference materials

Magnesium isotope ratios were measured in three types of reference materials: (1) plants and organic matter: rye flour (BCR-381), sea lettuce (*Ulva lactuca*) (BCR-279) and epiphytic lichen (*Pseudevernia furfuracea*) (BCR-482); (2) waters: natural fresh water (NIST SRM 1640) and seawater (BCR-403); (3) rocks and soil: granite (GA), diorite (DR-N), basalt (BE-N), carbonate (Cal-S) and forest soil (TILL-1). A natural grass (wavy hairgrass, *Deschampsia flexuosa*) collected in the Vosges Mountains (in north-eastern France) was also analysed. Sample descriptions are given in Table 1. Magnesium was extracted by acid digestion followed by ion exchange chromatographic separations. All chemical procedures were performed in a clean laboratory environment using doubly-distilled acids (HNO<sub>3</sub> and HCl) (Sigma-Aldrich, Inc.). Acid dilutions were performed using Milli-Q H<sub>2</sub>O (18 MΩ).

### Sample digestion procedure

Three digestion procedures were used depending on the sample. Rock and soil samples were dissolved in Savillex Teflon<sup>®</sup> beakers at 80 °C in a mixture of concentrated HNO<sub>3</sub>-HF (~ 3:1 ml) and for soil samples, 1 ml of 30% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Suprapur<sup>®</sup> (Merck KGaA) was added once the mixture had cooled. These mixtures were evaporated to dryness at 75 °C. Plant and lichen samples were dissolved in 3 ml of concentrated HNO<sub>3</sub> and 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at room temperature. The mixture was left at room temperature

overnight and then the temperature increased to 60 °C for an hour to ensure complete digestion of the organic matter. After cooling, 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to the mixture and left at room temperature overnight. These mixtures were evaporated to dryness at 75 °C. A few µl or ml of seawater or natural freshwater were evaporated to dryness at 75 °C.

All samples were then dissolved in 2 ml of concentrated HNO<sub>3</sub> at 80 °C for 5 hours. The corresponding solution were then evaporated to dryness and dissolved in 7 mol l<sup>-1</sup> HCl at 80 °C for overnight. Finally, the sample were evaporated and re-dissolved in either 1 ml of 7 mol l<sup>-1</sup> HCl or 1 ml 0.5 mol l<sup>-1</sup> HCl, depending on the sample type, at 80 °C for 2 hours. Centrifugation was systematically performed to ensure complete dissolution before resin loading. When residue or gel was observed, it was treated with HNO<sub>3</sub>-HF mixture and dried. The residues were then mixed with the supernatant and if necessary with a few drops of boric acid, at 80 °C for several hours. The mixture was then evaporated to dryness and dissolved in 7 mol l<sup>-1</sup> HCl at 80 °C for 2 hours.

### Ion exchange chromatographic separation

In order to eliminate potential matrix effects and isobaric interferences during Mg isotope determination, dissolved samples containing 50 µg of Mg, were passed through a series of columns containing ion-exchange resins (Table 2).

Based on the procedure developed by Maréchal *et al.* (1999) and Mason (2003), the first stage of

**Table 1.**  
Description and origin of reference materials analysed in this study

Sample	Description of sample	Prepared (or distributed) by	Location of sampling	Reference
NIST SRM 980	Mg standard solution	NIST	-	Cantazaro <i>et al.</i> (1966)
BCR-403	Seawater	IRMM	Southern Bight of the North Sea	Quevauviller <i>et al.</i> (1992)
NIST SRM 1640	Natural water	NIST	Clear Creek, CO (USA)	May and Rumble (2004)
BCR-279	Sea Lettuce	IRMM	Saline water in Lake Veere (NL)	Griepink and Muntau (1987)
BCR-482	Lichen	IRMM	Pine tree in the area of Axalp (CH)	Quevauviller <i>et al.</i> (1996)
BCR-381	Rye flour	IRMM	Commercial sources	Hollman <i>et al.</i> (1993)
TILL-1	Forest soil	CCRMP	North-western Lanark, Ontario (Ca)	Lynch (1996)
GA	Granite	CRPG	Andlau, Bas-Rhin (F)	Roubault <i>et al.</i> (1970)
BE-N	Basalt	IWG-GIT	Essey-la-Côte, Meurthe et Moselle (F)	Govindaraju (1980)
DR-N	Diorite	ANRT	Neuntelstein, Vosges (F)	de la Roche and Govindaraju (1969)
Cal-S	Carbonate	CRPG	Sorcy-St Martin quarry, Meuse (F)	Yeghicheyan <i>et al.</i> (2001)

IRMM - Institute for Reference materials and Measurements (Belgium); NIST - National Institute of standard and Technology (USA); CCRMP - Canadian Certified Reference Materials Project (Canada); CRPG - Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (France); IWG-GIT - International Working Group (France); ANRT - Association Nationale de la Recherche Technique (France).

**Table 2.**  
Details of the Mg separation procedure, using chromatographic exchange resins AG® MP-M1 and AG® 50W-X12

Stage 1 (x 1)	Reagent	Amount (ml)	Comments
<b>Resin: AG® MP-1M</b>			
1	Mili-Q H <sub>2</sub> O	20	Resin cleaning (three times)
	0.5 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	20	
	Mili-Q H <sub>2</sub> O	20	
2	7 mol l <sup>-1</sup> HCl	20	Resin conditioning
<b>3</b>	<b>Sample in 7 mol l<sup>-1</sup> HCl</b>	<b>1</b>	<b>Sample loading and Mg fraction collection</b>
<b>4</b>	<b>7 mol l<sup>-1</sup> HCl</b>	<b>0.5</b>	
<b>5</b>	<b>7 mol l<sup>-1</sup> HCl</b>	<b>6</b>	
6	Mili-Q H <sub>2</sub> O	5	Resin washing
7	6 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	20	
Stage 2 (x 1)	Reagent	Amount (ml)	Comments
<b>Resin: AG® 50W-X12</b>			
1	Mili-Q H <sub>2</sub> O	3	Resin cleaning
2	6 mol l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub>	3	
3	Mili-Q H <sub>2</sub> O	3	
4	6 mol l <sup>-1</sup> HCl	30	Resin conditioning Sample loading
5	Mili-Q H <sub>2</sub> O	5	
6	0.5 mol l <sup>-1</sup> HCl	10	
7	Sample in 0.5 mol l <sup>-1</sup> HCl	1	
8	0.5 mol l <sup>-1</sup> HCl	0.5	
9	0.5 mol l <sup>-1</sup> HCl	24	
10	0.5 mol l <sup>-1</sup> HCl	25	<b>Mg fraction collection</b>
11	1 mol l <sup>-1</sup> HCl	16	
12	1 mol l <sup>-1</sup> HCl	10	
Stage 3 (x 2)	Reagent	Amount (ml)	Comments
<b>Resin: AG® 50W-X12</b>			
1	Mili-Q H <sub>2</sub> O	3	Resin cleaning
2	6 mol l <sup>-1</sup> HCl	30	
3	Mili-Q H <sub>2</sub> O	5	
4	1 mol l <sup>-1</sup> HCl	8	Resin conditioning
5	Sample in 1 mol l <sup>-1</sup> HCl	0.5	Sample loading
6	1 mol l <sup>-1</sup> HCl	0.5	<b>Mg fraction collection</b>
7	1 mol l <sup>-1</sup> HCl	7.5	
8	1 mol l <sup>-1</sup> HCl	13	
9	2 mol l <sup>-1</sup> HCl	1	
<b>10</b>	<b>2 mol l<sup>-1</sup> HCl</b>	<b>5</b>	
11	Mili-Q H <sub>2</sub> O	3	
12	6 mol l <sup>-1</sup> HCl	10	Resin washing

column chemistry was performed using a macroporous anion exchange resin (Bio-Rad AG® MP-1M: 100-200 mesh size, chloride form) to remove the transition metals, mainly Cu, Fe and Zn. The pre-cleaned anion-exchange resin was placed in a Bio-Rad polycarbonate column of 40 mm length and 6 mm diameter. After conditioning the resins with 7 mol l<sup>-1</sup> HCl, samples were loaded with 1 ml of 7 mol l<sup>-1</sup> HCl. Magnesium and major cations were recovered in 6.5 ml 7 mol l<sup>-1</sup> HCl (Table 2). The collected solutions were evaporated

to dryness and residues dissolved in 1 ml 0.5 mol l<sup>-1</sup> HCl for the second stage. This first stage was performed only for solid samples (plant material, soil and rock) because of their high Fe/Mg and Zn/Mg ratios (compared to sea and river waters).

Following the methods developed for Li chemical separation by James and Palmer (2000), the second stage was carried out using 84 mm long and ~ 6 mm internal diameter Savillex Teflon® columns, filled with

~ 2.5 ml (dead volume included) of Bio-Rad AG® 50W-X12 cation exchange resin (200-400 mesh size, hydrogen form), which had been pre-cleaned in water. This resin volume corresponds to 6.6 meq and allowed an adequate separation of Mg from the rest of the matrix in two consecutive column passes (Table 2). For the first pass, samples were loaded in 1 ml 0.5 mol l<sup>-1</sup> HCl onto clean resins conditioned with 10 ml 0.5 mol l<sup>-1</sup> HCl. All sodium was eluted in the first 49.5 ml 0.5 mol l<sup>-1</sup> HCl. Approximately 96% of the potassium was removed in the next 16 ml, using 1 mol l<sup>-1</sup> HCl, and all of the Mg then eluted with 10 ml of 1 mol l<sup>-1</sup> HCl (Table 2). The Mg fraction at this stage still contained some impurities, mainly Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, and consequently a further stage of column chemistry was necessary to purify the Mg fraction. The solutions collected were evaporated to dryness and the residues then dissolved in 0.5 ml 1 mol l<sup>-1</sup> HCl. Samples were loaded onto the same resins once these had been cleaned and re-conditioned with 8 ml 1 mol l<sup>-1</sup> HCl. Magnesium was eluted in 5 ml 2 mol l<sup>-1</sup> HCl (Table 2). This final step of column chemistry was repeated twice. The eluted solutions were evaporated at 75 °C and the sample dissolved in 1 ml of Suprapur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at room temperature for 24 hours. The solutions were then dried at 75 °C and residues dissolved in 0.05 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> in preparation for isotope ratio measurements. The whole Mg separation procedure took four days.

### Major and trace element determinations

In order to check the purity of the collected Mg fractions, major elements (Na, K, Ca, Mg, Al, and Fe) and transition elements (Ti, Mn and Zn) were measured at the Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM, French national facility, Nancy), using a Perkin-Elmer® ELAN 6000 ICP-MS. Elements were determined following the procedure described in Carignan *et al.* (2001) and Yeghicheyan *et al.* (2001). In brief, concentrations were determined using cycles of three successive phases: (1) calibration performed with synthetic multi-elemental solutions, (2) an accuracy and reproducibility check, measuring SLRS-4 natural reference river water (NRC-CNRC, Canada), and (3) sample analyses, each separated by a rinse with 0.2 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> for 90 s. Uncertainties ranged between 1% and 10% and uncertainty limits were estimated following the procedure of Carignan *et al.* (2001).

### Magnesium isotope measurements

Magnesium isotope ratios were measured using two types of MC-ICP-MS instrument: (1) a GV

Instruments Isoprobe, at the Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CRPG) in Nancy (France) and (2) a Nu Instruments Nu Plasma at the Ecole Normale Supérieure (ENS) in Lyon (France). The Isoprobe was a single focussing magnetic sector MC-ICP-MS equipped with a hexapole collision cell and the Nu-Plasma was a double focussing MC-ICP-MS.

For measurements using the Isoprobe, all magnesium samples were diluted with 10 ml 0.05 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> at room temperature in order to achieve Mg concentrations of 5 µg g<sup>-1</sup> in the final solutions. Using an autosampler, solutions were introduced into the plasma torch through a PFA nebuliser and a cyclonic spray chamber. The ion beam was passed into the hexapole cell via a series of three nickel cones. The hexapole cell is a unique transfer system because the interaction between the ion beam and a collision gas (helium at a flux of ~ 10 ml min<sup>-1</sup>) reduced the energy spread of ions to less than 1 V and suppressed potential molecular interferences. This conditioned the ion beam, after acceleration, for direct entry into the magnetic analyser. Magnesium isotopes were simultaneously collected on three Faraday collectors (the second high collector (H2) for <sup>26</sup>Mg, the axial collector (AX) for <sup>25</sup>Mg and the second low collector (L2) for <sup>24</sup>Mg). <sup>27</sup>Al was systematically monitored during measurement in order to verify that no Al was present in the Mg fraction, as well as mass 23.5 (the Na peak tail). Data were acquired in blocks of twenty-five cycles of 12 s each. Two successive washes, using 0.6 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> (for 60 s) and 0.05 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> (for 240 s), were performed between two analyses.

For measurements using the Nu Plasma MC-ICP-MS, all Mg fractions were diluted with 0.05 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> at room temperature in order to achieve final solution Mg concentrations of ~ 0.2 µg g<sup>-1</sup>. Samples were introduced to the plasma (using an autosampler) through a desolvating nebuliser (Nu-Instrument DSN-100). The use of a desolvating nebuliser increases sensitivity, and reduces potential interferences from O, N, C and H to an insignificant level (Galy *et al.* 2001). The three Mg isotopes were collected simultaneously on three different Faraday collectors (the extreme high collector (H6) for <sup>26</sup>Mg, the axial collector (AX) for <sup>25</sup>Mg and the extreme low collector (L5) for <sup>24</sup>Mg). Data were acquired in two blocks of thirty cycles, with integration times of 10 s per cycle. Analyses were separated by two successive washes, using 0.6 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> for 60 s and 0.05 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> for 240 s.

The calibrator-sample bracketing technique was used with both spectrometers in order to correct for the instrument mass bias. Magnesium isotope ratios were measured relative to the NIST SRM 980<sub>CRPG</sub> reference material and then normalised to the international DSM3 Mg standard solution (Galy *et al.* 2003). The DSM3 Mg reference sample corresponds to pure Mg metal dissolved in HNO<sub>3</sub>, prepared and provided by A. Galy (Cambridge University). Data are expressed in delta notation as the part per thousand (‰) deviation from the DSM3 isotopic composition:  $\delta^x\text{Mg} (\text{‰}) = \{ (^x\text{Mg}/^{24}\text{Mg})_{\text{sample}} / (^x\text{Mg}/^{24}\text{Mg})_{\text{DSM3}} - 1 \} \times 10^3$  where *x* is either mass 26 or 25.

To assess data quality and follow the long-term reproducibility of Mg isotope ratio measurements, the Cambridge-1, analytical grade atomic absorption standard Mg solution (Aldrich Chemical Company, Inc. USA), labelled CRPG-Aldrich, and DSM3 Mg standard solutions were analysed during each analytical session.

## Results and discussion

### Total procedure blank, Mg fraction purity and chemistry yield

Blank levels were minimised throughout the procedure by the use of doubly distilled acids and Milli-Q H<sub>2</sub>O (18 MΩ). The total procedural Mg blank, which includes both the instrumental background and the chemical procedure blank, was systematically lower than 20 ng throughout the period of analyses. Moreover, when running a 2% HNO<sub>3</sub> solution, no significant interference could be detected on any of the Mg peaks. It therefore seems reasonable to assume that the total blank contribution (chemical and instrumental) was negligible (< 0.04%). If Mg is not perfectly separated from Ca, K, Zn, Al, Na or Ti, matrix effects may occur during isotope measurements (Galy *et al.* 2001), inducing errors in the correction for mass bias when using a sample-calibrator bracketing technique. For example, the presence of Al, Ca or Na can increase

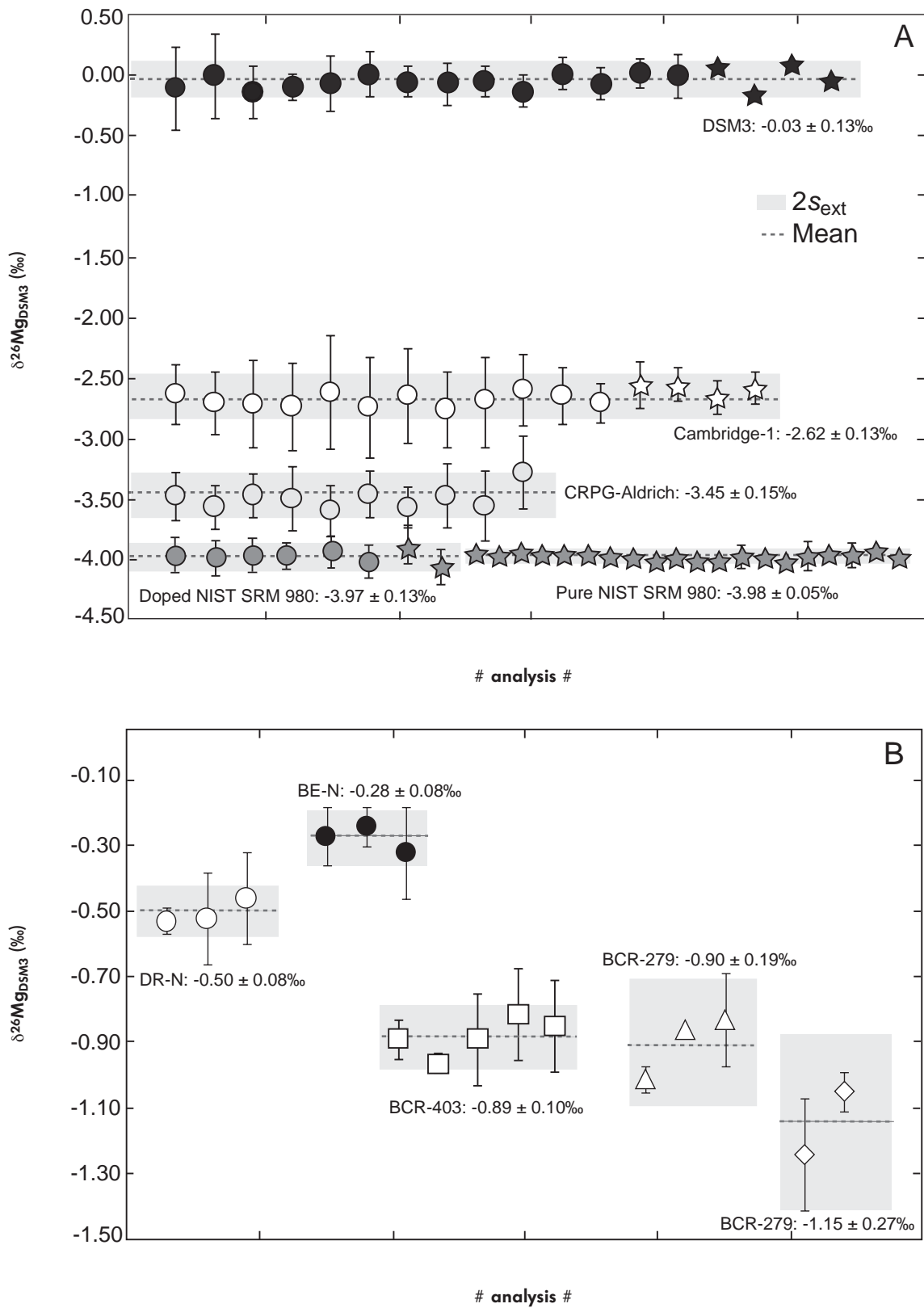
**Table 3.** Ca/Mg, K/Mg, Na/Mg, Ti/Mg, Al/Mg, Fe/Mg, Mn/Mg and Zn/Mg molar ratios for reference materials measured (a) before and (b) after the chemical procedure described in the text and Table 2

Samples	Ca/Mg	K/Mg	Na/Mg	Ti/Mg	Al/Mg	Fe/Mg	Mn/Mg	Zn/Mg	[ΣCat]/[Mg]
<b>a. Before chemistry</b>									
Doped NIST SRM 980 Mg solution	3.032	18.649	10.567	0.355	9.009	0.218	0.221	0.743	42.80
Seawater (BCR-402)	0.194	0.192	8.859	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	9.250
Natural water NIST SRM 1640	0.734	0.106	5.330	nd	0.008	0.003	0.009	0.003	6.190
Sea Lettuce (BCR-279)	1.170	0.577	1.985	nd	0.110	0.075	0.066	0.001	3.980
Lichen (BCR-482)	2.753	4.194	0.218	0.030	1.719	0.605	0.025	0.065	9.610
Rye flour BCR-381	0.310	4.192	0.047	nd	nd	nd	nd	nd	4.550
Natural grass	0.524	0.000	9.369	nd	nd	nd	nd	nd	9.890
Forest soil TILL-1	0.909	0.755	1.303	0.288	5.038	1.601	0.048	0.002	9.940
Granite GA	1.854	3.103	3.862	0.252	12.067	1.502	0.054	0.005	22.700
Basalt BE-N	1.152	0.283	0.702	0.125	3.148	1.113	0.028	0.002	6.550
Diorite DR-N	0.758	0.077	0.250	0.125	0.605	0.493	0.009	0.001	2.320
Carbonate Cal-S	109.106	0.020	0.040	0.003	0.067	0.069	0.003	0.003	109.31
<b>b. After chemistry</b>									
Doped NIST SRM 980 Mg solution	0.003	0.005	0.000	0.001	0.000	0.001	0.015	0.001	0.025
Seawater BCR-402	0.023	0.002	0.000	< LOD	0.001	0.000	0.000	0.000	0.022
Natural water NIST SRM 1640	0.016	0.016	0.001	< LOD	0.000	0.002	0.008	0.003	0.045
Sea Lettuce BCR-279	0.022	0.005	0.001	< LOD	0.000	0.000	0.004	0.001	0.032
Lichen BCR-482	0.000	0.014	0.027	< LOD	0.000	0.000	0.002	0.002	0.045
Rye flour BCR-381	0.002	0.023	0.000	< LOD	0.000	0.000	0.003	0.000	0.028
Natural grass	0.000	0.005	0.003	< LOD	0.001	0.000	0.000	0.002	0.011
Forest soil TILL-1	0.003	0.004	0.000	< LOD	0.000	0.001	0.003	0.001	0.011
Granite GA	0.004	0.014	0.000	< LOD	0.000	0.001	0.006	0.000	0.026
Diorite DR-N	0.022	0.003	0.001	< LOD	0.001	0.001	0.004	0.002	0.032
Basalt BE-N	0.000	0.002	0.001	< LOD	0.000	0.000	0.001	0.001	0.005
Carbonate Cal-S	0.005	0.000	0.013	< LOD	0.000	0.001	0.002	0.001	0.023

Analyses were performed using a Perkin-Elmer® ELAN 6000 ICP-MS.

nd: Not determined; ΣCat: Sum of cations.

LOD: uncertainty limits (μg g<sup>-1</sup>) were 8.70, 481.75, 16.14, 25.80, 0.10, 3.60, 4.25, 3.50, 0.05 for Mg, Ca, K, Na, Ti, Al, Fe, Mn, Zn respectively. The LOD was estimated following Carignan *et al.* (2001).



**Figure 1. (A)** Long-term reproducibility of  $\delta^{26}\text{Mg}$  measurements of Mg standard solutions DSM3 (black), Cambridge-1 (white), CRPG-Aldrich (light grey), and NIST SRM 980 (pure and doped (dark grey)) Mg standard solutions. Stars correspond to the MC-ICP-MS Nu-plasma measurements. **(B)**  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured for full replicates of several reference materials (see text, and Tables 1 and 4). Errors are given at the  $2s$  level.

$\delta^{26}\text{Mg}$  from 0.2 to 1‰, relative to the true value (Galy *et al.* 2001). In order to check the quality of our Mg separation technique, major and trace element concentrations were measured in the final Mg fractions of all samples (Table 3). It can be seen that the concentrations of all elements were on average 500 times lower than the Mg concentration, except for Ca which was  $\sim 250$  times lower. The sum of major cations (Ca+K+Na) was on average twenty-five times lower than Mg, which is better than the minimum value determined by Young and Galy (2004) by avoiding matrix effects. Moreover, there was no correlation between the concentrations in the final Mg fraction and the concentrations in the samples before chemistry (Table 3). This strongly suggests that the low levels of impurity measured in the final Mg fractions mainly originated from contamination during the chemical procedure, rather than from an inadequate chromatographic separation. The column chemistry developed in this study also ensured, on average, the recovery of  $100 \pm 8\%$  of the Mg in the sample.

### Reproducibility and accuracy

During this study, the long-term precision of Mg isotope measurements was assessed by repeated analyses (without column chemistry) of pure Mg standard solutions, CRPG269 Aldrich, Cambridge-1 and DSM3. The long-term errors on  $\delta^{26}\text{Mg}$  obtained during different analytical sessions ranged between 0.13‰ and 0.15‰ (2s) (Figure 1A). The reproducibility obtained in this study was close to that obtained by Chang *et al.* (2003) and Tipper *et al.* (2006a). The reproducibility determined from repeat analyses of reference samples (basalt, diorite, sea water, sea lettuce and lichen) ranged from 0.08‰ to 0.27‰ (at the 2s level) with an average value of 0.14‰ (Figure 1B).  $\delta^{26}\text{Mg}$  values for plants were less reproducible and may reflect significant isotopic heterogeneities in the plant samples.

The accuracy of the results was assessed through the determination of the isotope compositions of pure Mg standard solutions (Cambridge-1, CRPG-Aldrich and NIST SRM 980), the NIST SRM 980 solution doped with various elements (K, Na, Al, Ca, Zn, Mn, Ti and Fe) (Table 3) and reference materials with published Mg isotope compositions (basalt, limestone, seawater). Results obtained are listed in Table 4 and shown in Figure 1A, B. Relative to DSM3, the Mg standard solution Cambridge-1 yielded a mean value of  $\delta^{26}\text{Mg} = -2.62 \pm 0.13\%$ , identical within error to the values of  $-2.60 \pm 0.14\%$ ,  $-2.57 \pm 0.13\%$  and  $-2.58 \pm$

0.14‰, obtained by Tipper *et al.* (2006a), Pearson *et al.* (2005) and Galy *et al.* (2003), respectively. The CRPG-Aldrich solution yielded a  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  $-3.45 \pm 0.15\%$ , different to the values of  $-3.91\%$  and  $-0.82 \pm 0.19\%$  obtained by Ra and Kitagawa (2007) and Chang *et al.* (2003) respectively. These differences most likely result from industrial manufacturing procedures (Galy *et al.* 2003).

Eight full replicates of the doped NIST SRM 980 solution yielded an average  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  $-3.97 \pm 0.13\%$ . This  $\delta^{26}\text{Mg}$  value is similar (at 2s) to the value obtained for the pure NIST SRM 980 solution not processed by the chemical procedure ( $-3.98 \pm 0.05\%$ ; Table 4, Figure 1A). The accuracy was also checked by analysing limestone (Cal-S) (three full replicates), basalt (BE-N) (three full replicates) and BCR403 seawater (five full replicates). For Cal-S, the  $\delta^{26}\text{Mg}$  average value was  $-4.37 \pm 0.11\%$ , in agreement with published data ( $-4.38 \pm 0.31\%$ , Wombacher *et al.* 2006a). Also, published  $\delta^{26}\text{Mg}$  for limestones range between  $-4.38 \pm 0.31\%$  and  $-2.61 \pm 0.13\%$  (Brenot 2006, Wombacher 2006a, Galy *et al.* 2002), which includes our value. For Be-N basalt,  $\delta^{26}\text{Mg}$  was  $-0.28 \pm 0.08\%$ . This is just within the 2s range of the value of Wombacher *et al.* (2006a;  $-0.41 \pm 0.19\%$ ). The difference between both values could be either considered as insignificant considering both uncertainties or explained by isotope heterogeneity as shown by previous studies for some basalt reference materials (BCR-1, BCR-2) and olivines (Teng *et al.* 2007, Wiechert and Halliday 2007, Wombacher 2006a, Bizzarro *et al.* 2005, Young and Galy 2004). The seawater (BCR 403) analysed in this study yielded a mean  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  $-0.89 \pm 0.10\%$ . No difference could be statistically distinguished at the 2s level (0.14‰) with the mean published value for seawater ( $-0.82 \pm 0.11\%$ ; Ra and Kitagawa 2007, Tipper *et al.* 2006b, Pearson *et al.* 2006, Wombacher *et al.* 2006a, and Chang *et al.* 2003) (see detail in Table 4).

The  $\delta^{26}\text{Mg}$  values obtained for these reference materials are plotted versus the corresponding published values (Figure 2). All data points fit on a 1:1 line, showing that the Mg chemical separation protocol developed and used in this study did not induce any systematic isotope shift.

Furthermore, all samples defined a mass-dependent fractionation line in a  $\delta^{25}\text{Mg}'$  versus  $\delta^{26}\text{Mg}'$  diagram where:  $\delta^{25}\text{Mg}' = 0.516 \pm 0.005 \times \delta^{26}\text{Mg}' - 0.006 \pm 0.007\%$  (Figure 3). The slope of this line is

**Table 4.**  
Magnesium isotope ratios for standard solutions and for rock, soil, water and plant reference materials. Corresponding published values are also shown for comparison

Samples	$\delta^{26}\text{Mg}$ (‰)	$\pm 2s$	$\delta^{25}\text{Mg}$ (‰)	$\pm 2s$	N	$\Delta^{25}\text{Mg}'$	Instrument	Reference
<b>Mg standard solutions</b>								
DSM3	-0.03	0.14	-0.02	0.08	18	-0.004	Isoprobe	This study
Cambridge-1	-2.62	0.13	-1.34	0.10	18	0.026	Isoprobe	This study
Cambridge-1	-2.60	0.14	-1.34	0.08	168	0.015	Nu Plasma	1
Cambridge-1	-2.58	0.14	-1.33	0.07	35	0.015	Nu Plasma	2
Cambridge-1	-2.63	0.19	-1.35	0.09	28	0.021	Nu Plasma	3
Commercial Mg solution (Aldrich)	-3.43	0.15	-1.76	0.09	14	0.029	Isoprobe	This study
Commercial Mg solution (Aldrich)	-3.91	0.23	-1.92	0.13	18	0.119	Isoprobe	4
Commercial Mg solution (Aldrich)	-0.83	0.17	-0.42	0.10	206	0.013	Nu Plasma	3
NIST SRM 980 pure solution	-3.98	0.05	-2.04	0.05	20	0.036	Nu Plasma	This study
NIST SRM 980 doped	-3.98	0.14	-2.06	-0.08	1	0.016	Nu Plasma	This study
NIST SRM 980 doped	-3.98	0.14	-2.07	-0.08	1	0.006	Nu Plasma	This study
NIST SRM 980 doped	-3.96	0.14	-2.03	-0.08	1	0.035	Isoprobe	This study
NIST SRM 980 doped	-3.98	0.09	-2.05	0.08	2	0.026	Isoprobe	This study
NIST SRM 980 doped	-3.92	0.12	-2.03	0.14	3	0.014	Isoprobe	This study
NIST SRM 980 doped	-4.06	0.14	-2.05	0.11	3	0.067	Isoprobe	This study
NIST SRM 980 doped	-3.84	0.12	-1.98	0.03	2	0.023	Isoprobe	This study
NIST SRM 980 doped	-4.02	0.14	-2.10	0.08	1	-0.004	Isoprobe	This study
<b>Rocks and soils</b>								
Granite GA	-0.75	0.14	-0.36	0.08	1	0.031	Nu Plasma	This study
Diorite DR-N	-0.53*	0.04	-0.26*	0.04	4	0.016	Isoprobe	This study
Diorite DR-N	-0.52*	0.14	-0.30*	0.08	1	-0.029	Nu Plasma	This study
Diorite DR-N	-0.46	0.14	-0.23	0.08	1	0.01	Nu Plasma	This study
Basalt BE-N	-0.27	0.09	-0.14	0.11	5	0.001	Isoprobe	This study
Basalt BE-N	-0.24	0.06	-0.12	0.11	4	0.005	Isoprobe	This study
Basalt BE-N	-0.32	0.14	-0.21	0.08	1	-0.043	Nu Plasma	This study
Basalt BE-N	-0.41	0.19	n.f	n.f	3	-	Axiom	5
Basalt BCR-2	-0.14	0.11	n.f	n.f	4	-	Axiom	5
Basalt BCR-1	-0.37	0.10	-0.19	0.07	n.f	0.003	Nu Plasma	6
Limestone Cal-S	-4.41	0.14	-2.31	0.08	1	-0.01	Nu Plasma	This study
Limestone Cal-S	-4.40	0.08	-2.25	0.04	3	0.045	Isoprobe	This study
Limestone Cal-S	-4.31	0.18	-2.20	0.16	8	0.048	Isoprobe	This study
Limestone Cal-S	-4.38	0.31	n.f	n.f	14	-	Axiom	5
Soil TILL-1	-0.40	0.07	-0.23	0.06	2	-0.022	Nu Plasma	This study
<b>Water</b>								
Seawater BCR-403	-0.89	0.06	-0.47	0.11	3	-0.006	Isoprobe	This study
Seawater BCR-403	-0.96	0.03	-0.46	0.03	8	0.04	Isoprobe	This study
Seawater BCR-403	-0.89	0.14	-0.51	0.08	1	-0.046	Nu Plasma	This study
Seawater BCR-403	-0.82	0.14	-0.42	0.08	1	0.003	Nu Plasma	This study
Seawater BCR-403	-0.87	0.14	-0.47	0.08	1	-0.019	Nu Plasma	This study
North Atlantic sea water	-0.82	0.08	-0.42	0.09	4	0.007	Nu Plasma	3
Sea water NASS-5	-0.84	0.16	n.f	n.f	8	-	Axiom	5
Sea water IAPSO	-0.74	nf	-0.37	nf	4	0.016	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (surface)	-0.79	nf	-0.37	nf	3	0.042	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (surface)	-0.85	nf	-0.47	nf	3	-0.027	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (surface)	-1.00	nf	-0.51	nf	3	0.011	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (surface)	-0.97	nf	-0.49	nf	3	0.015	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (1000 m)	-0.69	nf	-0.38	nf	3	-0.02	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (2000 m)	-0.77	nf	-0.39	nf	3	0.011	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (3000 m)	-0.86	nf	-0.34	nf	3	0.108	Isoprobe	4
Northwest Pacific seawater (4000 m)	-0.73	nf	-0.4	nf	3	-0.02	Isoprobe	4
Natural river water NIST SRM 1640	-1.27	0.14	-0.67	0.08	1	-0.008	Nu Plasma	This study
River water SLRS-4	-0.97	0.05	n.f	n.f	3	-	Axiom	5
<b>Plants and cell organelles</b>								
Sea Lettuce BCR-279	-1.01	0.04	-0.5	0.04	5	0.026	Isoprobe	This study
Sea Lettuce BCR-279	-0.86	0.02	-0.42	0.04	7	0.028	Isoprobe	This study
Sea Lettuce BCR-279	-0.83	0.14	-0.44	0.08	1	-0.007	Nu Plasma	This study
Lichen BCR-482	-1.24	0.11	-0.63	0.08	3	0.016	Isoprobe	This study
Lichen BCR-482	-1.05	0.06	-0.59	0.04	2	-0.043	Nu Plasma	This study



Table 4 (continued).

Magnesium isotope ratios for standard solutions and for rock, soil, water and plant reference materials. Corresponding published values are also shown for comparison

Samples	$\delta^{26}\text{Mg}$ (‰)	$\pm 2s$	$\delta^{25}\text{Mg}$ (‰)	$\pm 2s$	N	$\Delta^{25}\text{Mg}'$	Instrument	Reference
<b>Plants and cell organelles (cont.)</b>								
Rye-flour BCR-381	-1.1	0.14	-0.6	0.08	1	-0.027	Nu Plasma	This study
Natural grass	-0.5	0.22	-0.26	0.13	2	0.001	Nu Plasma	This study
Chlorophyll a, Algae	-3.55	0.31	-1.77	0.15	3	0.081	Isoprobe	4
Chlorophyll a, Spinach	-3.01	0.23	-1.56	0.13	3	0.009	Isoprobe	4
Chlorophyll a, Spirulina	-2.76	0.23	-1.38	0.12	3	0.059	Isoprobe	4
Chlorophyll a, Chlorella	-2.64	0.22	-1.32	0.13	3	0.056	Isoprobe	4
Chlorophyll a, Spinach	-1.45	0.14	-0.74	0.08	1	-0.004	Nu Plasma	6
Chlorophyll a, Cyanobacteria	-1.39	0.29	-0.72	0.35	6	0.026	Nu Plasma	7
Chlorophyll a, Marine phytoplankton	-0.07	0.23	-0.04	0.13	3	0.015	Isoprobe	4
Chlorophyll b, Spinach	-2.66	0.36	-1.34	0.2	3	0.015	Isoprobe	4
Chlorophyll b, Spinach	-2.35	0.14	-1.2	0.08	1	0.021	Nu Plasma	6
Chlorophyll b, Chlorella	-1.97	0.31	-0.98	0.19	3	0.029	Isoprobe	4
Chlorophyll b, Marine phytoplankton	0.09	0.22	0.03	0.12	3	0.119	Isoprobe	4

\* Both values were obtained for the same DR-N solution, but using two different mass spectrometers (Isoprobe and Nu-plasma). All other values in the table correspond to full replicates (chemistry and isotope analysis). n.f: not furnished; N is the number of replicates.  $\Delta^{25}\text{Mg}'$  was calculated according to Young and Galy (2004):  $\Delta^{25}\text{Mg}' = \delta^{25}\text{Mg}' - 0.521 \delta^{26}\text{Mg}'$ .

1: From Tipper *et al.* (2006a). 2: From Pearson *et al.* (2006). 3: From Chang *et al.* (2003) converted relative to DSM3 using  $\delta^{26}\text{Mg}$  (NIST SRM 980<sub>OxI</sub>)<sub>DSM3</sub> =  $-3.40 \pm 0.13\%$  and  $\delta^{25}\text{Mg}$  (NIST SRM 980<sub>OxI</sub>)<sub>DSM3</sub> =  $-1.74 \pm 0.07\%$  (Galy *et al.* 2003). 4: From Ra and Kitagawa (2007), errors were propagated using  $\delta^{26}\text{Mg}$  (NIST SRM 980)<sub>DSM3</sub> =  $-5.40 \pm 0.22\%$  and  $\delta^{25}\text{Mg}$  (NIST SRM 980)<sub>DSM3</sub> =  $-2.70 \pm 0.12\%$ . 5: From Wombacher *et al.* (2006a). 6: From Young and Galy (2004). 7: From Black *et al.* (2006).

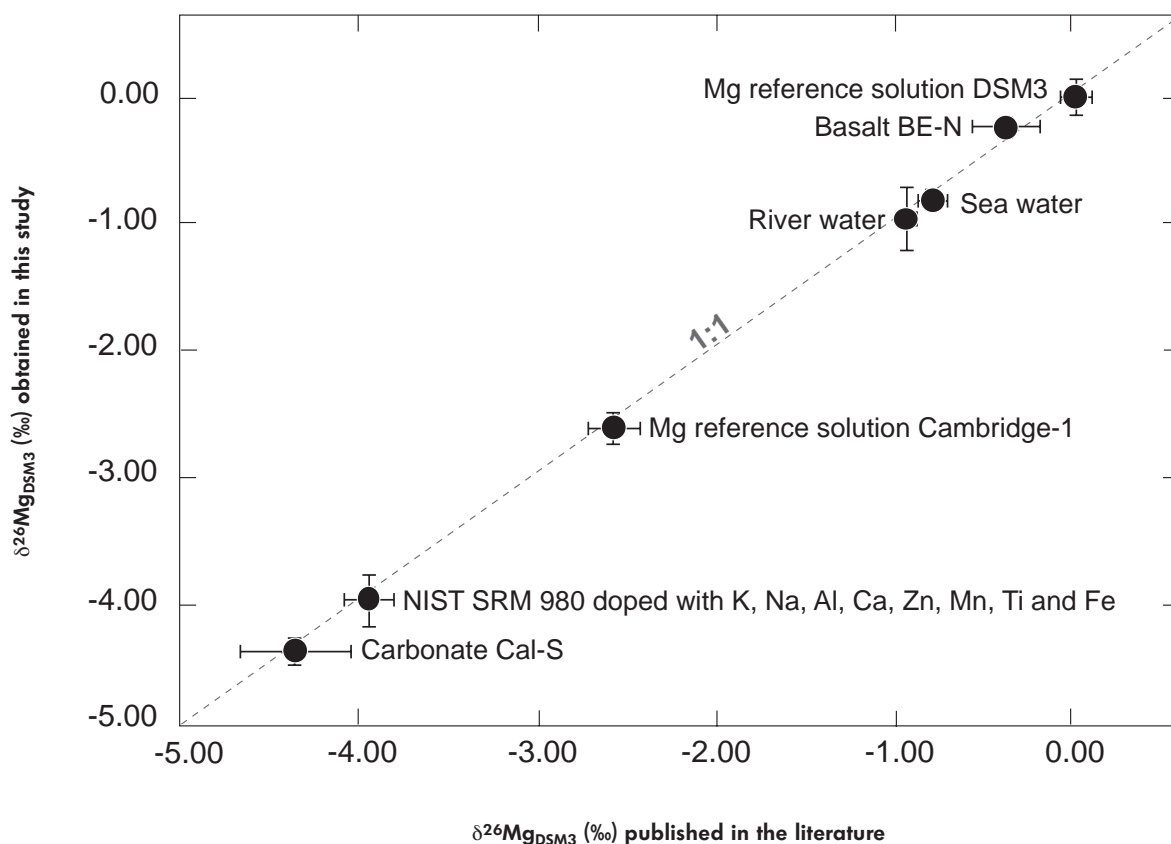
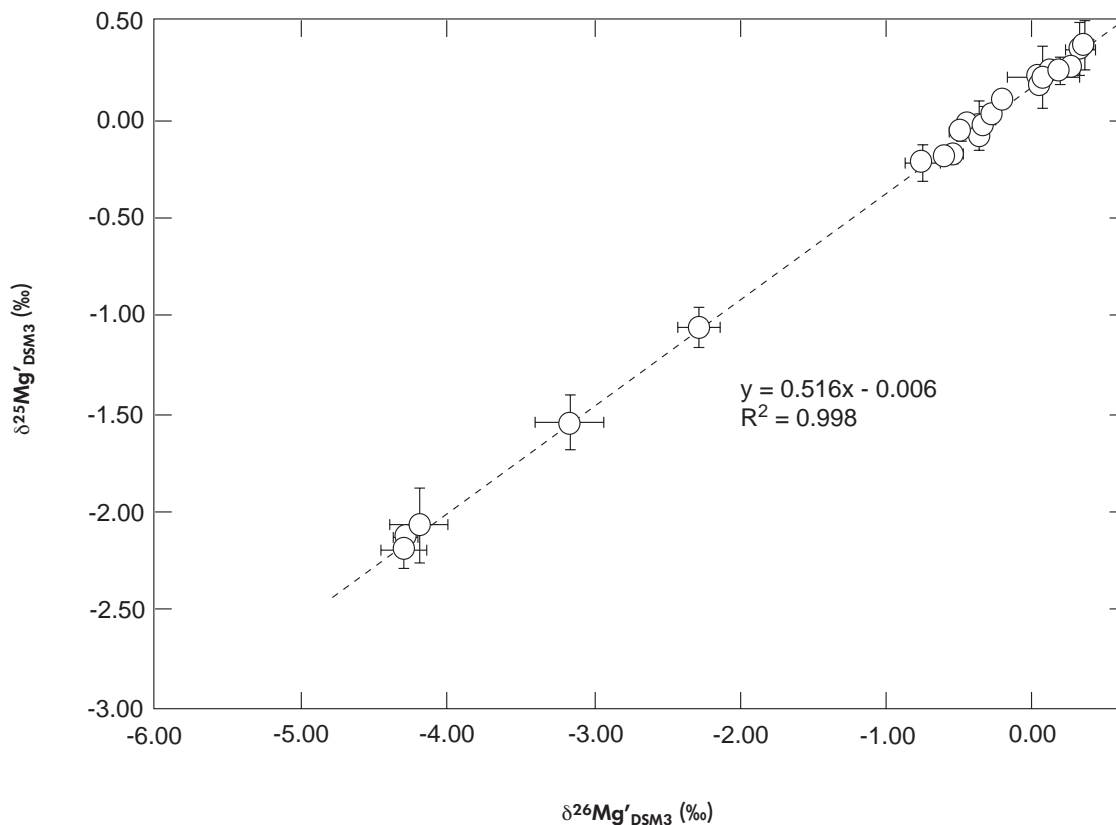


Figure 2. Magnesium isotope compositions of the reference materials analysed in this study plotted against data from the literature.



**Figure 3. Magnesium three-isotope plot relative to DSM3 for reference materials, and Mg standard solutions (Table 4).**  $\delta^{26}\text{Mg}' = 1000 \cdot \ln((\delta^{26}\text{Mg}_{\text{measured}} + 1000)/1000)$  and  $\delta^{25}\text{Mg}' = 1000 \cdot \ln((\delta^{25}\text{Mg}_{\text{measured}} + 1000)/1000)$ . Error bars are at the 2s level. The value of the slope and its equation was determined using Isoplot 3.00 (Ludwig 2003).

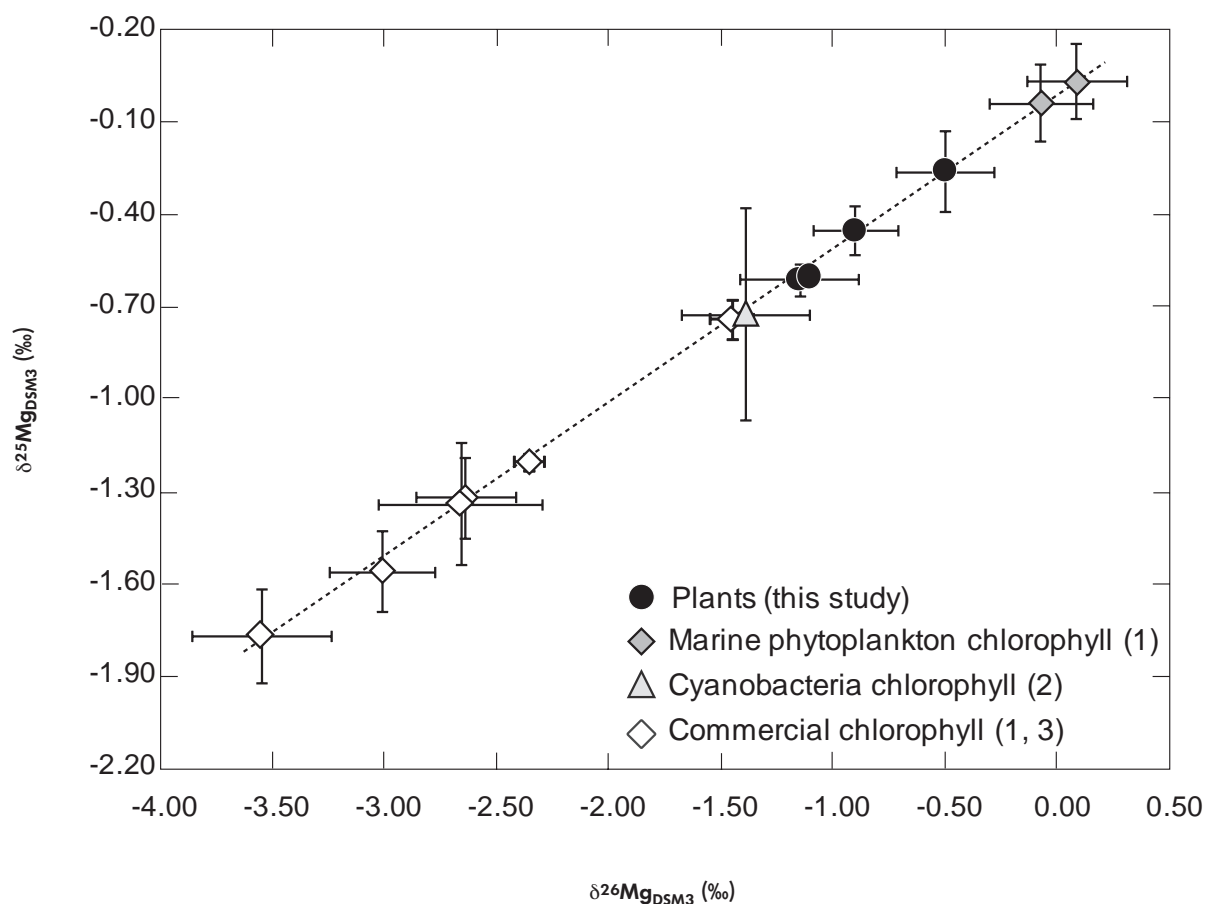
close to that found for terrestrial materials by Galy *et al.* (2001) ( $0.518 \pm 0.038$ ) and Pearson *et al.* (2005) ( $0.5165 \pm 0.0005$ ). The value of the slope also lies between the two theoretical mass fractionation coefficients for kinetic and equilibrium processes (Young *et al.* 2002).

### Mg isotope determinations of new reference materials

**Continental crust silicates: diorite (DR-N) and granite (GA).** The two continental rocks analysed, diorite and granite, gave  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-0.50 \pm 0.08\text{‰}$  and  $-0.75 \pm 0.14\text{‰}$  respectively (Table 4). The isotopic composition of diorite DR-N was close to the two published values for bulk continental rocks ( $\delta^{26}\text{Mg}$  of a paragneiss =  $-0.48 \pm 0.16\text{‰}$ ; Tipper *et al.* 2006a, and  $\delta^{26}\text{Mg}$  of a loess =  $-0.60 \pm 0.03\text{‰}$ ; Young and Galy 2004). The composition of granite GA was slightly lighter than other continental rocks. This could be explained either by small isotopic heterogeneities in continental crust material or by incorporation of limestone-alga

from surrounding shales and hornfels into the granite parent magma as demonstrated by von Eller (1964).

**Weathering products: soil (TILL-1) and river water (NIST SRM 1640).** The forest soil and river water displayed  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  $-0.40 \pm 0.07\text{‰}$  and  $-1.27 \pm 0.14\text{‰}$ , respectively (Table 4). The compositions of these samples cannot be compared directly with published values because their isotopic compositions are closely related to the local lithology. The soil, sampled near Lanark, Canada, was developed above a calcareous, grey-brown clay loam. Carbonates in the soil could explain the low  $\delta^{26}\text{Mg}$  value compared to other Himalayan silicate soils ( $-0.03 \pm 0.08\text{‰}$ , Tipper *et al.* 2006a). NIST SRM 1640 comes from a river which drains Clear Creek canyon in the Rocky Mountains, Colorado (USA), a complex of igneous and metamorphic rocks. Its low  $\delta^{26}\text{Mg}$  value is consistent with release of light isotopes during silicate weathering and is within the range published for other river waters (Tipper *et al.* 2006a, Brenot 2006).



**Figure 4. Magnesium three-isotope plot relative to DSM3 for plant reference materials and cell organelles molecule chlorophylls a and b (Young and Galy 2004). Error bars represent 2s. (1) Ra and Kitagawa (2007), (2) Black *et al.* (2006), (3) Young and Galy (2004).**

**Plants and organic matter.** Plants and organic matter displayed low  $\delta^{26}\text{Mg}$  values relative to DSM3. Lichen, rye flour, sea lettuce and hairgrass had  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-1.15 \pm 0.27\text{‰}$ ,  $-1.10 \pm 0.14\text{‰}$ ,  $-0.90 \pm 0.19\text{‰}$  and  $-0.50 \pm 0.22\text{‰}$ , respectively (Table 4). There are no published data for similar natural materials. The published  $\delta^{26}\text{Mg}$  values for organic matter are obtained on chlorophyll molecules from commercial materials (Young and Galy 2004, Ra *et al.* 2007) and from marine phytoplankton and cyanobacteria (Black *et al.* 2006, Ra *et al.* 2007). The  $\delta^{26}\text{Mg}$  values ranged from  $-3.55 \pm 0.29\text{‰}$  to  $-0.07 \pm 0.23\text{‰}$  and  $-2.66 \pm 0.36\text{‰}$  to  $0.09 \pm 0.22\text{‰}$  for chlorophyll-a and -b respectively. Bulk plant Mg isotope compositions obtained in this study fall, within uncertainties, in the range defined by chlorophyll published data (Figure 4).

Lichen and sea lettuce are used as a means for monitoring pollution of their habitats. The analysed lichen lives on the surface of trees and its nutrients are

mainly derived from the atmosphere, as soluble rain water and dust particles. Sea lettuce is a hydrophytic (aquatic) plant (green) alga that lives in brackish water. Its nutrients are taken up from the surrounding water. The BCR-482 lichen was collected from a pine tree in Axalp (Switzerland), located in the northern Alps, a region dominated by igneous and metamorphic rocks. Potential nutrient sources for lichens are carbonates ( $\delta^{26}\text{Mg} \sim -4.9$  to  $-1.0\text{‰}$ ), silicates ( $\delta^{26}\text{Mg} \sim -0.75$  to  $0.0\text{‰}$ ), marine salts with a composition assumed to be that of seawater ( $\delta^{26}\text{Mg} \sim -0.82 \pm 0.11\text{‰}$ ) and pine-leaf. The lichen isotope composition ( $\delta^{26}\text{Mg} = -1.15 \pm 0.27\text{‰}$ ) could be explained by a simple source mixing.

The sea lettuce was collected at a maximum depth of 1 m below the surface of the stagnant saline water of the Veere Lake, near Kwistenburg (Netherlands). The Veere Lake is a lagoon separated very recently (in 1961) from the North Sea by the Delta Works dam

system. It can therefore be assumed that the lagoon Mg isotope composition is similar to that of seawater. Sea lettuce grows under water and nutrients enter directly into leaves (thalli) from surrounding water. The similarity of seawater and sea lettuce isotopic compositions suggests that no isotope fractionation occurs during this process.

## Conclusions

This study presents an efficient analytical procedure for Mg separation from complex matrices using ion-exchange chromatography, with a ~ 100% yield. The chemical separation and purification of Mg were assessed by Mg isotope measurements of reference materials, including plants and organic matter (rye flour BCR-381, sea lettuce BCR-279, lichen BCR-482 and natural hairgrass), silicate (DR-N, BE-N and GA) and carbonate (Cal-S) rocks, forest soil (TILL-1), as well as seawater (BCR-403) and natural freshwater (NIST SRM 1640). The Mg isotopic compositions of the reference materials and Mg standard solutions reported in this study compare well with published values. We present, for the first time, plant Mg isotope compositions. Plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  values fell within the range defined by published data for chlorophylls. The total range of  $\delta^{26}\text{Mg}$  obtained in this study (~ 4.15‰) indicates large variations between natural samples, especially between rock, soil, river water and plants, compared to internal and external errors (~ 0.14‰). These materials are closely linked to weathering processes and to major element recycling by plants. The effects of both these processes on the Mg biogeochemical cycle and the Mg isotope signatures of natural waters still need to be investigated.

## Acknowledgements

We are most grateful to Jean Carignan, (SARM, CRPG), for providing advice, and the rock and plant reference materials for this study. We would also like to thank Delphine Yeghicheyan for her assistance in major and trace element determinations for column calibration using the Perkin Elmer 6000 ICP-MS, Céline Fournier for her technical help during GV Isoprobe MC-ICP-MS analytical sessions at CRPG (Nancy), and Philippe Télouk for his assistance during Mg isotope ratio measurements, using the Nu instrument MC-ICP-MS at ENS, Lyon. Alice Williams, Pete Burnard and Claire Rollion-Bard are acknowledged for comments on the manuscript.

## References

- Black J.R., Qing-Zhu Y. and Casey W. (2006)**  
An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 70, 4072-4079.
- Bizzarro M., Baker J.A., Haack H. and Lundgaard K.L. (2005)**  
Rapid timescales for accretion and melting of differentiated planetesimals inferred from  $^{26}\text{Al}$ - $^{26}\text{Mg}$  chronometry. *The Astrophysical Journal*, 632, L41-L44.
- Brenot A. (2006).**  
Origine de l'eau et des éléments dissous par tramage isotopique (H, O, S, Mg, Sr) sur le bassin amont de la Moselle. PhD thesis, INPL Nancy Lorraine, 240pp.
- Carignan J., Hild P., Mevelle G., Morel J. and Yeghicheyan D. (2001)**  
Routine analyses of trace elements in geological samples using flow injection and low pressure on-line liquid chromatography coupled to ICP-MS: A study of geochemical reference materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. *Geostandards Newsletter: The Journal of Geostandards and Geoanalysis*, 25, 187-198.
- Catanzaro E.J., Murphy T.J., Garner E.L. and Shields W.R. (1966)**  
Absolute isotopic abundance ratios and atomic weight of magnesium. *Journal of Research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry*, 70A, 453-458.
- Chang V.T.-C., Williams R.J.P., Makishima A., Belshaw N.S. and O'Nions R.K. (2004)**  
Mg and Ca isotope fractionation during  $\text{CaCO}_3$  biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323, 79-85.
- Chang V.T.-C., Makishima A., Belshaw N.S. and O'Nions R.K. (2003)**  
Purification of Mg from low-Mg biogenic carbonates for isotope ratio determination using multiple collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 296-301.
- de la Roche H. and Govindaraju K. (1969)**  
Rapport sur deux roches diorite DR-N et serpentine UB-N proposées comme étalons analytiques par un groupe de laboratoires français. *Bulletin de la Société Française de Céramique*, 85, 35-50.
- Galy A., Yoffe O., Janney P.E., Williams R.W., Cloquet C., Alard O., Halicz L., Wadhwa M., Hutcheon I.D., Ramon E. and Carignan J. (2003)**  
Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and new reference materials for magnesium-isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 1352-1356.
- Galy A., Bar-Matthews M., Halicz L. and O'Nions R.K. (2002)**  
Mg isotopic composition of carbonate: Insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters*, 201, 105-115.



## references

**Galy A., Belshaw N.S., Halicz L. and O'Nions R.K. (2001)**

High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 208, 89-98.

**Govindaraju K. (1980)**

Report on three GIT-IWG rock reference samples: Anorthosite from Greenland, AN-G; basalte d'Essey-la-Côte, BE-N; Granite de Beauvoir, MA-N. *Geostandards Newsletter*, 4, 49-138.

**Griepink B. and Muntau H. (1987)**

The certification of the contents (mass fractions) of arsenic, cadmium, copper, lead, selenium and zinc in sea lettuce (*Ulva lactuca*) CRM N° 279. *BCR Information series*, 54pp.

**Hollman P., Boenke A. and Finglas P. (1993)**

The certification of the mass fractions of major components and essential elements in rye flour, wheat flour and lyophilized haricots verts (beans) reference materials CRMs 381,382 and 383. *BCR Information series*, 126pp.

**James R.H. and Palmer M.R. (2000)**

The lithium isotope composition of international rock standards. *Chemical Geology*, 166, 319-326

**Ludwig K.R. (2003)**

User's manual for Isoplot 3.00. A geochronological toolkit for Microsoft Excel. *Berkeley Geochronology Center, Special Publication No. 4a* (Berkeley, California).

**Lynch J. (1996)**

Provisional elemental values for four new geochemical soil and till reference materials, TILL-1, TILL-2, TILL-3 and TILL-4. *Geostandards Newsletter*, 20, 277-287.

**Marechal C.N., Telouk P. and Albarede F. (1999)**

Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* 156, 251- 273.

**Mason T.F.D. (2003)**

High precision transition metal isotope analysis by plasma-source mass spectrometry and implications for low temperature geochemistry. PhD thesis, University of London, Imperial College of Sciences, Technology and Medicine, 271 pp.

**May W.E. and Rumble J. Jr. (2004)**

Certificate of analysis NIST SRM 1640, trace elements in natural water. <http://srms.nist.gov/certificates>.

**Pearson N.J., Griffin W.L., Alard O. and O'Reilly S.Y. (2006)**

The isotopic composition of magnesium in mantle olivine: Records of depletion and metasomatism. *Chemical Geology*, 226, 115-133.

**Quevauviller Ph., Herzig R. and Muntau H. (1996)**

The certification of the contents (mass fractions) of Al, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, and Zn in Lichen CRM N° 482. *BCR Information series*, 60pp.

**Quevauviller Ph., Kramer K.J.M., Vercoetere K. and Griepink B. (1992)**

The certification of the contents of Cd, Cu, Pb, Mo, Ni and Zn in sea water CRM N° 403. *BCR Information series*, 53pp.

**Ra K. and Kitagawa H. (2007)**

Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 817-821.

**Roubault M., de la Roche H. and Govindaraju K. (1970)**

Present status of the co-operative studies on the geochemical standards of the Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques. *Science de la Terre*, 15, 351-393.

**Teng F.-Z., Wadhwa M. and Helz R.T. (2007)**

Investigation of magnesium isotope fractionation during basalt differentiation: Implications for a chondritic composition of the terrestrial mantle. *Earth and Planetary Science Letters*, 261, 84-92.

**Tipper E.T., Galy A. and Bickle M.J. (2006a)**

Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters*, 247, 267-279.

**Tipper E.T., Galy A., Gaillardet J., Bickle M.J., Elderfield H. and Carder E.A. (2006b)**

The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters*, 250, 241-253.

**von Eller J.P. (1964)**

Dioritisation, granitisation et métamorphisme dans les Vosges cristalline du Nord: I- Région comprise entre la plaine d'Alsace, d'Andlau à Saint-Nabor et le champ-du-Feu. *Bulletin du Service de la Carte Géologique d'Alsace Lorraine*, 17, 117-120.

**Wiechert U. and Halliday A.N. (2007)**

Non-chondritic magnesium and the origins of the inner terrestrial planets. *Earth and Planetary Science Letters*, 256, 360-371.

**Wombacher F., Eisenhauer A., Heuser A. and Weyer S. (2006a)**

Combined chemical separation of Mg, Ca and Fe from geological reference samples for stable isotope determination by MC-ICP-MS and double-spike TIMS. *Geophysical Research Abstracts*, 8, A06219.

**Wombacher F., Eisenhauer A., Böhm F., Gussone N., Kinkel H., Lezius J., Noé S., Regenberg M. and Rüggeberg A. (2006b)**

Magnesium stable isotope compositions in biogenic CaCO<sub>3</sub>. *Geophysical Research Abstracts*, 8, A06353.

**Yeghicheyan D., Carignan J., Valladon M., Bouhnik Le Coz M., Le Cornec F., Castrec-Rouelle M., Robert M., Aquilina L., Aubry E., Churlaud C., Dia A., Deberdt S., Dupré B., Freyrier R., Gruau G., Hénin O., A.-M. de Kersabiec, Macé J., Marin L., Morin N., Petitjean P. and Serrat E. (2001)**

A compilation of silicon and thirty one trace elements measured in the natural river water reference material SLRS-4 (NRC-CNRC). *Geostandards Newsletter: The Journal of Geostandards and Geoanalysis*, 25, 465-474.

## references

---

**Young E.D. and Galy A. (2004)**

The isotope geochemistry and cosmochemistry of magnesium. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 55, 197-230.

**Young E.D., Galy A. and Nagahara H. (2002)**

Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, 66, 1095-1104.

## **IV. Systèmes expérimentaux des cultures des plantes**

L'étude de la croissance et de la nutrition des plantes nécessite le développement de dispositifs de croissance adaptés aux objectifs fixés à l'étude. L'un des facteurs essentiels pour une bonne croissance des plantes est la biodisponibilité des éléments dans le milieu de croissance. Ce terme désigne l'aptitude d'un élément chimique à être transféré du compartiment sol vers le système racinaire de la plante, en vue de son assimilation. La biodisponibilité dépend de la concentration, ainsi que la mobilité de l'élément considéré dans le milieu de croissance et de l'espèce végétale considérée. La biodisponibilité des éléments va influencer, non seulement sur la biomasse produite pendant la croissance de la plante, mais aussi sur les processus physiologiques associés à cette croissance.

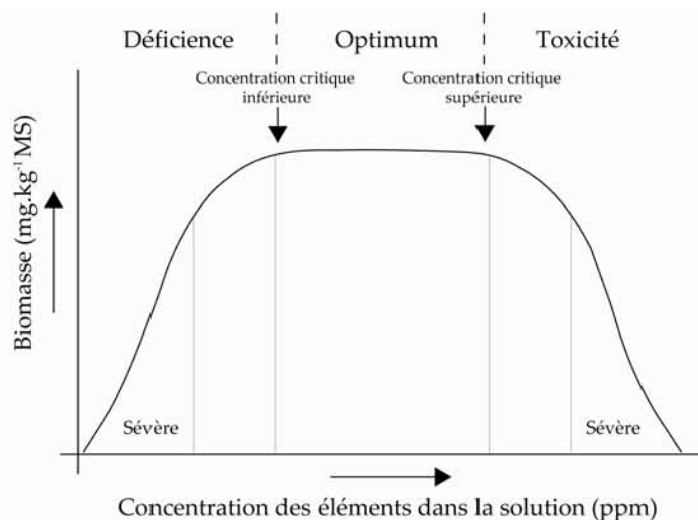
Dans un milieu de croissance naturel complexe tel que le sol, les éléments nutritifs chimiques se répartissent en trois fractions : la fraction soluble, qui comprend les formes libres et complexées par des ligands dans la solution du sol, la fraction échangeable, où l'élément est sous forme ionique, chargé, et la fraction incluse dans la structure des minéraux. La biodisponibilité des éléments nutritifs augmente suivant la séquence suivante : fraction soluble > fraction échangeable > fraction incluse dans les minéraux. Les croissances de plantes peuvent être réalisées sur des substrats simplifiés, soit minéraux (solides), où les éléments nutritifs ne sont pas directement biodisponibles, soit liquides, où les éléments sont directement assimilables par les plantes (culture hydroponique). Quel que soit le type de culture adopté, un des paramètres clés pour une bonne croissance des plantes est la solution d'arrosage des plantes. Cette solution est la seule source d'eau pour les plantes. Elle peut être dépourvue d'éléments nutritifs : cela n'empêche pas la croissance de plantes dans le cas d'une culture sur substrat minéral riche en éléments nutritifs. On parle de solution nutritive lorsque la solution contient des nutriments. C'est le cas des solutions d'une culture hydroponique ou d'une culture sur un substrat relativement inerte, tel que le sable. Dans ce dernier cas, la solution nutritive constitue la seule source d'éléments nutritifs pour les plantes ; le choix de sa composition doit alors se faire de sorte à éviter les antagonismes entre les éléments nutritifs.

### **IV-1. Composition de la solution nutritive et choix des plantes**

La formulation d'une solution nutritive doit tenir absolument compte de l'équilibre ionique de celle-ci : son pH doit être proche de la neutralité, et les rapports entre les cations majeurs (Ca/Mg, K/Mg et Ca/ K+Mg) doivent être vérifiés. Ces rapports sont primordiaux pour une bonne croissance des plantes. Un déséquilibre en concentration des cations peut en

effet entraîner une baisse, voire une cessation de l'absorption d'un des cations, tel que le Mg. Certains cations, tel le  $NH_4^+$ , doivent être évités dans la formulation de la solution, car en excès, ils sont toxiques pour la plante. Le choix d'une solution nutritive adaptée se fait sur la base des besoins de la plante à étudier. Ceci permet d'établir un bilan de consommation potentielle des éléments. La relation entre la concentration des éléments dans une plante et la croissance de celle-ci (traduite par la biomasse produite) permet de définir trois zones (Figure II-11) : (1) la zone de déficience, (2) la zone de croissance optimale et (3) la zone de toxicité. Les points d'inflexion de cette courbe de croissance correspondent aux concentrations critiques inférieure et supérieure. Ce sont, respectivement, les concentrations au-delà desquelles tout apport d'élément nutritif n'entraîne pas une augmentation de la biomasse, ou induit une baisse de la biomasse. La formulation des solutions nutritives doit ainsi proposer des concentrations en éléments, comprises entre les deux concentrations critiques, afin d'optimiser les conditions de croissance.

Dans le cadre de cette thèse, deux espèces végétales ont été choisies : le ray-grass, une espèce monocotylédone et le trèfle, une espèce dicotylédone. Elles sont parmi les plus couramment utilisées dans les expériences de laboratoire du fait de leur croissance rapide et de leurs systèmes racinaires denses et homogènes. Nous avons utilisé une solution nutritive employée par Chaignon (2001) en la modifiant de sorte à reproduire les besoins nutritifs du ray-grass et du trèfle. Le Mg dans la solution est apporté en excès pour éviter toute variation de concentration entre le début et la fin de la culture des plantes.



**Figure II-11.** Variation de la croissance des plantes (production de biomasse) en réponse à l'apport des éléments nutritifs dans le milieu de culture.



Pour approcher la formulation de la solution nutritive, des stocks indépendants de solution mère d'éléments nutritifs sont réalisés, puis mélangés, dans une certaine proportion pour donner une solution ionique fille neutre, avec de faibles rapports de K/Mg et Ca/Mg. Dans le cas de la solution utilisée dans cette étude, la somme des cations est égale à celle des anions, soit 8.5 meq.l<sup>-1</sup>. Le rapport K/Mg est proche de l'unité et le rapport de Ca/Mg est égal à 2 (Tableau II-8), ce qui permet d'éviter les antagonismes entre ces cations lors de la croissance des plantes.

**Tableau II-8 :** Equilibre ionique de la solution nutritive fabriquée pour la croissance des plantes.

Ions (meq.l <sup>-1</sup> )	$NO_3^-$	$H_2PO_4^{2-}$	$SO_4^{2-}$	Total	Pourcentage (%)
K <sup>+</sup>	2	0.5		2.5	29
Ca <sup>2+</sup>	4			4.0	47
Mg <sup>2+</sup>			2	2.0	24
<b>Total</b>	6	0.5	2	<b>8.5</b>	-
<b>Pourcentage (%)</b>	71	6	23	-	<b>100</b>

## IV-2. Stérilisation des graines et tests de germination

La stérilisation des graines est nécessaire pour minimiser le développement de microorganismes (champignons et bactéries) lors de la croissance des plantes. Trois différents protocoles de stérilisation ont été testés, et des suivis de germination ont été réalisés. Ainsi, les graines de ray-grass et de trèfle ont été traitées par des solutions d'hypochlorite de calcium (20%) et de peroxyde d'hydrogène à 30% et 6%. Pour chaque test, les graines ont été mises en contact avec ces solutions pendant 10 minutes sous agitation. Elles ont ensuite été rincées, successivement, cinq fois à l'eau ultrapure stérile. Le taux de germination pour chaque protocole a été calculé après conservation de ces graines pendant 72h, à 28°C, à l'obscurité, en boîtes de Pétri, sur des filtres en silice imbibés d'eau ultrapure. Le tableau II-9 résume les résultats obtenus. Seule la stérilisation avec du peroxyde d'hydrogène donne des taux de germination de plus de 90%, satisfaisants pour la suite de la culture. La stérilisation des graines au cours de toutes les manipulations suivantes a donc été réalisée avec du peroxyde d'hydrogène à 6%.

**Tableau II-9 :** Taux de germination des tests de stérilisation.

Solution de stérilisation	Taux de germination (%)	
	<i>Ray-grass</i>	<i>Trèfle</i>
Hypochlorite de calcium (20%)	35	63
Peroxyde d'hydrogène (6%)	97	98
Peroxyde d'hydrogène (30%)	53	80

Un ensemble de tests de croissance a été réalisé, en prélude aux expérimentations principales, dans le but d'optimiser le développement des parties racinaires et aériennes des plantes, d'estimer le temps minimum nécessaire pour obtenir une biomasse suffisante, et de valider les dispositifs expérimentaux employés.

### IV-3. Cultures sur substrats solides

Lors de la croissance de plantes sur substrat minéral solide, la séparation des particules attachées sur les racines en fin d'expérience est souvent délicate. Si des particules minérales restent attachées aux racines et sont minéralisées en même temps que celles-ci, la concentration en cations des racines peut être surestimée. Pour limiter donc cet effet, un support artificiel « en couches » superposées, a été utilisé. Ce dispositif permet également de créer un volume suffisant et nécessaire au développement des racines. Il consiste en deux couches de sable de quartz pur (sable de Fontainbleau, Deco™ Quartz) entre lesquelles est insérée la couche des minéraux, source de Mg (Figure II-14). Les sables ont été lavés, successivement, avec de l'acide chlorhydrique concentré (12N) pendant une semaine, puis rincés abondamment à l'eau ultrapure, afin de les débarrasser de toute impureté. Les substrats minéraux ont été choisis de manière à obtenir trois niveaux de biodisponibilité du magnésium pour la croissance des plantes.



**Figure II-12.** Dispositif de croissance des plantes (production de biomasse) sur substrat minéral.

#### III-3.1. Culture avec des minéraux facilement altérables non silicatés

Les premiers tests pour le choix des modalités de cultures ont été réalisés avec des substrats susceptibles de libérer facilement le Mg. Trois produits ont été sélectionnés : du sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ), de la magnésie ( $MgO$ ) et de la magnésie + oxyde de calcium

(MgO + CaO). Les quantités requises pour une croissance optimale de la plante ont été estimées, et une quantité bien en excès est ensuite placée dans les dispositifs afin d'éviter tout fractionnement de la source au cours de la culture. Ces sources minérales de Mg sont insérées entre les couches de sable tel que décrit précédemment. L'ensemencement des graines stérilisées est fait directement dans la couche de sable supérieure. Quatre répétitions sont faites pour chaque traitement. Un tube est inséré dans un angle du dispositif pour l'apport de la solution nutritive aux plantes. L'ensemble du dispositif est recouvert d'aluminium et est ensuite placé dans une chambre de culture pour germination. Quatre jours après le semis, les résultats indiquent que les taux de germination obtenus varient de 0 % (sulfate de magnésium) à 60 % (traitement de magnésite et de magnésie + oxyde de calcium). Dans les dispositifs avec les plus forts taux de germination, les pots de cultures sont mis à découvert, puis les plantes arrosées quotidiennement avec la solution nutritive pendant 10 jours. Au cours de la croissance des plantes, le taux de mortalité des jeunes plantules fut supérieur à 90% sur le substrat constitué du mélange magnésie + oxyde de calcium. Sur la magnésie, ce taux de mortalité est moins important mais demeure néanmoins très élevé (50%). Ces faibles rendements pourraient provenir d'un pH trop élevé et d'une trop grande disponibilité du Mg, qui à l'instar de tous les éléments, serait toxique au-delà de la concentration critique supérieure de Mg. En plus de ce problème nutritionnel, les plantules s'ancrent difficilement dans le substrat sableux meuble, ce qui semble accroître leur dégénérescence.

Le dispositif et la procédure en début de culture ont donc été modifiés et le semi direct des graines sur le substrat fut alors abandonné. Les graines des plantes stérilisées sont mises à germer en boîte de pétri (similairement aux tests de germination). Puis, les plantules sont repiquées dans la couche supérieure de sable du dispositif de culture. Afin d'éviter toute prolifération d'algues, la surface du dispositif doit demeurer sèche. Une couche supplémentaire de sable hydrophobe est ainsi rajoutée au dispositif. En plus de limiter le développement d'algues, cette couche hydrophobe permet de conserver l'humidité du substrat. Cette couche de sable est obtenue en mélangeant, sous hotte, du sable avec du RODHORSIL, un hydrofugeant, dans les proportions de 10 g de sable pour 5 ml d'hydrofugeant.

Un test réalisé avec ce nouveau dispositif en présence de magnésie montre que ces conditions de croissance permettent un meilleur ancrage des plantules. Cependant, le taux de mortalité reste semblable que dans le dispositif précédent (~ 50%). Ceci suggère que l'élévation du pH du milieu de culture (>8) lors de la dissolution rapide de la magnésie serait

la principale cause de mortalité des plantes. La magnésie et les autres substrats minéraux très ont donc été supprimés des substrats utilisables dans la suite des expérimentations.

#### **IV-3.2. Culture avec des sources minérales silicatées**

Une phlogopite, minéral magnésien considéré comme peu altérable et faisant partie de la famille des micas, a été utilisé pour ces tests. Elle a pour formule  $\text{KMg}_3(\text{Si}_3\text{AlO}_{10}(\text{F}, \text{OH})_2$ . Au contraire de la magnésie, cette phlogopite, au départ sous forme de grands cristaux décimétriques, nécessite d'être transformée en poudre afin d'augmenter sa surface spécifique et son taux d'altération. La phlogopite est donc broyée en milieu humide et les particules comprises entre 1 et 50  $\mu\text{m}$  sont séparées à l'aide de tamis. Ces particules sont ensuite séchées à l'étuve à 150°C. La poudre obtenue est alors insérée dans le même type de dispositif de culture que celui utilisé pour les tests avec magnésie (évoqué dans le paragraphe précédent). Les plantules sont repiquées après germination (similairement aux tests avec la magnésie). Au cours de la culture, les plantes sont arrosées avec la solution nutritive dépourvue de Mg et de Fe. Les systèmes racinaires des plantules se sont bien développés et le taux de mortalité est inférieur à 20%. Ce dispositif expérimental et ce substrat minéral sont conservés pour la suite des travaux de croissance de plantes sur substrat.

Le temps de croissance optimale des plantes a été estimé à 55 jours après le semis. Cette période (55 JAS) correspond au stade précédant la floraison du trèfle et la montaison du ray-grass. Lors de la croissance des plantes pendant cette période, les quantités de Mg prélevées n'entraînent pas de variations significatives de la concentration initiale de la source de Mg. Parallèlement à ces tests sur substrats minéraux, des systèmes de cultures hydroponiques avec du Mg directement assimilable ont été mis au point pour étudier une source de Mg très disponible.

#### **IV-4. Cultures hydroponiques**

La culture hydroponique désigne donc tout système de culture dont le support n'est pas un sol ni aucun autre substrat solide. Ces systèmes sont intéressants pour étudier les éléments nutritifs constitutifs des plantes et leur rôle dans les plantes. Cette technique de culture a connu une ascension rapide, car elle permet de s'affranchir de toutes les interférences liées au développement des plantes à partir d'un sol.

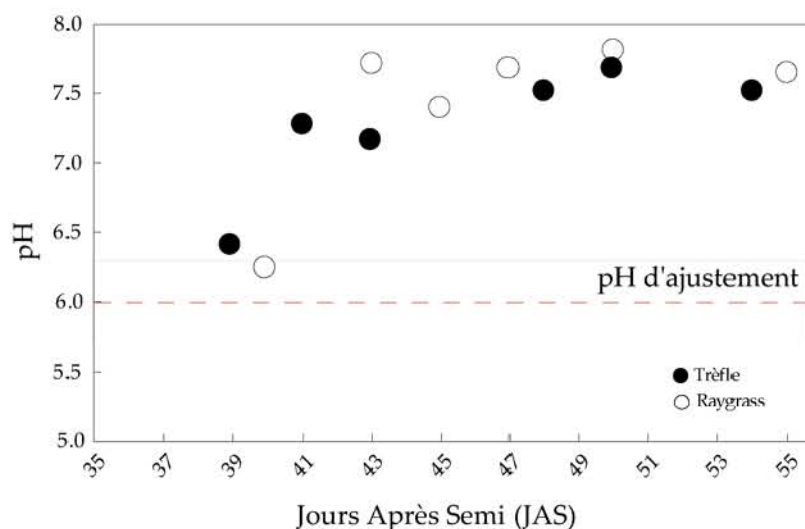
Concernant les procédures des cultures hydroponiques développées pendant ce travail de thèse, après la germination des graines, les plantules âgées de 5 jours sont mises sur une

grille en polyamide de 900  $\mu\text{m}$  de maille, prise entre 2 tubes interne et externe en PVC, de diamètre respectifs de 24 et 22.5 cm. Cet ensemble est imbriqué dans le couvercle perforé d'un bac de 40 l contenant une solution nutritive aérée, en permanence par 2 pompes "aquarium" (Newa33 Loreggia, Italie) débitant  $380\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$  d'air dans la solution. Ces pompes sont reliées par leurs sorties à 4 diffuseurs d'air en céramique. Pour éviter les variations de concentrations des ions dans la solution nutritive, celle-ci est renouvelée périodiquement toutes les deux semaines, pendant les 4 premières semaines, puis toutes les semaines, jusqu'à la fin de la culture.

Pour une absorption optimale du Mg par les plantes, le pH doit être compris entre 5 et 7.5 (ex. Epstein et Bloom, 2005). Une valeur constante de pH initial a donc été fixée à  $6\pm 0.3$  dans nos dispositifs. Au cours de la croissance des plantes, les variations de pH, si elles ne sont pas contrôlées, sont très marquées dès les premières semaines, puis tendent à se stabiliser à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine pour les espèces végétales (Figure II-13). Toutes variations du pH résultant du déséquilibre entre l'absorption de cations et d'anions sont alors ajustées quotidiennement avec une solution acide ( $\text{HSO}_4$ ) sur la base de la relation suivante :

$$Q = \frac{C.V}{1000} \quad (\text{Eq II-7})$$

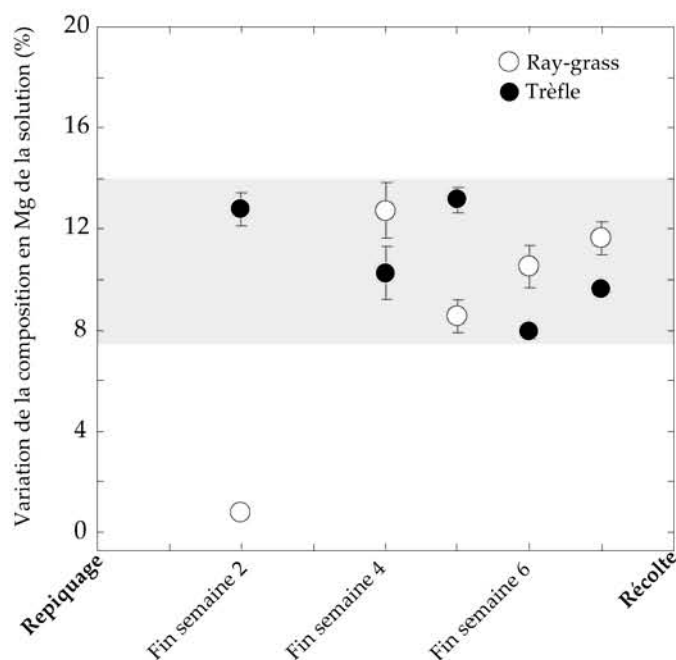
où  $Q$  est la quantité de matière (mol) de  $\text{OH}^-$ ; C et V sont respectivement la concentration (M) et le volume (ml) de la solution d'ajustement du pH.



**Figure II-13.** Variation du pH de la solution nutritive au cours de la croissance des plantes en culture hydroponique.

Les premiers tests montrent que la période de culture fixée à 55 JAS est également adaptée et permet d'obtenir une biomasse largement suffisante. Les analyses de la solution au cours de la culture suggèrent que le renouvellement de la solution nutritive au cours de la

croissance permet de limiter la variation de la concentration en Mg de la source à moins de 10% (Figure II-14).



**Figure II-14.** Pourcentage de variation de la composition en Mg de la solution nutritive au cours de la croissance des plantes en culture hydroponique.

## V. Conclusion

Une part prépondérante de ce travail de thèse a consisté à développer et valider des dispositifs et méthodes analytiques. Dans un premier temps, des tests de culture menés en chambre de culture ont permis de mettre au point des systèmes de culture sur substrats minéraux (phlogopite) et en hydroponique. Ces systèmes permettent d'optimiser la croissance des plantes sans induire de variations de la concentration du Mg de la source initiale. En parallèle, une technique analytique de séparation quantitative et qualitative du Mg de la matrice d'une large gamme d'échantillons, d'origine géologique et biologique a été développée en vue de l'analyse isotopique du Mg par MC ICP-MS. L'originalité de cette chimie séparative réside dans l'utilisation combinée de deux résines : l'une échangeuse d'anions et l'autre échangeuse de cations. La méthode permet de réduire la durée de la chimie du Mg et de récupérer une fraction purifiée de Mg dans laquelle le rapport [cation]/[Mg] est largement inférieure à 0.05. L'ensemble des protocoles a donc été appliqué pour la suite des analyses isotopiques du Mg des plantes, des eaux, des minéraux et des sols.

## V. Références bibliographiques hors article

- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J., and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Catanzaro, E. J. and Murphy, T. J., 1966a. Magnesium Isotope Ratios in Natural Samples. *Journal of Geophysical Research*, 71, 1271-1274.
- Catanzaro, E. J. and Murphy, T. J., 1966b. Magnesium Isotope Ratios in Natural Samples. *Journal of Geophysical Research* 71, 1271-1274.
- Chaignon V. 2001, Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse de doctorat, Université Aix-Marseille III. 183pp.
- Daughtry, A. C., Perry, D., and Williams, M., 1962. Magnesium isotopic distribution in dolomite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 26, 857-866.
- Epstein, E. and Bloom, A. J., 2005. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Sinauer Associates Inc., U.S.
- Fontaine G. H., Hattendorf B., Bourdon B. and Günther D., 2009. Effects of operating conditions and matrix on mass bias in MC-ICPMS. *Journal of analytical atomic spectrometry* 24, 637-648.
- Gray, C. M. and Compston, W., 1974. Excess  $^{26}\text{Mg}$  in the Allende Meteorite. *Nature* 251, 495-497.
- Houk, R. S., Fassel, V. A., Flesch, G. D., Svec, H. J., L., G. A., and Taylor, C. E., 1980. Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion Source for Mass Spectrometric Determination of Trace Elements. *Analytical Chemistry* 52, 2283-2289
- Maréchal C., 1998. Géochimie des isotopes du cuivre et du zinc : méthode, variabilité naturelle et application océanographique. Thèse de doctorat, Université de Grenoble 1, 261 pp.
- Millot, R., Guerrot, C., and Vigier, N., 2004. Accurate and High-Precision Measurement of Lithium Isotopes in Two Reference Materials by MC-ICP-MS. *Geostandards and Geoanalytical Research* 28, 153-159.
- Rehkämper, M., Schönbächler, M., and Stirling, C. H., 2001. Multiple Collector ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities. *Geostandards and Geoanalytical Research* 25, 23-40.
- Shima, M., 1964. The Isotopic Composition of Magnesium in Terrestrial Samples. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 37 284-285.
- Strelow F. W. E. An ion exchange selectivity scale of cations based on equilibrium distribution coefficients, *Analytical Chemistry* 32, 1185, 1960.
- Strelow F.W. E. and Sandrop H., Distribution coefficients and cation-exchange selectivities of elements with AG50WX8 resins in perchloric acid, *Talanta*, 19, 1113, 1972.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Walder, A. J. and Freedman, P. A., 1992. Isotopic ratio measurement using a double focusing magnetic sector mass analyser with an inductively coupled plasma as an ion source. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 7, 751-755.

Wombacher, F., Eisenhauer, A., Heuser, A., and Weyer, S., 2009. Separation of Mg, Ca and Fe from geological reference materials for stable isotope ratio analyses by MC-ICP-MS and double-spike TIMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24, 627 - 636.



**Détermination des fractionnements  
isotopiques du Mg lors de la  
croissance expérimentale des plantes**

# I. Résumé de l'étude

## I-1. Contexte et objectifs de l'étude

Les isotopes stables dits "non traditionnels" sont de plus en plus utilisés depuis quelques années, pour caractériser la composition des réservoirs terrestres et les flux au cours des cycles biogéochimiques continentaux. De récentes études se sont intéressées au fractionnement des isotopes du Mg lors des processus d'altération des silicates, en faisant fi de la composante biologique. Le Mg transporté par les cours d'eau proviendrait essentiellement des lithologies silicatées et carbonatées. Cependant, il a aussi été récemment mis en évidence que la contribution de la végétation aux flux de Mg dans les rivières pouvait atteindre 40%, en particulier dans des régions boréales. (Zakharova *et al.*, 2007). Si les plantes représentent un réservoir isotopiquement distinct en Mg, alors ce traceur pourrait, dans certains cas, aider à quantifier les flux issus de la biomasse ou de la végétation. Pour cela, il est fondamental de vérifier comment les isotopes de magnésium fractionnent au cours de la croissance des plantes. L'espèce végétale et le milieu de croissance influence le prélèvement, la translocation et la distribution du Mg dans la plante. L'objectif principal de cette étude est donc de quantifier les fractionnements isotopiques du Mg lors de la croissance des plantes ainsi que lors du passage de cet élément depuis le milieu nutritif jusqu'aux différents organes, et ce, dans diverses conditions de croissance. Les résultats permettront à terme de contraindre et prédire l'impact potentiel des plantes dans l'acquisition de la signature isotopique en Mg des eaux de surface.

## II-2. Matériel et méthodes

Pour cette étude, deux espèces végétales ont été choisies sur la base de leur croissance rapide en conditions expérimentales. Il s'agit du trèfle et du ray grass. Ces espèces végétales ont été cultivées en chambre de culture afin de s'affranchir des complexités environnementales. Deux types de substrat magnésien ont été utilisés comme source d'éléments nutritifs : (1) le premier, avec du Mg directement assimilable par les plantes, car sous forme soluble (hydroponie), et (2) le second, avec du Mg très peu disponible, car inclus dans la structure d'un minéral difficilement altérable (phlogopite). La croissance des plantes a duré 55 jours après le semis, et au terme desquels les plantes ont été récoltées. Les parties racinaires ont été séparées des parties aériennes. Pour les échantillons issus de la culture sur phlogopite, les racines ont été abondamment rincées avec de l'eau ultra-pure afin d'extraire

d'éventuelles particules minérales. Tous les échantillons ont ensuite été séchés, broyés et minéralisés avec un mélange d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène.

Parallèlement à ces cultures de plantes, des racines de ray-grass âgées de 35 jours ont été échantillonnées, puis lavées avec une solution acide de 0.05 M pendant 20 minutes afin de désorber les cations à la surface des racines. Les racines ont alors été scindées en deux lots d'1g : les racines vivantes et les racines mortes (séchées à l'étuve). Ces racines ont ensuite été immergées dans une solution de Mg pur ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) pendant 5, 10, 30, 60 et 80 minutes. Après chaque période de contact, les solutions résiduelles ont été collectées par centrifugation et filtrées à  $0.20 \mu\text{m}$ . Les concentrations des éléments majeurs (Mg, K et Na) des minéralisats et des solutions résiduelles ont été déterminées par ICP-AES. Puis, la purification chimique du Mg par chromatographie ionique a été réalisée en salle blanche, et les compositions isotopiques mesurées par MC ICP-MS (Nu Plasma, basé à l'ENS de Lyon).

### I-3. Principaux résultats

Les résultats montrent que les plantes sont systématiquement enrichies en isotopes lourds du Mg par rapport à la source initiale. Les variations  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{plante-source}}$  sont de 0.72 ‰ à 0.26 ‰ pour le ray-grass, et de 1.05 ‰ à 0.41 ‰ pour le trèfle. Les plantes cultivées sur la phlogopite ont des signatures isotopiques en Mg inférieures de 0.3 ‰ par rapport aux plantes cultivées en solution. En comparant les espèces végétales, le ray-grass a des valeurs moyennes de  $\delta^{26}\text{Mg}$  toujours inférieures de 0.3‰ par rapport au trèfle, quel que soit le milieu de culture. Le magnésium désorbé à partir des racines indique un enrichissement en isotopes lourds par rapport à la solution nutritive (de 0.69‰ et 0.53‰, respectivement, pour le ray-grass et le trèfle). Les expériences d'adsorption avec les racines vivantes et mortes du ray-grass indiquent également un enrichissement en isotopes lourds du Mg adsorbé sur la surface de la racine. Les résultats suggèrent donc que les principaux processus responsables de l'enrichissement en isotopes lourds de la plante sont localisés au niveau des racines.

La comparaison des compositions isotopiques des racines et des feuilles montre, pour les deux espèces, un enrichissement en isotopes légers des racines aux feuilles. Les valeurs de  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{feuilles-racines}}$  sont de -0.65 ‰ et -0.34 ‰, respectivement, pour le ray-grass et de trèfle sur phlogopite, et de -0.06‰ et -0.22 ‰ pour les mêmes espèces en culture hydroponique. Cet enrichissement en isotopes légers dans les feuilles peut être expliqué par des processus biologiques qui influencent différemment les compositions isotopiques des organes. Il s'agit (1) de la formation des complexes organomagnésiens (y compris la chlorophylle) et (2) du recyclage interne par le transport du Mg dans la plante. Pour les deux espèces, une

corrélation positive entre  $\delta^{26}\text{Mg}$  et K/Mg a été observée dans les différents organes. Cette corrélation est compatible avec les interactions entre les cycles internes de K et Mg, et la formation de composés organomagnésiens associée à un enrichissement en isotopes lourds.

## II. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth

Emile B. BOLOU-BI<sup>(1,2)\*</sup>, Anne POSZWA<sup>(2)</sup>, Corinne LEYVAL<sup>(2)</sup>, Nathalie VIGIER<sup>(1)</sup>

**Article accepté à GCA, le 17/08/09**

(1) CNRS-UPR 2300, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques,  
15 rue Notre Dame des Pauvres F-54501 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex, France

(2) CNRS-UMR 7137, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique  
dans les Sols, Nancy-Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bd des Aiguillettes, BP 70-239 F  
70 54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex, France

\*Corresponding Author:

Tel.: +33 (0)3 83 68 42 87

Fax: +33 (0)3 83 68 42 84

E-mail: emile.boloubi@limos.uhp-nancy.fr

## ABSTRACT

Two higher plant species (rye grass and clover) were cultivated under laboratory conditions on two substrates (solution, phlogopite) in order to constrain the corresponding Mg isotope fractionations during plant growth and Mg uptake. We show that bulk plants are systematically enriched in heavy isotopes relative to their nutrient source. The  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{plant-source}}$  range from 0.72‰ to 0.26‰ for rye grass and from 1.05‰ to 0.41‰ for clover. Plants grown on phlogopite display Mg isotope signatures (relative to the Mg source)  $\sim 0.3\%$  lower than hydroponic plants. For a given substrate, rye grass display lower  $\delta^{26}\text{Mg}$  (by  $\sim 0.3\%$ ) relative to clover. Magnesium desorbed from rye grass roots display a  $\delta^{26}\text{Mg}$  greater than the nutrient solution. Adsorption experiments on dead and living rye grass roots also indicate a significant enrichment in heavy isotopes of the Mg adsorbed on the root surface. Our results indicate that the key processes responsible for heavy isotope enrichment in plants are located at the root level. Both species also exhibit an enrichment in light isotopes from roots to shoots ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{leaves-roots}} = -0.65\%$  and  $-0.34\%$  for rye grass and clover grown on phlogopite respectively, and  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{leaves-roots}}$  of  $-0.06\%$  and  $-0.22\%$  for the same species grown hydroponically). This heavy isotope depletion in leaves can be explained by biological processes that affect leaves and roots differently: (1) organo-Mg complex (including chlorophyll) formation, and (2) Mg transport within plant. For both species, a positive correlation between  $\delta^{26}\text{Mg}$  and K/Mg was observed in the various organs. This correlation is consistent with a link between the K and Mg internal cycles and formation of organo-magnesium compounds associated with enrichment in heavy isotopes. Considering our results together with the published range for  $\delta^{26}\text{Mg}$  of natural plants, rocks, soils and rivers, we estimate the potential variation of the mean river  $\delta^{26}\text{Mg}$  value due to continental vegetation input change.

*Keywords: Plants, Experimental growth, Magnesium isotopes, uptake*

## 1. INTRODUCTION

35 Magnesium and calcium cycles are closely linked to the carbon cycle, through the  
36 weathering of silicates on continents and the precipitation of carbonates in the oceans (e.g.  
37 Berner *et al.*, 1983; Velbel, 1993). The general assumption is that Mg carried by rivers mainly  
38 originates from Mg silicate minerals and carbonates. If chemical weathering of these  
39 minerals has been intensively studied at various scales, the role of vegetation on continental  
40 weathering processes and the contribution of plants to the dissolved load of rivers have been  
41 less investigated. Recent studies have shown that plants may play a non-negligible role in  
42 the biogeochemical cycle of magnesium. Vegetation has been recognized to enhance mineral  
43 weathering rates via biological mechanisms. Laboratory experiments highlight greater  
44 silicate weathering rates in the presence of plants (Hinsinger *et al.*, 1992; 2001; Hinsinger and  
45 Gilkes, 1996; Rufyikiri *et al.*, 2004), in particular in symbiosis with microorganisms (Leyval  
46 and Berthelin, 1991; van Breemen *et al.*, 2000). In the field, estimated chemical weathering  
47 rates can be several times higher in vegetated areas when compared with bare rock zones  
48 (Taylor and Velbel, 1991; Benedetti *et al.*, 1994; Bormann *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998;  
49 Moulton *et al.*, 2000; Andrew *et al.*, 2008). The activity of proton (H<sup>+</sup>) ions located in the  
50 vicinity of the roots (rhizosphere) plays a major role in determining the rate of chemical  
51 weathering (Drever, 1994; Drever and Stilling, 1997; Hinsinger, 2006). Plants release H<sup>+</sup> in  
52 order to compensate for the positive charge excess linked to nutrient uptake (Marschner *et al.*,  
53 1986; Hinsinger, 1998; Haynes, 1990). Associated with CO<sub>2</sub> production by respiration, this  
54 process is expected to be responsible for carbonate as well as silicate mineral dissolution in  
55 soils (Jaillard *et al.*, 1991; Hinsinger *et al.*, 1992; 2001; Hinsinger and Gilkes, 1996; Rufyikiri *et al.*,  
56 2004). During mineral weathering, Mg<sup>2+</sup> is released from minerals to soil solutions where  
57 it can be taken up by roots as (Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>)<sup>2+</sup>. Mg is stored in vegetation over short (month) or  
58 longer (hundreds of years) periods, depending on the species. Magnesium ultimately returns  
59 to soils *via* the litterfall but biomass production may locally influence Mg availability for  
60 secondary mineral formation (Hinsinger *et al.*, 1992; Rufyikiri *et al.*, 2004) and transport to  
61 rivers (Prokrovsky *et al.*, 2005; Zakharova *et al.*, 2007). The role of vegetation on the Mg river  
62 flux has been documented only in boreal regions and it has been estimated that, in these  
63 regions, plants can represent an important source of dissolved Mg in surface waters through  
64 litter degradation (10-40%, Zakharova *et al.*, 2007).

65

66 Excluding H, C and O, magnesium is the fourth most abundant element in plants, after  
67 N, K and Ca (Epstein and Bloom, 2005). Magnesium is an essential nutrient for plant growth  
68 as it helps activate more than 300 enzymes and to synthesize organic molecules required by  
69 plants for growing (Wilkinson *et al.*, 1990; Fraùto Da Silva and Williams, 2007). A

70 fundamental biological function of Mg relies in its role in chlorophyll molecules in which it is  
71 the central ion. Chlorophyll, located in the leaves of most plants or in cells of green algae and  
72 cyanobacteria, is responsible for the absorption of light during photosynthesis. During  
73 chlorophyll synthesis, Mg ions are actively inserted into the chlorine ring through a chelatase  
74 enzyme action (Papenbrock *et al.*, 2000; Willows, 2007).

75  
76 Magnesium isotopes are a promising tool that could help to better constrain the role of  
77 the biomass on the Mg cycle. Magnesium has three stable and light isotopes ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  and  
78  $^{26}\text{Mg}$ ), which fractionate during low temperature processes (e.g. Galy *et al.*, 2001). Terrestrial  
79 samples define a range of  $\sim 5\text{‰}$  for  $\delta^{26}\text{Mg}$ , where  $\delta^{26}\text{Mg} = \left( \frac{^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}}{(^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg})_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 10^3$ . Recently, the behaviour of Mg isotopes has been investigated on a catchment scale  
80 (de Villiers *et al.*, 2005; Tipper *et al.*, 2006a and b; 2008; Brenot *et al.*, 2008; Pogge von  
81 Strandmann *et al.*, 2008) and during biologically mediated processes (Chang *et al.*, 2004;  
82 Black *et al.*, 2006; Ra and Kitagawa, 2007; Black *et al.*, 2008). Tipper *et al.* (2006a, 2006b and  
83 2008) and Brenot *et al.* (2008) have shown that the Mg isotope signatures of rivers draining  
84 silicate rocks are potentially related to processes associated with weathering such as mineral  
85 leaching and/or clay mineral formation. Silicate soils are enriched in heavy isotopes ( $\delta^{26}\text{Mg} =$   
86  $-0.03\text{‰}$ ) relative to the continental crust ( $\delta^{26}\text{Mg} = -0.48\text{‰}$ ) while corresponding surface  
87 waters are enriched in light isotopes ( $\delta^{26}\text{Mg} = -3.87$  to  $-0.7\text{‰}$ ). In contrast, Pogge von  
88 Strandmann *et al.* (2008) observed no systematic differences between the Mg isotope  
89 composition of soils, waters or unweathered rocks in a basaltic catchment. To date, the  
90 effects of plant growth on river  $\delta^{26}\text{Mg}$  signatures have not been studied.

91  
92  
93 Until now, only three  $\delta^{26}\text{Mg}$  data for natural plants (sea lettuce, hair grass and lichen)  
94 and organic matter (rye flour) are available (Bolou-Bi *et al.*, 2009). Plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  fall in the  
95 range defined by chlorophylls ( $-3.55\text{‰}$  to  $0.09\text{‰}$ ) (Young and Galy, 2004; Black *et al.* 2006, Ra  
96 and Kitagawa, 2007, Black *et al.*, 2008). It has been shown that the biological process linked to  
97 the incorporation of Mg into the chlorophyll molecule induces Mg isotope fractionation.  
98 However, the sense of this fractionation is matter of debate. Black *et al.* (2006; 2008) found  
99 that chlorophyll molecules are depleted in heavy Mg isotopes relative to the growth medium  
100 ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{chlorophyll-nutrient}} = -0.71\text{‰}$  for experimentally grown cyanobacteria chlorophyll, and  
101  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{chlorophyll-nutrient}} = -0.47\text{‰}$  for experimentally grown wheat). In contrast, Ra and Kitagawa  
102 (2007) observed that the chlorophyll molecules of marine red algae are enriched in the heavy  
103 isotope ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{chlorophyll-seawater}} = 0.58\text{‰}$  and  $0.74\text{‰}$  for chlorophyll a and chlorophyll b  
104 respectively). Compared to the leaves from which they were extracted, chlorophyll can also  
105 be either isotopically heavier (English ivy, Black *et al.*, 2007), or lighter (for wheat, Black *et al.*,  
106 2008). In leaves, the fraction of chlorophyll Mg ranges between 10% and 25% (Marschner,  
107 1986). Therefore, most of the leaf Mg is involved in other physiological reactions such as

108 protein synthesis and enzyme activation (as Mg-ATP complex), or is present as free Mg<sup>2+</sup> in  
109 cell solutions (Kirkby and Mengel, 1976; Marschner, 1986; Wilkinson *et al.*, 1990; Shaul, 2002).  
110 Parameters such as plant species, environmental conditions and Mg availability in soils have  
111 an impact on the uptake, transport and utilization of Mg within plants (Scott and Robson,  
112 1990 and 1991; Erikson and Kähr, 1995; Courtois *et al.*, 2003; Hermans and Verbruggen, 2005).  
113 These parameters can be explored in order to determine and better understand chlorophyll  
114 and plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  signatures.

115

116 This study investigates Mg isotope fractionation during Mg uptake by roots and Mg  
117 transfer and translocation in higher plants. For this, two plant species were grown under  
118 laboratory conditions with two different levels of Mg bioavailability: (1) in hydroponic  
119 conditions and (2) on a mineral substrate not easily weatherable (phlogopite). Simple  
120 experiments using aliquots of dead and fresh roots were also performed in order to better  
121 determine the role of adsorption on root surfaces. The corresponding isotope fractionations  
122 are estimated and the implications for the Mg biogeochemical cycle are discussed.

123

124

## 2. MATERIALS AND METHODS

125

### 2.1. Plants, material and growth conditions

126

127  
128 We performed several experiments with rye grass (*Lolium multiflorum*) and clover  
129 (*Trifolium repens*) each grown on two different types of Mg source. These two species were  
130 chosen due to their adventitious root architecture that allows rapid growth and favours  
131 nutrient uptake under laboratory conditions (Kirchmann, 1965). Rye grass is a  
132 monocotyledon species widely grazed or cropped as a forage crop in association with clover,  
133 a dicotyledonous species from temperate regions (Hall, 1992; Høgh-Jensen and Schjoerring,  
134 1997; Peoples *et al.*, 1998).

135

136 Commercial seeds of rye grass and clover were first surface sterilized with 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
137 and then germinated on a silicon filter paper soaked with Milli-Q water. Six days later,  
138 plantlets were transferred in the cropping devices (Figure 1 A, B). Magnesium was supplied  
139 either as MgSO<sub>4</sub> salt dissolved in distilled water, or as a mineral substrate (1-50 $\mu\text{m}$   
140 phlogopite powder). Magnesium was systematically supplied in excess relative to the Mg  
141 amount required by the plants for growth. Plants were grown for 55 days, which  
142 corresponds to the end of bolting stage for rye grass and the start of flower bud formation for  
143 clover. During these growth periods, no leaves fell. All plant cultures were carried out in a



144 culture chamber at 24/20 °C during 16/8 h day/night cycles with an additional illumination of  
145 420  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 70% relative humidity during the day.

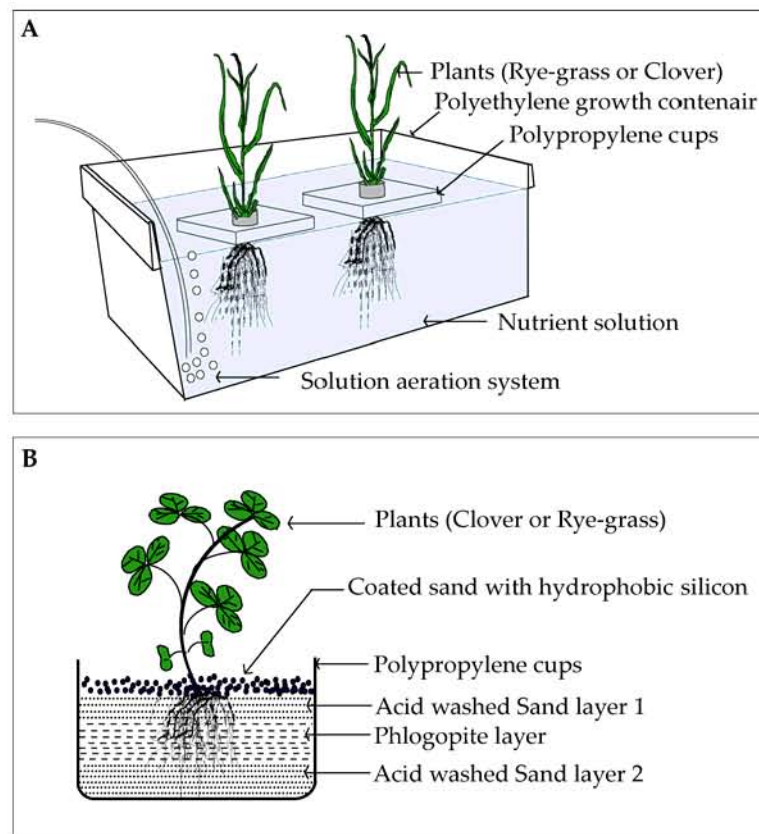
146

### 147 2.1.1. Hydroponic cultures

148

149 Thirty plantlets of rye grass and 20 plantlets of clover were transferred into small  
150 polypropylene cups (Figure 1A). Each cup was placed into a high-density polyethylene  
151 container (40 cm large, 60 cm long and 20 cm high) similar to the device developed by  
152 Chaignon and Hinsinger (2003). Macronutrient compositions were (in mM): 2  $\text{KNO}_3$ , 2  
153  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1  $\text{MgSO}_4$ , 0.5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and micronutrients were (in  $\mu\text{M}$ ): 0.1  $\text{FeNaEDTA}$ , 10  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
154 2  $\text{MnCl}_2$ , 1  $\text{ZnSO}_4$ , 0.05  $\text{NaMoO}_4$ , 0.2  $\text{CuCl}_2$ . The solution pH was checked daily and adjusted  
155 if necessary to  $6 \pm 0.3$ , using  $\text{NaOH}$  (0.1M). Nutrient solution was completely changed, using  
156 the same initial solution stock on the 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup> and 42<sup>nd</sup> days after plantlet transplantation  
157 in order that the Mg content of the nutritive solution did not vary by more than 10%. Fifty-  
158 five days after seed sowing, plants were harvested and separated into shoots (leaves and  
159 stem for clover) and roots.

160



161

162

163 **Figure 1.** Schematic diagram of experimental cropping devices used for rye grass and clover growths:  
164 (A) the hydroponic culture and (B) the culture on phlogopite. Mg is supplied either as a  $\text{MgSO}_4$  salt  
165 dissolved in a continuously aerated solution, or as a phlogopite powder (see text for more details).

166 Roots were washed twice with deionised water. An aliquot of roots harvested from a  
167 few growth-cups was immersed into a 0.01M CaCl<sub>2</sub> solution for 30 min in order to collect  
168 surface-bound Mg. The desorbed solutions were then filtered at 0.20µm and stored at 4°C  
169 until chemical analyses. Bulk roots and shoots were all oven-dried at 60 °C during 48h.

170

### 171 *2.1.2. Mineral cultures*

172

173 A trioctahedral mica, a phlogopite from Madagascar (Vohitrosy), was chosen as the  
174 source of both Mg and Fe in this second set of experiments. The chemical composition of  
175 phlogopite is (in g.kg<sup>-1</sup>): 390 SiO<sub>2</sub>, 150 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 52 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.9 MnO, 2.5 CaO, 294 MgO, 110 K<sub>2</sub>O,  
176 11.3 TiO<sub>2</sub>, 1.3 NaO, and 1.1 P<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Leyval and Berthelin, 1991). Phlogopite grains were  
177 ground, sieved (1-50µm) and washed with distilled water. The phlogopite powder was  
178 inserted between two sand layers and seedlings were planted above these layers (Figure 1B).  
179 Each cropping device contained 200g of sand and 50g of phlogopite. In order to avoid any  
180 mousse and algae proliferation, a fine layer of sand coated with hydrophobic silicon  
181 (Rhodorsil®) covered the sand-phlogopite layers. Thirty rye grass seedlings and 10 clover  
182 seedlings were grown per device. Plants were daily watered with a nutrient solution (the  
183 same as described in section 2.1.1 but free of Mg and Fe). The moisture in the medium was  
184 monitored and maintained at 70% of water content. At day 55 of growth, plants were  
185 harvested and separated into leaves, stems and roots. Roots were washed ultrasonically with  
186 distilled water in order to remove fine phlogopite particles.

187

188 After plant harvest, distilled water was added to the top of the cropping device in  
189 order to collect the lixiviated solutions by simple flow. The corresponding solutions were  
190 filtered at 0.20µm, acidified and stored at 4°C. All plant parts were oven-dried at 60°C  
191 during 48h and then reduced to fine particles by crushing.

192

### 193 *2.1.3. Root immersion in pure Mg solution*

194

195 Thirty-five day-old fresh roots of hydroponically grown rye grass were collected for  
196 immersion experiments. Roots were first washed with Milli-Q H<sub>2</sub>O, cut and leached with  
197 0.05M HNO<sub>3</sub> for 20 min in order to exchange the cations adsorbed on the root acidic groups  
198 using protons. The excess acid solution was removed by rinsing roots several times with  
199 Milli-Q H<sub>2</sub>O until a constant pH was reached (Rufyikiri et al., 2002). Major element  
200 concentrations including Mg were measured before and after this HNO<sub>3</sub> pre-leaching in  
201 order to estimate the root cation exchange capacity (RCEC). Roots were then cut every 2 cm,  
202 and aliquots of a few grams were dried at 60°C. About 1g of fresh roots (living root) and dry

203 roots (dead roots) were immersed and agitated in 20 ml of pure Mg solution (1ppm Mg) for  
204 1, 5, 10, 30, 60 and 80 min. The corresponding residual solutions were collected by  
205 centrifugation, filtered at 0.20µm and stored at 4°C for chemical analysis.

206

## 207 **2.2. Chemical analysis and Mg isotope measurements**

208

209 About 200 mg of powdered plant was digested in a microwave (Mars 5<sup>®</sup>, CEM  
210 Corporation) at LIMOS laboratory (Nancy) in a HNO<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mixture (4:2 ml:ml). The  
211 digested samples were then diluted to 25 ml using Milli-Q water. Major and trace  
212 concentrations were determined using an ICP-EAS spectrometer at the SARM (French  
213 National Analytical Facility, Nancy).

214

215 Prior to isotope composition measurements, Mg was separated from the sample matrix  
216 and purified according to the procedure described in Bolou-Bi *et al.* (2009). Briefly, purified  
217 Mg (~50µg) fractions were obtained by ion-chromatography using Bio-rad AGMP1M X8  
218 anion exchange and AG50W X12 cation exchange resins. Samples were then diluted with  
219 0.05N HNO<sub>3</sub> (at 200-250 ppb Mg) before introduction in the mass spectrometer, a *Nu*  
220 *Instruments* MC-ICP-MS based at the "Ecole Normale Supérieure" (ENS, Lyon, France). Mg  
221 isotope ratios were measured relative to the NIST-SRM980<sub>CRPG</sub> standard solution using the  
222 standard-sample bracketing technique in order to correct for instrumental mass bias. All  
223 results were then normalised to the international DSM3 Mg standard (Galy *et al.* 2003). Data  
224 are expressed in δ notation as the part per thousand (‰) deviation from DSM3 composition:  
225  $\delta^x\text{Mg} (\text{‰}) = \{({}^x\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{sample}}/({}^x\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{DSM3}} - 1\} \times 1000$  where *x* is either mass 26 or 25. The  
226 accuracy of the technique was assessed using a series of reference materials (Bolou Bi *et al.*,  
227 2009). The long-term reproducibility of Mg isotope ratios was estimated by repeat  
228 measurements of Cambridge-1 Mg standards (Table 1). Four total procedure blanks were  
229 measured and correspond to ~0.04% maximum contribution to the sample Mg.

230

231

## 3. RESULTS

232

### 3.1. Plant growth and magnesium concentration

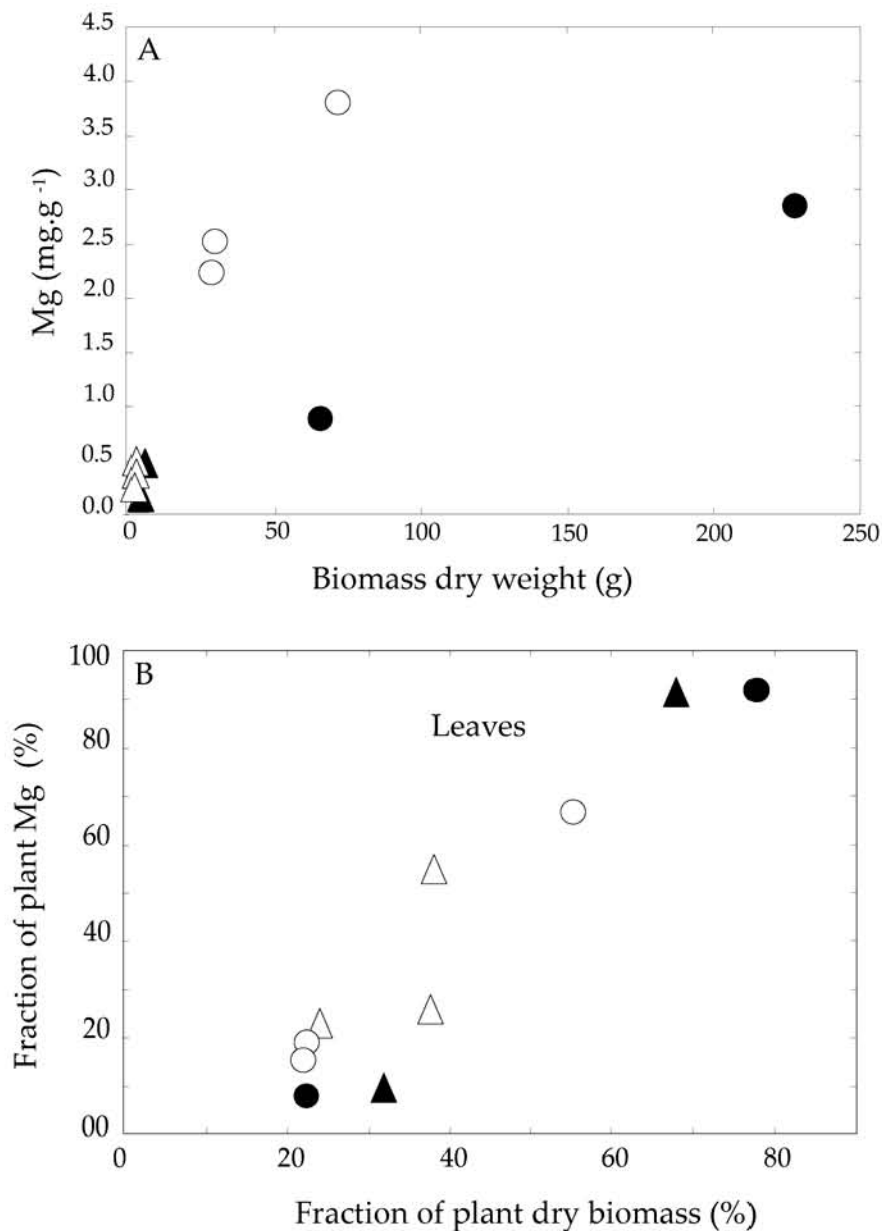
233

234 After 55 days of cropping, the collected rye grass biomass reached 6.1 g and 292.5 g for  
235 the phlogopite and hydroponic cultures respectively. The clover biomass is systematically  
236 lower (2.8 g and 130.2 g for phlogopite and hydroponic cultures respectively) (Table 1).  
237 Phlogopite substrate cultures led to biomasses significantly lower when compared with  
238 hydroponic

		Biomass (g)	Biomass (%)	K (mg.g <sup>-1</sup> ) or mg.l <sup>-1</sup>	Mg (mg.g <sup>-1</sup> ) or mg.l <sup>-1</sup>	Mg (%)	$\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰)	2SD	$\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰)	2SD	$\Delta^{25}\text{Mg}'$	N(n)
<i>Standard</i>	DSM3	-	-	-	-	-	0.01	0.14	0.00	0.09	-0.002	12
<i>Standard</i>	Cambridge	-	-	-	-	-	-2.71	0.18	-1.39	0.08	0.017	7
<i>Mineral culture</i>												
Phlogopite		-	-	-	-	-	-1.22	0.24	-0.64	0.20	-0.003	10(21)
Rye grass	Shoot	4.18	68.1	3.09	0.43	90.8	-0.56	0.14	-0.28	0.07	0.013	1(3)
	Root	1.95	31.9	2.64	0.09	9.2	0.09	0.14	0.05	0.07	0.001	1(2)
	Bulk plant	6.14	100.0	2.95	0.33	100	-0.50	0.14	-0.25		0.012	
	Lixiviated solution	-	-	50.83	4.22	-	-1.37	0.14	-0.69	0.07	0.023	1(1)
Clover	Leaf	1.07	38.21	3.18	0.49	53.48	-0.31	0.14	-0.16	0.07	0.007	1(2)
	Stem	0.67	24.1	5.02	0.32	22.0	-0.08	0.14	-0.04	0.07	0.005	1(2)
	Root	1.05	37.8	4.42	0.23	24.5	0.03	0.14	0.04	0.07	0.022	1(2)
	Bulk plant	2.79	100.0	4.1	0.35	100	-0.18		-0.08		0.010	
	Lixiviated solution	-	-	91.87	22.84	-	-1.39	0.14	-0.73	0.07	-0.002	1(1)
<i>Hydroponic culture</i>												
Nutrient solution		-	-	-	-	-	-0.97	0.19	-0.51	0.10	-0.008	4(6)
Rye grass	Shoot	227.40	77.7	4.96	2.83	92.1	-0.72	0.14	-0.36	0.07	0.015	1(2)
	Root	65.10	22.3	2.07	0.84	7.9	-0.66	0.14	-0.34	0.07	0.004	1(2)
	Bulk plant	292.50	100.0	4.32	2.39	100	-0.71	-	-0.36	-	0.015	
	Desorbed Mg	-	-	51.71	5.35		-0.28	0.14	-0.15	0.07	-0.001	1(2)
Clover	Leaf	72.03	55.3	6.78	3.86	66.7	-0.61	0.14	-0.31	0.07	0.005	1(2)
	Stem	28.81	22.1	5.62	2.23	15.4	-0.55	0.14	-0.29	0.07	-0.008	1(2)
	Root	29.39	22.6	3.75	2.53	17.9	-0.39	0.14	-0.19	0.07	0.015	1(2)
	Bulk plant	130.23	100.0	5.84	3.20	100	-0.56	-	-0.29	-	0.005	
	Desorbed Mg	-	-	24.60	6.70	-	-0.44	0.14	-0.22	0.07	0.009	1(2)

239 **Table 1.** Plant total biomasses (g), Mg concentrations (mg.g<sup>-1</sup>), Mg distributions (%) and Mg isotope compositions ( $\delta^{26}\text{Mg}$ ) of the various rye grass and clover parts. Calculated values  
240 for bulk plants are also given. N represents the number of separate column chemistry and (n) represents separate standard-bracketed replicates using MC ICP-MS. Cambridge 1 mean  
241  $\delta^{26}\text{Mg}$  are comparable to published values (Galy *et al.*, 2003; Tipper *et al.*, 2006a; Black *et al.*, 2006; Bolou-Bi *et al.*, 2009).  $\Delta^{25}\text{Mg}'$  was calculated according to Young and Galy (2004):  
242  $\Delta^{25}\text{Mg}' = \delta^{25}\text{Mg}' - 0.521\delta^{26}\text{Mg}'$ . DSM3 values relative to SRM<sub>CRPG</sub> are  $\delta^{26}\text{Mg} = 3.97 \pm 0.14\text{‰}$  and  $\delta^{25}\text{Mg} = 2.04 \pm 0.09\text{‰}$ .

243 cultures (Fig. 2A). This can be explained by the full bioavailability of Mg, Fe and K, in the  
 244 case of the hydroponic cultures, while phlogopite needs to be significantly weathered in  
 245 order to release sufficient Mg and Fe for the plant growth. This difference in Mg bioavailability  
 246 is also highlighted by the presence of interveinal chlorosis in leaves, typical of Mg deficiency  
 247 symptoms. In adaptation to this nutrient deficiency, plant response resulted in decreasing  
 248 shoot growth and increasing root growth in order to favour nutrient uptake. The root-shoot  
 249 biomass ratios of plants grown on phlogopite are indeed higher (0.5 and 0.6 for rye grass and  
 250 clover) when compared with hydroponically grown plants (0.3 for both species) (Table 2).  
 251



252  
 253  
 254 **Figure 2. (A)** Biomass dry weight (g) versus Mg concentration (mg.g<sup>-1</sup>) for all experiments. **(B)** Fraction  
 255 of plant Mg versus the fraction of plant biomass for the various organs of rye grass (filled symbols)  
 256 and clover (open symbols). Triangles correspond to plants grown on phlogopite and circles are the  
 257 hydroponic cultures. Literature data are also shown (grey ellipse).

258 This effect has previously been reported for experimentally grown plants (Hinsinger and  
259 Gilkes, 1996; Hermans and Verbruggen, 2005; Ding *et al.*, 2006). However, for both cultures,  
260 shoots represent the main part of the biomass (generally >60%, Fig. 2B), in agreement with  
261 published observations (Hinsinger and Gilkes, 1996; Belastegui-Macadam *et al.*, 2007).

262

263 Magnesium concentrations for rye grass shoots and roots and for clover leaves, stems  
264 and roots are reported as dry weights (DW) in Table 1. Concerning the rye grass grown on  
265 phlogopite, magnesium concentrations were 0.43 mg.g<sup>-1</sup> and 0.10 mg.g<sup>-1</sup> DW for shoots and  
266 roots respectively (Table 1). For clover, Mg concentrations were 0.49 mg.g<sup>-1</sup>, 0.32 mg.g<sup>-1</sup>, 0.23  
267 mg.g<sup>-1</sup> DW for leaves, stem and roots respectively. Hydroponic rye grass display Mg  
268 contents of 2.83 mg.g<sup>-1</sup> and 0.84 mg.g<sup>-1</sup> DW for shoots and roots respectively. Magnesium  
269 contents in clover were 3.86 mg.g<sup>-1</sup>, 2.23 mg.g<sup>-1</sup>, 2.53 mg.g<sup>-1</sup> DW for leaves, stem and roots  
270 respectively. Magnesium contents measured in rye grass were significantly lower than those  
271 of the clovers (Fig. 2A). In general, dicotyledonous species (e.g. clover or bean) display  
272 greater Mg concentrations than for monocotyledon species (e.g. rye grass or wheat)  
273 (Hinsinger and Gilkes, 1996; Courtois *et al.*, 2003; Belastegui-Macadam *et al.*, 2007). This  
274 difference is explained by higher root cation exchange capacity of the dicotyledonous  
275 species, inducing greater uptake of divalent cations (Mg, Ca) (Wacquant, 1974; Woodward *et*  
276 *al.*, 1984; Wilkinson *et al.*, 1990, Keltjens and Tan, 1993).

277

278 It has been estimated that the optimal Mg content in plant tissues is ~2 mg g<sup>-1</sup> DW  
279 (Epstein and Bloom, 2005). Leaf and bulk plant Mg contents of rye grass and clover grown  
280 on phlogopite are significantly lower than this value (< 0.5 mg.g<sup>-1</sup> DW). Associated with the  
281 lower corresponding biomasses, this is likely to be the consequence of a Mg-deficient  
282 environment. In contrast, leaves of hydroponic plants exhibit higher Mg contents (2.83 mg.g<sup>-1</sup>  
283 and 3.86 mg.g<sup>-1</sup> DW). In all experiments, most of the Mg has been transferred in the shoots  
284 (leaf + stem) (91% and 92% for the rye grass and 75% and 82% for clover, see Fig. 2B), as is  
285 often the case for these species (Belastegui-Macadam *et al.*, 2007; Scott and Robson, 1990), as  
286 well as for tall fescue (Shewmaker *et al.*, 2008) and wheat (Scott and Robson, 1991). We have  
287 also estimated that seeds represent a maximum contribution of 0.1% of the bulk plant Mg  
288 (not shown here).

289

290

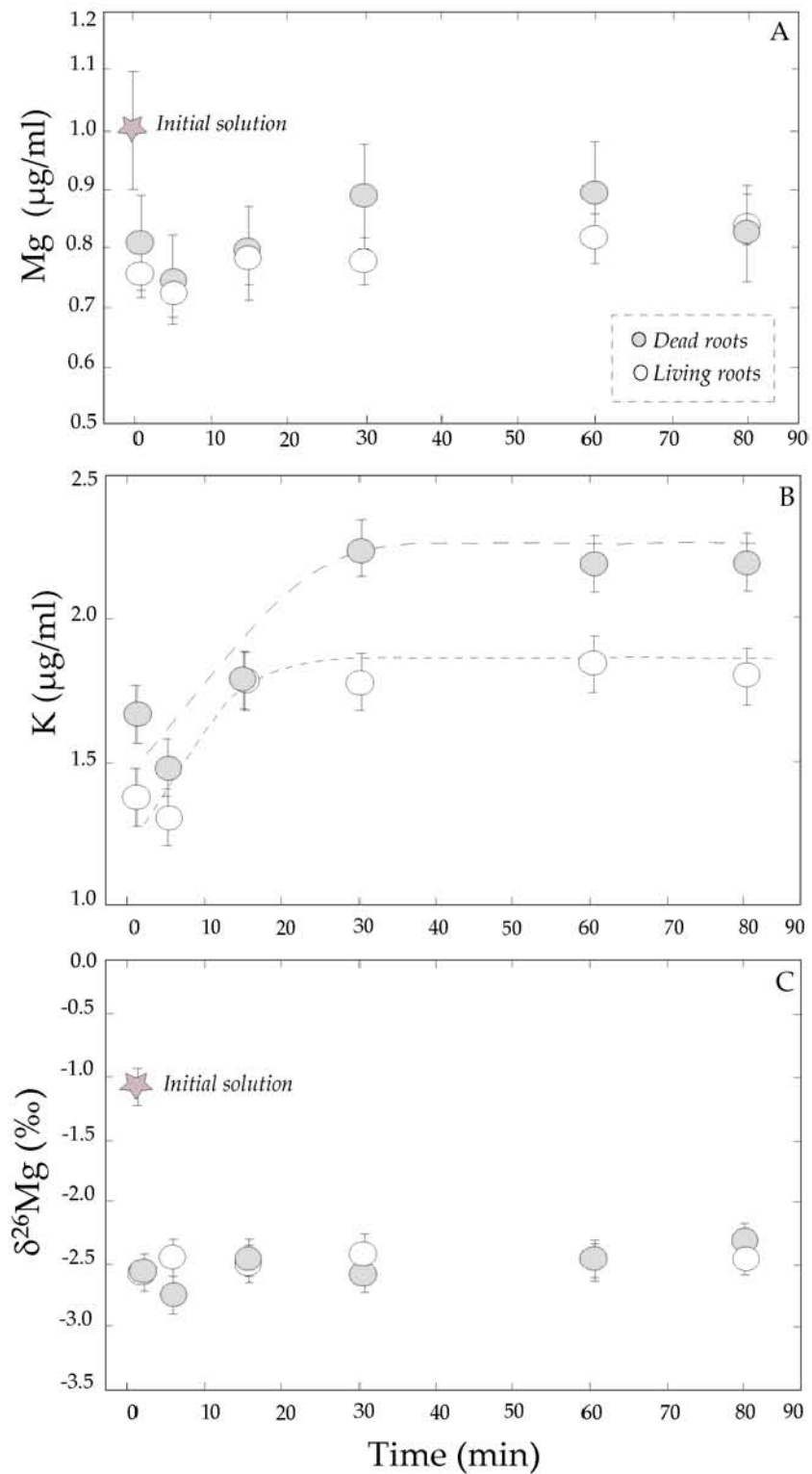
291

292

293

294

295  
296



297  
298

299 **Figure 3.** Magnesium (A), potassium (B), and  $\delta^{26}\text{Mg}$  (C) measured in the solutions used for the dead  
300 and living root immersion experiments, as a function of time. Dead roots were dried for 48h. The  
301 initial solution was a pure Mg solution (no K).  
302

303 During the dead and living root immersion experiments, solution Mg contents decrease  
304 during the first minute and then remain roughly constant until the end of the experiment  
305 (Table 3, Fig. 3). It can be calculated that living and dead roots retain on average ~22% and  
306 ~17% of the solution Mg (Fig. 3A), representing only 15 % and 12 % of their respective Mg  
307 exchange capacities, estimated independently (Table 3). CaCl<sub>2</sub> desorption experiments led to  
308 a Mg exchange capacity of the rye grass roots of 2µeq/g. For comparison, the rye grass root  
309 HNO<sub>3</sub> pre-leaching led to a value of 2.4µeq/g (Table 3). The constancy of solution Mg content  
310 indicates that a certain level of saturation was rapidly attained. This may correspond to the  
311 saturation of only a small fraction of the root ion exchange sites (Helmi and Elgabal, 1958;  
312 Wacquant, 1974; Amory and Dufey, 1984; Dufey *et al.*, 1985). The relatively good  
313 reproducibility of the results between both experiments raises the question if excised (living)  
314 roots behave differently than dead (dried) roots. First, several studies report an increase of O<sub>2</sub>  
315 consumption and CO<sub>2</sub> production by roots during the 10h to 24h after their excision (Moore  
316 *et al.*, 1961; Leggett and Gilbert, 1967 and 1969; Saglio and Pradet, 1980; Schumacher and  
317 Smucker, 1985). Additionally, the activity of living roots can be checked by following the  
318 potassium concentration in solution. As shown in Fig. 3B, the equilibrium K concentration is  
319 lower for the experiments using the living roots. This is compatible with a metabolic activity  
320 of the living roots since it can be explained by K reabsorption by living roots, taking place  
321 only through an active inward transport that requires metabolic energy (see Mengel and  
322 Pflüger, 1972; Poole, 1969 and 1971). We can therefore reasonably assume that living roots  
323 remain biologically active during the whole experiment (80 min).

324

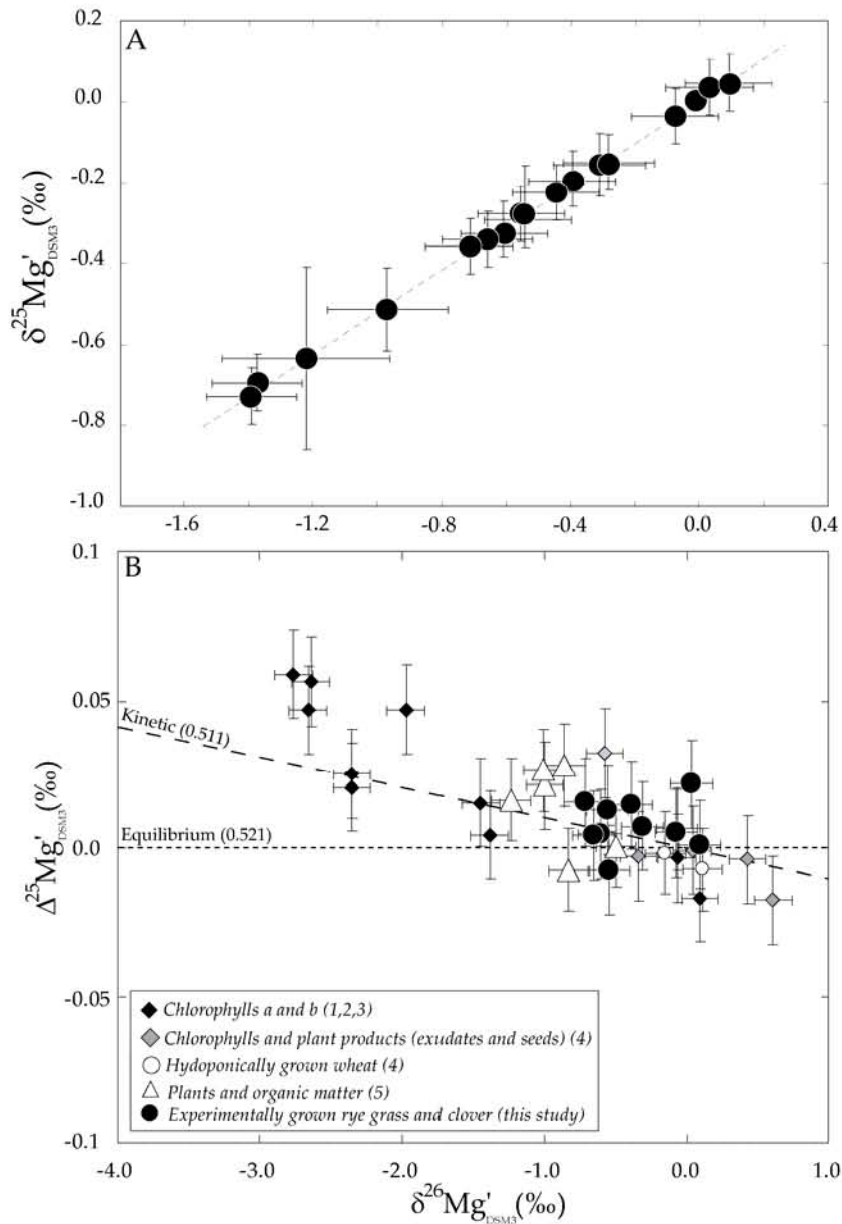
### 325 **3.2 Mg isotope compositions**

326

327 All samples analysed in this study define a mass-dependent fractionation line in a  
328  $\delta^{26}\text{Mg}'$  versus  $\delta^{25}\text{Mg}'$  diagram (Fig. 4A) (Young and Galy (2004)). The slope of this line is  
329  $0.5181 \pm 0.0033$  when including DSM3 and Cambridge standards. This value is statistically  
330 similar to the average slope of terrestrial materials ( $0.516 \pm 0.0005$  and  $0.5163 \pm 0.0004$ ) (Young  
331 and Galy, 2004; Pearson *et al.*, 2005). When plotting the data in a  $\Delta^{25}\text{Mg}'$  ( $\Delta^{25}\text{Mg}' = \delta^{25}\text{Mg}' -$   
332  $0.521 \delta^{26}\text{Mg}'$ ) versus  $\delta^{25}\text{Mg}'$  or  $\delta^{26}\text{Mg}'$  ( $\delta^x\text{Mg}' = 10^3 \times \ln((\delta^x\text{Mg} + 10^3)/10^3)$ ) diagram, it is possible  
333 to amplify the small differences in  $\beta$  values ( $\beta = \ln(\alpha_{25/24})/\ln(\alpha_{26/24})$ ) among the samples, and  
334 potentially distinguish between kinetic and equilibrium isotope fractionation (Young and  
335 Galy, 2004). We report all our data in such a diagram as well as other data available for  
336 organic matter (Black *et al.*, 2008; Bolou Bi *et al.*, 2009) (Fig. 4B). Magnesium incorporation  
337 into chlorophyll molecules, seeds, flour and exudates seem to follow a kinetic process, since  
338 they all align along the kinetic fractionation line ( $\beta = 0.511$ ). Bulk natural and experimental  
339 plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  are all close to 0‰, where both lines intercept, and it is therefore difficult to



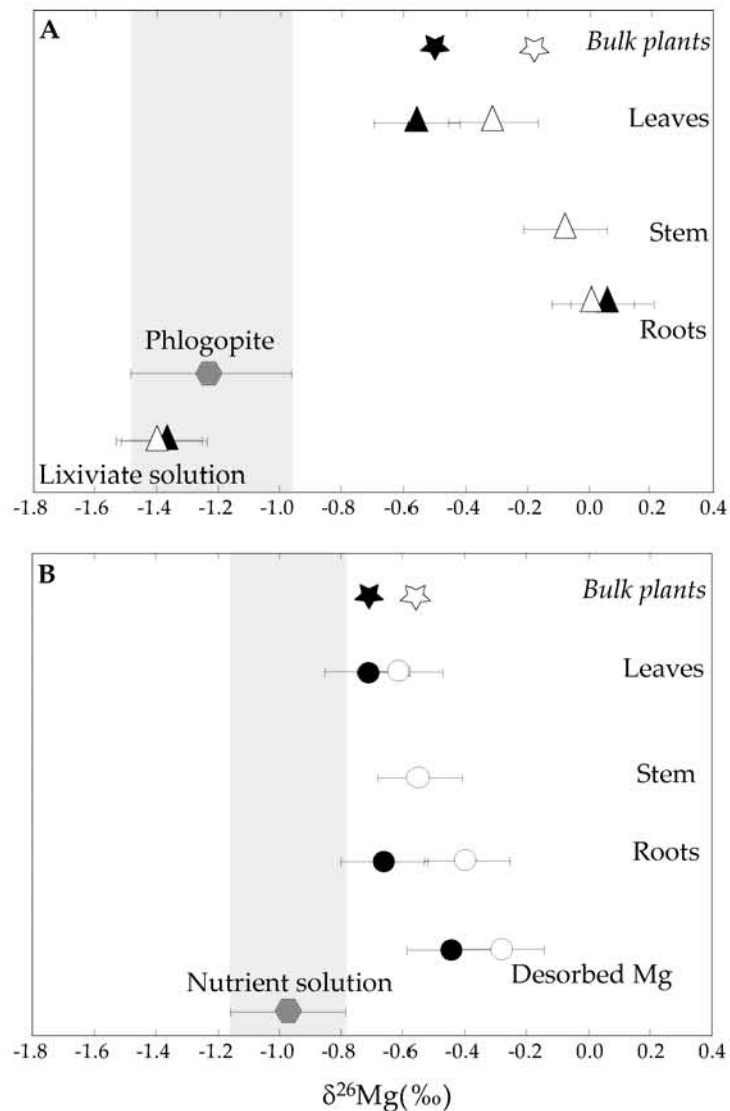
340 distinguish which process dominated during their development. Bulk plant values are,  
 341 however, compatible with the trend defined by the other organic matter samples.  
 342



343  
 344  
 345 **Figure 4. (A)** Mg isotope composition of all the samples analysed in this study, plotted in a  $\delta^{26}\text{Mg}'$   
 346 versus  $\delta^{25}\text{Mg}'$  three isotope plot, as defined in Young and Galy (2004). Error bars are 2SD. **(B)**  $\Delta^1\text{-}\delta'$   
 347 diagram for plant data obtained in this study (filled circles) and for published data (1: Young and  
 348 Galy, 2004; 2: Ra an Kitagawa, 2007; 3: Black *et al.*, 2006; 4: Black *et al.*, 2008; 5: Bolou-Bi *et al.*, 2009).  
 349

350 Phlogopite  $\delta^{26}\text{Mg}$  is  $-1.22 \pm 0.24\text{‰}$  ( $2\sigma$ ,  $n = 10$ ). The corresponding standard deviation is  
 351 slightly higher than our usual reproducibility and may be explained by some isotope  
 352 heterogeneity among or within grains. Roots display  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $0.09 \pm 0.14\text{‰}$  and  
 353  $0.03 \pm 0.14\text{‰}$  for the rye grass and the clover respectively (Fig. 5A), which is significantly

354 higher than the phlogopite  $\delta^{26}\text{Mg}$  value. In contrast, lixiviated solutions collected at the end  
 355 of the experiments show a slight depletion in heavy isotopes relative to the mineral, with  
 356  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-1.37\pm 0.14\text{‰}$  and  $-1.39\pm 0.14\text{‰}$  respectively. Leaves of both plant species are  
 357 lighter than roots, with  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  $-0.56\pm 0.14\text{‰}$  for the rye grass, and  $-0.31\pm 0.14\text{‰}$  for the  
 358 clover. The clover stem has a  $\delta^{26}\text{Mg}$  ( $-0.08\pm 0.14\text{‰}$ ) identical, within uncertainty, to that of the  
 359 root ( $0.03\pm 0.14\text{‰}$ ).  
 360



361  
 362 **Figure 5.**  $\delta^{26}\text{Mg}$  of the various parts of the rye grass and clover grown on phlogopite culture (A) and  
 363 hydroponically (B). The corresponding bulk-plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  are also shown (stars), as well as the  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  
 364 the Mg desorbed using  $\text{CaCl}_2$  (see text), and of the lixiviated solutions collected at the end of the  
 365 experiments, as described in section 2.  
 366

367 Plants grown in solutions highlight similar trends (Fig. 5B). The average  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  
 368 the nutritive solutions is  $-0.97\pm 0.19\text{‰}$ . The rye grass and clover roots display higher  $\delta^{26}\text{Mg}$   
 369 values ( $-0.66\pm 0.14\text{‰}$  and  $-0.39\pm 0.14\text{‰}$  respectively). Leaves of both species are isotopically  
 370 slightly lighter than the corresponding roots, with  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-0.72\pm 0.14\text{‰}$  and

371  $-0.61 \pm 0.14\text{‰}$  for the rye grass and clover leaves respectively. The clover stem has a  
372 composition intermediate between roots and leaves ( $-0.55 \pm 0.14\text{‰}$ ). Magnesium desorbed  
373 from roots (using  $\text{CaCl}_2$ ) display  $\delta^{26}\text{Mg}$  heavier than the isotope composition of roots and of  
374 the nutritive solution ( $\delta^{26}\text{Mg} = -0.28 \pm 0.14\text{‰}$  for Mg desorbed from rye grass roots and  
375  $-0.44 \pm 0.14\text{‰}$  from clover roots).

376

377 Bulk plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  have been calculated based on Mg content and  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured for  
378 the various parts of each plant (Table 1). Rye grass and clover grown on phlogopite display  
379  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  $-0.50\text{‰}$  and  $-0.18\text{‰}$  respectively. The same species grown hydroponically display  
380 bulk  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  $-0.71\text{‰}$  and  $-0.56\text{‰}$  respectively. Concerning both root immersion  
381 experiments, the immersion solution starts with an initial  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  $-0.97\text{‰}$ , which  
382 decreases down to  $\sim -2.5\text{‰}$  during the first minute and then remains constant until the end  
383 of the experiments (Fig. 3C).

384

385

#### 4. DISCUSSION

386

387 Overall, these results show that bulk plants are enriched in heavy isotopes relative to  
388 their nutrient source. The  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{plant-source}}$  range from  $0.26\text{‰}$  to  $1.05\text{‰}$  (Table 2). For  
389 comparison, hydroponically grown wheat is also enriched in heavy isotopes, by  $0.28\text{‰}$   
390 relative to the nutrient solution (Black et al., 2008). This fractionation depends both on the  
391 Mg availability of the source and on the plant species. Bulk-plants cropped on phlogopite  
392 lead to Mg isotope fractionations  $\sim 0.3\text{‰}$  higher than hydroponic plants. When considering a  
393 similar substrate, rye grass displays an isotope fractionation of  $0.15\text{--}0.33\text{‰}$  lower than that of  
394 clover. The other characteristic feature is that, from roots to shoots, a slight enrichment in  
395 light isotopes is observed for both species. This enrichment is more pronounced for plants  
396 cultivated on phlogopite with  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{leaves-roots}} = -0.65\text{‰}$  and  $-0.34\text{‰}$  for rye grass and clover  
397 while for hydroponic culture,  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{leaves-roots}} = -0.06\text{‰}$  and  $-0.22\text{‰}$  for rye grass and clover  
398 respectively (Table 2).

399

400 The  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{plant-source}}$  does not correlate with plant Mg content, suggesting that plant isotope  
401 signatures cannot be simply explained by a single process which fractionates Mg isotopes. It  
402 can be observed that the higher the root/shoot biomass ratio, the greater the bulk-plant  
403  $\delta^{26}\text{Mg}$ . This suggests that source Mg availability controls fractionation and indicates that the  
404 key processes responsible for plant enrichment in heavy isotopes are located at root level.  
405 Also, leaves from plants grown on phlogopite exhibit the greatest depletion in heavy  
406 isotopes. This again suggests a role of nutrient bioavailability on the leaf isotope signature.

407

408  
409  
410  
411

Treatments	Root/shoot ratio	Bulk-plant $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰)	$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰) (Plant-Source)	$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰) (Root-Source)	$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰) (Leaf-Source)	$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰) (Leaf-Root)	$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ (‰) (Desorbed Mg-nutrient)
<b>Phlogopite culture</b>							
Rye-grass	0.47	-0.50	0.72	1.31	0.67	-0.65	-
Clover	0.61	-0.18	1.05	1.25	0.91	-0.34	-
<b>Hydroponic culture</b>							
Rye-grass	0.29	-0.71	0.26	0.31	0.25	-0.06	0.70
Clover	0.29	-0.56	0.41	0.58	0.36	-0.22	0.53

412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424

**Table 2.** Mg isotope fractionation between the source and bulk plant, roots, leaves and between roots and leaves or desorbed Mg.

## 425 4.1. Root level processes

426

427 Several studies show that all the Mg taken up by plants was initially physically  
428 adsorbed on the negative charges located on the root surface (Komai, 1962; Wacquant, 1974;  
429 Stok *et al.*, 1981; Kelly and Barber, 1991; Keltjens, 1995). This highlights the main role played  
430 by root cation exchange capacity which can also explain higher magnesium contents in  
431 clover relative to rye grass (see section 3.1).

432

433 Magnesium adsorption on root surfaces may also play a key role in the "heavy" isotope  
434 composition of plants. Both living and dead root immersion experiments and rye grass root  
435 Mg desorption by CaCl<sub>2</sub> highlight significant Mg isotope fractionation in favour of the heavy  
436 isotopes during Mg binding to organic molecules. Mg desorbed from roots leads to  
437  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{desorbed Mg-nutrient}}$  of 0.7‰ and 0.5‰ for rye grass and clover respectively (Table 2, Fig 5B).  
438 The same trend is observed during the root immersion experiments (Table 3, Fig. 3), but with  
439 a much higher estimated  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{adsorbed Mg-solution}}$ . Using simple mass balance,  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of the  
440 Mg bound to roots during the experiment are calculated to be ~4.3‰ and ~6‰ for living and  
441 dead roots respectively. Corresponding Mg isotope fractionations should be ~6‰ and ~8‰  
442 respectively. This is significant when compared with the range of  $\delta^{26}\text{Mg}$  values displayed on  
443 Earth (~5‰, Young *et al.*, 2002). Nevertheless, Kim *et al.* (2001; 2002 and 2003) also  
444 determined large Mg isotope fractionations (from 10‰ to 24‰) during Mg binding to  
445 specific organic molecules (e.g. synthetic pectin). The large difference between  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{adsorbed Mg-}}$   
446  $\text{solution}$  estimations from desorption and from immersion experiments may be due to a  
447 significant contribution from the nutrient solution during the desorption experiment.  
448 However this is not supported by the similar Mg exchange capacity found in both cases (~2.4  
449 and ~2  $\mu\text{eq/g}$  respectively), even if both estimations may not be directly compared. Another  
450 possibility is that some kinetic or reservoir effects may have occurred during root immersion,  
451 making it difficult to quantify Mg isotope fractionation associated with adsorption from a  
452 single experiment. In the case of the root immersion experiment, only a small fraction of the  
453 root ion exchange sites may have been saturated. It has been reported that adsorption is a  
454 function of pH reference. The initial solution pH was relatively low (6.8) and at this pH only  
455 the -COO<sup>-</sup> groups are expected to be saturated (Debbaudt *et al.*, 2004). The phenolic groups  
456 (-NH<sub>2</sub>, -SH, -OH), also present in the pectin of the root walls, will only be saturated at higher  
457 pH (Wacquant, 1974). On the other hand, the Mg desorbed by CaCl<sub>2</sub> may originate from  
458 several types of exchangers. Additionally, some residual calcium still adsorbed on roots, not  
459 extracted by the HNO<sub>3</sub> pre-leaching (Table 3), could also limit the Mg adsorption on roots  
460 (Dufey *et al.*, 1985). Further investigations are needed in order to better constrain the  
461 magnitude of Mg isotope fractionation linked to Mg binding on specific organic molecules

462

463 **Table 3.**  $\delta^{26}\text{Mg}$ , K and Mg contents for the solution used in the root immersion experiment. Major element composition of fresh roots before and  
 464 after the pre-leaching performed with nitric acid is also given (see text for more details).

465

466

Time	-----Fresh roots-----				-----Pre-leached roots-----				-----Solution (dead roots)-----			-----Solution (living roots)-----			
(min)	Na ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	K ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Mg ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Ca ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Na ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	K ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Mg ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Ca ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	K ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Mg ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$\delta^{26}\text{Mg}$ ( $\pm 0.14\%$ )	K ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Mg ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$\delta^{26}\text{Mg}$ ( $\pm 0.14\%$ )	
-	1.87	3.77	1.44	1.23	0.02	0.36	0.06	0.48	-	-	-	-	-	-	
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-0.97	-	1.00	-0.97	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.67	0.81	-2.54	1.38	0.76	-2.55	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	1.48	0.75	-2.73	1.31	0.72	-2.43	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	1.79	0.79	-2.43	1.79	0.78	-2.48	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	2.25	0.89	-2.57	1.78	0.78	-2.4	
60	-	-	-	-	-	-	-	-	2.19	0.89	-2.44	1.85	0.82	-2.47	
80	-	-	-	-	-	-	-	-	2.20	0.83	-2.31	1.80	0.85	-2.43	

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

and study the role of competition between nutrients. Nevertheless, results from all our experiments, suggest that, whatever the species or the media, Mg adsorption lead to an enrichment of heavy isotopes on the root surface.

Bulk rye grass and clover roots collected from hydroponic experiments exhibit isotope compositions which are lighter than the desorbed Mg (Fig. 5B). This difference cannot be fully explained by subtracting the isotopically heavy adsorbed Mg since this adsorbed Mg represents less than 3% of the bulk root Mg (Table 2). This result indicates that Mg uptake by roots occurs through one or more mechanisms which favour the passage of light isotopes. The mechanism of Mg uptake by root is not yet clearly determined. There are two main steps: initially, the Mg ion must traverse the root membrane, followed by a radial movement towards the root centre where stem vessels are localized for cation transport towards the shoots. Several mechanisms have been discussed for Mg transport across a membrane: transport via saturable carrier-proteins, via ion channels and/or ion exchangers, and diffusion (Komai, 1962; Leggett and Gilbert, 1969; Maas and Ogata, 1971; Joseph and Tang, 1976; Macklon and Sim, 1976; Rengel and Robinson, 1989; Rengel, 1990; Mengel *et al.*, 2001; Shaul, 2002). Little is known at this point about the isotope fractionation associated with these mechanisms. Ion channels are not *a priori* expected to fractionate Mg isotopes, and Richter *et al.* (2006) experimentally observed that Mg diffusing in water is not associated with significant isotope fractionation. In contrast, as described above,  $Mg^{2+}$ - $H^+$  ion exchange by organic molecules are expected to be associated with enrichment in heavy isotopes. Without further information, we can therefore assume that the membrane transition is not responsible for the enrichment of roots in light isotopes relative to the adsorbed phase. Subsequently, Mg may reach xylem vessels through two possible pathways (Shaul, 2002): (1) from cell to cell (named the symplasmic pathway, via the cytoplasm) or (2) following an extra-cellular pathway where carboxyl groups act as cation exchangers, similar to external adsorption sites (the apoplasmic pathway, Chamuah and Dey, 1982; Marshner, 1986; Haynes, 1980). Khun *et al.* (2000), using a  $^{25}Mg$  spike, showed that Mg rapidly reaches the root epiderm and endoderm via the apoplasmic route. Then, the presence of Caspary bands located in the endoderm dictates a symplasmic pathway for ions through the stele to the xylem vessels. If the symplasmic pathway is not expected to be associated with significant isotope fractionation, the apoplasmic pathway from the epiderm to the endoderm is likely to result in enrichment in heavy isotopes. To summarize, at our present level of knowledge, it is difficult to explain the light isotope enrichment of roots relative to the adsorbed phase using biological mechanisms, even if we cannot fully exclude them.

In the xylem sap, Mg is carried from roots to shoots as both free  $Mg^{2+}$  ions and bound with various organic anions (Todd, 1961; Kirkby and Mengel, 1976; Bradfield, 1976; Schell, 1997). Casolo *et al.* (1998) indicate that equilibrium between  $Mg^{2+}$  and Mg-organic compounds would be established in the cell cytoplasm. As previously described, Mg bound to organic molecules is expected to be isotopically heavier than  $Mg^{2+}$  in solution (Bigeisen and Mayer, 1947; Chacko *et al.*, 2001; Black *et al.* 2007). If organic compounds are preferentially transported toward shoots, then this effect may partly explain the isotopically lighter root compositions. Mg can also return from leaves to roots (Jeschke and Pate, 1991) and the isotope composition of this magnesium which has undergone several processes in the leaves, as described below, may in some cases also influence the bulk root isotope composition.

## 4.2 Shoot level processes

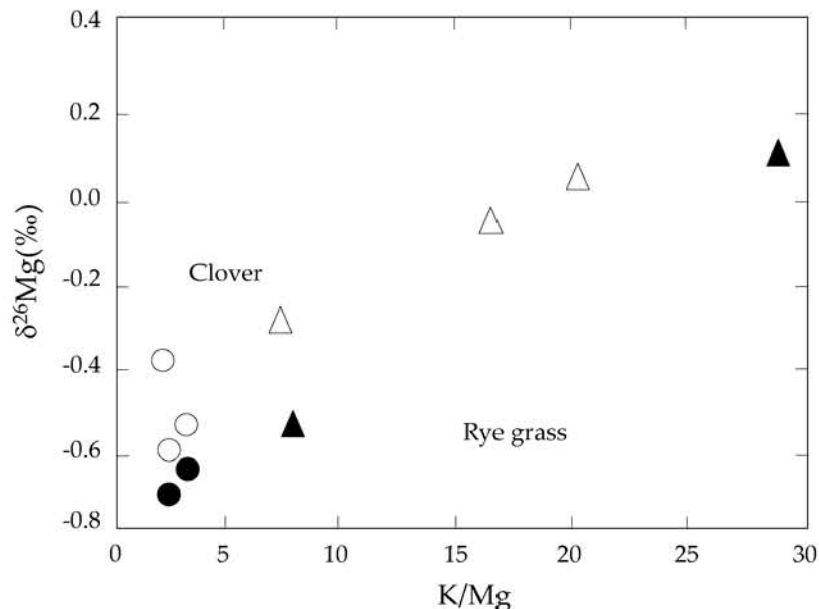
Chlorophyll molecules are synthesized in leaves and this process is associated with Mg isotope fractionation, although there is no consensus about the sense of this fractionation (Black *et al.*, 2006; 2007; Ra and Kitagawa, 2007; Black *et al.*, 2008). It is possible that, as suggested by Black *et al.* (2006), insertion of Mg in the centre of the chlorophyll molecule is associated with enrichment in light isotopes. This seems in contradiction with Mg binding to other organic molecules, during adsorption processes for example, but binding energies are different and both reactions may not be directly comparable. Another possibility is that, as described in the previous section, the preferential transportation of  $Mg^{2+}$  ions from roots to leaves results in a lighter composition of leaves relative to roots. Consequently, chlorophyll formed in leaves may be lighter than roots or bulk plant even if its their formation process in leaves is associated with an enrichment in heavy isotopes. In leaves, the fraction of chlorophyll Mg is relatively small (10 - 25%, Marschner, 1986), and its isotope composition has little influence on the leaf isotope composition.

Once chlorophyll molecules are formed, part of the remaining Mg may be implied in the synthesis of other organic compounds such as Mg-ATP, citrate and malate (Kirkby and Mengel, 1976). Several studies show that these organo-magnesium compounds can be translocated (transported) from older to younger tissues (leaves, roots) and to reproductive organs (seeds, fruits). In contrast with calcium, magnesium is a mobile element in the phloem sap, the second type of vascular plant vessel by which organic nutrients are carried from leaves towards storage organs (e.g. Steucek and Koontz, 1970; Jeschke and Pate, 1991; Zhong *et al.*, 1993; Feger *et al.*, 1997). The preferential transport of these organic compounds



from leaves to other organs may also participate to the heavy isotope depletion seen in the leaves.

$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{leaf-root}}$  are greater for plants grown on phlogopite (-0.65 and -0.34‰ versus -0.06 and -0.22‰ for hydroponic species, Table 2). Plants grown on phlogopite also display higher K/Mg ratios, and this likely reflects high K/Mg in the lixiviated solutions (see section 3). As shown in Fig. 6,  $\delta^{26}\text{Mg}$  correlates positively with K/Mg, suggesting potassium plays a key role in the Mg plant internal cycle. Potassium within plants is not bound with organic molecules and is mainly used for cell pH regulation. Magnesium in contrast is used by plants for both cell pH regulation and for organic compound formation. When K/Mg is high, Mg is primarily formed and stored as mobile polyphosphates in cell vacuoles (Zhong *et al.*, 1993; Tuma *et al.*, 2004). This means that organic magnesium compound formation is enhanced at high K levels, as well as Mg transport by the phloem sap to fruit and storage organs, including roots (Addiscott, 1974; Jeschke and Pate, 1991; Mengel *et al.*, 2001). The positive correlation between  $\delta^{26}\text{Mg}$  and K/Mg is therefore consistent with higher concentrations of organomagnesium compounds with elevated  $\delta^{26}\text{Mg}$  (i.e. isotopically heavy organic molecules) at high K level. Higher  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{leaf-root}}$  for species grown on phlogopite can therefore be explained by an enhanced transport of heavy Mg from leaves to roots, i.e. through the transport of organomagnesium compounds.



**Figure 6.**  $\delta^{26}\text{Mg}$  versus K/Mg for the various parts of rye grass (filled symbols) and clover (open symbols). Same symbols as in figure 5, i.e. triangles for plants grown on phlogopite and circles for hydroponic plants.

### 4.3 Implications for the Mg biogeochemical cycle

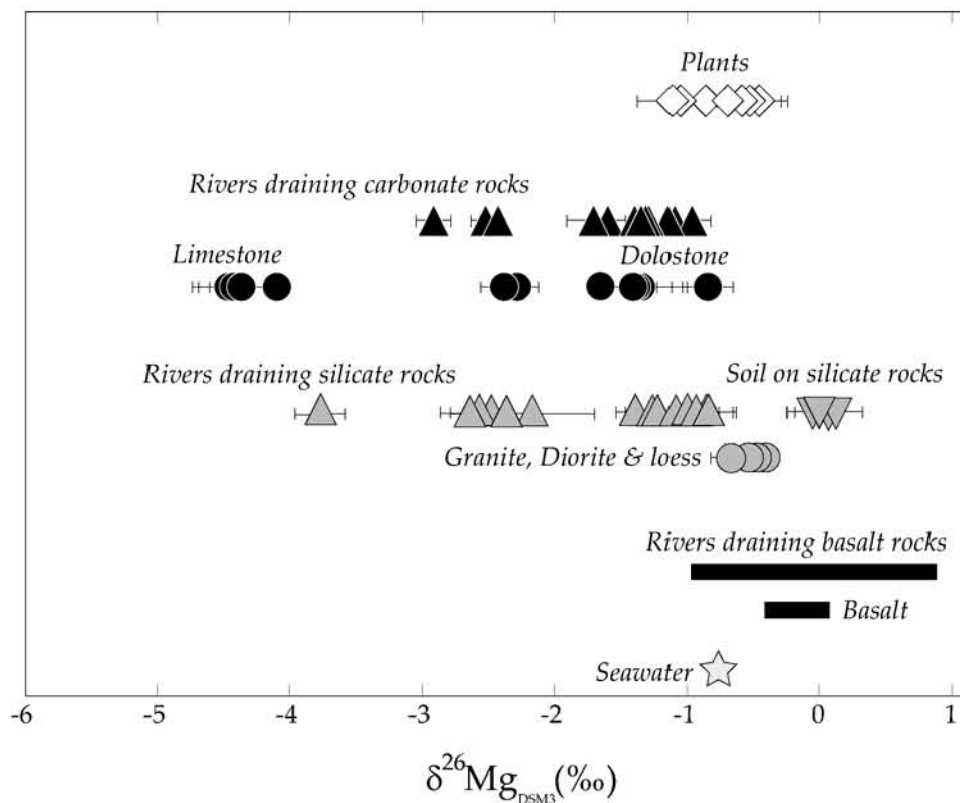
The results obtained in this study and by Black *et al.* (2008) indicate that higher plants are enriched in heavy Mg isotopes relative to the solution from which the nutrients are taken up. Plants therefore reflect an isotopically fractionated reservoir at the scale of a soil system. Vegetation may therefore have an impact on the Mg contents and isotope compositions of soil solutions and potentially river waters.

First, rye grass and clover used in this study are the dominant plant species of temperate pastures and are widely used as ruminant forage. Magnesium, which accumulates mainly in the shoots of these plants, will therefore be exported from soils after each harvest. In France, rye grass and clover production represents a biomass of  $7.25 \times 10^6$  t per year (Huyghe *et al.*, 2005), corresponding to  $1.45 \times 10^4$  t of exported Mg per year. This flux is a priori too small to have an important effect on river Mg isotope signatures.

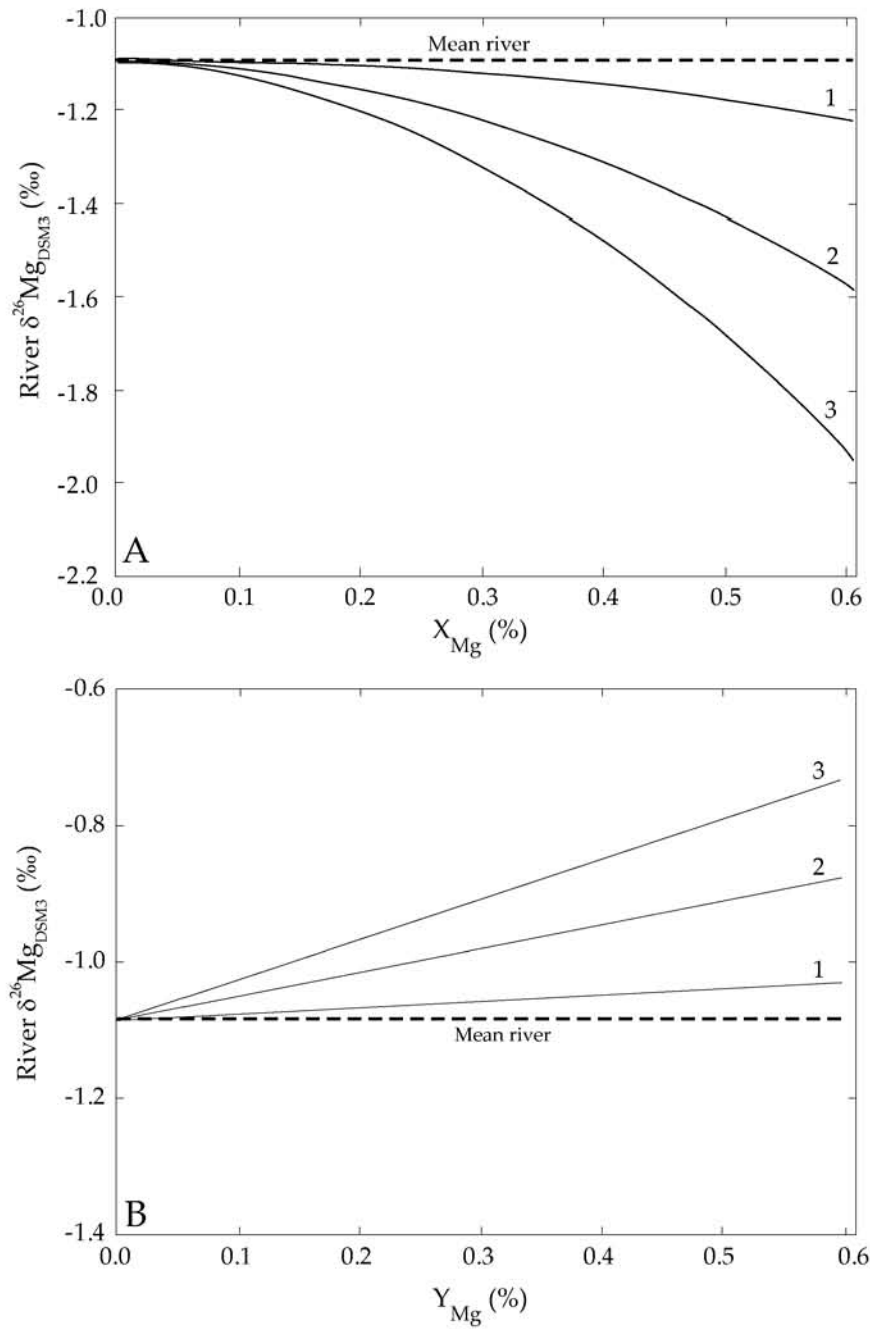
However, forests represent an important Mg reservoir located mainly in leaves. In forest ecosystems, leaves are the main constituent of the litter and therefore a significant proportion of Mg returns to the soils through litter decomposition. However, in the case of soils developed on rocks depleted in nutrients, such as sandstones for example, the main Mg sources for plants are atmospheric inputs. In these Mg-deficient conditions, plant Mg is constantly recycled (up to ~80% of Mg uptaken by roots, Katzensteiner and Glatzel, 1997) and transported from old to younger leaves and to storage tissues as detailed in section 4.2. Consequently, in these environments, litter will display much lower Mg levels, steady state may not be reached and Mg isotope compositions of soil solutions are expected to evolve as a function of vegetation growth.

At the worldwide scale, vegetation biomass represents the third most significant Mg reservoir ( $\sim 3.10^9$  t Mg), which in size is comparable to all rivers and lakes ( $\sim 1.5 \times 10^9$  t Mg). It is possible to simulate the potential influence of vegetation on the mean river  $\delta^{26}\text{Mg}$ . This mean river  $\delta^{26}\text{Mg}$  was estimated to be  $-1.09\text{‰}$  by Tipper *et al.* (2006b). Natural plants analysed so far display  $\delta^{26}\text{Mg}$  ranging between  $-1.10\text{‰}$  and  $-0.50\text{‰}$  ( $n = 4$ , Bolou-Bi *et al.*, 2009). This range is similar to that displayed by continental rocks and minerals (although few data are available yet), and corresponds to the highest  $\delta^{26}\text{Mg}$  values displayed by river waters draining carbonate and silicate catchments (Fig. 7). Since few plant  $\delta^{26}\text{Mg}$  data are available, it is difficult to consider the average value as representative, and we have instead considered a range of values for the vegetation  $\delta^{26}\text{Mg}$  (Fig. 7). Zakharova *et al.* (2007) calculated that up to 40% of river-dissolved Mg can originate from litter degradation. As shown in Fig. 8a, this

upper limit would lead to a maximum river  $\delta^{26}\text{Mg}$  increase of only  $\sim 0.2\%$ . Conversely, a significant expansion of the continental vegetation, as would be expected during interglacial periods, could slightly increase the river  $\delta^{26}\text{Mg}$  (Fig. 8b).



**Figure 7.** Comparison of the  $\delta^{26}\text{Mg}$  published for natural plants (Bolou- Bi et al., 2009) with the  $\delta^{26}\text{Mg}$  values presently known for the other reservoirs (Young and Galy 2004; Bizarro et al., 2005; de Villiers et al., 2005; Teng et al., 2007; Wiechert and Halliday, 2007; Tipper et al., 2006a, 2006b and 2008; Brenot et al., 2008; Pogge von Strandmann et al., 2008). Data from de Villiers et al. (2005) were converted in DSM3 scale using the seawater  $\delta^{26}\text{Mg}$ , assumed to be equal to  $-0.82\%$ .



**Figure 8.** Simple simulation of the change in river  $\delta^{26}\text{Mg}$  as a function of the percent of river dissolved Mg (A) taken up by growing vegetation ( $Y_{\text{Mg}}$ ) or (B) coming from litter degradation ( $X_{\text{Mg}}$ ). Curves correspond to various  $\delta^{26}\text{Mg}$  mean value for natural plants: -1.00‰ (1), -0.75‰ (2) and -0.50‰ (3). The present-day mean riverine  $\delta^{26}\text{Mg}$  (dashed line) is from Tipper *et al.* (2006b).

## 5. CONCLUSION

We have experimentally grown higher plants (rye grass and clover) in order to investigate and quantify corresponding Mg isotope fractionations. Bulk plants are systematically enriched in heavy isotopes relative to their nutrient source with (1) plants

grown on phlogopite displaying Mg isotope fractionation systematically higher than hydroponic plants and (2) for a single substrate, rye grass displaying  $\delta^{26}\text{Mg}$  values systematically lower than clover. Most of the plant Mg is located in leaves but the key processes responsible for the plant enrichment in heavy isotopes seem to be located at the root level, where interactions with organic acids play a key role. Both species also exhibit slight enrichments in light isotopes from roots to leaves or shoots. This effect can be explained by biological processes such as organic molecule formation, Mg transport and internal cycles affecting leaves and roots differently. Plant and leaf  $\delta^{26}\text{Mg}$  depend on the availability of Mg and K in the source. Consequently, parameters such as the degree of chemical erosion and the type of minerals present in soils should have an impact on the Mg isotope composition of plants. Although continental vegetation variations have only a small impact on the isotope composition of fresh water input to the ocean, the results obtained in this study suggest that, at a smaller scale, plants may play a non-negligible role in the Mg isotope composition of soils and soil solutions.

### **Acknowledgements**

This study was financially supported by the "Reliefs de la Terre" CNRS-INSU program research and a BQR (Nancy University – Region Lorraine). We are most grateful to Hervé Marmier for his assistance in major and trace element analyses and Philippe Télouk for his assistance during Mg isotope ratio measurements, using the Nu instrument MC ICP-MS at ENS, Lyon. We would also like to thank Abda Thiam for his contribution to the development of the mineral cropping device and Pete Burnard is acknowledged for comments on the manuscript.

## 6. REFERENCES

- Addiscott, T. M., 1974. Potassium and the distribution of calcium and magnesium in potato plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25, 1173-1183.
- Amory D. and Dufey J. (1984) Adsorption and exchange of Ca, Mg and K-ions on the root cell walls of clover and rye grass. *Plant and Soil* 80, 181-190.
- Andrews M. Y., Ague J. J. and Berner R. A. (2008) Weathering of soil minerals by angiosperm and gymnosperm trees. *Mineral Magazine* 72, 11-14.
- Belastegui-Macadam X. M., Estavillo J. M., García-Mina J. M., González A., Bastias E. and González-Murua C. (2007) Clover and ryegrass are tolerant species to ammonium nutrition. *Journal of Plant Physiology* 164, 1583-1594.
- Benedetti M., Menard O., Noack Y., Carvalho A. and Nahon D. (1994) Water-rock interactions in tropical catchments: field rates of weathering and biomass impact. *Chemical Geology* 118, 203-220.
- Berner R. A., Lasaga A. C. and Garrels R. M. (1983) The carbonate-silicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *American Journal of Science* 283, 641-683.
- Black J. R., Yin Q.-Z. and Casey W. H. (2006) An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 4072-4079.
- Black J. R., Yin Q. Z., Rustad J. R. and Casey W. H. (2007) Magnesium isotopic equilibrium in chlorophylls. *Journal of American Chemistry Society* 129, 8690-8691.
- Black J. R., Epstein E., Rains W. D., Yin Q. Z. and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental Science Technology* 42, 7831-7836.
- Bigeleisen J. and Mayer M. G. (1947) Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *Journal of Chemical Physics* 15 261-267.
- Bizzarro M., Baker J. A., Haack H. and Lundgaard K.L. (2005) Rapid timescales for accretion and melting of differentiated planetesimals inferred from  $^{26}\text{Al}$ - $^{26}\text{Mg}$  chronometry. *The Astrophysical Journal*, 632, L41-L44.
- Bolou-Bi B. E., Vigier N., Brenot A. and Poszwa A. (2009) Magnesium isotope compositions of natural reference materials. *Geostandard and Geoanalytical Research* 33, 95-109.
- Bormann B. T., Wang D., Snyder M. C., Bormann F. H., Benoit G. and April R. (1998) Rapid, plant-induced weathering in an aggrading experimental ecosystem. *Biogeochemistry* 43, 129-155.
- Bradfield E. G. (1976) Calcium complexes in the xylem sap of apple shoots. *Plant and Soil* 44, 495-499.

- Breemen van N., Finlay R., Lundström U., Jongmans A. G., Giesler R. and Olsson M. (2000) Mycorrhizal weathering: A true case of mineral plant nutrition? *Biogeochemistry* 49, 53-67.
- Brenot A., Cloquet C., Vigier N., Carignan J. and France-Lanord C. (2008) Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Casolo V., Zancani M., Macri F. and Vianello A. (1998) Coordinate control by  $Mg^{2+}$  of the phosphorylative activities and of the succinate dehydrogenase of higher plant mitochondria. *Plant Science* 136, 149-157.
- Chacko T., Cole D. R. and Horita J. (2001) Equilibrium Oxygen, Hydrogen and Carbon Isotope Fractionation Factors Applicable to Geologic Systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 43, 1-81.
- Chaignon V. and Hinsinger P. (2003) A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 32, 824-833.
- Chamuah G. S. and Dey S. K. (1982) Cation-exchange capacity of clonal tea roots and its implications on fertiliser responses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33, 309-317.
- Chang V. T. C., Williams R. J. P., Makishima A., Belshaw N. S. and O'Nions R. K. (2004) Mg and Ca isotope fractionation during  $CaCO_3$  biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 79-85.
- Courtois D., Kastenmayer P., Clough J., Vigo M., Sabatier M., and Arnaud M. J. (2003) Magnesium enrichment and distribution in plants. *Isotopes in Environmental Health Studies* 39, 273-279.
- Debbaudt A. L., Ferreira M. L. and Gschaider M. E. (2004) Theoretical and experimental study of  $M^{2+}$  adsorption on biopolymers. III. Comparative kinetic pattern of Pb, Hg and Cd. *Carbohydrate Polymers* 56, 321-332.
- Ding Y., Luo W. and Xu G. (2006) Characterisation of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. *Annals of Applied Biology* 149, 111-123.
- Drever J. I. (1994) The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 2325-2332.
- Drever J. I. and Stillings L. L. (1997) The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 120, 167-181.
- Dufey J. E., Amory D. E. and Braun R. (1985) Propriétés électriques et sélectivité d'échange ionique des racines. *Pédologie* 35, 231-249.
- Epstein E. and Bloom A. J. (2005) *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Sinauer Associates Inc., U.S., 2<sup>nd</sup> edition
- Ericsson T. and Kahr M. (1995) Growth and nutrition of birch seedlings at varied relative addition rates of magnesium. *Tree Physiology* 15, 85-93.

- Feger K. H. (1997) Biogeochemistry of magnesium in forest ecosystems. In: Hüttr R.F., Schaaf W. (eds.), *Magnesium Deficiency in Forest Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 67–99.
- Fraústo da Silva J. J. R. and Williams R. J. P. (2007) The biological chemistry of the elements: the Inorganic Chemistry of life, 3rd edition. Oxford University Press, Oxford.
- Galy A., Belshaw N. S., Halicz L. and O'Nions R. K. (2001) High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 208, 89-98.
- Galy A., Yoffe O., Janney P. E., Williams R. W., Cloquet C., Alard O., Halicz L., Wadhwa M., Hutcheon I. D., Ramon E. and Carignan J. (2003) Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18, 1352–1356.
- Hall M. H. (1992) Ryegrass. Pennsylvania State University Coop. Extension Service Agronomical Facts 19.
- Haynes R. (1980) Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: Their role in ion accumulation by plants. *The Botanical Review* 46, 75-99.
- Haynes R. J. (1990) Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126, 247-264.
- Helmy A. K. and Elgabaly M. M. (1958) Exchange capacity of plant roots. *Plant and Soil* 10, 93-100.
- Hermans C. and Verbruggen N. (2005) Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 56, 2153-2161.
- Hinsinger P. (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 64, 225-265.
- Hinsinger P. and Gilkes, R. J. (1996) Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science* 47, 533-544.
- Hinsinger P., Jaillard, B. and Dufey J. E. (1992) Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* 56, 977-982.
- Hinsinger P., Fernandes Barros O. N., Benedetti M. F., Noack Y. and Callot G. (2001) Plant-induced weathering of a basaltic rock: experimental evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 137-152.
- Hinsinger P., Plassard C. and Jaillard B. (2006) Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *Journal of Geochemical Exploration* 88, 210-213.
- Høgh-Jensen H. and Schjoerring J. K. (1997) Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N<sub>2</sub> fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. *Plant and Soil* 197, 187-199.



- Huyghe, C., Couteaudier, Y., Duru, M., and Bournoville, R., 2005. Prairies et cultures fourragères en France : Entre logiques de production et enjeux territoriaux. Inra
- Jaillard B., Guyon A. and Maurin A. F. (1991) Structure and composition of calcified roots, and their identification in calcareous soils. *Geoderma* 50, 197-210.
- Jeschke W. D. and Pate J. S. (1991) Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant of *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. *Journal of Experimental Botany* 42, 1105-1116.
- Joseph R. A. and Tang H. (1976) Kinetics of potassium and magnesium uptake by intact soybean roots. *Physiologia Plantarum* 36, 233-235.
- Katzensteiner K. and Glatzel G. (1997) Causes of Magnesium Deficiency in Forest Ecosystems. In Hüttl R. F. and Schaaf W. (eds.), *Magnesium Deficiency in Forest Ecosystems*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 227-251.
- Kelly J. M. and Barber S. A. (1991) Magnesium uptake kinetics in loblolly pine seedlings. *Plant and Soil* 134, 227-232.
- Kelly E. F., Chadwick O. A. and Hilinski T. E. (1998) The Effect of Plants on Mineral Weathering. *Biogeochemistry* 42, 21-53.
- Keltjens W. G. (1995) Magnesium uptake by Al-stressed maize plants with special emphasis on cation interactions at root exchange sites. *Plant and Soil* 171, 141-146.
- Keltjens W. G. and Tan K. (1993) Interactions between aluminium, magnesium and calcium with different monocotyledonous and dicotyledonous plant species. *Plant and Soil* 155-156, 485-488.
- Kim D., Joen B., Kwon S., Shin J., Ryu H., Kim J. and Joen Y. (2001) Separation of magnesium isotopes by 1-aza-12-crown-4 bonded Merrifield peptide resin. *Korean Journal of Chemical Engineering* 18, 750-754.
- Kim D. W., Jeon B. K., Lee N.-S., Jang Y. H., Ryu H. I. and Kim C. S. (2002) Magnesium isotope effect in the aqueous-monoazacrown bonded Merrifield peptide resin. *Separation Science and Technology* 37, 1959 - 1971.
- Kim D. W., Jeon B. K., Kang B. M., Lee N.-S., Ryu H.-I. and Lee Y.-I. (2003) Adsorption and isotope effects by ion exchange with 1-aza-12-crown-4 bonded Merrifield peptide resin. *Journal of Colloid and Interface Science* 263, 528-532.
- Kirchmann R. (1965) Influence de l'apport de strontium stable au sol sur la contamination par <sup>90</sup>Sr de végétaux cultivés : ray-grass et trèfle violet. *Physiologia Plantarum* 18, 885-890.
- Kirkby E. A. and Mengel, K. (1976) The role of magnesium in plant nutrition. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 139, 209-222.
- Komai Y. (1962) Studies on the Absorption of cations by barley roots with special references to magnesium. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture, Series B, Agriculture and biology* 14, 99-126.

- Kuhn A. J., Schröder W. H. and Bauch J. (2000) The kinetics of calcium and magnesium entry into mycorrhizal spruce roots. *Planta* 210, 488-496.
- Leggett J. E. and Gilbert W. A. (1967) Localization of the Ca-Mediated apparent ion selectivity in the cross sectional volume of soybean roots. *Plant Physiology* 42, 1658-1664.
- Leggett J. E. and Gilbert W. A. (1969) Magnesium uptake by soybeans. *Plant Physiology* 44, 1182-1186.
- Leyval C. and Berthelin J. (1991) Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of pine. *Soil Science Society of America Journal* 55, 1009-1016.
- Maas E. V. and Ogata G. (1971) Absorption of magnesium and chloride by excised corn root. *Plant Physiology* 47, 357-360.
- Macklon A. E. S. and Sim A. (1976) Cortical cell fluxes and transport to the stele in excised root segments of *Allium cepa* L. *Planta* 128, 5-9.
- Marschner, H. (1986) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, New York.
- Marschner H., Römheld V., Horst W. J., and Martin P. (1986) Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149, 441-456.
- Mengel K. and Pflüger R. (1972) The release of potassium and sodium from young excised roots of *Zea mays* under various efflux conditions *Plant Physiology* 49, 16-19.
- Mengel K., Kirkby E. A., Kosegarten, H. and Appel T. (2001) *Principles of plant nutrition*. Springer-Verlag, Edition: 5, Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.
- Moore D. P., Overstreet R., and Jacobson L. (1961) Uptake of magnesium & its interaction with calcium in excised barley roots. *Plant Physiology* 36, 290-295.
- Moulton K. L., West J., and Berner R. A. (2000) Solute flux and mineral mass balance approaches to the quantification of plant effects on silicate weathering. *American Journal of Science* 300, 539-570.
- Papenbrock J., Mock H.-P., Tanaka R., Kruse E. and Grimm B. (2000) Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Plant Physiology* 122, 1161-1170.
- Pearson N. J., Griffin W. L., Alard O. and O'Reilly S. Y. (2006) The isotopic composition of magnesium in mantle olivine: Records of depletion and metasomatism. *Chemical Geology* 226, 115-133.
- Peoples M. B., Gault R. R., Scammell G. J., Dear B. S., Virgona J., Sandral G. A., Pau J., Wolfe E. C. and Angus J. F. (1998) Effect of pasture management on the contributions of fixed N to the N economy of lye-farming systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 49, 459-474.

- Pogge von Strandmann P. A. E., Burtonn K. W., James R. H., van Calsteren P. Gislason S. R. and Sigfússon B. (2008) The influence of weathering processes on riverine magnesium isotopes in a basaltic terrain. *Earth and Planetary Science Letters* 276, 187-197.
- Pokrovsky O. S., Schott J., Kudryavtzev D. I. and Dupré B. (2005) Basalt weathering in Central Siberia under permafrost conditions. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 69, 5659-5680.
- Poole R. J. (1969) Carrier-mediated potassium efflux across the cell membrane of red beet. *Plant Physiology* 44, 485-490.
- Poole R. J. (1971) Effect of sodium on potassium fluxes at the cell membrane and vacuole membrane of red beet. *Plant Physiology* 47, 731-734.
- Ra K. and Kitagawa H. (2007) Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 817-821.
- Rengel Z. (1990) Competitive  $Al^{3+}$  inhibition of net  $Mg^{2+}$  uptake by intact *Lolium multiflorum* roots: II. Plant age effects. *Plant Physiology* 93, 1261-1267.
- Rengel Z. and Robinson D. L. (1989) Competitive  $Al^{3+}$  inhibition of net  $Mg^{2+}$  uptake by intact *Lolium multiflorum* roots: I. Kinetics. *Plant Physiology* 91, 1407-1413.
- Richter F. M., Mendybaev R. A., Christensen J. N., Hutcheon I. D., Williams R. W., Sturchio N. C. and Beloso J. A. D. (2006). Kinetic isotopic fractionation during diffusion of ionic species in water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 277-289.
- Rufyikiri G., Dufey J. E., Achard R. and Delvaux B. (2002) Cation exchange capacity and aluminium-calcium-magnesium binding in roots of bananas cultivated in soils and in nutrient solutions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33, 991-1009.
- Rufyikiri G., Nootens D., Dufey J. E. and Delvaux B. (2004) Mobilization of aluminium and magnesium by roots of banana (*Musa* spp.) from kaolinite and smectite clay minerals. *Applied Geochemistry* 19, 633-643.
- Saglio P. H. and Pradet A. (1980) Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiology* 66, 516-519.
- Schell J. (1997) Interdependence of pH, malate concentration, and calcium and magnesium concentrations in the xylem sap of beech roots. *Tree Physiology* 17, 479-483.
- Schumacher T. E. and Smucker A. J. M. (1985) Carbon transport and root respiration of *Phaseolus vulgaris* subjected to localized anoxia. *Plant Physiology* 78, 359-364.
- Scott B. J. and Robson A. D. (1990) Distribution of magnesium in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in relation to supply. *Australian Journal of Agricultural Research* 41, 499-510.
- Scott B. J. and Robson A. D. (1991) Distribution of magnesium in wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to supply. *Plant and Soil* 136, 183-193.

- Shaul O. (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* 15, 309-323
- Shewmaker G., Johnson D., and Mayland H. (2008) Mg and K effects on cation uptake and dry matter accumulation in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant and Soil* 302, 283-295.
- Steucek G. L. and Koontz H. V. (1970) Phloem mobility of magnesium. *Plant Physiology* 46, 50-52.
- Stok B. P., Tanczos O. G., Kähr M., Stuiver C. E. E., Pieter A. K., and Kuiper J. C. (1981) Transport of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ , and  $Mg^{2+}$  stimulated adenosine triphosphatase activity in oat roots as affected by mineral nutrition. *Physiologia Plantarum* 52, 115-123.
- Taylor A. B. and Velbel M. A. (1991) Geochemical mass balances and weathering rates in forested watersheds of the southern Blue Ridge. II: Effects of botanical uptake terms. *Geoderma* 51, 29-50.
- Teng F.Z., Wadhwa M. and Helz R. T. (2007) Investigation of magnesium isotope fractionation during basalt differentiation: Implications for a chondritic composition of the terrestrial mantle. *Earth and Planetary Science Letters* 261, 84-92.
- Tipper E. T., Galy A. and Bickle M. J. (2006a) Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters* 247, 267-279.
- Tipper E. T., Galy A., Gaillardet J., Bickle M. J., Elderfield H. and Carder, E. A. (2006b) The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters* 250, 241-253.
- Tipper E. T., Galy A. and Bickle M. J. (2008) Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica and Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Todd J. R. (1961) Magnesium in forage plants. II. Magnesium distribution in grasses and clovers. *The Journal of Agricultural Science* 57, 35-38.
- Tůma J., Skalický M., Tůmová L., Bláhová P., and Rosůlková M. (2004) Potassium, magnesium and calcium content in individual parts of *Phaseolus vulgaris* L. plant as related to potassium and magnesium nutrition. *Plant, Soil and Environment* 50, 18-26.
- Velbel M. A. (1993) Temperature dependence of silicate weathering in nature: How strong a negative feedback on long-term accumulation of atmospheric CO<sub>2</sub> and global greenhouse warming? *Geology* 21, 1059-1062.
- de Villiers S., Dickson J. A. D. and Ellam R. M. (2005) The composition of the continental river weathering flux deduced from seawater Mg isotopes. *Chemical Geology* 216, 133-142.
- Wacquant J. P. (1974) Recherches sur les propriétés d'adsorption cationique des racines (rôle physiologique et importance écologique), Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

- Wiechert U. and Halliday Alex N. (2007) Non-chondritic magnesium and the origins of the inner terrestrial planets. *Earth and Planetary Science Letters*, 256, 360–371.
- Wilkinson S., Welch R., Mayland H. and Grunes D. (1990) Magnesium in plants: uptake, distribution, function and utilization by man and animals. *Metal Ions in Biological Systems* 26, 33–56.
- Willows R. D. (2007) Chlorophyll Synthesis. In *The Structure and Functions of plastids, advances in photosynthesis and Respiration* 23 (eds. R. R. Wise and J. K. Hooper.). Springer Netherlands. pp. 295-313.
- Woodward R., Harper K., and Tiedemann A. (1984) An ecological consideration of the significance of cation-exchange capacity of roots of some Utah range plants. *Plant and Soil* 79, 169-180.
- Young E. D., Galy A. and Nagahara H. (2002) Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 66, 1095-1104.
- Young E. D. and Galy A. (2004) The isotope geochemistry and cosmochemistry of magnesium. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 55, 197-230.
- Zakharova E. A., Pokrovsky O. S., Dupré B., Gaillardet J. and Efimova L. E. (2007) Chemical weathering of silicate rocks in Karelia region and Kola peninsula, NW Russia: Assessing the effect of rock composition, wetlands and vegetation. *Chemical Geology* 242, 255-277.
- Zhong W., Schobert C. and Komor E. (1993) Transport of magnesium ions in the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* 190, 114-119.

**Rôle de la végétation sur les  
compositions isotopiques du Mg des  
eaux et des sols dans le bassin versant  
du Val de Senones**

# I. Résumé de l'étude

## I-1. Contexte et objectif de l'étude

L'altération chimique des silicates de Mg et de Ca joue un rôle essentiel sur les variations des conditions climatiques à l'échelle des temps géologiques, en tamponnant les fluctuations de la teneur atmosphérique en CO<sub>2</sub>. Dès lors, la détermination du flux de Mg issu de cette altération représente un enjeu capital dans les prédictions climatiques. A l'échelle locale, l'altération chimique joue un rôle crucial dans l'évolution, la diversification et la durabilité des écosystèmes forestiers. En effet, ce mécanisme assure, au moins partiellement, la restauration de la réserve en nutriments disponibles dans les sols, et contribue à l'acquisition de la composition chimique des eaux souterraines et des rivières.

Les processus d'altération entraînent le passage du Mg de la lithosphère à l'hydrosphère. Celui-ci peut alors être utilisé lors de mécanismes biogéochimiques, incluant la nutrition et un transit pendant une période plus ou moins longue, dans les plantes. Les flux du Mg sont alors susceptibles d'être modifiés par des mécanismes biologiques. Cependant, la contribution des processus impliquant les plantes, comparée à celle des processus purement géochimiques, est très peu documentée. Ceci est lié au manque de méthodologies et de techniques appropriées pour distinguer les cations, dans les eaux, issus de la végétation de ceux provenant directement de l'altération des silicates (et/ou des carbonates). L'utilisation de nouveaux traceurs isotopiques des cations majeurs des principaux réservoirs terrestres revêt un intérêt nouveau dans l'étude des cycles biogéochimiques de ces éléments. En effet, si des fractionnements isotopiques sont susceptibles de se produire lors de processus et mécanismes physico-chimiques et/ou biologiques, ces nouveaux traceurs permettent de mettre en évidence et de dissocier ceux-ci. Ces outils pourraient également permettre d'estimer la contribution respective des processus et mécanismes et les potentielles origines de ces éléments dans les cycles biogéochimiques.

L'objectif de ce travail est donc d'utiliser les isotopes du Mg comme traceurs de sources et/ou de processus afin d'étudier le rôle de la végétation sur son cycle biogéochimique. Les différentes signatures isotopiques du Mg dans les principaux compartiments d'un écosystème forestier ont été déterminées afin d'estimer l'impact des plantes sur la composition isotopique des eaux de surface.

## **I-2. Matériels et Méthodes**

### **I-2.1. Site d'étude**

Cette étude a été menée dans le bassin versant du Val de Senones dans les Vosges (Nord-Est de la France). Le bassin se subdivise en trois sous-bassins versants voisins, situés sous une même ligne de crête. Ces trois sous-bassins ont été sélectionnés, équipés et étudiés dans le cadre du programme de suivi d'un amendement calco-magnésien, réalisé en 2003 sur des écosystèmes forestiers des Vosges par l'ONF. Ce sont : (1) la Basse des Escaliers (123 ha), (2) la Basse Courbeligne (200,3 ha) et (3) la Basse du Gentil Sapin (222 ha). Notre étude a porté sur le bassin du Gentil Sapin. C'est le bassin versant témoin de ce programme, c'est-à-dire qu'il n'a pas été amendé. Il est essentiellement occupé localement par des landes en mélange avec de jeunes peuplements de résineux sur les sommets et des forêts mûres sur les pentes fortes (sapin et épicéa). Il est localisé à une altitude moyenne de 786 m, et la précipitation moyenne annuelle y est de 1088 mm. Ce bassin a été choisi pour notre étude du fait de la nature de son substratum géologique. La roche mère est essentiellement constituée de grès, le Grès Vosgien, roche très riche en silice, pauvre en éléments alcalins et alcalino-terreux, notamment en Mg. Sur ces roches se développent des sols également pauvres en Mg et très acides. Ainsi, les précipitations constituent la principale entrée de Mg dans cet écosystème « naturel », et l'impact de la végétation (prélèvement racinaire, retours pas les litières) serait alors amplifié.

Sur les sommets, une parcelle sous lande en mélange avec de jeunes arbres a été instrumentée afin de récolter les précipitations et solutions du sol à différentes profondeurs, l'objectif étant de suivre leur qualité chimique au cours du temps. Sur cette parcelle, les sols sont à dominante podzolique (FAO : Podzosol) dont les principaux horizons sont A<sub>0</sub> (0 à -5 cm), A<sub>1</sub> (-5 à -25cm), A<sub>2</sub> (-25 à -60 cm), B<sub>h</sub> (-60 à -65 cm), B<sub>s</sub> (-65 à 95 cm), B<sub>s</sub>C (-95 à 110 cm) et C (< -110 cm).

### **I-2.2. Echantillonnage et analyse**

Les solutions prélevées sont de trois types : les précipitations, les solutions de sol et le ruisseau. Les précipitations (neige et pluies) ont été collectées à l'aide de deux dispositifs situés à un mètre de la surface du sol, comprenant un entonnoir de 30 cm de diamètre qui surplombe un collecteur de 25 l. Les eaux de précipitations ont été collectées une fois par mois, de septembre 2006 à septembre 2008. Les collecteurs lysimétriques installés dans les différents horizons du sol ont permis de collecter les solutions de sol. Les lysimètres sont des tuyaux en PVC découpés en gouttières de 12 cm de diamètre, enfoncés dans le sol. Ces gouttières collectent alors les eaux de



drainage des différents horizons et les acheminent, à l'aide de tuyau en polypropylène, à des collecteurs en polypropylène. Ces collecteurs ont été régulièrement échantillonnés de mai 2006 à septembre 2008. Les eaux drainant le bassin versant à travers le ruisseau principal ont été prélevées à l'exutoire durant la même période que les solutions de sol. Toutes les solutions ont ensuite été filtrées à 0.22 µm (filtre nylon Millipore), puis conservées à 4 °C jusqu'à l'analyse de leurs compositions chimiques en éléments majeurs et isotopiques en Mg et Sr.

Deux espèces végétales très différentes ont été étudiées sur le bassin versant. Ce sont la canche flexueuse pour la strate herbacée et l'épicéa pour les essences forestières. Les parties aériennes (feuilles) de multiples plants de canches ont été échantillonnées à 2 cm du sol. Différents organes d'un jeune épicéa ont été échantillonnés. Les aiguilles de différents âges (1, 2 et 3 ans) ont été prélevées à 130, 400 et 500 cm du sol. Le tronc a été également échantillonné à 10, 130, 400 et 500 cm du sol.

Parallèlement, une fosse réalisée sur la placette d'étude a permis de prélever les sols des différents horizons pédologiques caractéristiques. Les sols prélevés sont tamisés à 5 mm sur le terrain. Les racines fines d'épicéa et de la canche ont été récoltées sur le refus du tamis. Seules les racines de diamètre inférieur à 2 mm ont été sélectionnées puis triées selon les espèces. Ces racines ont été lavées à l'eau ultrapure par agitation aux ultrasons. Chaque échantillon de sol a été séché à l'air libre, puis tamisé à 2 mm. Les échantillons de feuilles, d'aiguilles et de racines ont été séchés à l'étuve à 65 °C pendant 48h, puis finement broyés et minéralisés avec un mélange de HNO<sub>3</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le dosage des cations majeurs et du Sr a été réalisé par ICP AES au LIMOS, pour les plantes et les solutions de sols, et au CRPG pour les échantillons de sol. Les compositions isotopiques du Mg ont été mesurées par MC ICP-MS (Nu Plasma) à l'ENS de Lyon, après la séparation chimique du Mg au CRPG suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 (Procédures et développements analytiques) de cette thèse.

## **I-3. Résultats**

### **I-3.1. Plantes**

Les compositions isotopiques du Mg et les fractionnements isotopiques estimés sont comparables à ceux obtenus expérimentalement (voir chapitre précédent). En effet, les racines des plantes sont systématiquement enrichies en isotopes lourds, comparativement à la fraction échangeable de Mg ou à la solution, suggérant que le prélèvement racinaire est associé à un enrichissement en isotopes lourds ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{racine-échangeable}} = 0.7\text{‰}$  à  $1.40\text{‰}$  pour l'épicéa et de  $0.20\text{‰}$  à  $0.45\text{‰}$ . pour la canche). Puis, des racines aux feuilles ou aux aiguilles, les isotopes légers sont

préférentiellement transférés ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{feuilles-racine}} = -1.66\text{‰}$  à  $-0.72\text{‰}$  pour l'épicéa, et de  $-0.27\text{‰}$  pour la canche). Ce fractionnement isotopique du Mg est plus accentué dans l'épicéa que pour les autres espèces végétales. Ceci suggère alors que ces fractionnements seraient contrôlés par l'espèce végétale. Cependant, au cours des croissances expérimentales, ce fractionnement isotopique du Mg dans la plante est également assujéti aux conditions environnementales de croissance, notamment la 'déficience' en Mg. L'analyse des différentes classes d'âge des aiguilles d'épicéa montre, quel que soit le niveau de prélèvement, un enrichissement en isotopes lourds des aiguilles âgées vers les jeunes aiguilles ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{aiguille âgées - aiguilles jeunes}} = 0.28\text{‰}$  à  $0.41\text{‰}$ ). Cette augmentation de la composition isotopique du Mg dans les aiguilles peut s'expliquer par une remobilisation du Mg sous la forme de complexes organiques à travers le phloème.

### I-3.2. Sols, solutions de sol et ruisseau

L'horizon superficiel A<sub>1</sub> présente la composition isotopique la plus faible du profil de sol, avec une valeur de  $-0.48\text{‰}$ . Puis, les valeurs de  $\delta^{26}\text{Mg}$  augmentent et atteignent la valeur maximale de  $0.25\text{‰}$  dans l'horizon A<sub>2</sub>, avant de baisser pour demeurer constantes dans les horizons profonds à  $0\text{‰}$ . Au contraire du Mg, les compositions isotopiques du Sr augmentent de  $0.7153$  dans l'horizon de surface (A<sub>1</sub>), à  $0.7172$  dans l'horizon C. Ces valeurs sont cependant toutes inférieures à celles de la roche mère ( $0.720$ ).

Parallèlement, les solutions de sol analysées présentent une gamme totale de variation en  $\delta^{26}\text{Mg}$  de  $1.6\text{‰}$  avec deux mois très contrastés (mai et janvier). Les compositions les plus basses ont été obtenues pendant le mois de mai 2006 (de  $-1.05\text{‰}$  dans l'horizon de surface à  $-1.50\text{‰}$  dans l'horizon C). Les solutions de sol collectées pendant le mois de janvier présentent une variation très marquée dans l'horizon A<sub>1</sub>. Elles ont des valeurs en  $\delta^{26}\text{Mg}$  supérieures ( $-0.10\text{‰}$  à  $-0.49\text{‰}$ ) à celles du mois de mai. Cependant, comparées aux valeurs de  $\delta^{26}\text{Mg}$  des horizons totaux des sols, les solutions du sol demeurent enrichies en isotopes légers. Les compositions isotopiques du Sr des solutions augmentent de l'horizon A<sub>1</sub> ( $0.7136$ ) à l'horizon C ( $0.7152$ ), mais demeurent inférieures à celles des sols totaux.

Les compositions isotopiques en Mg des solutions de sol ne peuvent être seulement expliquées par les précipitations, dont les compositions isotopiques varient de  $-0.74\text{‰}$  à  $-0.50\text{‰}$ . Les résultats d'un simple calcul de bilan de masse indiquent que les solutions de sol pourraient être la résultante d'un mélange de Mg issu des précipitations et du recyclage biologique, à travers la dégradation de la litière. Ces sources affectent exclusivement les compositions des horizons A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et B<sub>n</sub>. Au delà de ces horizons, la composition isotopique de la solution de sol

semble être essentiellement contrôlée par l'altération géochimique et la formation de phases secondaires.

La composition isotopique (Mg et Sr) du ruisseau drainant le bassin versant semble être très peu affectée par les processus biologiques. En particulier, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les compositions isotopiques du ruisseau et les saisons, qui affectent dans les sols ces processus biologique. Par contre, les  $\delta^{26}\text{Mg}$ , qui varient de -0.85‰ à -0.19‰ et les rapports  $87\text{Sr}/86\text{Sr}$  (0.718 - 0.720) corrélient avec l'intensité des précipitations. Les rapports isotopiques les plus bas sont mesurés lors des périodes de faibles précipitations. Les compositions isotopiques en Sr étant très proches de celle de la roche mère, ces résultats suggèrent que les eaux alimentant le ruisseau seraient des eaux ayant résidé plus longtemps dans le sol et l'altérée. Elles refléteraient ainsi des interactions eaux-roches prononcées liées à des processus de précipitation-dissolution des minéraux secondaires dans les horizons profonds du sol.

Cette étude dont le résumé est indiqué ci-dessus est présentée sous la forme d'un article en préparation pour une soumission à un journal.

## II. "Magnesium and strontium isotope systematics in the Senones catchment (Vosges Mountains): role of vegetation"

Emile B. BOLOU-BI<sup>(1,2)\*</sup>, Nathalie VIGIER<sup>(1)</sup>, Anne POSZWA<sup>(2)</sup>

**Manuscrit en préparation**

(1) CNRS-UPR 2300, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques,  
15 rue Notre Dame des Pauvres F-54501 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex, France

(2) CNRS-UMR 7137, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, Nancy-Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bd des Aiguillettes, BP 70-239 F 70 54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex, France

\*Corresponding Author:

Tel.: +33 (0)3 83 68 42 87

Fax: +33 (0)3 83 68 42 84

E-mail: [emile.boloubi@limos.uhp-nancy.fr](mailto:emile.boloubi@limos.uhp-nancy.fr)

## 1. Introduction

Products of chemical and physical erosion carried to the ocean by continental waters are key components in global geochemical cycles. Continental chemical erosion of magnesium and calcium silicates consumes atmospheric CO<sub>2</sub> and plays a major role in past atmospheric chemistry and climate changes (e.g. Berner *et al.*, 1983; Berner and Berner, 1997). In ecosystems, chemical erosion of silicate rocks results in the release of plant macronutrients, (e.g. Mg, Ca, and K) and micronutrients (e.g. Fe, Mn and B). Silicate mineral weathering is also the only process able to contribute to natural neutralization of landscape acidification (April *et al.*, 1986; Bricker and Rice, 1989; Likens and Bormann, 1995). Until recently, in most studies, Mg and Ca silicate weathering was often treated as an inorganic process. More recently, geologists have paid appreciable attention to how plants and microbiota affect weathering. In association or not with microorganisms, the effects of plants on chemical weathering have been studied both in the field and in laboratory conditions. Results have demonstrated that plant could enhance silicate-weathering rates.

In tropical regions, Benedetti *et al.* (1994; 2003) conclude that weathering rates increase by factor of 2 to 5 under vegetated zones. Similarly, in temperate regions, by comparing the cation concentration outflow of vegetated and bare zones, Berner and Rao (1997) and Bormann *et al.* (1998) found an increase of weathering rate of 2 to 10 due to plant and other biota. Recently, Moulton *et al.* (2000) highlight that the release of cations, (especially Ca and Mg) in streams is increased by about 4 times in vegetated areas compared to more barren zones. These authors also estimate an increase of mineral weathering by a factor 2 for plagioclase and 10 for pyroxene. Enhancement of silicate weathering rate by plants seems to depend on the species. Most studies point out that angiosperms species induce an increase of weathering rate to a greater degree (up to 8) than gymnosperms because of difference in growth rate, nutritional needs and cation cycling by litterfall flux (e.g. Andrews *et al.*, 2008; Homann *et al.*, 1992; Moulton *et al.*, 2000; Quideau *et al.*, 1999).

Through the cation recycling in forest ecosystems, vegetation is one of the most important internal sources for cations in the upper soil horizons and soil solutions. Thus, the contribution of vegetation to dissolved cation fluxes in rivers may be important following the litterfall production and degradation rate. Recently, Zakharova *et al.* (2007) estimate that, for Russian rivers, the litter degradation would be responsible for 10 to 40% of dissolved Mg and Ca fluxes. Other studies have used isotope tracers as a proxy for specific cations to demonstrate the local importance of biological mechanisms in nutrients dynamic (for example Sr isotopes for tracing the Ca cycle) (Drouet *et al.*, 2007, Poszwa *et al.*, 2000; Poszwa *et al.*, 2004; Wickman, 1996). The

use of isotopic tool has recently being extended to new tracers including Mg, Si, Fe and Ca stable isotopes.

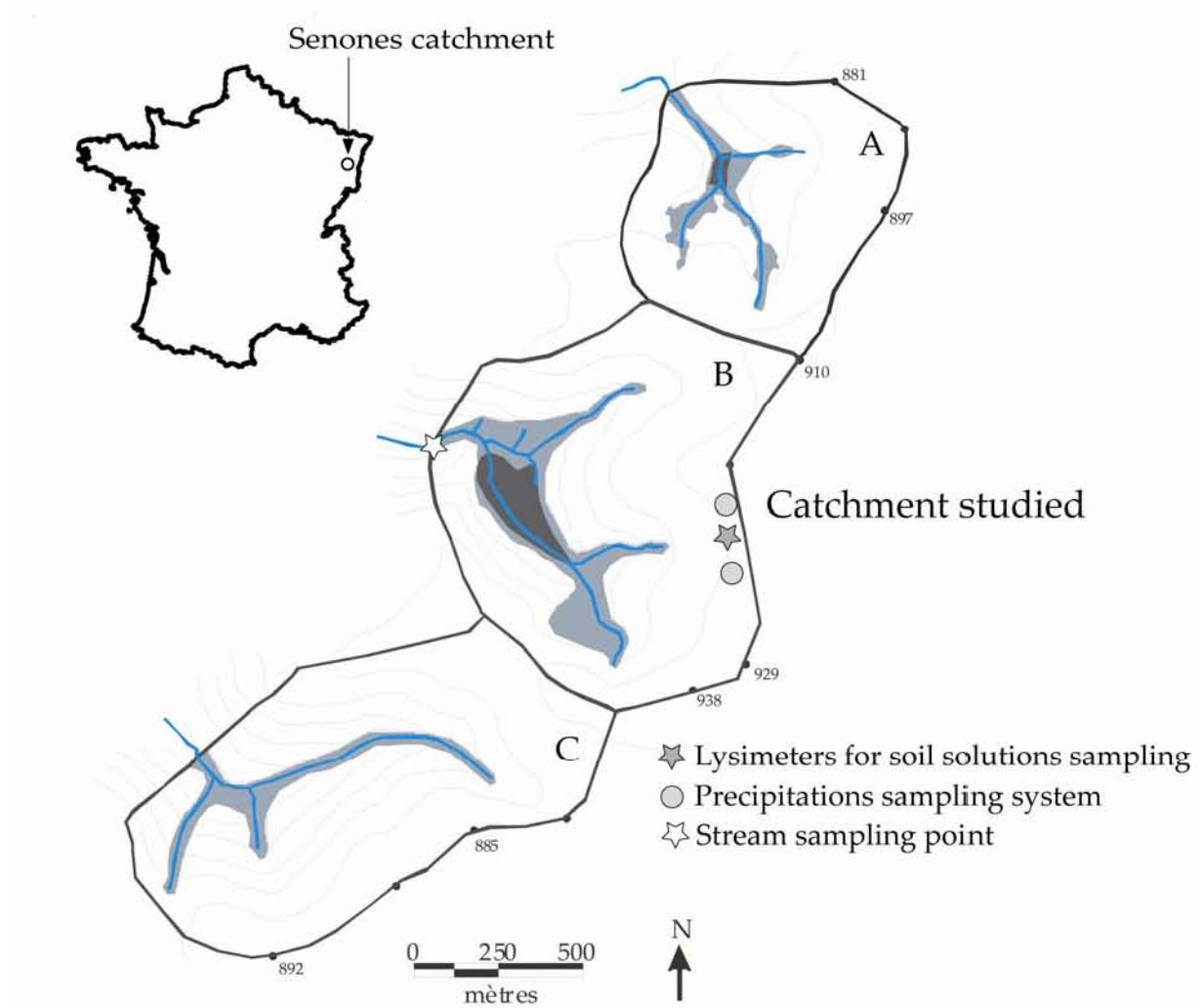
Magnesium isotopes are an innovative tool used to explore and better understand Mg cycle at the Earth surface. Recently, significant Mg isotope fractionation have been highlighted during silicate weathering at a catchment scale (e.g. Brenot *et al.*, 2008; De Villiers *et al.*, 2005; Pogge von Strandmann *et al.*, 2008a and b; Tipper *et al.*, 2006a and b; Tipper *et al.*, 2008) and during plant growth (Black *et al.*, 2008; Bolou Bi *et al.*, 2009; Bolou Bi *et al.*, accepted). Relative to estimated composition of the continental crust ( $\delta^{26}\text{Mg} \sim -0.5\text{‰}$ ), silicate soils are enriched in heavy isotope, with  $\delta^{26}\text{Mg}$  closed to  $\sim 0\text{‰}$ , while corresponding river waters display low  $\delta^{26}\text{Mg}$  ( $\delta^{26}\text{Mg} \sim -2.6\text{‰}$  to  $-0.7\text{‰}$ ). In parallel to these observations, Black *et al.* (2008) and Bolou-Bi *et al.* (accepted) found that experimentally grown plants preferentially accumulate heavy isotopes ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{plant-source}} = 0.28$  to  $1.05\text{‰}$ ). Consequently, it can be envisioned that part of the light isotope signatures displayed by natural waters is the consequence of Mg uptake by plants.

In order to study how vegetation could affect natural water isotope compositions, a small silicate and well-constrained forest ecosystem of the Vosges mountains (NE France) was studied (Angeli, 2006; Nys 2004). This specific forest ecosystem has been chosen for its Mg-poor underlying lithology (sandstone), in the aim to maximise the effect of plants on cation release to waters. Mg isotopes were measured in the various soil horizons, in different plant species and in waters (soil solutions and streamwater). The  $\delta^{26}\text{Mg}$  variations between soils, waters and vegetation are then discussed and linked to specific biological or chemical processes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Site description

The study was conducted in the Senones catchment located in the south of the Vosges Mountains, in Northeast France (Figure 1). The Senones watershed is composed by three small catchments that are monitored in order to study dolostone application influence on the restoration of soils and waters biological and chemical quality (Angeli, 2006). The catchment studied here has not been submitted to this application and is considered as the "reference" area. The Senones catchment is located at an altitude of about 786 m. Mean annual precipitations and temperatures are 1088 mm and 17 °C respectively. The bedrock is mainly composed of "Vosgian sandstone" and conglomerate. These rocks are from the Permian and Trias inferior (Bundsanstein) (Nedeltcheva *et al.*, 2006 and Thomas *et al.*, 1999). The Vosgian sandstone forms the largest and the hardest parts of the tabular landscape. These sandstones are rich in quartz (76-83%), which is coated by dry siliceous and iron cement, and depleted in alkaline and



**Figure 1.** Map of the Senones catchment in the Vosges Mountains with locations of lysimeters and stream sampling sites.

alkaline earth cations (Na, Mg, Ca). Soils are sandy, acid ( $\text{pH} \sim 4.4 \pm 0.4$ ) and dominated by a base-poor oxic Podzosol and Rankosol (according to the FAO Soil Classification). About 52 % of the study area (222 ha), corresponding to the steep slopes, is covered by a mixture of conifers of spruce (*Picea Abies* L.) and fir (*Abies alba* Mill). An important grass layer composed mainly by hair grass (*Deschampsia flexuosa*) covers the top of the catchment. The herbaceous layer also contains bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and calluna (*Calluna vulgaris*) (Angeli, 2006). The sampling site is located on the top of the catchment dominated by typical forest podzosol (Figure 1). This soil present 7 horizons ( $A_0$  (0-5 cm),  $A_1$  (-5 to -25 cm),  $A_2$  (-25 to -60 cm),  $B_h$  (-60 to -65 cm),  $B_s$  (-65 cm to -95 cm),  $B_{sC}$  (-95 to -110 cm) and C (up to -110 cm) (Nys 2004; Guillet, 1972).

## 2.2 Sampling and analytical techniques

### 2.2.1 Rock, soil and extraction of the exchangeable fraction

Soil samples were collected at the end of spring, in May 2006. Characteristic soil horizons of the podzsol were sampled from 0 cm to -120 cm. Samples were air dried for two days and sieved to 2 mm prior to analyses. A<sub>0</sub> horizon as well as unweathered bedrock (Vosgian sandstone) were also sampled. All soil samples (0-5 cm) were oven dried at 65 °C for 48h and powdered using the centrifugal grinding mill (Retsch® ZM 1). They were then digested and major elements were analyzed similarly as plant samples (see below). Bulk soils and rock were digested by alkaline fusion using lithium metaborate (LiBO<sub>2</sub>), and were dissolved in diluted HNO<sub>3</sub> for major and trace element analyses using an ICP AES and the Elan 6000 Perkin® ICP MS respectively, according to methods reported by Govindarajun and Mervel (1987) and Carignan *et al.* (2001).

Three solutions have been tested (BaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl and NH<sub>4</sub>-Acetate 1M, pH7) to determine the best technique to extract the soil exchangeable fraction of Mg without releasing structural Mg, which may have a different isotope signature. For each test, about 1.5 to 2 mg of soil horizons sample was put in contact with ~20 ml of the various solutions. The mixtures were shaken for 1 h according to Simard (1993). Then, the solutions were collected after centrifugation and filtration using 0.45µm Nylon Millipore® filters. Residues were then put again twice in contact with a new solution aliquot of a similar volume. All solutions obtained after each extraction cycle were evaporated to dryness. Residues were then dissolved in diluted HNO<sub>3</sub> solution (2%) for major elements and silicon analyses using Elan 6000 Perkin® ICP MS . For further Mg isotope analyses, about 5 mg of dried soil were put in contact with 50 ml of NH<sub>4</sub>-Ac solution.

### 2.2.2 Bulk precipitations, soil solutions and stream waters

Three types of solutions were collected approximately monthly from May 2006 to April 2008. Bulk precipitations were sampled in open field using funnel collectors (Ø = 15 cm) placed 1 m above the soil surface. Funnel collectors were connected to 20-l containers for water storage. Gravitational soil solutions were continuously collected in bottles from tension-free lysimeters installed at the basis of each soil horizon. The main streamwater was sampled at the outlet of the catchment (Figure 1). All waters were stored in cleaned High Density PolyEthylene (HDPE) Nalgen® and filtered through 0.22µm Nylon Millipore® filters. The solution pH was measured in laboratory and unacidified aliquots were analysed by ICP AES for major elements (Ca, Mg, K

and Na). The remaining samples were stored in dark cool chamber for Mg isotope measurements.

### 2.2.3 Vegetation

We sampled individuals of the two species which are the most abundant in the studied site: a spruce (*Picea Abies* L.) and hair grass (*Deschampsia flexuora*). Vegetation samples were collected in May 2006 at the same time as the rock and soil sampling. For grass, the aboveground parts (leaves) and whole roots were harvested from 0 to -25 cm and 25 to 45 cm depth. For the spruce, needles and wood were harvested at 10, 130, 400 and 500 cm height respectively. Needles were separated into various age classes (1 : current needles, 2: two years old needles and 3 : three years old needles). Sapwood and bark were sampled in the trunk wood (not the cork). Fine roots (< 2mm) were collected from 0 to -25 cm and 25 to 45 cm depth. Then, all roots were washed ultrasonically with distilled water in order to remove fine grain particles derived from adjacent soil.

Prior to determination of major concentrations, all plant samples were heated to 65 °C for 48 h and powdered using a centrifugal grinding mill (Retsch® ZM 1). About 200 mg of plant powder were digested in a mixture of 6 ml of HNO<sub>3</sub> (Merk suprapur) and 2 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merk suprapur) using a microwave digestion system (Mars 5®). For roots , 20µl of HF (Merk suprapur) was added to the mixture. Major element analyses were performed by ICP AES.

### 2.2.4 Magnesium separation procedure and isotope measurements

Prior to isotope composition measurements, Mg has been separated and purified according to the procedure described in Bolou-Bi *et al.* (2009). In brief, purified Mg (~50µg) samples were obtained by ion-chromatography using successively the Bio-Rad AGMP1-X8 anion exchange and AG50W-X12 cation exchange resins. Samples were then diluted with 0.05N HNO<sub>3</sub> (at 200-250 ppb) before introduction in the mass spectrometer, the *Nu Instruments* MC-ICP-MS based at the "Ecole Normale Supérieure" (ENS, Lyon, France). Magnesium isotope compositions were measured relative to the NIST-SRM980<sub>CRPG</sub> standard solution, using the standard-sample bracketing technique. All results were then normalised to the international DSM3 standard (Galy *et al.*, 2003). Data are expressed in  $\delta$  notation as the part per thousand (‰) deviations from DSM3 composition:



$$\delta^x\text{Mg}(\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{{}^x\text{Mg}}{{}^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{Sample}}}{\left( \frac{{}^x\text{Mg}}{{}^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3}}} - 1 \right) \times 10^3$$

where  $x$  is either the mass 26 or 25. The long-term reproducibility of Mg isotope ratios estimated by repeat measurements of Cambridge-1 and DSM3 Mg standards has been used as standard deviation of all samples analyzed in this study.

### 2.2.5 Strontium separation procedure and isotope measurements

The protocol used here has been described by e.g. Brenot *et al.* (2008). Strontium was purified using the standard chemical separation technique with Eichrom Sr-Spec™ resins. Total procedural blank levels were lower than 300 pg, negligible in relation to sample Sr concentrations and to the precision of the isotopic measurements. The Sr isotopic compositions were measured using a Finnigan Mat 262 thermal ionization mass spectrometer and normalized to  ${}^{86}\text{Sr}/{}^{88}\text{Sr} = 0.1194$ . Analyses of the international reference material NIST-NBS987 measurements yielded  ${}^{87}\text{Sr}/{}^{86}\text{Sr} = 0.710182 \pm 0.000040$  (2 $\sigma$ , N = 20) in static mode and  ${}^{87}\text{Sr}/{}^{86}\text{Sr} = 0.710218 \pm 0.000020$  (2 $\sigma$ , N = 4) in dynamic mode. Uncertainties for individual  ${}^{87}\text{Sr}/{}^{86}\text{Sr}$  measurements were  $\sim 25 \times 10^{-6}$  (2SD).

## 3. Results

### 3.1. Soil profile and bedrock

#### 3.1.1. Mineralogy, major elements and Sr

Mineralogical and chemical characteristics of the investigated soil (podzol) and unweathered bedrock are given in Tables 1 and 2. Based on the < 2mm soil fraction, sand represents about 76% to 82% of the soil skeleton, whereas silt and clays represent up to 10% and 7% respectively. The mineralogical analysis of the fine fraction (< 25 $\mu\text{m}$ ) indicates that illite, vermiculite and kaolinite are the most dominant secondary clays. These three minerals represent  $\sim 20\%$  to 52% of the whole clay content. In A<sub>2</sub>, B<sub>h</sub> and B<sub>s</sub> horizons, all clays have approximately the same content ( $\sim 30\%$  of soil clay content). Kaolinite and illite, with 52 and 45% of whole clay content respectively most abundant in the deepest soil B<sub>s</sub>C and C horizons. Chlorite-vermiculite peaks were observed in soil profile, especially in B<sub>s</sub> horizon. In the unweathered rock, micas constitute the sole (100%) mineral in the fine fraction.

**Table 1:**  
Selected chemical and physical properties of a typical soil profile.

Sample	Depth	Horizon	pH-H <sub>2</sub> O	Organic			--Particle-size distribution--			-----Mineral composition of fraction < 25µm-----					
				matter	Org. C	Org. N	C/N	Clay	Silt	Sand	Mica	Chlorite- Vermiculite	Illite- Vermiculite	Illite	Kaolinite
	(cm)			(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Soil	-15	A1	4.2	109	62.8	2.5	24.8	6.9	10.3	82.9	0	0	0	0	0
Soil	-30	E	4.3	43.4	25.1	1.0	24.6	8.4	10.3	81.4	0	0	30	33	37
Soil	-55	B <sub>h</sub>	4.4	39.7	22.9	0.9	25.2	13.0	10.6	76.5	0	21	33	25	22
Soil	-60	B <sub>s</sub>	4.6	18.5	10.7	0.4	27.2	11.7	12.2	76.2	0	13	25	28	33
Soil	-85	C	4.6	11.3	6.5	0.3	21.9	11.6	12.2	76.3	0	11	20	32	34
Soil	-120	C	nd*	nd*	nd*	nd*	nd*	7.3	14.5	78.3	0	3	0	45	52
Bedrock	-	-	-	-	-	-	-	nd*	nd*	nd*	100	0	0	0	0

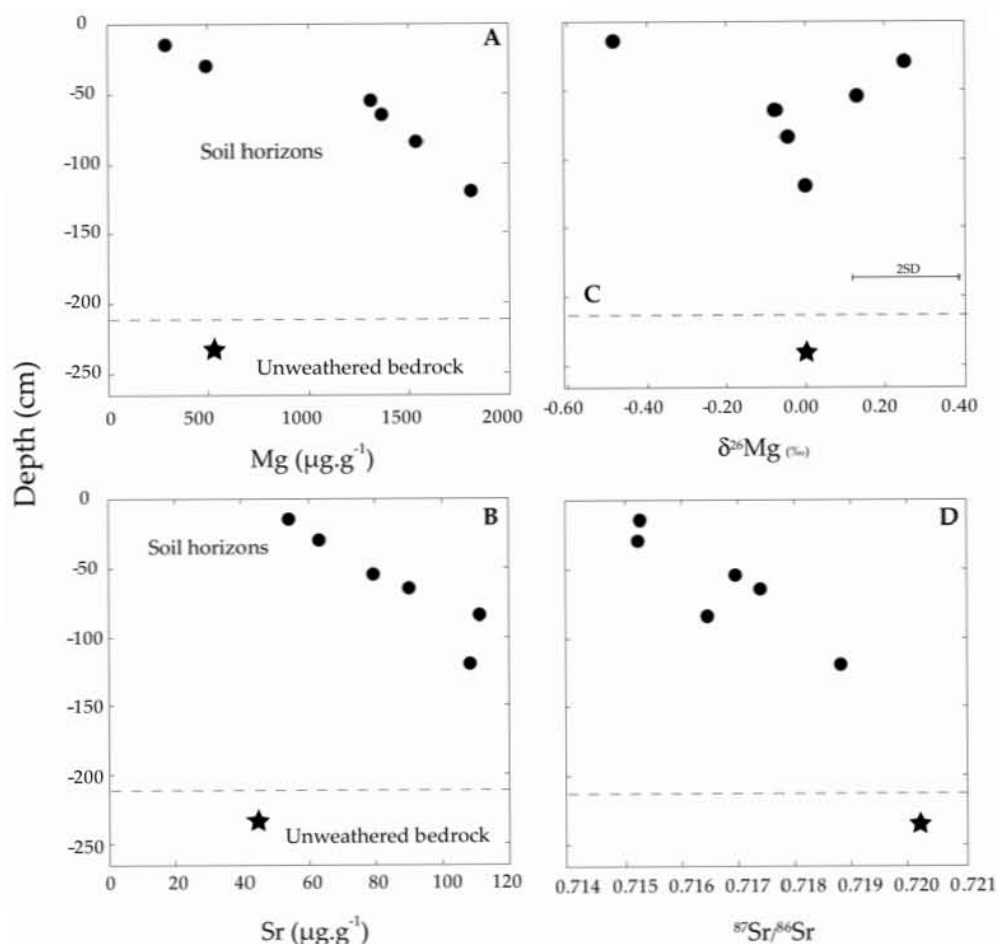
(\*) nd: not determined

**Table 2:**  
Average element composition (mass %) of soil horizon and the bedrock.

Sample	Depth	Horizon	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	Sr	δ <sup>26</sup> Mg	N	<sup>87</sup> Sr/ <sup>86</sup> Sr	87/86 err.
	(cm)		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	ppm	± 0.14 (‰)			
Soil	-15	A1	85.22	1.70	0.26	0.00	0.05	0.04	< L.D.	0.51	0.18	54.28	-0.48	1(3)	0.7153	0.00001
Soil	-30	E	90.93	2.54	0.48	0.00	0.08	< L.D.	< L.D.	0.69	0.21	63.29	0.25	1(3)	0.7152	0.00002
Soil	-55	B <sub>h</sub>	84.86	5.30	1.76	0.01	0.22	< L.D.	< L.D.	1.19	0.23	79.79	0.13	1(3)	0.7170	0.00002
Soil	-60	B <sub>s</sub>	86.74	5.64	1.53	0.01	0.23	< L.D.	0.07	1.35	0.21	90.46	-0.08	1(3)	0.7174	0.00001
Soil	-85	C	87.57	6.37	1.24	0.02	0.26	< L.D.	< L.D.	1.46	0.19	111.6	-0.05	1(3)	0.7165	0.00001
Soil	-120	C	86.09	7.39	1.26	0.01	0.30	< L.D.	< L.D.	1.47	0.21	108.4	0.00	1(3)	0.7188	0.00002
Bedrock	-	-	92.74	3.40	0.32	0.00	0.09	0.34	0.13	1.66	0.11	45.01	nd	nd	0.7202 <sup>a</sup>	0.00001

(a) Data from Angeli (2006).

The organic matter content decreases from the A<sub>1</sub> horizon (119 g.kg<sup>-1</sup>) to C horizon (11 g.kg<sup>-1</sup>). Similarly, the organic carbon content decreases with depth (Table 1). In all bulk soil samples the average SiO<sub>2</sub> content is 87%±2%, while it is ~93% in unweathered rocks. Aluminium is the second-most abundant element and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> increases regularly from 1.7% in the A<sub>1</sub> horizon to 7.4% in the C horizon. For comparison, the unweathered bedrock displays ~ 3% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Among the base cations, potassium is the most dominant element of the whole profile. Its content decreases from 0.5% to ~1.5% with depth from A<sub>1</sub> to C horizon. All soil samples display K content lower than fresh rock, which exhibits an average K content of 1.7%. For magnesium, the first two horizons are depleted (MgO < 0.08%) relative to bedrock (MgO = 0.09%), while the rest of the profile is enriched in Mg (MgO > 0.2%). More precisely, Mg content regularly increases from the A<sub>1</sub> horizon (0.05%) to the deepest horizon (0.30%) (Figure 2A). Strontium content also increases from 54 µg.g<sup>-1</sup> in the A<sub>1</sub> horizon to ~108 µg.g<sup>-1</sup> in the deepest horizons (Figure 2B). Percents of CaO and Na<sub>2</sub>O in the soil samples are often lower than analytical uncertainties (0.02 and 0.07% respectively). The unweathered bedrock contains ~0.3% CaO and 0.1% Na<sub>2</sub>O.



**Figure 2.** Magnesium concentration (A), Strontium concentration (B), Mg isotope compositions (C) and <sup>87</sup>Sr/<sup>86</sup>Sr ratio of bulk soil according to depth. The uncertainty (2SD) on δ<sup>26</sup>Mg is 0.14‰.

The behaviour of mobile cations can be better quantified by normalising to refractory elements such as Ti, Zr or Cr (e.g. Chadwick *et al.*, 1990; Kurtz *et al.*, 2000). In the Senones soil profile, Ti appears to be the least mobile elements (Table 2). Cations (Si, Al, Fe, K and Mg) depletion or gain factors relative to Ti have been calculated using the following relation:

$$\tau_{m,w} = \left( \frac{C_{m,w}}{C_{m,p}} \times \frac{C_{i,w}}{C_{i,p}} \right) - 1$$

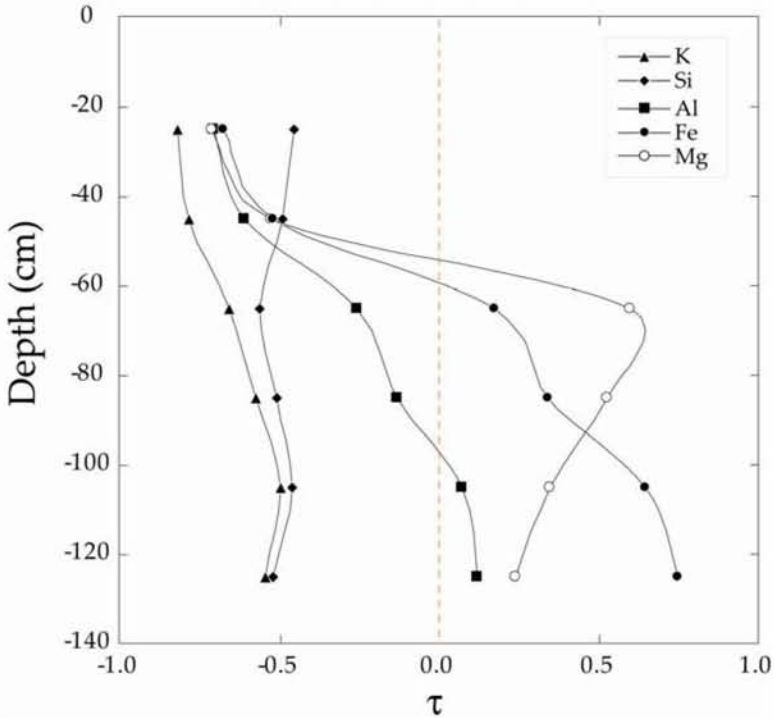
where *m* and *i* refer respectively to the mobile elements and immobile one (Ti) and C their concentrations in the soil horizons (*w*) and parent material (*p*).

The results of the calculated losses or gains of cations ( $\tau$ ) in the soil profile according to the equation (1) are presented on Figure 3. Soil profile highlights a narrow variation in  $\tau(\text{Si})$  ranging from about -0.46 to -0.56. As detailed above, extensive loss of potassium is conspicuous (from 80% in A<sub>1</sub> horizon to 50% in deepest horizon). Gains and /or losses of Al, Fe and Mg from the mineral fraction follow a similar trend in the soil profile (Figure 3). The  $\tau(\text{Al})$ ,  $\tau(\text{Fe})$  and  $\tau(\text{Mg})$  value are negative in the upper horizons (A<sub>1</sub> and in A<sub>2</sub>) and positive in the other horizons (Figure 3). This indicates that these cations are lost from surface horizons and gained (accumulated) in the lower horizons, reflecting either clay and sesquioxide formation and/or cation transport in podzsol (e.g. Oh and Richter, 2005). Strong relationships were found between  $\tau(\text{Mg})$  and  $\tau(\text{Al})$  ( $R^2 = 0.99$ ),  $\tau(\text{K})$  ( $R^2 = 0.96$ ) and  $\tau(\text{Fe})$  ( $R^2 = 0.69$ ) reflecting clay fraction formation in soil horizons. MgO also positively correlates with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> in the soil profile (Figure 4).

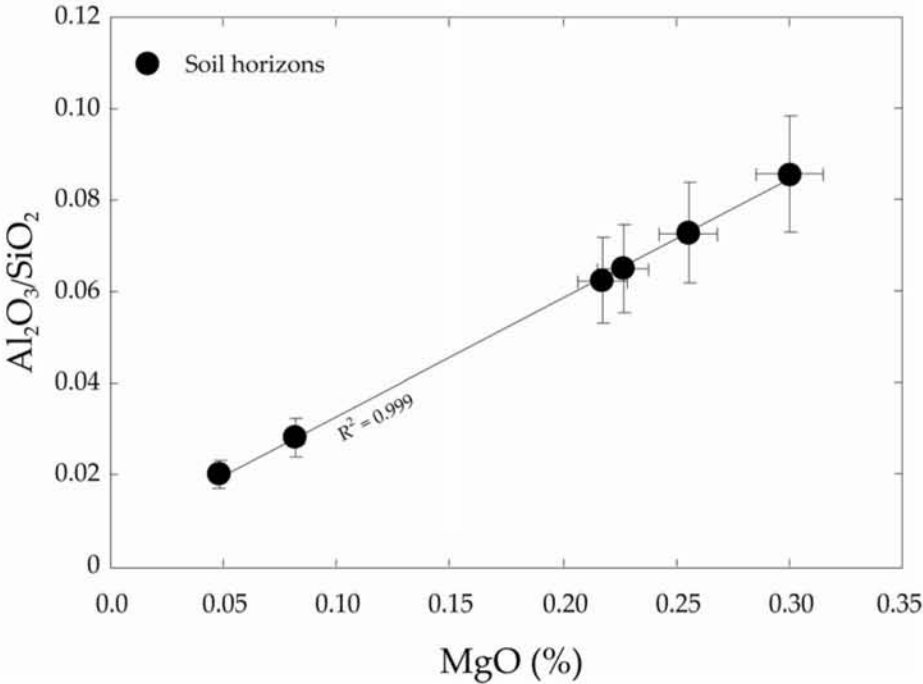
### 3.1.2. Exchangeable fractions

Using NH<sub>4</sub>-Acetate (1M at pH 7), about 70% of the exchangeable Mg fraction is leached during the first extraction step. The second step allows the leaching of all the remaining exchangeable Mg (~30%) since no Mg is leached during the third step. Silicon concentrations measured in solutions were always similar to the blank (<0.05) even after the third extraction step. It was therefore considered that the procedure using NH<sub>4</sub>-Ac does not induce the release of structural Mg from soil minerals. Using BaCl<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub>Cl solutions, no Si was released in solution (<0.05%), but Mg still continues to be leached after the last step. Even if globally the three techniques lead to very similar results, only exchangeable Mg concentrations and isotopic compositions obtained using the 1 M NH<sub>4</sub>-Ac solution were discussed in the following section (Table 3). The concentrations of exchangeable Mg decrease from the A<sub>1</sub> horizon (5.88  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) to the deepest one (0.39  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) with a peak in B<sub>s</sub> horizon (3.75  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). The highest concentration of

exchangeable strontium was measured in the A<sub>1</sub> horizon (0.31 μg.g<sup>-1</sup>). Then it decreases and remains constant in the rest of soil profile (below 0.07 μg.g<sup>-1</sup>).



**Figure 3.** Calculated losses or gains of cations ( $\tau$ ) in the soil profile relative to titanium (see text).



**Figure 4.** Influence of the litter degradation input during the bedrock (sandstone) weathering in the soil profile.

**Table 3 :**

Majors cations (Mg, Ca, K and Na) and Sr concentrations and Mg isotopes compositions measured in NH<sub>4</sub>-Ac leached solutions from soil horizons of the Val de Senones catchment.

Samples description		Mg	Ca	K	Na	Sr	Fe	Mn	Al	Si	$\delta^{26}\text{Mg}$	$\pm 2\sigma$	N
Type	Depth (cm)	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	‰	‰	
Ac-NH <sub>4</sub> extrated	-15	5.88	32.94	13.99	10.01	0.31	0.62	0.07	1.19	2.28	-0.67	0.24	2 (5)
Ac-NH <sub>4</sub> extrated	-30	1.72	9.16	5.34	6.28	0.07	0.38	0.05	1.08	1.99	-0.52	0.16	2 (5)
Ac-NH <sub>4</sub> extrated	-55	3.75	9.15	12.47	8.74	0.08	6.01	0.19	7.22	1.38	-0.42	0.07	2 (6)
Ac-NH <sub>4</sub> extrated	-60	0.39	1.67	6.08	8.40	<ld	0.40	0.31	13.14	2.47	-0.95	0.31	2 (4)

### 3.1.3. Mg and Sr isotope compositions

The A<sub>1</sub> horizon displays the lowest  $\delta^{26}\text{Mg}$  value (-0.48‰) of the soil profile. Then, Mg isotope compositions define a peak towards heavier compositions in the A<sub>2</sub> and B<sub>h</sub> soil horizons, with respective  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of 0.25‰ and 0.13‰ (Figure 2C). In the deeper mineral horizons (B<sub>s</sub>, B<sub>s</sub>C and C),  $\delta^{26}\text{Mg}$  remains constant close to 0‰ which is the value obtained for the sandstone. Except for the upper soil horizon (A<sub>1</sub>) which is enriched in organic matter,  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of Senones soil samples are within the published range for soils developed on silicate rocks (0.11‰ to 0.02‰, Tipper *et al.*, 200; Brenot *et al.*, 2008). The sandstone analysed in this study displays higher  $\delta^{26}\text{Mg}$  relative to estimates for continental crust (-0.75‰ to -0.42‰, Bolou-Bi *et al.*, 2009; Brenot *et al.*, 2008; Tipper *et al.*, 2006 and Young and Galy, 2004). It is however closed to the shale isotope compositions (0.03‰, Teng *et al.*, 2007). The Mg exchangeable fractions display lower  $\delta^{26}\text{Mg}$  values, ranging from -0.67‰ to -0.95‰, relative to bulk soil samples (Table 4). The  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios of bulk soil increase regularly from 0.7153 in the A<sub>1</sub> horizon to 0.7172 in the deepest soil horizon (Figure 2D). All soil  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios values are lower than the value of 0.7202 determined for the corresponding bedrock (Angeli, 2006). In contrast with MgO, there is no correlation between  $\delta^{26}\text{Mg}$  and clay content,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$  or  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ .

## 3.2. Water samples

### 3.2.1. Precipitations

Na is the main cation in open field precipitations, with an average concentration of 0.25 mg.l<sup>-1</sup> ( $n = 6$ ) and a slight peak in winter samples relative to summer samples (Table 4). For the others cations, no seasonal variation has been observed. Calcium is the second major cation, with an average concentration of 0.12 mg.l<sup>-1</sup>. K and Mg display similarly concentration in precipitations, with respective mean concentration of 0.07 and 0.04 mg.l<sup>-1</sup>. Concentrations of strontium are on average 0.50 µg.l<sup>-1</sup>. Our results are consistent, within uncertainties with published values reported for the same catchment (see Angeli, 2006). Strontium concentrations in precipitations are lower than those reported by Probst *et al.* (2000) (1.1 µg.l<sup>-1</sup>) for other small granitic catchment located in the Vosges Mountains.

The Na-normalized ratios (Ca/Na, Mg/Na and K/Na, µM/µM) intercorrelate together, with  $r^2 > 0.995$ . Ca/Na range between 0.02 and 4, K/Na between 0.1 and 2.3 and Mg/Na between 0.1 and 1.3. Comparing all Na-normalized ratios, the lowest values are obtained for winter samples (November to January). Part of this signature might therefore be derived from anthropogenic inputs, during road-salt (NaCl) applications in the area.

**Table 4:**

Majors cations (Mg, Ca, K and Na) and Sr concentration, Mg and Sr isotopes compositions measured in the water samples (precipitations, soil solutions and streamwater) in the Val de Senones catchment. nd : not determined.

Sample description Name	depth (cm)	Date	Mg mg.l <sup>-1</sup>	Ca mg.l <sup>-1</sup>	K mg.l <sup>-1</sup>	Na mg.l <sup>-1</sup>	Sr µg.l <sup>-1</sup>	δ <sup>26</sup> Mg <sub>DMS3</sub>	δ <sup>25</sup> Mg <sub>DMS3</sub>	<sup>87</sup> Sr/ <sup>86</sup> Sr	1σ*10 <sup>4</sup>
<i>Open field precipitation</i>											
NF	Snow	01/04/2006	nd	nd	nd	nd	nd	-0.38	-0.22	nd	nd
PHC	100	01/08/2006	0.04	0.21	0.11	0.03	nd	-0.74	-0.38	nd	nd
PHC	100	21/09/2006	0.03	0.18	0.10	0.04	0.5	-0.50	-0.26	0.7097	0.12
PHC	100	27/11/2006	0.04	0.03	0.05	0.35	0.8	-0.63	-0.33	0.7104	0.15
PHC	100	05/12/2006	0.05	0.13	0.00	0.42	0.4	nd	nd	nd	nd
PHC	100	10/01/2008	0.05	0.02	0.06	0.52	0.3	nd	nd	nd	nd
PHC	100	29/04/2008	<ld	0.16	0.07	0.15	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Soil solutions</i>											
ST6-1	-20	12/05/2006	0.08	0.32	0.63	0.43	1.9	-1.08	-0.60	nd	nd
ST6-1	-20	10/08/2006	0.14	0.55	0.26	0.48	nd	-0.15	-0.09	0.7137	0.17
ST6-1	-20	01/09/2006	0.10	0.49	0.14	0.48	nd	-0.53	-0.27	nd	nd
ST6-1	-20	21/09/2006	0.20	0.79	0.25	0.60	nd	-0.08	-0.04	0.7138	0.08
ST6-1	-20	27/11/2006	0.18	0.56	0.34	0.41	1.8	-0.54	-0.26	nd	nd
ST6-1	-20	01/12/2006	0.14	0.50	0.28	0.54	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-1	-20	10/01/2008	0.13	0.35	0.39	0.52	nd	-0.10	-0.08	0.7137	0.13
ST6-1	-20	29/04/2008	0.05	0.29	0.55	0.54	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-2	-40	12/05/2006	0.05	0.27	0.53	0.42	1.5	-0.88	-0.46	nd	nd
ST6-2	-40	10/08/2006	0.08	0.46	0.56	0.27	nd	-0.20	-0.13	nd	nd
ST6-2	-40	21/09/2006	0.08	0.59	0.24	0.46	nd	-0.05	-0.04	nd	nd
ST6-2	-40	27/11/2006	0.05	0.29	0.15	0.44	nd	-0.13	-0.07	nd	nd
ST6-2	-40	01/12/2006	0.05	0.35	0.14	0.45	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-2	-40	10/01/2008	0.03	0.13	0.23	0.54	1.5	-0.44	-0.24	nd	nd
ST6-2	-40	29/04/2008	0.01	0.16	0.32	0.55	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-3	-70	12/05/2006	0.06	0.28	0.57	0.42	1.5	-0.99	-0.54	nd	nd
ST6-3	-70	10/08/2006	0.06	0.36	0.34	0.52	nd	-0.71	-0.36	0.7148	0.18



ST6-3	-70	21/09/2006	0.08	0.47	0.63	0.49	nd	0.06	0.01	0.7152	0.09
ST6-3	-70	27/11/2006	0.08	0.29	0.29	0.34	1.8	-0.40	-0.22	0.7147	0.22
ST6-3	-70	01/12/2006	0.08	0.36	0.35	0.39	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-3	-70	10/01/2008	0.05	0.15	0.41	0.45	nd	-0.49	-0.26	nd	nd
ST6-3	-70	29/04/2008	0.01	0.17	0.46	0.50	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-6	-160	12/05/2006	0.06	0.27	0.64	0.43	1.3	-1.50	-0.80	nd	nd
ST6-6	-160	10/08/2006	0.10	0.41	0.81	0.52	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-6	-160	21/09/2006	0.08	0.35	0.78	0.52	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-6	-160	27/11/2006	0.07	0.24	0.43	0.37	1.0	0.06	0.03	0.7148	0.37
ST6-6	-160	01/12/2006	0.07	0.35	0.31	0.47	nd	nd	nd	nd	nd
ST6-6	-160	29/04/2008	0.01	0.15	0.35	0.55	nd	-0.37	-0.19	nd	nd
<i>Stream water</i>											
D011-5		12/05/2006	0.28	0.63	0.72	0.69	nd	-0.85	-0.45	nd	nd
D011-5		10/08/2006	0.18	0.54	0.52	0.65	nd	-0.08	-0.06	0.7200	0.25
D011-5		01/09/2006	0.18	0.54	0.57	0.70	nd	nd	nd	0.7194	0.11
D011-5		21/09/2006	0.24	0.59	0.62	0.75	4.15	-0.19	-0.12	0.7196	0.23
D011-5		27/11/2006	0.25	0.57	0.85	0.59	4.65	-0.19	-0.10	nd	nd
D011-5		10/01/2008	0.17	0.47	0.45	0.68	4.10	-0.72	-0.37	0.7185	0.16
D011-6		29/04/2008	0.18	0.42	0.45	0.64	nd	-0.42	-0.22	nd	nd

For the first time, Mg isotope compositions of rainwater are presented (Table 4). They range from  $-0.74 \pm 0.14\text{‰}$  to  $-0.50\text{‰}$ , with an average value of  $-0.62 \pm 0.24\text{‰}$ . One snow sample also exhibits a  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  $-0.39 \pm 0.14\text{‰}$ . These values are higher than the seawater  $\delta^{26}\text{Mg}$  value ( $-0.83\text{‰}$ ) which was reported for glacial ice in Iceland (Pogge Von strandmann *et al.*, 2008). The  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios of corresponding precipitations vary from 0.7097 to 0.7100. These values are also higher than the seawater present day  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  (0.70923, Depaolo and Ingram, 1985). Similar  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  range (0.709 to 0.710) for open field precipitations are documented for other small catchments in the Vosges Mountains (Probst *et al.*, 2000).

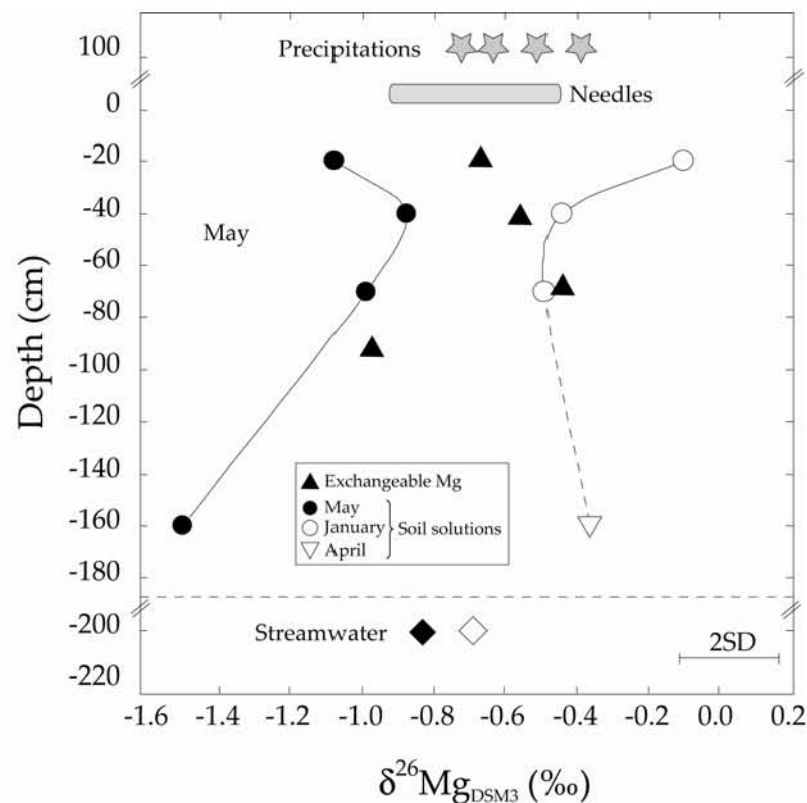
### 3.2.2. Soil solutions

Cation concentrations in all soil solutions are on average 2 to 6 times higher than in precipitations, whatever the sampling depth (Table 4). Na displays the highest concentration with a mean value of  $0.47 \text{ mg.l}^{-1}$ . Among major cations, Mg displays the lowest concentrations, with an average of  $0.08 \text{ mg.l}^{-1}$ . Strontium concentrations display a narrow range, with an average concentration of  $1.56 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ . For the same catchment, Angeli (2006) reported similar concentrations in soil solution. The Na-normalized ratios (Ca/Na, Mg/Na and K/Na) are in the lower part of the range exhibited by precipitations. These Na-normalized ratios are systematically lower than 1.2, 1 and 0.4 for K, Ca and Mg respectively. Mg/Na are similar to ratios published for rivers draining silicate rocks ( $0.24 \pm 0.12$ ), while Ca/Na are slightly higher than the ratio determined by other silicate rivers ( $0.35 \pm 0.24$ ) (e.g. Gaillardet *et al.*, 1999).

Soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  highlight a range of  $1.6\text{‰}$ . The lowest  $\delta^{26}\text{Mg}$  values were determined during the campaign of May. These  $\delta^{26}\text{Mg}$  values range between  $-1.05\text{‰}$  in the soil solution sampled in A<sub>1</sub> horizon and  $-1.50\text{‰}$  for the deepest one ( $-160 \text{ cm}$ ). Soil solution of the January sampling campaign indicate a reverse trend relative to the May campaign (Figure 5). Soil solutions display at this period  $\delta^{26}\text{Mg}$  values from  $-0.10\text{‰}$  in A<sub>1</sub> horizon to  $-0.49\text{‰}$  in B<sub>s</sub> horizon. The  $\delta^{26}\text{Mg}$  of soil solutions sampled at other seasons plot between these two contrasted periods. Compared to corresponding bulk soil samples ( $-0.48\text{‰}$  to  $0.25\text{‰}$ ), soil solutions display lower  $\delta^{26}\text{Mg}$  values, except for the more superficial soil solution sampled in summer.  $\delta^{26}\text{Mg}$  does not correlate with Mg/Na, K/Na or Ca/Na ratio, suggesting that Mg isotope compositions of soil solutions cannot be explained by a simple binary mixing. The corresponding exchangeable Mg fractions display relatively high  $\delta^{26}\text{Mg}$  values, increasing from  $-0.67\text{‰}$  in the A<sub>1</sub> horizon to  $-0.42\text{‰}$  in the B<sub>h</sub> horizon. Then,  $\delta^{26}\text{Mg}$  decrease to reach  $-0.97\text{‰}$  in the B<sub>s</sub> horizons (Figure 5).

Strontium isotope compositions of soil solutions slightly increase from the A<sub>1</sub> horizon to the deepest mineral horizon (Table 5). No significant variation occurs according to the season.

The  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios range from 0.71365 to 0.71379 for upper A<sub>1</sub> horizon and from 0.71469 to 0.71522 for deeper mineral horizons (B<sub>s</sub> and C). Solutions  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios are lower compared to bulk soil  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios, but higher than for precipitations. Compared to published data, measured  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  are in the range found by Angeli (2006) (0.712 to 0.728) for streamwater draining soils developed on sandstone and granites in the Vosges Mountains. There is a positive relationship between  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  and Mg/Na or Sr/Na.



**Figure 5.** Soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  as a function of depth, at two sampling dates: one during the plant growth period (May) in filled circles and the second during the dormancy periods (January-April) in open circles.

### 3.2.3. Streamwater

In the stream, all measured cations including Sr, are enriched by a factor 1.5 to 2.8 relative to soil solutions collected in the Senones catchment. Sodium and potassium are the dominant cations in the streamwater with average concentrations of 0.67 mg.l<sup>-1</sup> and 0.60 mg.l<sup>-1</sup> ( $n=28$ ) respectively, close to those reported by Angeli (2006) for an adjacent catchment (0.63 to 0.71 mg.l<sup>-1</sup> for K and 0.55 to 0.63 mg.l<sup>-1</sup> for Na). Calcium has an average concentration of 0.54 mg.l<sup>-1</sup>, significantly lower than those reported by Angeli (2006) (0.72 to 1.33 mg.l<sup>-1</sup>). Magnesium displays the lowest concentrations with an average value 0.21 mg.l<sup>-1</sup>, also lower than reported by Angeli (2006). Strontium concentrations are relatively constant with an average value 4.30  $\mu\text{g.l}^{-1}$  ( $n=3$ ). Ca/Na, Mg/Na, K/Na and Sr/Na are systematically lower than 0.6, 0.8 and 0.2

respectively, similarly as soil solutions (<1). These ratios are closed to typical Na-normalized ratio displayed by rivers draining silicates (e.g. Gaillardet et al. 1999; Moon et al. 2007), strongly suggesting a negligible contribution from a carbonate component.

Streamwater  $\delta^{26}\text{Mg}$  range between -0.85‰ and -0.08‰ (Table 4). This range is compatible with published values for waters draining similar lithologies, (-0.7‰ to -3.83‰, Brenot et al., 2008; De Villiers et al., 2005; Tipper et al., 2006a; Tipper et al., 2008), except in summer, where the highest  $\delta^{26}\text{Mg}$  are measured.  $\delta^{26}\text{Mg}$  do not correlate with various indices of lithology (i.e. Na-normalized ratios). Streamwater  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios vary in a restricted way and are more radiogenic than soil solutions (from 0.7185 to 0.7200, Table 5). These ratios are closed to those determined in other stream and river waters of the Vosges Mountains, (e.g. Angeli, 2006, Probst et al., 2000; Brenot et al, 2008).

### 3.3. Vegetation

#### 3.3.1 Spruce

Magnesium concentrations in spruce needles range from ~0.57 to ~0.91 mg.g<sup>-1</sup> of dry matter (DM). This is significantly higher than Mg in wood (~0.07 to 0.09 mg.g<sup>-1</sup> DM) and in roots (~0.48 to 0.61 mg.g<sup>-1</sup> DM). Whatever the sampling height, Mg concentration in needles decrease from the young needles (1) to the old needles (3), similarly to K but on contrary to Ca (Table 5). These processes are classically observed and well documented (Andrews *et al.*, 1999; Dambrine *et al.*, 1991; Eschrich *et al.*, 1988; Wyttenbach *et al.*, 1995). Mg concentrations in the various plant compartments are about 1 to 8 and 2 to 12 times significantly lower than Ca and K concentrations respectively. Strontium concentrations in needles range from 0.28 to 0.33 µg.g<sup>-1</sup> DM, but not enough measures were made for studying the internal Sr dynamic (Table 6). However, Sr/Na ratios in the aboveground plant compartment are low (0.1) and a strong correlation was found between Mg/Na and Sr/Na ( $r^2 = 0.9541$ ).

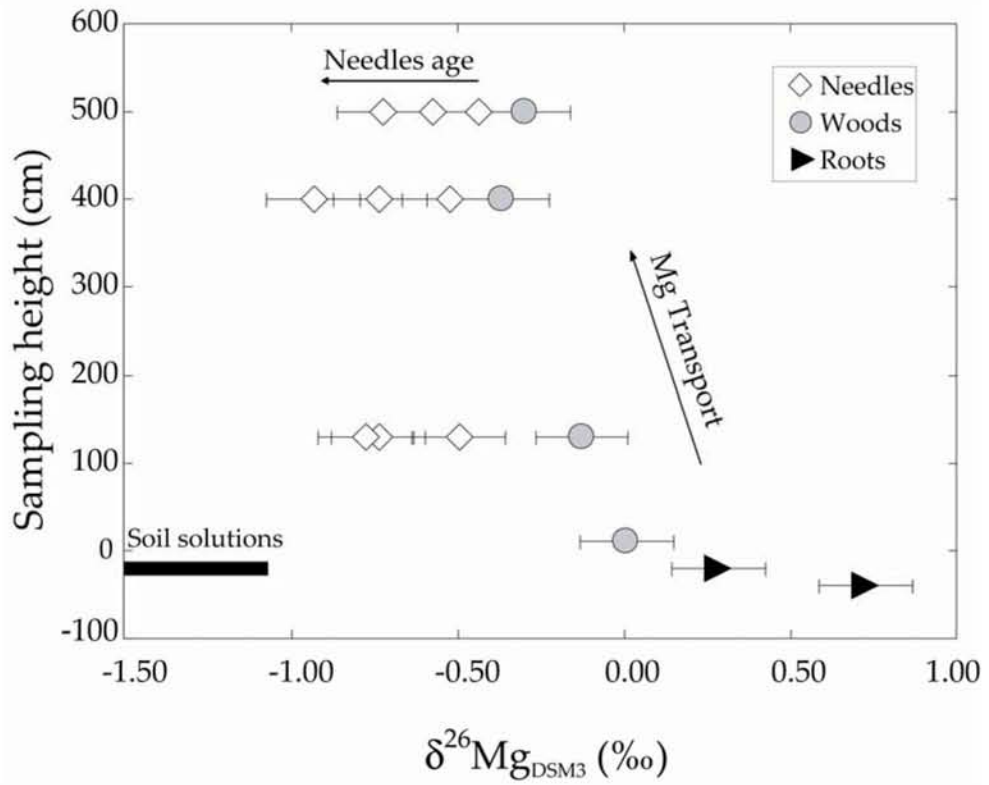
Mg isotope compositions of plant harvested in May 2005, indicate two systematic trends: (1) roots display  $\delta^{26}\text{Mg}$  (0.73‰ and 0.28‰) significantly higher than  $\text{NH}_4\text{-Ac}$  exchangeable solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  and relative to soil solution (Figure 6). Then, the light Mg isotopes are preferentially transferred towards aboveground compartments (wood and needles). This systematic has been observed in experimental plant cultures (Black et al., 2008; Bolou-Bi et al., accepted). The needles have the lowest  $\delta^{26}\text{Mg}$  values (Table 6). For each sampling height,  $\delta^{26}\text{Mg}$  increase systematically from the old needle (3) to young needle (1) (Figure 7). Moreover, all needles of similar age display similar  $\delta^{26}\text{Mg}$ , within uncertainties, at all heights.

**Table 5:**

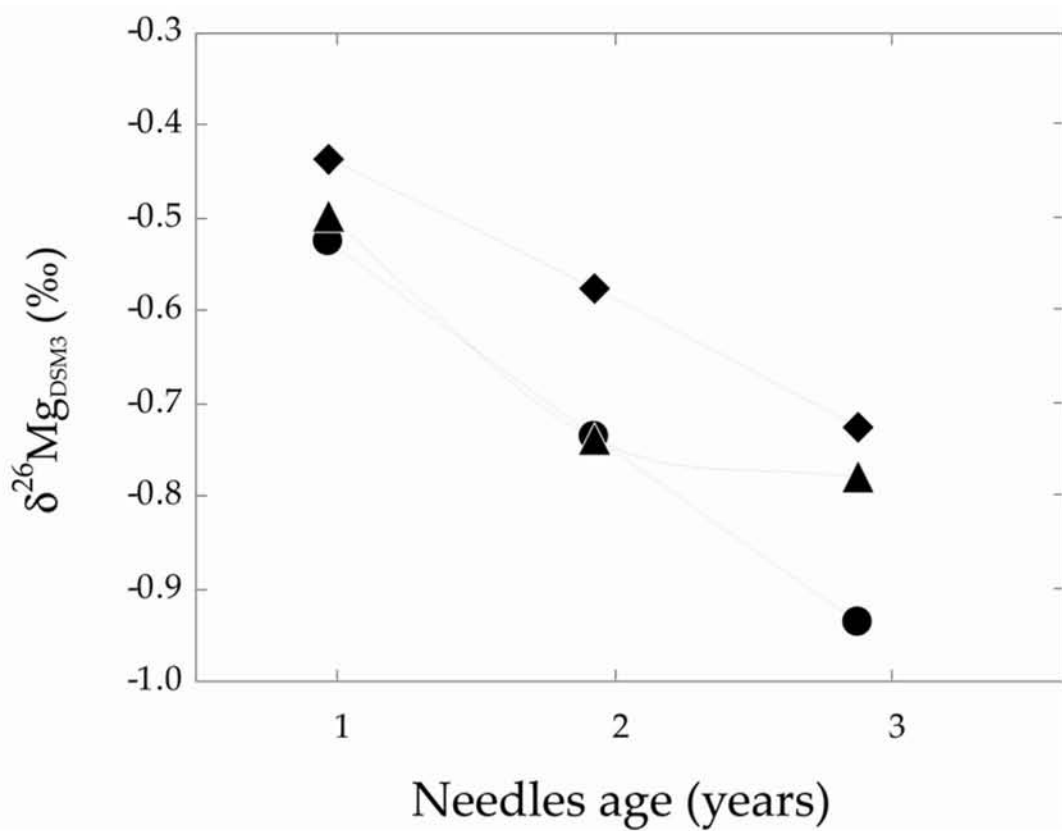
Majors cations (Mg, Ca, K and Na) and Sr concentrations, Mg and Sr isotopes compositions measured in vegetation samples (roots, woods, needles and leaves) and in forest floor sample in the Val de Senones catchment.

Plant species	Sample	Description		Mg	Ca	K	Na	Sr	$\delta^{26}\text{Mg}$	$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	$1\text{s}\cdot 10^4$
		depth (cm)	age*	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\pm 0.14\text{‰}$	nd	nd
<b>Spruce</b>	<i>Needles</i>	500	<i>n</i>	0.91	3.22	5.57	0.08	0.0028	-0.44	0.7134	0.11
		500	<i>n+1</i>	0.77	4.21	6.07	0.14	nd**	-0.57	nd	nd
		500	<i>n+2</i>	0.79	4.74	5.42	0.20	0.0031	-0.72	0.7133	0.14
		400	<i>n</i>	0.72	2.91	5.04	0.08	nd	-0.52	nd	nd
		400	<i>n+1</i>	0.62	4.34	5.30	0.16	nd	-0.73	nd	nd
		400	<i>n+2</i>	0.57	4.74	5.32	0.14	nd	-0.93	nd	nd
		130	<i>n</i>	0.87	3.57	4.37	0.06	0.0033	-0.49	0.7133	0.07
		130	<i>n+1</i>	0.77	4.88	4.82	0.12	nd	-0.74	nd	nd
	130	<i>n+2</i>	0.78	5.58	4.56	0.15	0.0029	-0.78	0.7132	0.09	
	<i>Woods</i>	10	-	0.09	0.43	0.70	0.03	nd	0.01	nd	nd
		130	-	0.07	0.53	0.76	0.03	nd	-0.13	nd	nd
		400	-	0.09	0.55	0.91	0.07	nd	-0.37	nd	nd
		500	-	0.09	0.55	1.20	0.07	nd	-0.30	nd	nd
	<i>Roots</i>	-20	-	0.61	1.85	1.64	0.05	0.013	0.28	0.7140	0.04
-40		-	0.48	1.23	2.30	0.06	0.051	0.73	0.7152	0.09	
<b>Hair grass</b>	<i>Leaves</i>	50	-	0.11	0.50	1.33	<ld	nd	-0.49	nd	nd
	<i>Roots</i>	-20	-	0.94	1.06	7.77	<ld	nd	-0.22	nd	nd
<b>Forest floor</b>	<i>forest floor</i>	-5	-	0.30	0.80	0.92	0.08	nd	-0.20	0.7150	0.04

(\*) year : n is the current needles, n+1 and n+2 corresponds to the one year and two years needles old. (\*\*) nd: not determinate.  
The uncertainties on K, Ca and Mg measured by ICP AES are 10%.



**Figure 6.**  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured in the various organs of the young spruce sampled in the Senones catchment.



**Figure 7.** Systematic variation in the  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of needles at four heights, increasing from old needles to young needles.

The  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio of roots increases from a value of  $0.714\pm 0.0018$  in the  $A_1$  horizon to  $0.715\pm 0.0009$  in the  $A_2$  horizon. The deepest root has not been analysed but this trend of  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio is similar to those found by Poszwa et al., (2001) and reflect available Sr for plant in soil. The  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio of roots are higher than the  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios measured in needles showing a narrow range of variation with an average value of  $0.7133\pm 0.0001$  ( $n = 4$ ). Plant  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios are significantly higher than precipitation isotope composition of (0.7100), indicating that most of the Sr taken up by trees coming from available Sr in the very superficial horizon ( $A_0$ ) for which Sr isotopic composition was not determined.

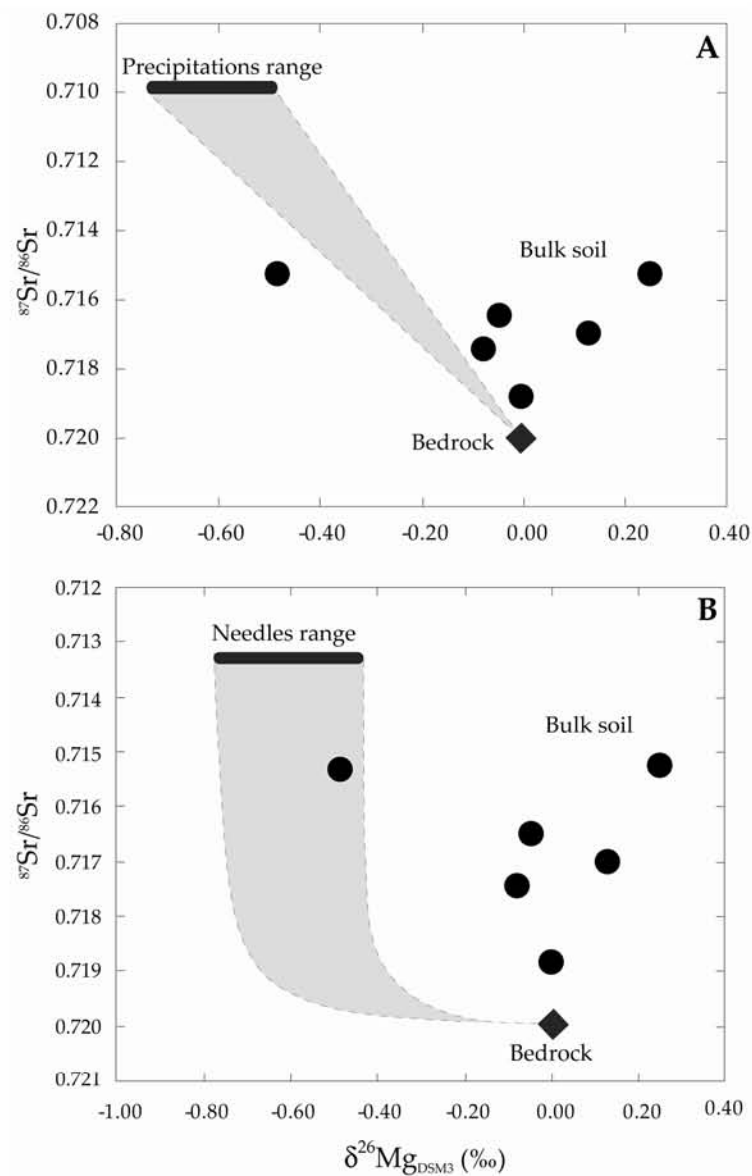
### 3.3.2. Grass and organic layer

Magnesium concentrations are  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DM and  $0.94 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  DM for shoot and roots of grass respectively (Table 6). These concentrations are 2 to 12 times lower than Ca and K concentration. Concentrations of Mg, Ca and K in the forest floor are on average  $0.30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $0.80 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $0.92 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (Table 5) respectively.  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of grass roots display an average value of  $-0.22\text{‰}$  higher than for shoots ( $-0.49\text{‰}$ ). This is also higher than for the corresponding  $\text{tNH}_4\text{-Ac}$  exchangeable solution ( $-0.9\text{‰}$  to  $-0.42\text{‰}$ ) and soil solution ( $-1.5\text{‰}$  to  $-0.88\text{‰}$ ).

Concentrations of major elements in the organic layer ( $A_0$ ) are lower than in all living plant parts (needles, shoot and roots), especially for Mg and Ca. This strongly suggests a greater depletion of Mg and Ca in the litter. Sodium concentrations remain similar in the organic layer and the living tissues with an average of  $0.08 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . The organic layer displays a  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  $-0.20\text{‰}$ , slightly higher than in living tissues (needles for spruce and shoot for grass). Compared to  $\delta^{26}\text{Mg}$  of soil solutions sampled at the same period (may) and exchangeable Mg fraction, grass display higher  $\delta^{26}\text{Mg}$  values and follow the same pattern than the spruce (from roots to shoot).

## 4. Discussion

Results show that  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured in the various plant parts (from roots to shoot and needles) are different from soil solution and precipitation isotope signatures. Moreover, an internal, systematic variation from roots to shoot is observed. Both observations add support that biological processes can fractionate Mg isotopes and can therefore affect the isotope composition of soils and soil solutions. In addition, it can be shown that a simple mixing between lithological, atmospheric and vegetation endmembers (Figure 8) cannot explain the  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured in the upper soil horizons. Processes, silicate weathering and Mg uptake and recycling by the vegetation could explain these particular features, and these aspects will be investigated in the following sections.



**Figure 8.** Simulation of a simple mixing between lithological, atmospheric and vegetation end members and data for soil samples.

## 4.1. Role of vegetation

### 4.1.1. Mg isotope systematic in plants

In this study, the range of Mg isotope compositions measured in plants and  $\delta^{26}\text{Mg}$  systematic between the Mg sources and the different plant organs are comparable to those previously published by Black *et al.* (2008), Bolou-Bi *et al.*, 2009; and Bolou-Bi *et al.*, (accepted).



First, at the root level, Mg uptake is systematically associated with enrichment in heavy isotopes. Assuming that plants take up Mg from the exchangeable fraction of soil, the  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{root-nutrient}}$  range from 0.70‰ to 1.40‰ for spruce. The  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{root-solution}}$  range from 0.20‰ to 0.45‰ for the hair grass. Then,  $\delta^{26}\text{Mg}$  decrease from roots to aboveground parts, for all the studied species. This effect is more pronounced for spruce ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{shoot-roots}} = -1.66\text{‰}$  to  $-0.72\text{‰}$ ) compared to rye grass and clover ( $-0.65\text{‰}$  to  $-0.06\text{‰}$ ). This suggests that the plant species may control the internal Mg fractionation between roots and shoots. However, Bolou-Bi et al. (accepted) indicate that another factor controlling this internal Mg isotope fractionation is the growth medium (e.g. Mg deficiency or not). The role of Mg bioavailability in the growth media seems to be important since  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{shoot-root}}$  is higher for plants grown on Mg-poor sandstones relative to plants grown on phlogopite or with a Mg-rich nutritive solution (Bolou Bi et al., accepted). Based on experimental growth of clover and rye grass, Bolou Bi et al. (accepted) found that  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{shoot-root}}$  positively correlate with K/Mg of the growth media. K/Mg range between 20 and 16 in Senones soil solutions and in the  $\text{NH}_4\text{-Ac}$  exchangeable fractions. This is high relative to the estimated adequate K/Mg ratio, which is 4-5, for an ideal plant growth (Ding *et al.*, 2006; Ologunde and Sorensen, 1982). The high  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{shoot-roots}}$  observed in this study can thus be related to the high K/Mg in solutions. It is known that the presence of high K in plant promotes Mg transport as organic complexes from old leaf toward storage tissues (roots) or younger tissues (e.g. Addiscott, 1974; Mengel *et al.*, 2001; Merhaut, 2006). Corresponding high  $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{shoot-root}}$  values are therefore coherent with a significant Mg isotope fractionation in favour of the heavy isotope during Mg adsorption or binding to organic molecules.

Spruce needle  $\delta^{26}\text{Mg}$  decrease with the needle age (Figure 6), at all tree heights. This systematic therefore appears during each new needle synthesis. Oren *et al.* (1988) and Slovik (1997) highlight that for synthesis of new needles, in spring, Mg comes from two ecophysiological sources: (1) direct uptake from soil followed by transport by the xylem sap, and (2) remobilization of Mg from different old plant organs through the phloem sap. Oren et al., (1988) underline that Mg remobilization is mainly occurring from one-year-old needles to current ones. Consequently, Mg concentrations in old needles become lower than the youngest one (Table 6). This is what is observed in this study (Table 5) as well as in published studies of Hodson and Sangster (1998), Kovarova and Vacek (2003) and Legoaster *et al.* (1991). Magnesium remobilization from old to young organs is carried out through phloem sap as organic compounds (Mengel *et al.*, 2001). The  $\delta^{26}\text{Mg}$  decrease with needle age is therefore well explained by remobilization of isotopically heavy organic molecules. The consequence of this process is that needle litter, mainly composed of old needles (e.g. Feger, 1997), would have a low  $\delta^{26}\text{Mg}$  compared with total living needles. In contrast with spruce, grass litter is expected to have  $\delta^{26}\text{Mg}$  representative of shoot isotope composition. Indeed, hair grass is an annual plant and,

about 75 to 90% of Mg taken up return annually to soil via litter (e.g. Callahan and Kucera, 1981; Morton, 1977).

#### 4.1.2. Effect of Mg biocycling on soil solution and bulk soil isotope compositions

Soil solutions are significantly lighter than the initial rock ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{solution-rock}} = -1.63$  to  $-1.01\text{‰}$ ). Compared to vegetation, these soil solutions are also isotopically lighter ( $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{solution-plant}} = -2.44$  to  $-1.60\text{‰}$ , using the two extreme  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of plant:  $-0.93\text{‰}$  and  $0.73\text{‰}$ ). The preferential heavy Mg isotope uptake by roots can explain, at least partly, the low solution  $\delta^{26}\text{Mg}$ . This process is coherent with observed seasonal variations of the upper soil solutions: during spring (May) plants develop new organs after the dormancy period of winter, by enhancing their nutriment uptake, including Mg, essential for the photosynthesis in plants. The Mg uptake by plant can explain the lightest soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  values measured during May compared to those sampled in January.

As a first approximation, the theoretical isotope composition of soil solution drained out of the root zone (between 0 and -70 cm depth) can be estimated by mass balance calculation, similarly as in Cenki-Tok *et al.* (2009) following the relation:

$$F_{Mg_i} \times \delta^{26}\text{Mg}_i = F_{Mg_j} \times \delta^{26}\text{Mg}_j + F_{Mg_{pl}} \times \delta^{26}\text{Mg}_{pl} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $F_{Mg}$  are Mg fluxes and letters  $i$ ,  $j$  and  $pl$  refer respectively to depths in the root zone where Mg is taken up by plant, to Mg fluxes drained out the upper soil layer (below -70 cm) , and to fluxes of Mg taken up by plant.

Regular measurements of Mg concentration in precipitations lead to estimate a corresponding Mg flux of  $0.81 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$ , which is roughly in agreement with the value published by Angeli (2006) ( $0.7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$ ). The second contribution of Mg to the soil is linked to litter degradation. The main component of the litter fall is grass litter because spruce and other tree are young and scattered throughout the site. This main contribution of grass to litter is also supported by the Sr isotope composition of organic layer (0-5 cm), which exhibit  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio significantly higher than needles ones. Thus, this ecosystem can be considered as grassland. In temperate grassland, Aerts (1993; 1999) estimated the production of hair grass litter to  $4.3 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$ . In addition, Callahan and Kucera (1980) estimate in grassland an annually turnover rate of Mg to soil of 75% in the same type of climate. If these figures are representative, the corresponding Mg flux from litter degradation can be deduced to be  $0.35 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$ . Assuming that the first organic soil sample (0-5 cm) represent the remaining product after litter biodegradation, and that the initial

$\delta^{26}\text{Mg}$  of the litter is equal to the value given by grass roots (-0.49‰), we calculate that Mg released by the litter would have a  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of  $\sim -0.6\%$ . Then, adding the Mg coming from litter with Mg coming from precipitation gives an idea of the isotope composition and flux of the Mg input to the soil solution for the upper horizon. Considering the estimations described above, we find a corresponding Mg input flux of  $1.17 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$  with a  $\delta^{26}\text{Mg}$  of  $-0.57\%$ . In 2006, Angeli, estimated that, the Mg flux drained out of the soil, at the bottom of the soil profile (-140 cm) is  $0.8 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{y}^{-1}$ . Consequently, if this is valid, then the Mg input flux (calculated as described above) is greater than the corresponding output flux. Then, using equation (1), and assuming that this loss of Mg exclusively results from plant nutrition, it is possible to calculate the theoretical  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of the soil solution drained out this root zone ( $\delta^{26}\text{Mg}_i$ ), and compare it to measured values at -70 cm. The calculations indicate that soil solution, if affected only by precipitation, litter degradation and uptake by plant, should display a  $^{26}\text{Mg}$  value of  $-0.79\pm 0.04\%$ , considering that bulk spruce and grass display bulk  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of  $-0.19\%$  and  $-0.25\%$  respectively. This theoretical  $\delta^{26}\text{Mg}$  value estimated is higher than the measured  $\delta^{26}\text{Mg}$  value ( $-0.99\%$  in May at 70cm) with a small difference of  $\sim -0.20\%$ , slightly higher than the uncertainties. These results strongly suggest that most of the soil solution isotope signature collected in upper soil horizons (-5 cm to -65 cm) is due to biological recycling, with probably a small effect of silicate weathering. This influence of the vegetation occurs only in the upper soil horizons and therefore cannot explain the lightest  $\delta^{26}\text{Mg}$  values measured in deep soil solutions. Silicate weathering also needs to be taken into account for explaining the evolution of soil and soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  in the deeper horizons.

## 4.2. Effect of weathering process on Mg isotope composition of soil

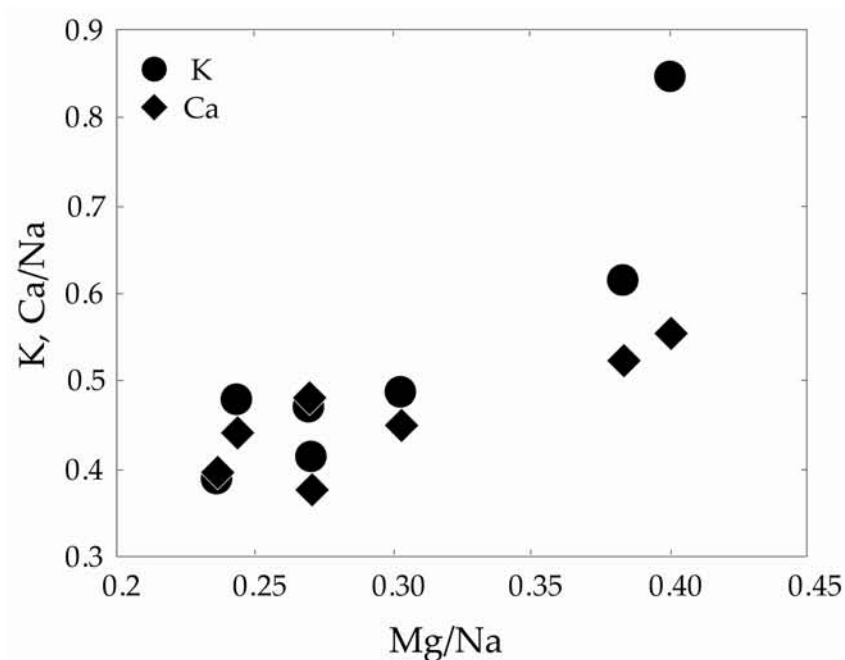
The positive correlation between the  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Si}_2\text{O}$  and  $\text{MgO}$  (Figure 4) a priori suggest that the Mg of soil samples result from a mixing between Mg rich clays and organic matter. However, as highlighted in Figure 8, bulk soil  $\delta^{26}\text{Mg}$  cannot be explained by such a mixing, indicating small but significant isotope fractionation during water/soil/organic matter interactions. The soil studied is a podzol. In this type of soil, the production organic acids, by leaching from plants, decomposition of litter by microbes and exudation by roots, fungi and microorganisms, contribute to mineral weathering and formation of an eluvial horizon (Lundström and Öhman, 1990; Lundström *et al.*, 2000). The organic acids induce cation transportation, mainly Al and Fe, as organic complex toward illuviated layer, corroborated by the fact that soluble aluminium in eluvial horizons of podzolized soils, is mainly (about 80%) organically bound (Dahlgren and Ugolini, 1989; Lundström, 1993). In some conditions, the litter is accumulated in the upper soil horizons. These upper two layers ( $A_1$  and  $A_2$ ) have low Mg concentrations, but display the two contrasted  $\delta^{26}\text{Mg}$  values (Figure 2A and 2B). Comparing

these bulk soil  $\delta^{26}\text{Mg}$  to the vegetation (especially grass leaves (-0.50‰) and roots (0.28‰ and 0.73‰) suggest that these soil horizons can be explained by a mixture between bedrock and organic litter (Figure 8). However, in the deeper soil horizon, the  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of bulk soil and soil solution strongly suggest that another process induce Mg isotope fractionation in favour of the heavy isotopes. This process induces an accumulation of Mg as indicated by the calculation of loss or gain of element ( $\tau$  values) (Table 4). The magnesium accumulation and sequestration in soil may be carried out through the secondary clay formation, as strongly suggested by the  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$  variation along the soil profile (Figure 4). The mineralogical analyses of the fine fraction of bedrock and soil horizons show apparition of secondary mineral such as chlorite, vermiculite and illite in soil profile (Table 1). The formation of these secondary clay results from alteration of mica in bedrock, accompanied by losses of the interlayer K and Na. Potassium is also released during the illitization and kaolinitization of primary minerals buffered the pore waters (Dawson and Smith, 1992; Morad, 1990; Rimsaite, 1975). Potassium release from primary mineral would be compensated by relative increases of Mg and  $\text{H}_2\text{O}$  (table 4,  $\tau$  values), highlighted by the strong relationship between  $\tau_{\text{Mg}}$  vs.  $\tau_{\text{K}}$  ( $R^2 = 0.7534$ ) and between  $\delta^{26}\text{Mg}$  vs.  $\tau_{\text{K}}$  ( $R^2 = 0.6089$ ). The clay formation in soil samples appears therefore as main control of Mg isotope composition especially in deep soil horizons. In the last three horizons,  $\tau_{\text{Mg}}$  regularly increases, while  $\delta^{26}\text{Mg}$  stays relatively constant (from -0.08 to 0‰). This trend is not compatible with a simple Rayleigh process where an increase of  $f$  is expected to be associated with a decrease of  $\delta^{26}\text{Mg}$  (for a  $\alpha_{\text{clay-solution}} > 1$ ). In parallel, soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  decreases. It is likely that the amount of dissolved Mg incorporated into secondary phases is too small to affect the bulk soil isotope composition.

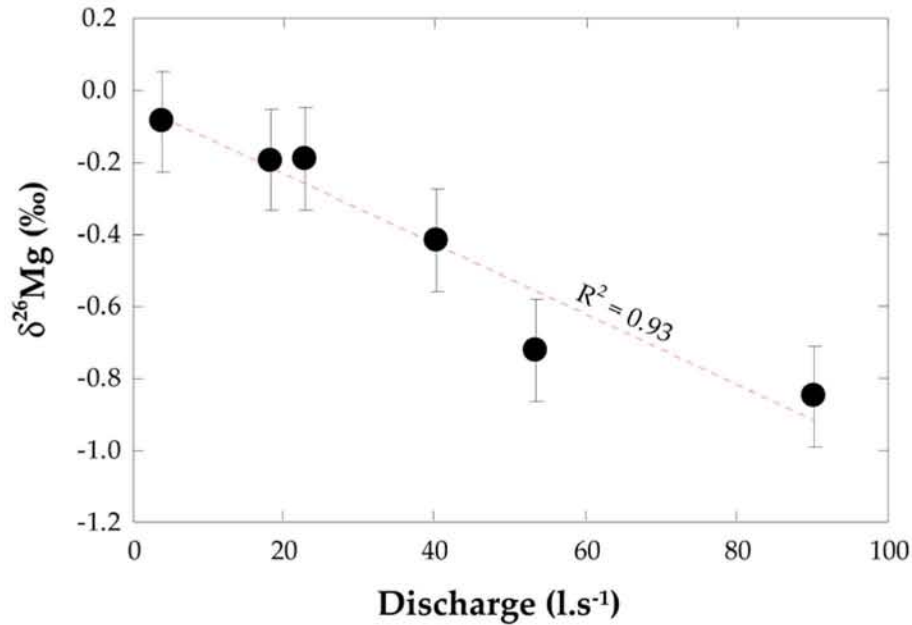
### 4.3. Stream waters

Processes described in sections 4.1 and 4.2 may also control the chemical and isotopic composition of stream waters. Dissolved cations of the streamwater are products of weathering of minerals in the catchment, atmospheric deposition, and probably vegetation inputs. Concentrations of major elements and Sr are significantly higher in stream waters collected at various seasons, compared with the range displayed by soil solutions. And, no correlations were found between the  $\delta^{26}\text{Mg}$  of Streamwater and various seasons, indicating a little effect of biological activities on streamwater composition. Moreover, Sr isotopic ratios measured in stream waters of the catchment are very close to the silicate bedrock (sandstone) composition. Na-normalized cation molar ratios are low. Both observations strongly suggest that Sr and major elements of this river water are mainly derived from silicate dissolution. Moreover, Mg/Na correlates with Ca/Na and K/Na (Figure 9). These correlations probably reflect a mixing between two main water types.

Indeed, Streamwater  $\delta^{26}\text{Mg}$  decrease with the discharge (Figure 10). Streamwater samples collected during low discharge period have the greatest  $\delta^{26}\text{Mg}$ . In contrast, streamwater sample collected during high discharge period displays lowest  $\delta^{26}\text{Mg}$ . These high  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of streamwater obtained with low discharge suggest that dissolved Mg is derived from a Mg pool associated to long pathway and residence time of water percolating through the soil profile and its isotopic composition reflects the mineral-water interaction (mineral precipitation-dissolution process). The lowest  $\delta^{26}\text{Mg}$  found and measured in streamwater during the high discharge period is more difficult to interpret. These  $\delta^{26}\text{Mg}$  could result from combined processes releasing heavy Mg (and probably higher Sr isotopic ratios): (1) the contribution of another water source, (like deep old water) to streamwater, (2) the leaching of Mg adsorbed on organic matter surface due to the surface runoff from permanent moist zone early described for this site (Angeli, 2006).



**Figure 9.** Ca/Na and K/Na as a function of Mg/Na.



**Figure10.** Streamwater  $\delta^{26}\text{Mg}$  variations with discharge.

## 5. Conclusion

This study emphasizes the potential of Mg isotopes as tracers of biogeochemical processes in a small-forested catchment. At the soil profile scale, vegetation is enriched in heavy isotope ( $\delta^{26}\text{Mg}$ : -0.93 to +0.78‰). Preferential uptake of heavy isotopes by plant roots results in low  $\delta^{26}\text{Mg}$  soil solutions collected in the upper horizons of the soil profile. Two major processes control soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  values. In the upper horizons, biological activity dominates, through Mg uptake by roots and litterfall degradation. In deeper horizons, precipitation of clays seems to play a main role. The vegetation effect induce variation in the  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of soil solutions following the season with contrasted  $\delta^{26}\text{Mg}$  values obtained in spring (May) and winter (January-April). At the watershed scale, the  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of stream waters fluctuate between -0.85 and -0.08‰ and follow precipitation intensity. These results indicate that stream water is fed during the wet period by water affected by some processes favouring heavy enrichment. While in dry periods, the streamwater  $\delta^{26}\text{Mg}$  value result from water having long residence time in soil profile reflecting mineral formation-dissolution process in deeper soil horizons. We conclude that Mg isotopes analysis might become a helpful tool to constrain the relationships between vegetation and weathering processes at a soil scale. However, some investigations in futures researches are still needed, such as quantifying the isotope fractionation occurring during clay formation, litter degradation and adsorption on organic matter.

### Acknowledgements

This study was financially supported by the "Reliefs de la Terre" CNRS-INSU program research, the "ISOSIL" ANRJ project, and a BQR (Nancy University – Region Lorraine). We are most grateful to Hervé Marmier for his assistance in major and trace element analyses, Philippe Télouk for his assistance during Mg isotope ratio measurements, using the Nu instrument MC ICP-MS at ENS, Lyon and Cathérine Zimmernan and Christiane Parmentier for  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios measurement at CRPG.

## 6. References

- Addiscott, R. H., 1974. Potassium and the distribution of calcium and magnesium in potato plants. . *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25, 1173-1183.
- Andrews, J., Siccama, T., and Vogt, K., 1999. The effect of soil nutrient availability on retranslocation of Ca, Mg and K from senescing sapwood in Atlantic white cedar. *Plant and Soil* 208, 117-123.
- Andrews, M. Y., Ague, J. J., and Berner, R. A., 2008. Weathering of soil minerals by angiosperm and gymnosperm trees. *Mineral Mag* 72, 11-14.
- Angeli, N., 2006. Evolution de la composition chimique des ruisseaux vosgiens : Analyse rétrospective et effet d'un amendement calco-magnésien. PhD. thesis, Nancy Université, 457p.
- Armbruster, M., MacDonald, J., Dise, N. B., and Matzner, E., 2002. Throughfall and output fluxes of Mg in European forest ecosystems: a regional assessment. *Forest Ecology and Management* 164, 137-147.
- Benedetti, M., Menard, O., Noack, Y., Carvalho, A., and Nahon, D., 1994 Water-rock interactions in tropical catchments: field rates of weathering and biomass impact. . *Chemical Geology* 118, 203-220.
- Benedetti, M. F., Dia, A., Riotte, J., Chabaux, F., Gérard, M., Boulègue, J., Fritz, B., Chauvel, C., Bulourde, M., Déruelle, B., and Ildefonse, P., 2003. Chemical weathering of basaltic lava flows undergoing extreme climatic conditions: the water geochemistry record. *Chemical Geology* 201, 1-17.
- Berner, E. K., Berner; R. A., and Moulton, K. L., 2003. Plants and mineral weathering: present and past. *Treatise on Geochemistry* 5, 169-188.
- Black, J. R., Epstein, E., Rains, W. D., Yin, Q. Z., and Casey, W. H., 2008. Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7831-7836.
- Blair, J., 1988. Nutrient release from decomposing foliar litter of three tree species with spicial reference to calcium, magnesium and potassium dynamics. *Plant and Soil* 110, 49-55.

- Bolou-Bi, B. E., Vigier, N., Brenot, A., and Poszwa, A., 2009. Magnesium isotope compositions of natural reference materials. . *Geostand. Geoanal. Res.* 33, 95-109.
- Bolou-Bi, B. E., vigier, N., leyval, C., and Poszwa, A., submitted. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth.
- Bormann, B. T., Wang, D., Snyder, M. C., Bormann, F. H., Benoit, G., and April, R., 1998. Rapid, plant-induced weathering in an aggrading experimental ecosystem. *Biogeochemistry* 43, 129-155.
- Boy, J. and Wilcke, W., 2008. Tropical Andean forest derives calcium and magnesium from Saharan dust. *Global Biogeochem. Cycles* 22.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J., and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Chadwick, O. A., Brimhall, G. H., and Hendricks, D. M., 1990. From a black to a gray box -- a mass balance interpretation of pedogenesis. *Geomorphology* 3, 369-390.
- Chadwick, O. A., Derry, L. A., Bern, C. R., and Vitousek, P. M., in press. Changing sources of strontium to soils and ecosystems across the Hawaiian Islands. *Chemical Geology* In Press, Corrected Proof.
- Dambrine, E., Le Goaster, S., and Ranger, J., 1991. Croissance et nutrition minérale d'un peuplement d'épicéa sur sol pauvre. II : Prélèvement racinaire et translocation d'éléments minéraux au cours de la croissance. *Acta oecologica* 12, 791-808.
- Dawson, J. B. and Smith, J. V., 1992. Potassium loss during metasomatic alteration of mica pyroxenite from Oldoinyo Lengai, northern Tanzania: contrasts with fenitization. *Contributions to Mineralogy and Petrology* 112, 254-260.
- De Villiers, S., Dickson, J. A. D., and Ellam, R. M., 2005. The composition of the continental river weathering flux deduced from seawater Mg isotopes. *Chemical Geology* 216, 133-142.
- Depaolo, D. J. and Ingram, B. L., 1985. High-Resolution Stratigraphy with Strontium Isotopes. *Science* 227, 938-941.
- Ding, Y., Luo, W., and Xu, G., 2006. Characterisation of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. *Annals of Applied Biology* 149, 111-123.
- Drouet, T., Herbauts, J., Gruber, W., and Demaiffe, D., 2005. Strontium isotope composition as a tracer of calcium sources in two forest ecosystems in Belgium. *Geoderma* 126, 203-223.
- Drouet, T., Herbauts, J., Gruber, W., and Demaiffe, D., 2007. Natural strontium isotope composition as a tracer of weathering patterns and of exchangeable calcium sources in acid leached soils developed on loess of central Belgium. *European Journal of Soil Science* 58, 302-319.
- Eschrich, W., Fromm, J., and Essiamah, S., 1988. Mineral partitioning in the phloem during autumn senescence of beech leaves. *Trees - Structure and Function* 2, 73-83.



- Feger, K. H., 1997. Biogeochemistry of Mg in forest ecosystems, Magnesium Deficiency in Forest Ecosystems. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Forsius, M., Kleemola, S., Starr, M., and Ruoho-Airola, T., 1995. Ion mass budgets for small forested catchments in Finland. *Water, Air, & Soil Pollution* 79, 19-38.
- Galy, A., Yoffe O., Janney P.E., Williams R.W., Cloquet C., Alard O., Halicz L., Wadwha M., Hutcheon I.D., Ramon E., and J., C., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and new reference materials for magnésium isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18, 1352-1356.
- Graustein, W. C., 1988.  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios measure the sources and flow of strontium in terrestrial ecosystems. In: Rundel, P. W., Ehleringer, J. R., and Nagy, K. A. Eds.), *Stable Isotopes in Ecological Research*. Springer-Verlag.
- Green, G. P., Bestland, E. A., and Walker, G. S., 2004. Distinguishing sources of base cations in irrigated and natural soils: evidence from strontium isotopes. *Biogeochemistry* 68, 199-225.
- Guillet B. (1972). Relation entre l'histoire de la végétation et la podzolisation dans les Vosges. Ph.D. thesis, Université Henri Poincaré, 156p.
- Haynes, R. J., 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126, 247-264.
- Helmisaari, H.-S., 1995. Nutrient cycling in *Pinus sylvestris* stands in eastern Finland. *Plant and Soil* 168-169, 327-336.
- Hinsinger, P., Neto, O., Barros, F., Benedetti, M. F., Noack, Y., and Calloti, G., 2001. Plant-induced weathering of a basaltic rock: Experimental evidence. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 65, 137-152.
- Hodson, M. J. and Sangster, A. G., 1998. Mineral Deposition in the Needles of White Spruce [*Picea glauca*(Moench.) Voss]. *Ann Bot* 82, 375-385.
- Homann, P. S., Miegroet, H., Cole, D. W., and Wolfe, G. V., 1992. Cation distribution, cycling, and removal from mineral soil in Douglas-fir and red alder forests. *Biogeochemistry* 16, 121-150.
- Kovarova, M. and Vacek, S., 2003. Mountain Norway spruce forests: Needle supply and its nutrient content. *Journal of Forest Science* 49, 327-332.
- Kurtz, A. C., Derry, L. A., Chadwick, O. A., and Alfano, M. J., 2000. Refractory element mobility in volcanic soils. *Geology* 28, 683-686.
- Marschner, H., Römheld V., Horst W. J., and Martin P., 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149, 441-456.
- Mengel, K. K., Ernest A., Kosegarten, H., and Appel, T., 2001. Principles of plant nutrition. Springer-Verlag, Edition: 5, Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.

- Merhaut, D., 2006. Magnesium. In: Barker, A. V. and Pilbeam, D. J. Eds.), Handbook of Plant Nutrition. CRC Press.
- Morad, S., 1990 Mica Alteration Reactions in Jurassic Reservoir Sandstones from the Haltenbanken Area, Offshore Norway. *Clays and Clay Minerals* 38, 584-590.
- Moulton, K. L., West, J., and Berner, R. A., 2000. Solute flux and mineral mass balance approaches to the quantification of plant effects on silicate weathering. *Am J Sci* 300, 539-570.
- Nakano, T. and Tanaka, T.-i., 1997. Strontium isotope constraints on the seasonal variation of the provenance of base cations in rain water at Kawakami, Central Japan. *Atmospheric Environment* 31, 4237-4245.
- Nedeltcheva, T., Piedallu, C., Gégout, J.-C., Boudot, J.-P., Angeli, N., and Dambrine, E., 2006. Environmental factors influencing streamwater composition on sandstone (Vosges Mountains). *Annals of Forest Science* 63, 369-376.
- Nys, C. (2004). Restauration de la qualité des sols et des eaux de deux bassins versants situés dans les Vosges gréseuses et les Vosges cristallines : Caractérisation initiale des sites ateliers d'amendement calco-magnésien (Bassins versants de Cornimont et Senones). INRA Nancy, ONF, 38p
- Oh, N.-H. and Richter, D. D., 2005. Elemental translocation and loss from three highly weathered soil-bedrock profiles in the southeastern United States. *Geoderma* 126, 5-25.
- Ologunde, O. O. and Sorensen, R. C., 1982. Influence of Concentrations of K and Mg in Nutrient Solutions on Sorghum. *Agron J* 74, 41-46.
- Oren, R., Schulze, E. D., Werk, K. S., Meyer, J., Schneider, B. U., and Heilmeyer, H., 1988. Performance of two *Picea abies* (L.) Karst. stands at different stages of decline. *Oecologia* 75, 25-37.
- Pogge von Strandmann, P. A. E., Burton K. W., James, R. H., van Calsteren, P., and Gíslason, S. R., Sigfússon, B., 2008a. The influence of weathering processes on riverine magnesium isotopes in a basaltic terrain. *Earth and Planetary Science Letters* 276, 187-197.
- Pogge von Strandmann, P. A. E., James, R. H., van Calsteren, P., Gíslason, S. R., and Burton, K. W., 2008b. Lithium, magnesium and uranium isotope behaviour in the estuarine environment of basaltic islands. *Earth and Planetary Science Letters* 274, 462-471.
- Poszwa, A., Dambrine, E., Pollier, B., and Atteia, O., 2000. A comparison between Ca and Sr cycling in forest ecosystems. *Plant and Soil* 225, 299-310.
- Poszwa, A., Ferry, B., Dambrine, E., Pollier, B., Wickman, T., Loubet, M., and Bishop, K., 2004. Variations of bioavailable Sr concentration and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio in boreal forest ecosystems. *Biogeochemistry* 67, 1-20.

- Probst, A., El Gh'mari, A., Aubert, D., Fritz, B., and McNutt, R., 2000. Strontium as a tracer of weathering processes in a silicate catchment polluted by acid atmospheric inputs, Strengbach, France. *Chemical Geology* 170, 203-219.
- Puech, L. and Mehne-Jakobs, B., 1997. Histology of magnesium-deficient Norway spruce needles influenced by nitrogen source. *Tree Physiol* 17, 301-310.
- Quideau, S. A., Graham, R. C., Chadwick, O. A., and Wood, H. B., 1999. Biogeochemical Cycling of Calcium and Magnesium by *Ceanothus* and *Chamise*. *Soil Sci Soc Am J* 63, 1880-1888.
- Ra, K. and Kitagawa, H., 2007. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 817-821.
- Raulund-Rasmussen, K. and Vejre, H., 1995. Effect of tree species and soil properties on nutrient immobilization in the forest floor. *Plant and Soil* 168-169, 345-352.
- Rimsaite, J., 1975. Natural Alteration of Mica and Reactions between Released Ions in Mineral Deposits. *Clays and Clay Minerals* 23, 247-255.
- Salamanca, E., Kaneko, N., and Katagiri, S., 1998. Nutrient dynamics in decomposing forest leaf litter: A comparison of field and laboratory microcosm approach. *Journal of Forest Research* 3, 91-98.
- Simard, R. R., 1993. Ammonium acetate-extractable elements. In: Carter, M. R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA. .
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2006a. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters* 247, 267-279.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Tipper, E. T., Galy, A., Gaillardet, J., Bickle, M. J., Elderfield, H., and Carder, E. A., 2006b. The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters* 250, 241-253.
- Wytenbach, A., Schleppe, P., Tobler, L., Bajo, S., and Bucher, J., 1995. Concentrations of nutritional and trace elements in needles of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) as functions of the needle age class. *Plant and Soil* 168-169, 305-312.
- Zakharova, E. A., Pokrovsky, O. S., Dupré, B., Gaillardet, J., and Efimova, L. E., 2007. Chemical weathering of silicate rocks in Karelia region and Kola Peninsula, NW Russia: Assessing the effect of rock composition, wetlands and vegetation. *Chemical Geology* 242, 255-277.

**Synthèse générale,  
Conclusion générale  
et Perspectives**

## I. Synthèse des résultats obtenus

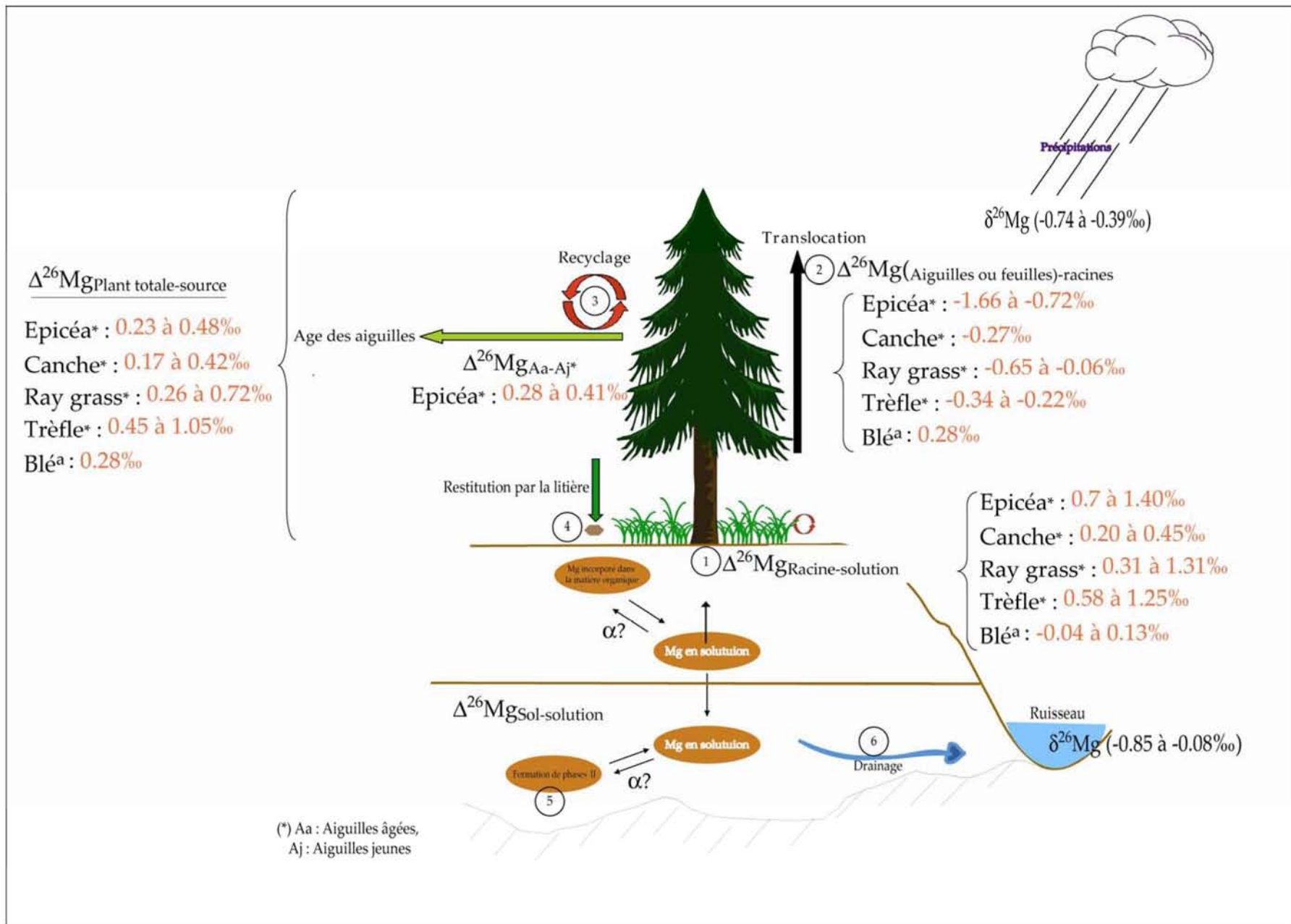
Les fractionnements isotopiques du Mg ont été étudiés en conditions contrôlées et dans le milieu naturel. Les résultats obtenus montrent que des fractionnements isotopiques significatifs sont engendrés par des processus biologiques directs (prélèvement racinaire et transport interne), ou indirects (restitution par la litière), ainsi que par des processus abiotiques (précipitation-dissolution de minéraux secondaires dans les sols). La synthèse de ces résultats est illustrée sur la Figure V-1.

Nos résultats mettent en évidence plusieurs points qui peuvent se résumer ainsi :

- (1) toutes les espèces de plantes supérieures étudiées accumulent systématiquement et préférentiellement les isotopes lourds du Mg à partir de la solution source (Figure V-1) ;
- (2) les feuilles sont isotopiquement plus légères que les racines ;
- (3) en fonction des conditions de croissance, une remobilisation du Mg favorise la migration des isotopes lourds du Mg des feuilles âgées vers les feuilles jeunes et/ou les racines.

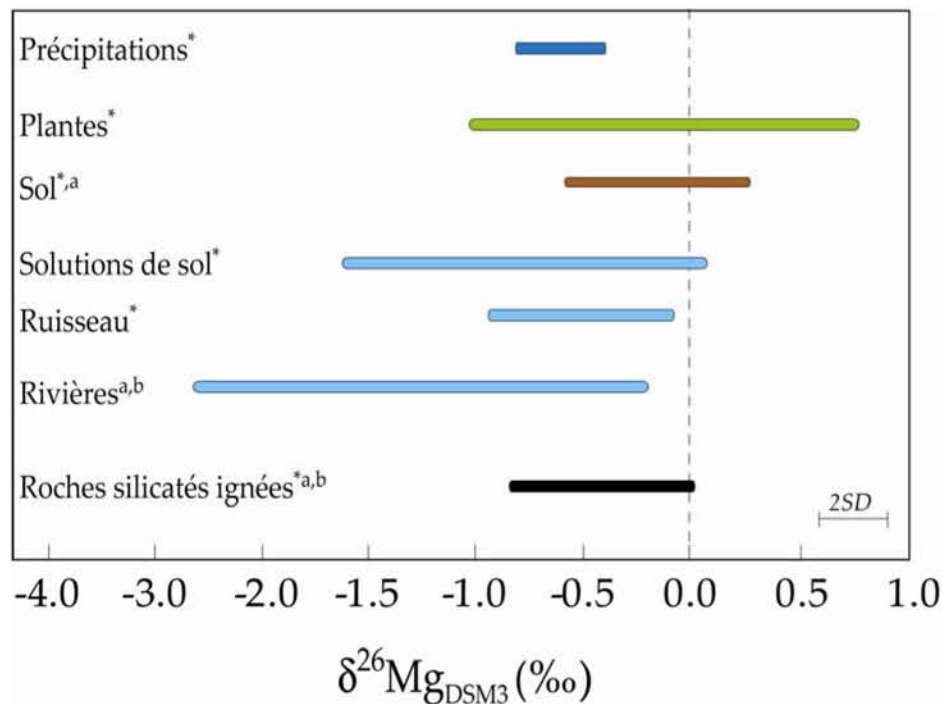
Ces processus résultent en un enrichissement en isotopes légers des solutions de sol. Cependant, à l'échelle d'un profil de sol, le prélèvement préférentiel des isotopes lourds par les plantes n'est pas le seul mécanisme responsable des compositions isotopiques mesurées dans les divers compartiments. Nos résultats obtenus sur le site de Senones suggèrent également que :

- (4) la dégradation de la litière serait à l'origine d'un fractionnement isotopique du Mg avec un départ préférentiellement des isotopes légers vers la solution.
- (5) l'incorporation du Mg dans les phases secondaires minérales dans les sols induirait un enrichissement en isotopes lourds par rapport aux solutions du sol.
- (6) la composition isotopique du ruisseau montre des variations qui corréleraient avec celles du débit. Les précipitations et les interactions minéraux-eau, ayant lieu dans l'altérite profonde, semblent jouer un rôle essentiel sur la signature du ruisseau.



**Figure V-1 :** Récapitulatif et synthèse des principaux résultats et conclusions de cette étude (\*) et des données de la littérature (<sup>a</sup>, Black *et al.*, 2008).

A plus grande échelle, les signatures isotopiques du Mg des plantes naturelles ne peuvent être distinctement différenciées des principaux réservoirs, comme l'illustrent les Figures V-2 et III-7. Le cycle biologique du Mg étant lié à celui de divers autres éléments, dont les isotopes, fractionnent également lors de la croissance des plantes, il paraît intéressant de comparer ces systèmes à celui du Mg, afin d'envisager de coupler différents traceurs, en fonction de l'échelle d'étude, du contexte et de la question scientifique.



**Figure V-2 :** Comparaison des compositions isotopiques mesurées au cours de cette thèse (\*) et des données de la littérature ((a) Tipper *et al.* (2006a, 2006b et 2008) et (b) Brenot *et al.* (2008)).

## II. Comparaison avec les autres systèmes isotopiques "non traditionnels"

Ces dix dernières années, d'autres systèmes isotopiques dits "non traditionnels" ont été développés, tels que les isotopes de Si, Ca, Fe et Zn, tous des nutriments utilisés par les plantes. On peut alors se demander quelles sont leurs applications par rapport à celles démontrées pour le Mg ? Les fractionnements isotopiques du Mg observés dans cette étude sont-ils compatibles et du même ordre de grandeur que ceux observés pour ces autres traceurs ? Enfin, après ces premières études, un traceur semble-t-il plus pertinent qu'un autre pour quantifier les flux liés aux variations de la biomasse terrestre au cours des temps géologiques ?

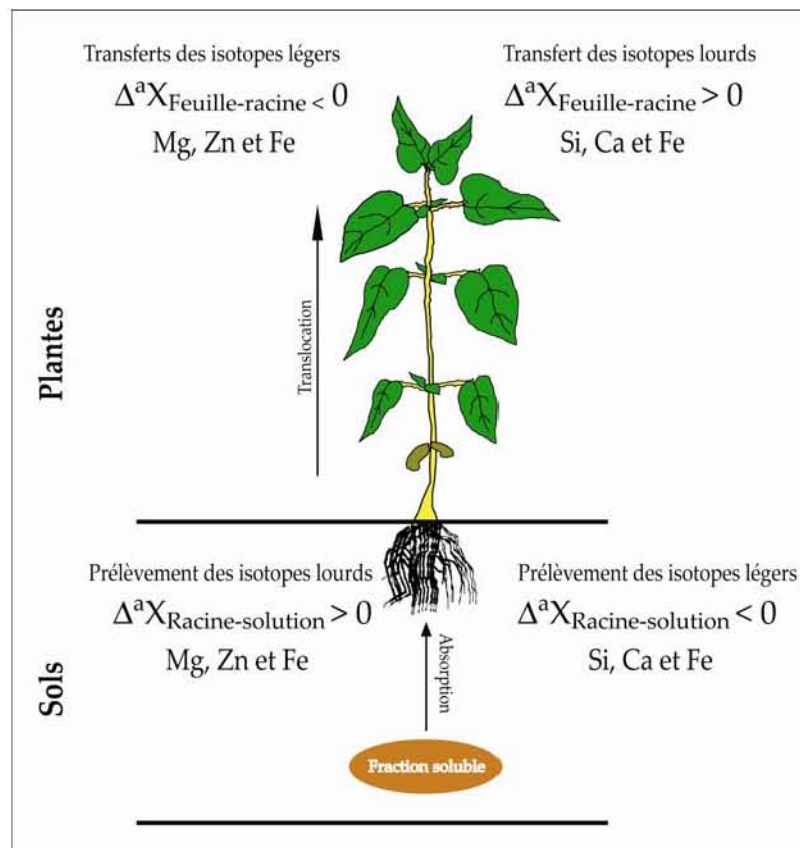
Les études sur les compositions isotopiques du silicium mettent en évidence des gammes de compositions isotopiques les plus importantes observées dans les échantillons terrestres. En particulier, les valeurs  $\delta^{30}\text{Si}$  varient de -2.5 à 6‰ dans les plantes. En comparaison, la gamme de variation de  $\delta^{26}\text{Mg}$  dans les plantes est de 0.73‰ à -0.93‰. Contrairement au Mg, les plantes prélèvent préférentiellement les isotopes légers de Si ( $\Delta^{30}\text{Si}_{\text{plante-source}}$  de  $-1.1 \pm 0.33$ ‰ à  $-0.77 \pm 0.21$ ‰) (Figure V-3) (Opfergelt *et al.*, 2006 et 2008, Ding *et al.*, 2005 et 2008; Sun *et al.*, 2008; Ziegler *et al.*, 2005b). Dans la plante, Si migre par la transpiration et précipite sous forme de phytolithes dans les zones d'évaporation (feuilles). Ce processus est associé à un enrichissement en isotopes légers, et de ce fait, le profil des compositions isotopiques du Si dans la plante montre un enrichissement en faveur des isotopes lourds des racines aux feuilles.

Les amplitudes globales des composition isotopiques du Ca ( $\delta^{44/40}\text{Ca}$ ) induites par les plantes sont de -2.20‰ à 1.8‰ (Cenki-Tok *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2008; Wiegand *et al.*, 2005). Similairement au Si, les plantes prélèvent préférentiellement les isotopes légers. Leurs compositions isotopiques sont en effet plus légères que celles des solutions et celles du pool échangeable du sol (Page *et al.*, 2008). Les  $\delta^{44}\text{Ca}$  mesurés dans les racines des plantes sont parmi les plus basses observées dans les échantillons terrestres ( $\delta^{44}\text{Ca} < -2$  ‰). L'absorption du Ca est suivie par une migration des isotopes lourds des racines vers les feuilles. Cette variation des racines aux feuilles est interprétée comme le résultat de la migration du Ca via le flux de transpiration. Les mécanismes d'échanges ioniques sur les parois de la tige contrôleraient cette migration. Dans la plante, les feuilles âgées ont des  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  supérieurs à ceux des jeunes feuilles, expliquant alors une litière avec des rapports isotopiques plus élevés (Cenki-Tok *et al.*, 2009 ; Page *et al.*, 2008). Toutes ces variations des isotopes du Ca observées lors des processus biologiques sont à l'inverse de la dynamique des isotopes du Mg mis en évidence dans cette thèse.

La plus grande gamme de compositions isotopiques de Zn a été observée dans les plantes avec des amplitudes en  $\delta^{66}\text{Zn}$  pouvant atteindre 1.6‰. Weiss *et al.* (2005), Moynier *et al.* (2008) montrent que lors de croissances expérimentales de plantes, l'absorption du Zn induit un enrichissement de 0.2‰ en isotopes lourds dans les racines par rapport à la solution nutritive (Figure V-3). Dans la plante, les transports internes entraînent un fractionnement isotopique en faveur des isotopes légers de la racine vers les feuilles. Des tendances similaires sont observées en milieu naturel (Viers *et al.*, 2007). Comme pour les isotopes du Mg, deux étapes de fractionnement des isotopes du Zn semblent avoir lieu lors de son incorporation dans la plante. Le premier fractionnement isotopique du Zn entre les solutions et les racines est attribué à l'adsorption à la surface des racines. Par contre, l'évolution des compositions isotopiques entre les racines et les feuilles est attribuée à la



diffusion du Zn au cours de sa migration dans le xylème (Moynier *et al.*, 2008). Richter *et al.* (2008) montrent qu'il n'existerait pas de fractionnement isotopique du Mg au cours de la diffusion dans une solution. Cette hypothèse est corroborée par le fait que nos résultats ne montrent aucune corrélation entre les compositions isotopiques en Mg et la hauteur des plantes. Le système isotopique du Mg se distingue également de celui du Zinc par le processus de remobilisation des compartiments âgés vers les compartiments en croissance. En effet, Viers *et al.* (2007) observent des litières enrichies en isotopes lourds par rapport aux feuilles, qu'ils expliquent par une remobilisation des isotopes légers dans la plante.



**Figure V-3** : Variations des compositions isotopiques des cations ( $^aX$  :  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{66}\text{Zn}$  et  $^{57}\text{Fe}$ ) lors de la croissance des plantes. **Magnésium** : Cette étude, Black *et al.* (2008) ; **Silicium** : Ding *et al.* (2005, 2008), Opfergelt *et al.* (2006, 2008) et Sun *et al.*, 2008 ; **Calcium** : Cenki-Tok *et al.* (2009), Page *et al.* (2008), Wiegand *et al.* (2005) et Schimdt *et al.* (2003); **Zinc** : Moynier *et al.* (2008), Viers *et al.* (2007) et Weiss *et al.* (2005) et **Fer** : Guelke et von Blanckenburg (2007).

Une seule étude à ce jour concerne les fractionnements isotopiques du Fe lors de la croissance des plantes. La différence de  $\delta^{57}\text{Fe}$  entre le sol et les différentes parties des plantes s'échelonne entre -1.67 et 0.21‰ (Guelke et von Blanckenburg, 2007). Ces amplitudes sont semblables à celles observées pour le Mg et le Zn. Les auteurs suggèrent que le fractionnement isotopique du Fe au cours du prélèvement racinaire et du transport interne

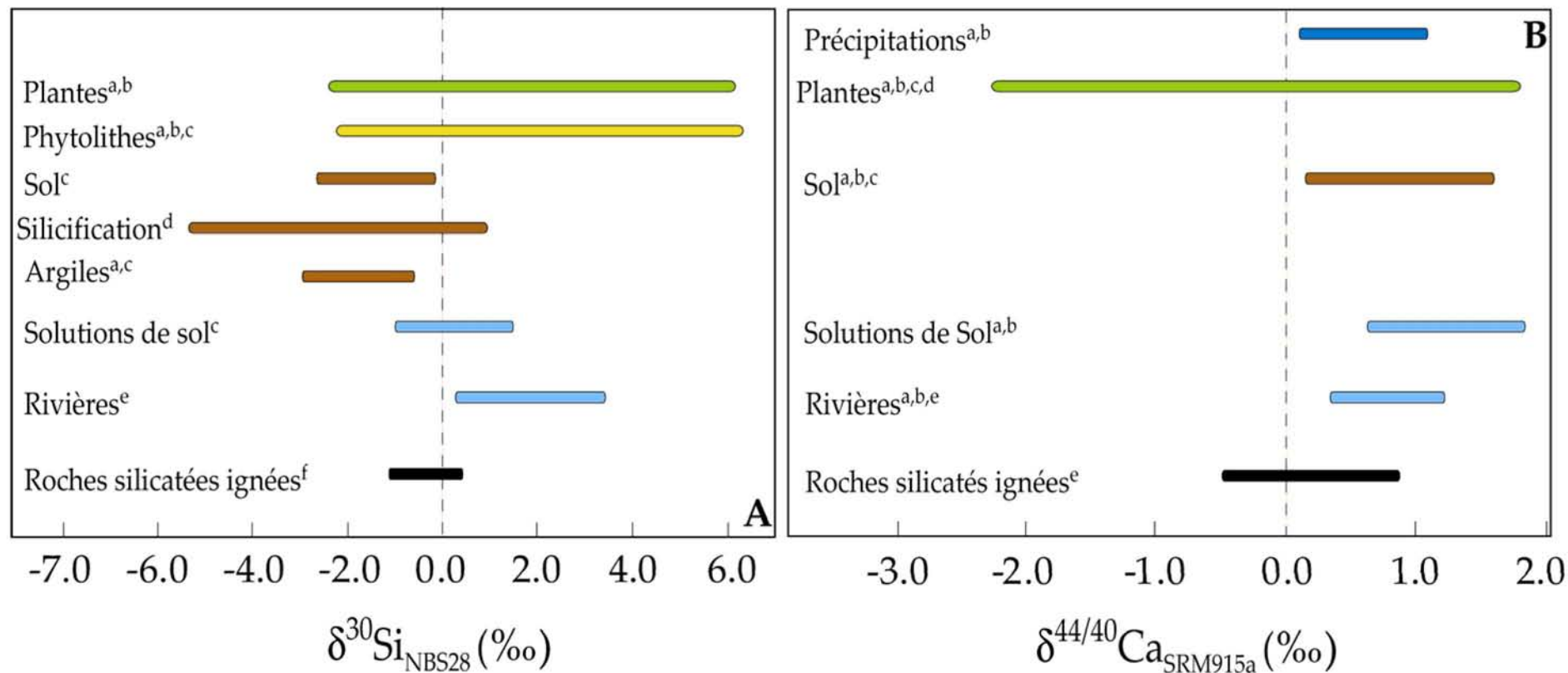
est lié aux stratégies développées par les plantes pour acquérir le Fe du sol (Figure V-3). Les plantes de stratégie d'acquisition de type I (réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ ) incorporent de préférence les isotopes légers du Fe ( $\Delta^{57}\text{Fe}_{\text{Plant-sol}} = -1.67\text{‰}$ ). Ce fractionnement est suivi d'un appauvrissement en isotopes lourds des feuilles âgées aux jeunes feuilles en croissance. Par contre les plantes de stratégie de type II (acquisition du Fe par complexation par des phytosidérophores) incorporent préférentiellement les isotopes lourds du Fer ( $\Delta^{57}\text{Fe}_{\text{Plant-sol}} = 0.21\text{‰}$ ). Le Fe est ensuite intégré sans aucun fractionnement lors de son transport dans la plante. Les plantes de stratégie II sont donc globalement enrichies en isotopes lourds. Même si le fractionnement lors du transport diffère, les variations isotopiques du Mg et du Fe se rejoignent dans les plantes de stratégie II, en particulier lors de l'étape de prélèvement. Par contre, dans le cas des plantes de stratégie I, les fractionnements isotopiques du Fe et du Mg sont inverses pendant le prélèvement, et identiques lors de leur transport dans la plante.

Parallèlement à ces études sur les fractionnements isotopiques induits par les plantes, des travaux sur les processus bio-physico-chimiques dans les sols ont montré que l'altération des silicates entraîne des fractionnements isotopiques du Si et Ca. Dans leurs études respectives de profils de sol développés sur des basaltes, Opgerfelt *et al.* (2008) et Ziegler *et al.* (2005a, b) ont montré que la composition isotopique du Si dissout est contrôlée par les effets combinés de l'altération des roches, de la néoformation des argiles et du recyclage biologique de la silice. Les mécanismes d'altération associés à une séquestration préférentielle des isotopes légers de Si dans les minéraux secondaires et les précipités polymorphes ( $\Delta^{30}\text{Si}_{\text{argile-solution}} = -3.3\text{‰}$  à  $-1.6\text{‰}$ ) tendent à enrichir les solutions de sol en isotopes lourds (Figure V-4A). La conséquence directe de tous les mécanismes (prélèvement racinaire et formation des argiles) est l'enrichissement des rivières en isotopes lourds avec des compositions isotopiques ( $\delta^{30}\text{Si}$ ) variant de 0.4‰ à 3.4‰, largement supérieures à la gamme définie par les roches ignées (-1‰ à 0.4‰) (cf. Basile-Doelsch *et al.*, 2005 ; Ding *et al.*, 2004, Opgerfelt *et al.*, 2008 ; de la Rocha *et al.*, 2000 ; Ziegler *et al.*, 2005b). Lors de l'altération des silicates, le comportement des isotopes du Si est inverse à celui des isotopes du Mg. A l'échelle continentale, et comme pour le système isotopique du Mg, les signatures isotopiques en Si des végétaux ne se distinguent ni de celles des silicates primaires, ni de celles des rivières (cf. Basile-Doelsch *et al.*, 2005). L'utilisation des isotopes du Si pour contraindre l'impact de la végétation sur les processus d'altération et la composition des rivières s'avère donc aussi complexe. Cependant, Ding *et al.* (2008) et Opfergelt *et al.* (2008) suggèrent que les signatures des phytolithes des plantes seraient d'excellents traceurs de paléoenvironnement et de paléoarchéologie, à une échelle plus régionale.

En ce qui concerne les isotopes du Ca mesurés dans les sols, ceux-ci montrent un enrichissement systématique ( $> 1.5\text{‰}$ ) en isotopes lourds, de la surface vers la profondeur (Page *et al.*, 2008). Ces sols ont des  $\delta^{44}\text{Ca}$  variant de  $-1.90\text{‰}$  en surface à  $-0.33\text{‰}$  en profondeur, inférieurs à ceux de silicates ( $-0.37\text{‰}$  à  $0.34\text{‰}$ ) et à ceux de la plupart des rivières ( $-1.71\text{‰}$  à  $0.87\text{‰}$ ) (cf. Centi-Tok *et al.*, 2009 ; Lui *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2003 ; Wiegand *et al.*, 2005) (Figure V-4B). Ces résultats suggèrent que les isotopes du Ca fractionnent également lors de l'altération des silicates. Les basses valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  observées dans les horizons supérieurs, sont attribuées au recyclage par la biomasse végétale qui prélève préférentiellement les isotopes légers et les restitue sous forme de litière (Centi-Tok *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2006). Le recyclage ne peut expliquer les gammes observées dans les solutions des horizons profonds. Cependant, aucune étude n'a mis à ce jour en évidence des fractionnements isotopique du Ca lors de la formation de minéraux secondaires. De plus, les compositions isotopiques des rivières à l'échelle d'un bassin versant varient en fonction du débit (Schmidt *et al.*, 2003). Comme pour Mg et Si, les isotopes du Ca peuvent apporter des indices supplémentaires pour estimer le rôle de la végétation à l'échelle d'un petit bassin versant, mais semblent plus difficiles à utiliser sur une plus grande échelle (Figure V-4B).

Tous ces nouveaux traceurs isotopiques, étudiés dans la thèse (Mg), dont les applications ont été passées brièvement en revue (Si, Ca, Zn et Fe) paraissent d'excellents traceurs des processus biologiques. Les fractionnements isotopiques déterminés ont permis d'apporter un regard nouveau sur certains processus physiologiques, dans lesquels sont impliqués ces cations. Le sens des fractionnements isotopiques permet de classer ces systèmes en deux grandes catégories : (1) le silicium et le calcium (2), le magnésium et le zinc (Figure V-3). Ces deux groupes reflètent leur mobilité dans les plantes. En effet, Si et Ca sont considérés comme des éléments immobiles dans le phloème des plantes, alors que Mg et Zn sont des cations mobiles, constamment recyclés et impliqués dans la synthèse de composés organiques dans la plante. Entre ces deux pôles, se situe le Fe, dont la dynamique dans le phloème est encore controversée.

Ces nouveaux traceurs isotopiques, caractérisés dans les profils de sols, permettent également d'identifier et de quantifier certains mécanismes pédogénétiques non accessibles par des mesures classiques, comme par exemple la formation de minéraux secondaires, le lessivage et la lixiviation de cations. Cependant, à l'échelle continentale, les signatures isotopiques des principaux réservoirs ne se distinguent pas franchement les unes des autres (Figure V-2 et Figure V-4). En conséquence les interprétations deviennent plus complexes et leurs applications limitées pour évaluer la contribution de chacun de ces réservoirs à la composition chimique des rivières et des océans, notamment la végétation.



**Figure V-4** : Schéma récapitulatif des signatures isotopiques de Si et Ca dans les différents réservoirs (hors carbonates). Les données sont issues de la littérature **Silicium (A)** : (a) Ding *et al.* (2004, 2005, 2008), (b) Opfergelt *et al.* (2006, 2008), (c) Ziegler *et al.* (2005a, 2005b), (d) Basile-Doelsch *et al.* (2005), (e) de la Rocha *et al.* (2000) et (f) Ding *et al.* (1996) cité de Basile-Doelsch *et al.* (2005); **Calcium (B)** : (a) Cenki-Tok *et al.* (2009), (b) Schimdt *et al.* (2003), (c) Wiegand *et al.* (2005), (d) Page *et al.* (2008) et (e) Lui *et al.* (2006). La conversion du  $^{44}\text{Ca}_{\text{SW}}$  au  $^{44}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  a été faite avec la relation suivante :  $^{44}\text{Ca}_{\text{SRM915a}} = ^{44}\text{Ca}_{\text{SW}} + 1.88$  (Schimdt *et al.*, 2003).

### III. Conclusion générale et perspectives

Les objectifs initiaux de cette thèse étaient de quantifier les fractionnements isotopiques de Mg lors de la croissance des plantes, et d'étudier l'impact de la végétation sur les signatures isotopiques en Mg des eaux de sol et de rivières.

La mesure des isotopes du Mg dans les plantes a requis le développement d'une séparation chimique spécifique avant analyses par MC ICP-MS. La première partie de cette thèse a donc été consacrée à développer et valider un protocole de séparation du Mg pour une large gamme d'échantillons (plantes, roches granitiques). Par rapport aux méthodes existantes dans la littérature, avant le début de la thèse, l'originalité de cette méthode réside dans l'utilisation combinée de deux résines échangeuses d'ions, une anionique pour séparer le Fe, le Zn et le Cu et l'autre cationique pour séparer et éliminer les majeurs. L'analyse de onze matériaux de référence, dont 8 nouveaux (quatre plantes, une eau, un sol et deux roches de la croûte continentale) a prouvé la robustesse de cette méthode.

Dans un second temps, les variations des compositions isotopiques du Mg ont été investiguées expérimentalement lors de la croissance de plantes. Les résultats mettent en évidence des fractionnements isotopiques du Mg induits par les plantes lors de leur croissance. Comparé à la composition isotopique en Mg de la source, les plantes sont enrichies en isotopes lourds. L'investigation plus précise des mécanismes montre que l'adsorption du Mg sur les molécules organiques localisées à la surface des racines joue un rôle majeur. Puis, le transport du Mg des racines aux feuilles s'accompagne d'un enrichissement en isotopes légers, mais l'intensité de ce fractionnement est variable, puisqu'il est d'autant plus fort que le milieu est carencé en Mg directement disponible tel que :

$$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{racine-feuilles}} (\text{hydroponie}) < \Delta^{26}\text{Mg}_{\text{racine-feuilles}} (\text{Phogopite}) < \Delta^{26}\text{Mg}_{\text{racine-feuilles}} (\text{grès}).$$

En milieu naturel, l'étude des compositions isotopiques de plantes, de sols (total ou échangeable) et de solutions de sol à différentes profondeurs a permis de contraindre certains mécanismes biogéochimiques impliqués dans le fonctionnement d'un écosystème forestier sur un bassin versant (Val de Senones - Vosges). Les résultats indiquent qu'à l'échelle de ce petit bassin versant, les fractionnements isotopiques du Mg induits par des mécanismes biologiques ont un impact sur les compositions isotopiques en Mg des horizons superficiels des sols. Le recyclage et la dégradation de la litière, ainsi que le prélèvement du Mg par les racines, expliquent les  $\delta^{26}\text{Mg}$  mesurés dans les solutions de sol. Les horizons de sols sont également sujets à des processus d'altération et de mobilisation spécifiques des

cations. Dans les horizons profonds, les compositions isotopiques sont homogènes autour de 0‰, et probablement sous le contrôle de processus d'altération et de synthèse des phases secondaires. La composition isotopique du ruisseau drainant le bassin versant serait la résultante d'eaux ayant un trajet plus long et beaucoup plus profond présentant une signature reflétant les processus de précipitation-dissolution dans les horizons profonds du sol lors des périodes de bas débits.

Cette étude présente les premières signatures isotopiques de plantes naturelles, et confirme des fractionnements isotopiques significatifs engendrés pendant leur croissance et leur évolution. Cependant, certains aspects considérés au cours de cette thèse nécessitent d'être clarifiés et précisés dans les futures études. Ainsi, il est nécessaire dans le cadre d'études sur les plantes :

- de quantifier le fractionnement isotopique du Mg lors des processus d'adsorption sur la matière organique, ainsi que le rôle de la nature des groupements fonctionnels (carboxyles, aminés, sulfatés et phosphatés...);
- de comparer les compositions isotopiques des formes (complexées ou libres) du Mg lors des processus de transports internes du Mg dans le xylème et le phloème, accessibles par l'analyse des sèves brutes et élaborées;
- de déterminer le rôle des microorganismes (bactéries et champignons mycorhiziens) lors du prélèvement racinaire du Mg, ainsi que les fractionnements isotopiques associés, car, dans la nature les plantes sont généralement associées à cette microflore.

A l'échelle d'un bassin versant, pour mieux contraindre le cycle isotopique du Mg, il serait nécessaire :

- d'étudier les variations isotopiques du Mg associées à la dégradation de la litière, en conditions expérimentales et/ou naturelles ;
- d'estimer les compositions isotopiques du Mg des précipitations sous couvert.
- d'investiguer les variations isotopiques du Mg au cours de différents processus pédogénétiques, et surtout d'étendre cette étude à d'autres écosystèmes (autre fonctionnement hydrologique, autre climat, ex. zone tropicale) ;
- de quantifier, en conditions expérimentales, les fractionnements isotopiques liés à la synthèse de minéraux secondaires.

A l'échelle continentale, afin d'évaluer l'impact de la végétation sur la composition isotopique des fleuves, il serait intéressant :

- de mieux déterminer la composition isotopique de la croûte continentale supérieure ;
- de coupler le système isotopique du Mg à d'autres systèmes (tels que Si, Li, et Ca) car les systèmes isotopiques pris individuellement ne suffisent pas à distinguer les différents processus, et sont plus ou moins sensibles à la formation de minéraux secondaires. Une approche utilisant divers systèmes isotopiques serait plus pertinente. En effet, en utilisant une combinaison d'isotopes impliqués dans la nutrition des plantes d'une part (ex. Si comme élément immobile, Mg en tant que élément mobile) et d'autre part des isotopes non essentiels aux plantes (ex. Li), cela permettrait de déterminer la contribution et l'impact des différents processus (altération des silicates, prélèvement racinaire et dégradation de la litière) sur les compositions isotopiques des fleuves.

## IV. Références bibliographiques

- Basile-Doelsch, I., Meunier, J. D., and Parron C., 2005. Another continental pool in the terrestrial silicon cycle. *Nature* 433, 399-402.
- Black, J. R., Epstein, E., Rains, W. D., Yin, Q. Z., and Casey, W. H., 2008. Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental Science and Technology* 42, 7831-7836.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J., and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Cenki-Tok, B., Chabaux, F., Lemarchand, D., Schmitt, A. D., Pierret, M. C., Viville, D., Bagard, M. L., and Stille, P., 2009. The impact of water-rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil- and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 2215-2228.
- Ding T., Jiang S., Wang D., Li Y., Li J., Song H., Liu Z., and Lao X. (1996) Silicon Isotope Geochemistry. *Geological Publishing House*.
- Ding, T., Wan, D., Wang, C., and Zhang, F. (2004). Silicon isotope compositions of dissolved silicon and suspended matter in the Yangtze river, China. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 205-216.
- Ding, T. P., Ma, G. R., Shui, M. X., Wan, D. F., and Li, R. H. (2005). Silicon isotope study on rice plants from the Zhejiang province, China. *Chemical Geology* 218, 41-50.
- Ding, T. P., Zhou, J. X., Wan, D. F., Chen, Z. Y., Wang, C. Y., and Zhang, F. (2008). Silicon isotope fractionation in bamboo and its significance to the biogeochemical cycle of silicon. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1381-1395.
- Guelke, M. and Von Blanckenburg, F. (2007). Fractionation of stable iron isotopes in higher plants. *Environmental Science and Technology* 41, 1896-1901.
- Liu, Z., Liu, C., Han, G., Wang, Z., Xue, Z., Song, Z., and Yang, C., 2006. Environmental geochemistry of calcium isotopes: Applications of a new stable isotope approach. *Chinese Journal of Geochemistry* 25, 184-194.
- Moynier, F., Pichat, S., Pons, M.-L., Fike, D., Balter, V., and Albarède, F., (2008) Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology*, *In press*.
- Opfergelt, S., Cardinal, D., Henriët, C., Draye, X., André, L., and Delvaux, B., 2006. Silicon Isotopic Fractionation by Banana ( *Musa* spp.) Grown in a Continuous Nutrient Flow Device. *Plant and Soil* 285, 333-345.
- Opfergelt, S., Delvaux, B., André, L., and Cardinal, D., 2008. Plant silicon isotopic signature might reflect soil weathering degree. *Biogeochemistry* 91, 163-175.
- Page, B., Bullen, T., and Mitchell, M., 2008. Influences of calcium availability and tree species on Ca isotope fractionation in soil and vegetation. *Biogeochemistry* 88, 1-13.



- Richter, F. M., Mendybaev, R. A., Christensen, J. N., Hutcheon, I. D., Williams, R. W., Sturchio, N. C., and Beloso, J. A. D., 2006. Kinetic isotopic fractionation during diffusion of ionic species in water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 277-289.
- de la Rocha, C. L., Brzezinski, M. A., and DeNiro, M. J., 2000. A first look at the distribution of the stable isotopes of silicon in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 2467-2477.
- Schmitt, A.-D., Chabaux, F., and Stille, P., 2003. The calcium riverine and hydrothermal isotopic fluxes and the oceanic calcium mass balance. *Earth and Planetary Science Letters* 213, 503-518.
- Sun L., Wu L. H., Ding T. P., Tian S. H., 2008. Silicon isotope fractionation in rice plants, an experimental study on rice growth under hydroponic conditions. *Plant and soil* 304, 291-300.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Tipper, E. T., Galy, A., Gaillardet, J., Bickle, M. J., Elderfield, H., and Carder, E. A., 2006. The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters* 250, 241-253.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M. J., 2006. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters* 247, 267-279.
- Viers, J., Oliva, P., Nonell, A., Gelabert, A., Sonke, J. E., Freydier, R., Gainville, R., and Dupr\_e, B. (2007). Evidence of Zn isotopic fractionation in a soil-plant system of a pristine tropical watershed (Nsimi, Cameroon). *Chemical Geology* 239, 124-137.
- Weiss, D. J., Mason, T. F. D., Zhao, F. J., Kirk, G. J. D., Coles, B. J., and Horstwood, M. S. A. (2005). Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist* 65, 703-710.
- Wiegand, B. A., Chadwick, O. A., Vitousek, P. M., and Wooden, J. L. (2005). Ca cycling and isotopic fluxes in forested ecosystems in Hawaii. *Geophysical Research Letters* 32, L11404.
- Ziegler, K., Chadwick, O. A., Brzezinski, M. A., and Kelly, E. F. (2005a). Natural variations of  $\delta^{30}\text{Si}$  ratios during progressive basalt weathering, Hawaiian Islands. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 4597-4610.
- Ziegler, K., Chadwick, O. A., White, A. F., and Brzezinski, M. A. (2005b).  $\delta^{30}\text{Si}$  systematics in a granitic saprolite, Puerto Rico. *Geology* 33, 817-820.

---

**Annexes 1 :**  
**Liste des Figures et Tableaux**

---

# Liste des figures

## Introduction

- Figure 0-1** : Exemple de détermination des sources carbonatées, silicatées et d'évaporites altérées dans les plus grands bassins mondiaux (Gaillardet *et al.* 1999)..... 2
- Figure 0-2** : Représentation schématique de la démarche scientifique et des objectifs spécifiques de ce travail de thèse..... 5

## Chapitre I

- Figure I-1** : Cycle biogéochimique terrestre du Mg. Les représentations des réservoirs ne sont pas proportionnelles et les flux sont issus des travaux de Berner *et al.* (1983), excepté celui de la biomasse qui a été calculé sur la base de composition moyenne de 0.2% de Mg dans la plante..... 10
- Figure I-2** : Compositions moyennes en % de matière sèche (\*) des éléments nutritifs des plantes à l'exception du C, O et H qui représentent 45%, 45% et 6% de MS (d'après Epstein et Bloom, 2005).. 11
- Figure I-3** : Représentation du nombre de protons (Z) en fonction du nombre de neutrons (N) (ex. Hoefs, 2004) ..... 12
- Figure I-4** Abondances relatives des isotopes naturels stables du magnésium d'après White et Cameron (1948), Catanzaro *et al.* (1966) ..... 12
- Figure I-5** : Variation de l'énergie potentielle (kJ / mol) d'un système formé par deux atomes d'hydrogène en fonction de la distance interatomique (nm). La différence d'énergie entre cette énergie minimale et le puits de la courbe d'énergie potentielle est notée ZPE (Zero Point Energy). Les flèches indiquent l'énergie, en kJ / mol, nécessaire pour dissocier les atomes (d'après O'Neil, 1986)..... 15
- Figure I-6** : Courbes des fractionnements isotopiques du Mg. Ces courbes sont calculées sur la base de la relation  $\delta^{26}\text{Mg} = \beta\delta^{26}\text{Mg}$  avec  $\beta$  égal à 0.511 et 0.521 et 0.516..... 19
- Figure I-7** : Description des fractionnements isotopiques dépendant de la masse suivis par des échantillons (cas de quelques échantillons naturels) (d'après Young et Galy, 2004)..... 20
- Figure I-8** : Concentration relative des cations dans la solution du sol en fonction de la distance à la surface de la racine. Tout rapport supérieur à 1 indique l'accumulation des éléments nutritifs dans la rhizosphère (d'après Kelly *et al.*, 1991) ..... 21
- Figure I-9** : Coupes transversale et longitudinale d'une racine décrivant les mouvements des cations de la solution externe aux vaisseaux conducteurs de la plante.  $\leftrightarrow$ : Sites d'absorption (voir texte)... 23
- Figure I-10** : Comparaison de la capacité d'échange cationique des racines des espèces dicotylédones et monocotylédones (de Waquant, 1974). M.S : Matière sèche ..... 25
- Figure I-11** : Relation entre la capacité d'échange cationique des racines d'espèces végétales et la

proportion de cations adsorbés dans les feuilles (Wacquant, 1974). M.S: Matière sèche .....	26
<b>Figure I-12</b> : Relation entre la capacité d'échange cationique des racines et la concentration en Mg et Ca dans les feuilles de diverses espèces dicotylédones et monocotylédones. Les figurés noirs désignent le Ca et les figurés blancs désignent le Mg.....	27
<b>Figure I-13</b> : Mouvements et interactions des cations et des molécules d'eau dans les vaisseaux conducteurs du xylème et du phloème des plantes vasculaires.....	28
<b>Figure I-14</b> : Magnésium prélevé et stocké dans les feuilles en fonction des biomasses produites ....	29
<b>Figure I-15</b> : Structure chimique des chlorophylles a et b .....	30
<b>Figure I-16</b> : Influence du K sur l'absorption et la translocation du Mg dans les plantes .....	31
<b>Figure I-17</b> : Contribution (en %) de différents réservoirs au flux annuel de cations dissous dans une rivière typique d'une région boréale (en Russie) (d'après Zakharova <i>et al.</i> 2007) .....	33
<b>Figure I-18</b> : Compositions isotopiques du magnésium des roches silicatées. Compilation de données de la littérature (d'après Brenot <i>et al.</i> , 2008; Galy <i>et al.</i> , 2002; Pogge von Strandmann <i>et al.</i> , 2008; Teng <i>et al.</i> , 2007; Tipper <i>et al.</i> , 2006a; Young et Galy, 2004).....	35
<b>Figure I-19</b> : Signatures isotopiques du magnésium des roches silicatées aux roches carbonatées (d'après Brenot <i>et al.</i> , 2008; Chang <i>et al.</i> , 2004; Galy <i>et al.</i> , 2002; Pogge von Strandmann <i>et al.</i> , 2008; Teng <i>et al.</i> , 2007; Tipper <i>et al.</i> , 2006; Young et Galy, 2004).....	35
<b>Figure I-20</b> : Relation entre les compositions isotopiques du Mg des roches et des rivières de bassins monolithologiques (d'après De Villiers <i>et al.</i> 2005 ; Tipper <i>et al.</i> 2008 et Brenot <i>et al.</i> 2008).....	37
<b>Figure I-21</b> : Diagramme de $\delta^{26}\text{Mg}$ vs $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ pour la caractérisation des sources du Mg dans les eaux de surface du bassin de la Moselle échantillonnées en des points représentatifs des lithologies du bassin (d'après Brenot <i>et al.</i> , 2008).....	38
<b>Figure I-22</b> : Diagramme de $\delta^{26}\text{Mg}$ vs $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ et $\text{Si}(\text{OH})_4/\text{Ca}$ pour la caractérisation des sources du Mg dans les eaux de surface (d'après Tipper <i>et al.</i> , 2008).....	39
<b>Figure I-23</b> : $\delta^{26}\text{Mg}$ mesurés dans les différentes parties d'un blé cultivé en conditions expérimentales (d'après Black <i>et al.</i> , 2008).....	40
<b>Figure I-24</b> : Simulations des processus de fractionnement isotopique du Mg lors de la croissance du blé en culture hydroponique. Les courbes des modèles ont été réalisées avec un fractionnement isotopique $\Delta$ de 0.7‰. La courbe du processus de fractionnement à l'équilibre est celle qui reproduit au mieux les données mesurées (d'après Black <i>et al.</i> , 2008).....	40
<b>Figure I-25</b> Composition isotopique de l'eau de mer. Données issues de la littérature (d'après Carder <i>et al.</i> , 2005 (cité de Pearson <i>et al.</i> , 2005); Chang <i>et al.</i> , 2004; Pearson <i>et al.</i> , 2005; Ra et Kitagawa, 2007; Tipper <i>et al.</i> , 2006; Wombacher <i>et al.</i> , 2006; Young et Galy 2004).....	41
<b>Figure I.26</b> : Cycle global du Mg avec une estimation des $\delta^{26}\text{Mg}$ moyens lorsqu'ils ont été estimés dans la littérature (d'après Tipper <i>et al.</i> , 2006b).....	42

## Chapitre II

- Figure II-1 :** Schéma simplifié des spectromètres de masse utilisés pour les mesures des compositions isotopiques du magnésium : (A) Isoprobe basé au CRPG à Nancy et (B) Nu Plasma basé à l'ENS à Lyon ..... 50
- Figure II-2 :** Spectre de masse du magnésium. La largeur des pics est déterminée par la dimension des fentes d'entrée et de sortie, et par la dispersion en énergie du faisceau d'ions..... 52
- Figure II-3 :** Effet de l'interférence du C-N de masse 26 sur le spectre du  $^{26}\text{Mg}$  obtenu avec l'Isoprobe. Pour l'analyse des rapports isotopiques du Mg, les cages de Faraday sont disposées de sorte à collecter simultanément les trois isotopes du Mg. Ces cages doivent être parfaitement alignées et le passage du faisceau devant la fente donne les pics normaux représentés sur la figure A, alors qu'en présence de C-N, le spectre de cette molécule contribue au spectre de la masse 26 (B)..... 54
- Figure II-4 :** Logarithmes népériens des rapports isotopiques du standard SRM980<sub>CRPG</sub> mesurés lors d'une session d'analyse sur le Nu Plasma. La pente de la droite donne la valeur de  $\beta$ , qui lie théoriquement les coefficients du fractionnement instrumental de masse..... 55
- Figure II-5 :** Evolution de la variation des compositions isotopiques du standard SRM980<sub>CRGP</sub> mesurées au cours du temps le Nu Plasma..... 56
- Figure II.6 :** Variation de la composition isotopique du standard SRM980 en fonction de la molarité de l'acide de dilution de l'échantillon (A) et la variation de la composition isotopique du DSM3 en fonction de la différence de la concentration avec la solution du SRM980<sub>CRPG</sub> (B) ..... 57
- Figure II.7 :** Fractionnement isotopique lors de l'élution et la séparation chimique du Mg par chromatographie ionique sur résine échangeuse d'ions (d'après Teng *et al.*, 2007 et Chang *et al.*, 2003)..... 58
- Figure II-8 :** Courbes d'élution des cations obtenues avec le protocole chimique développé par Brenot (2006) pour une séparation efficace du Mg de la matrice ..... 61
- Figure II-9 :** Courbes d'élution des cations avec de l'acide chlorhydrique de 0.5 M, puis 1 M..... 65
- Figure II-10.** Résumé des différentes étapes de la chimie séparative du Mg développé pour une purification efficace et rapide du Mg de la matrice..... 66
- Figure article :** "*Magnesium Isotope composition of Natural Reference Materials*"
- **Figure 1.** (A) Long-term reproducibility of  $\delta^{26}\text{Mg}$  measurements of Mg standard solutions DSM3 (black), Cambridge-1(white), CRPG-Aldrich (light grey), and NIST SRM 980 (pure and doped (dark grey)) Mg standard solutions. Stars correspond to the MC-ICP-MS Nu-plasma measurements. (B)  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured for full replicates of several reference materials (see text, and Tables 1 and 4). Errors are given at the  $2\sigma$  level..... 73
  - **Figure 2.** Magnesium isotope compositions of the reference materials analysed in this study plotted against data from the literature..... 76
  - **Figure 3.** Magnesium three-isotope plot relative to DSM3 for reference materials, and Mg standard solutions (Table 4).  $\delta^{26}\text{Mg}' = 1000 \cdot \ln((\delta^{26}\text{Mg}_{\text{measured}} + 1000)/1000)$  and  $\delta^{25}\text{Mg}' = 1000 \cdot \ln((\delta^{25}\text{Mg}_{\text{measured}} + 1000)/1000)$ . Error bars are at the  $2\sigma$  level. The value of the slope and its equation was determined using Isoplot 3.00 (Ludwig 2003) ..... 77
  - **Figure 4.** Magnesium three-isotope plot relative to DSM3 for plant reference materials and

cell organelles molecule chlorophylls a and b (Young and Galy 2004). Error bars represent  $2\sigma$ . (1) Ra and Kitagawa (2007), (2) Black *et al.* (2006), (3) Young and Galy (2004) ..... 78

**Figure II-11.** Variation de la croissance des plantes (production de biomasse) en réponse à l'apport des éléments nutritifs dans le milieu de culture..... 83

**Figure II-12.** Dispositif de croissance des plantes (production de biomasse) sur substrat minéral.... 85

**Figure II-13.** Variation du pH de la solution nutritive au cours de la croissance des plantes en culture hydroponique..... 88

**Figure II-14.** Pourcentage de variation de la composition en Mg de la solution nutritive au cours de la croissance des plantes en culture hydroponique..... 89

### Chapitre III

**Figure 1.** Schematic diagram of experimental cropping devices used for rye grass and clover growths: (A) the hydroponic culture and (B) the culture on phlogopite. Mg is supplied either as a  $MgSO_4$  salt dissolved in a continuously aerated solution, or as a phlogopite powder (see text for more details) ..... 99

**Figure 2. (A)** Biomass dry weight (g) versus Mg concentration ( $mg.g^{-1}$ ) for all experiments. **(B)** Fraction of plant Mg versus the fraction of plant biomass for the various organs of rye grass (filled symbols) and clover (open symbols). Triangles correspond to plants grown on phlogopite and circles are the hydroponic cultures. Literature data are also shown (grey ellipse) ..... 103

**Figure 3.** Magnesium (A), potassium (B), and  $\delta^{26}Mg$  (C) measured in the solutions used for the dead and living root immersion experiments, as a function of time. Dead roots were dried for 48h. The initial solution was a pure Mg solution (no K) ..... 105

**Figure 4. (A)** Mg isotope composition of all the samples analysed in this study, plotted in a  $\delta^{26}Mg'$  versus  $\delta^{25}Mg'$  three isotope plot, as defined in Young and Galy (2004). Error bars are 2SD. **(B)**  $\Delta'-\delta'$  diagram for plant data obtained in this study (filled circles) and for published data (1: Young and Galy, 2004; 2: Ra an Kitagawa, 2007; 3: Black *et al.*, 2006; 4: Black *et al.*, 2008; 5: Bolou-Bi *et al.*, 2009). ..... 107

**Figure 5.**  $\delta^{26}Mg$  of the various parts of the rye grass and clover grown on phlogopite culture (A) and hydroponically (B). The corresponding bulk-plant  $\delta^{26}Mg$  are also shown (stars), as well as the  $\delta^{26}Mg$  of the Mg desorbed using  $CaCl_2$  (see text), and of the lixiviated solutions collected at the end of the experiments, as described in section 2 ..... 108

**Figure 6.**  $\delta^{26}Mg$  versus K/Mg for the various parts of rye grass (filled symbols) and clover (open symbols). Same symbols as in figure 5, ie triangles for plants grown on phlogopite and circles for hydroponic plants ..... 115

**Figure 7.** Comparison of the  $\delta^{26}Mg$  published for natural plants (Bolou- Bi *et al.*, 2009) with the  $\delta^{26}Mg$  values presently known for the other reservoirs (Young and Galy 2004; Bizarro *et al.*, 2005; de Villiers *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 2007; Wiechert and Halliday, 2007; Tipper *et al.*, 2006a, 2006b and 2008; Brenot *et al.*, 2008; Pogge von Strandmann *et al.*, 2008). Data from de Villiers *et al.* (2005) were converted in DSM3 scale using the seawater  $\delta^{26}Mg$ , assumed to be equal to  $-0.82\%$  ..... 117

**Figure 8.** Simple simulation of the change in river  $\delta^{26}\text{Mg}$  as a function of the percent of river dissolved Mg (A) taken up by growing vegetation ( $Y_{\text{Mg}}$ ) or (B) coming from litter degradation ( $X_{\text{Mg}}$ ). Curves correspond to various  $\delta^{26}\text{Mg}$  mean value for natural plants: -1.00‰ (1), -0.75‰ (2) and -0.50‰ (3). The present-day mean riverine  $\delta^{26}\text{Mg}$  (dashed line) is from Tipper *et al.* (2006b)..... 118

## Chapitre IV

**Figure 1.** Map of Senones catchment in the Vosges Mountains with locations of lysimeters, stream sampling sites ..... 135

**Figure 2.** Magnesium concentration (A), Strontium concentration (B), Mg isotope compositions (C) and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio of bulk soil according to depth. The uncertainty (2SD) on  $\delta^{26}\text{Mg}$  is 0.14‰..... 140

**Figure 3.** Calculated losses or gains of cations ( $\tau$ ) in the soil profile relative to titanium (see text)..... 142

**Figure 4.** Influence of the litter degradation input during the bedrock (sandstone) weathering in the soil profile..... 142

**Figure 5.** Soil solution  $\delta^{26}\text{Mg}$  as a function of depth, at two sampling dates: one during the plant growth period (May) in filled circles and the second during the dormancy periods (January-April) in open circles. .... 148

**Figure 6.**  $\delta^{26}\text{Mg}$  measured in the various organs of the young spruce sampled in the Senones catchment. .... 151

**Figure 7.** Systematic variation in the  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of needles at four heights, increasing from old needles to young needles..... 151

**Figure 8.** Simulation of a simple mixing between lithological, atmospheric and vegetation endmembers and data for soil samples ..... 153

**Figure 9.** Ca/Na and K/Na as a function of Mg/Na..... 158

**Figure 10.** Streamwater  $\delta^{26}\text{Mg}$  variations with discharge ..... 159

## Conclusion générale

**Figure V-1 :** Récapitulatif et synthèse des principaux résultats et conclusions de cette étude (\*) et des données de la littérature (a, Black *et al.*, 2008)..... 166

**Figure V-2 :** Comparaison des compositions isotopiques mesurées au cours de cette thèse (\*) et des données de la littérature ((a) Tipper *et al.* (2006a, 2006b et 2008) et (b) Brenot *et al.* (2008))..... 167

**Figure V-3 :** Variations des compositions isotopiques des cations ( $^a\text{X}$  :  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{66}\text{Zn}$  et  $^{57}\text{Fe}$ ) lors de la croissance des plantes. **Magnésium** : Cette étude, Black *et al.* (2008) ; **Silicium** : Ding *et al.* (2005, 2008), Opfergelt *et al.* (2006, 2008) et Sun *et al.*, 2008 ; **Calcium** : Cenki-Tok *et al.* (2009), Page *et al.* (2008), Wiegand *et al.* (2005) et Schimdt *et al.* (2003); **Zinc** : Moynier *et al.* (2008), Viers *et al.* (2007) et

Weiss *et al.* (2005) et **Fer** : Guelke et von Blanckenburg (2007)..... 169

**Figure V-4** : Schéma récapitulatif des signatures isotopiques de Si et Ca dans les différents réservoirs (hors carbonates). Les données sont issues de la littérature **Silicium (A)** : (a) Ding *et al.* (2004, 2005, 2008), (b) Opfergelt *et al.* (2006, 2008), (c) Ziegler *et al.* (2005a, 2005b), (d) Basile-Doelsch *et al.* (2005), (e) de la Rocha *et al.* (2000) et (f) Ding *et al.* (1996) cité de Basile-Doelsch *et al.* (2005); **Calcium (B)** : (a) Cenkci-Tok *et al.* (2009), (b) Schimdt *et al.* (2003), (c) Wiegand *et al.* (2005), (d) Page *et al.* (2008) et (e) Lui *et al.* (2006). La conversion du  $^{44}\text{Ca}_{\text{SW}}$  au  $^{44}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  a été faite avec la relation suivante :  $^{44}\text{Ca}_{\text{SRM915a}} = ^{44}\text{Ca}_{\text{SW}} + 1.88$  (Schimdt *et al.*, 2003)..... 172



# Liste des Tableaux

## Chapitre I

- Tableau I-1** : Quantité et temps de résidence du magnésium dans la litière de forêts sous les principaux climats terrestres (Données issues de Feger, 2007)..... 32
- Tableau I-2** : Analyse de profils des océans. (1) Ra et Kitagawa dans l'océan Pacifique et (2) de Villiers *et al.* (2005) dans l'océan Atlantique et la mer Méditerranée. Les données de De Villiers *et al.* (2005) ont été calculées et converties par rapport au DSM3, en considérant que la valeur moyenne de l'eau de mer (-0.82‰)..... 41

## Chapitre II

- Tableau II-1** : Les interférents potentiels sur les isotopes du magnésium ..... 53
- Tableau II-2** : Bilan des procédures de séparation chimique de Mg de différentes matrices pour analyse des rapports isotopiques d'échantillons terrestres..... 59
- Tableau II-3** : Proportion en masse (ppm/ppm de Mg) des échantillons utilisés pour la calibration des résines et la validation de la chimie séparative développées par Brenot (2006)..... 60
- Tableau II-4** : Nombre de passages sur colonne pour une purification complète d'un échantillon en fonction du rapport initial K/Mg. (\*) P (1, 2, etc.) désigne le nombre de passages sur la résine cationique..... 61
- Tableau II-5** : Composition de la fraction finale lors de l'élution des éléments sur la résine anionique AG MP-1M. La concentration des éléments a été mesurée à l'ICP Elan 6000 au SARM..... 62
- Tableau II-6** : Rapport des coefficients de partage des éléments dans les acides nitrique et chlorhydrique sur la résine échangeuse de cations AG50W-X8 (Strelow, 1960; Strelow *et al.*, 1971)..... 63
- Tableau II-7** : Composition et rendements des éluats lors des protocole-tests de chimie séparative de Mg sur la résine cationique AG50W-X12, pour les test 1 (A) et test (B)..... 64
- Tableaux article** : "*Magnesium Isotope composition of Natural Reference Materials*"
- **Table 1**: Description and origin of reference materials analysed in this study..... 69
  - **Table 2**: Details of the Mg separation procedure, using chromatographic exchange resins AG® MP-M1 and AG® 50W-X12..... 70
  - **Table 3**: Ca/Mg, K/Mg, Na/Mg, Ti/Mg, Al/Mg, Fe/Mg, Mn/Mg and Zn/Mg molar ratios for reference materials measured (a) before and (b) after the chemical procedure described in the text and Table 2..... 72
  - Magnesium isotope ratios for standard solutions and for rock, soil, water and plant reference materials. Corresponding published values are also shown for comparison..... 75
- Tableau II-8** : Equilibre ionique de la solution nutritive fabriquée pour la croissance des plantes.... 84
- Tableau II-9** : Taux de germination des tests de stérilisation..... 84

## Chapitre III

**Table 1.** Plant total biomasses (g), Mg concentrations ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Mg distributions (%) and Mg isotope compositions ( $\delta^{26}\text{Mg}$ ) of the various rye grass and clover parts. Calculated values for bulk plants are also given. N represents the number of separate column chemistry and (n) represents separate standard-bracketed replicates using MC ICP-MS. Cambridge 1 mean  $\delta^{26}\text{Mg}$  are comparable to published values (Galy et al. 2003; Tipper et al., 2006a; Black et al., 2006; Bolou-Bi et al., 2009).  $\Delta^{25}\text{Mg}'$  was calculated according to Young and Galy (2004) :  $\Delta^{25}\text{Mg}' = \delta^{25}\text{Mg}' - 0.521\delta^{26}\text{Mg}'$ . DSM3 values relative to  $\text{SRM}_{\text{CRPG}}$  are  $\delta^{26}\text{Mg} = 3.97 \pm 0.14\text{‰}$  and  $\delta^{25}\text{Mg} = 2.04 \pm 0.09\text{‰}$  ..... 102

**Table 2.** Mg isotope fractionation between the source and bulk plant, roots, leaves and between roots and leaves or desorbed Mg ..... 110

**Table 3.**  $\delta^{26}\text{Mg}$ , K and Mg contents for the solution used in the root immersion experiment. Major element composition of fresh roots before and after the pre-leaching performed with nitric acid is also given (see text for more details) ..... 112

## Chapitre IV

**Table 1:** Selected chemical and physical properties of a typical soil profile..... 139

**Table 2:** Average element composition (mass %) of soil horizon and the bedrock ..... 139

**Table 3 :** Majors cations (Mg, Ca, K and Na) and Sr concentrations and Mg isotopes compositions measured in  $\text{NH}_4\text{-Ac}$  leached solutions from soil horizons of the Val de Senones catchment ..... 143

**Table 4:** Majors cations (Mg, Ca, K and Na) and Sr concentration, Mg and Sr isotopes compositions measured in the water samples (precipitations, soil solutions and streamwater) in the Val de Senones catchment ..... 145

**Table 5 :** Majors cations (Mg, Ca, K and Na) and Sr concentrations, Mg and Sr isotopes compositions measured in vegetation samples (roots, woods, needles and leaves) and in forest floor sample in the Val de Senones catchment ..... 150

---

---

**Annexes 2 :**  
**Analyse des plantes**

---

---

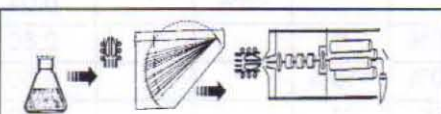


CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902081  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA10

Emission - ICP		ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	0.27						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.029	Be		Lu		W	
MgO	0.16	Bi		Mo		Y	
CaO	0.55	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.41	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.32	Cs		Pr			
Perte au Feu	97.81	Cu		Rb			
Total	99.54	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			



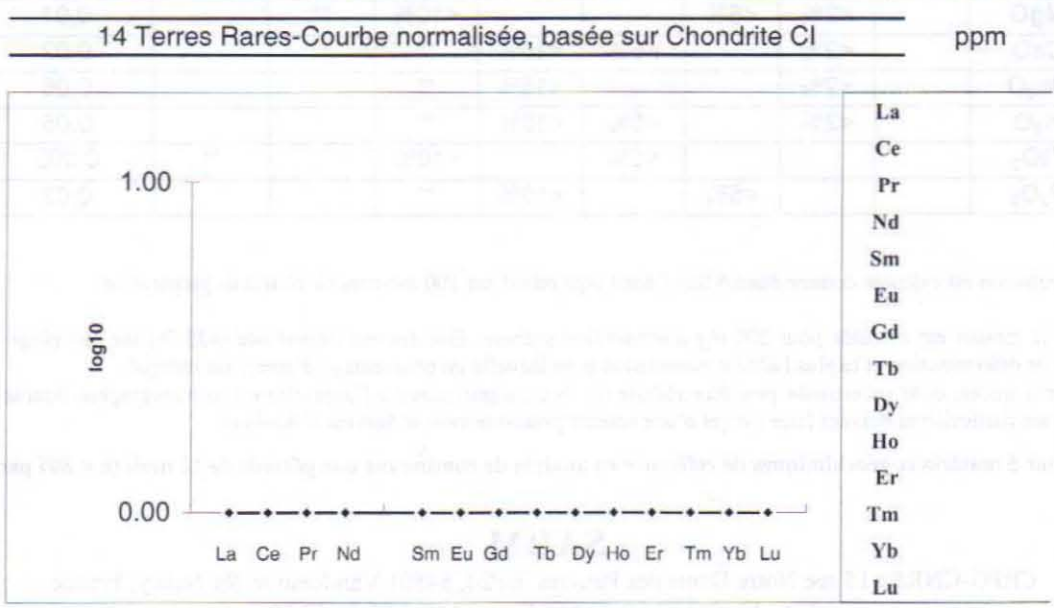
Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- <l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902082  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA11

Emission - ICP		ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	0.67	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Be		Lu		W	
MnO	0.038	Bi		Mo		Y	
MgO	0.14	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.76	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.52	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.28	Cu		Rb			
Perte au Feu	97.41	Dy		Sb			
Total	99.82	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

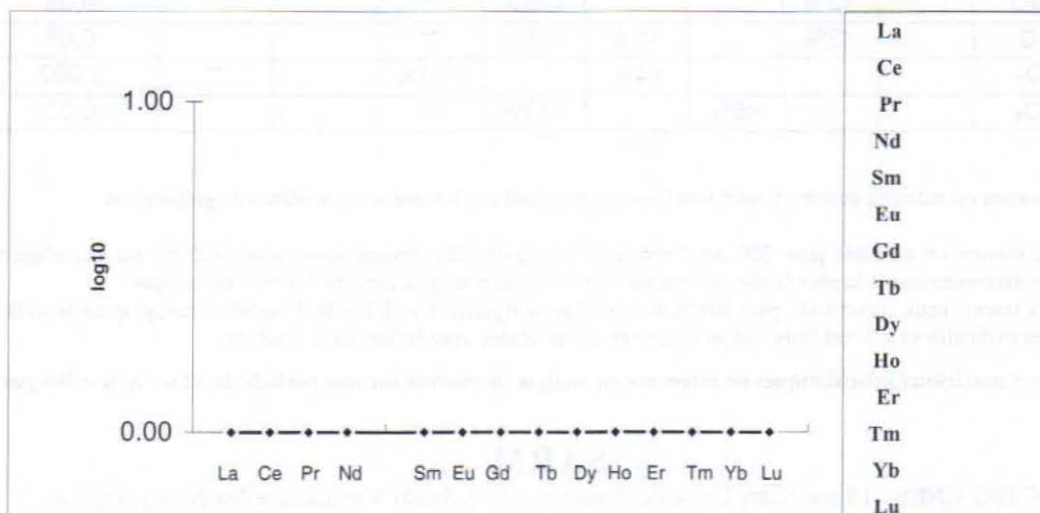
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- <l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm



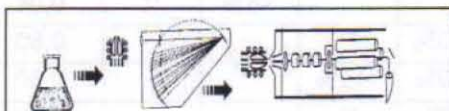


CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902083  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA12

Emission - ICP		ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	0.78	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Be		Lu		W	
MnO	0.039	Bi		Mo		Y	
MgO	0.14	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.87	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.50	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.25	Cu		Rb			
Perte au Feu	96.80	Dy		Sb			
Total	99.38	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			



Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

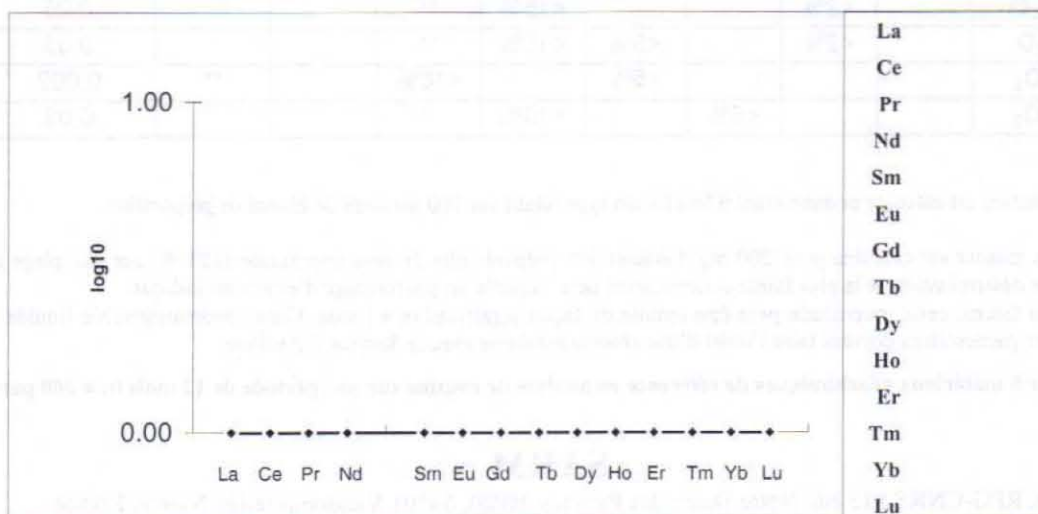
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902084  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA13

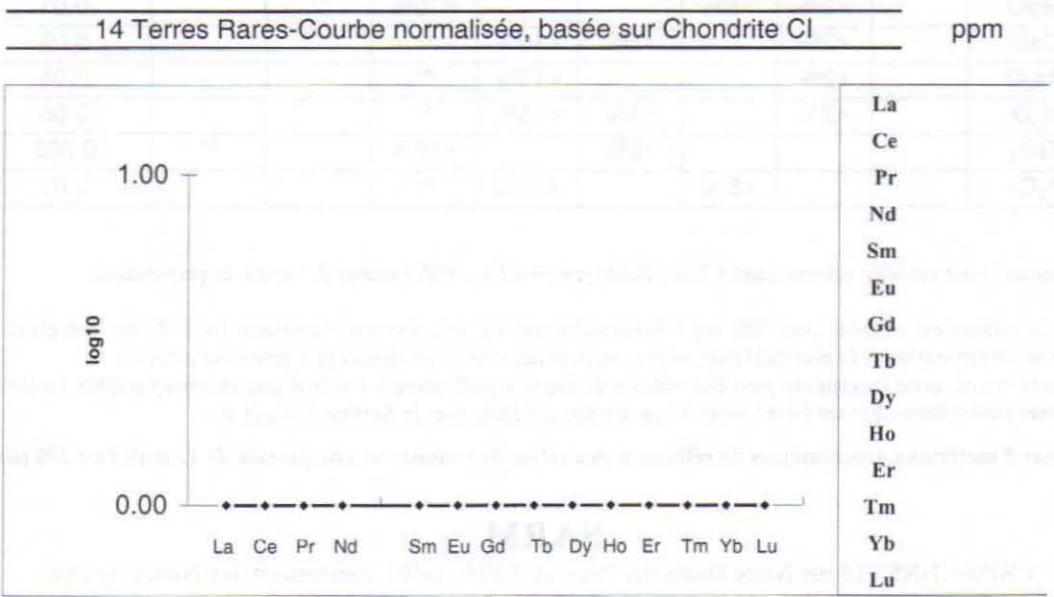
Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	1.08						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.033	Be		Lu		W	
MgO	0.15	Bi		Mo		Y	
CaO	0.93	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.48	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.24	Cs		Pr			
Perte au Feu	97.11	Cu		Rb			
Total	100.03	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**  
 < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
 n. d. : Non dosé.





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902077  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA40

Emission - ICP		ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	0.36	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Be		Lu		W	
MnO	0.023	Bi		Mo		Y	
MgO	0.13	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.44	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.52	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.34	Cu		Rb			
Perte au Feu	98.11	Dy		Sb			
Total	99.92	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

Analyse automatisée:

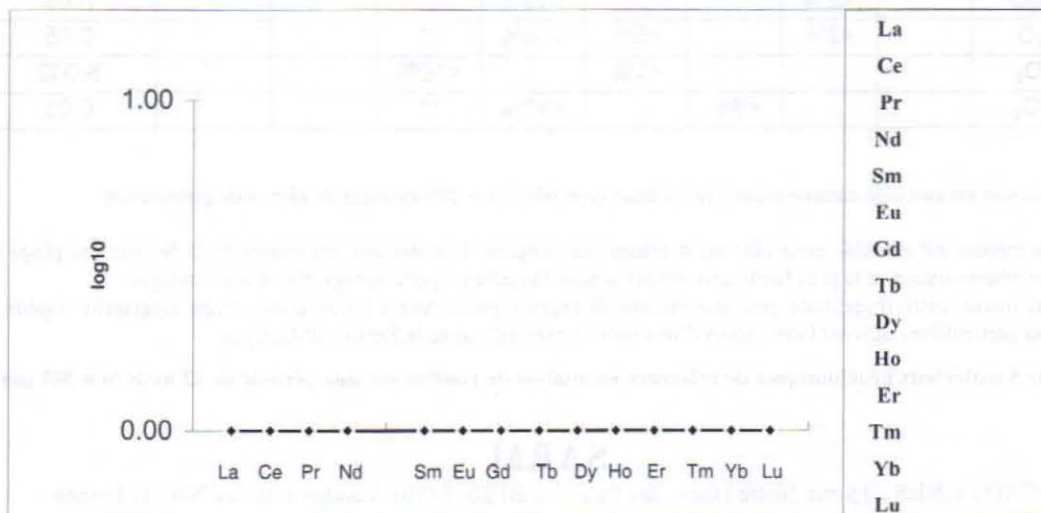
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI ppm







CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902078  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA41

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	0.68						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.05	Ba		La		V	
MnO	0.033	Be		Lu		W	
MgO	0.12	Bi		Mo		Y	
CaO	0.67	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.60	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.30	Cs		Pr			
Perte au Feu	97.31	Cu		Rb			
Total	99.76	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

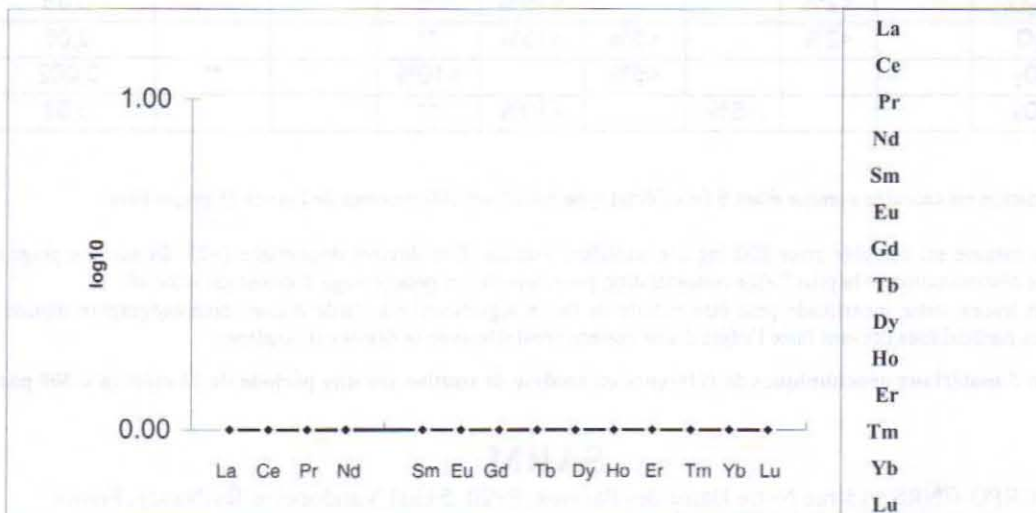
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902079  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA42

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	0.84	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.02	Be		Lu		W	
MnO	0.033	Bi		Mo		Y	
MgO	0.10	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.73	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.62	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.27	Cu		Rb			
Perte au Feu	96.95	Dy		Sb			
Total	99.56	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

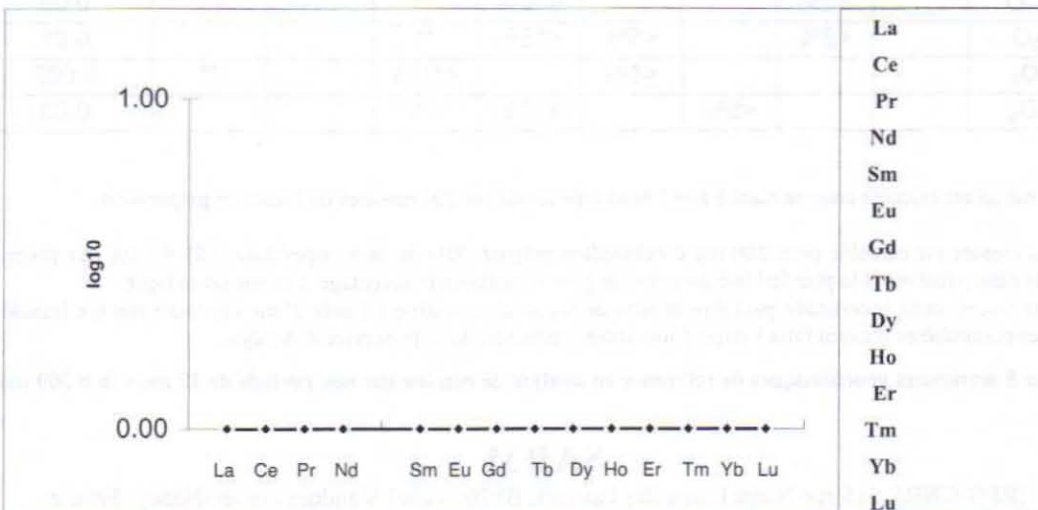
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902080  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA43

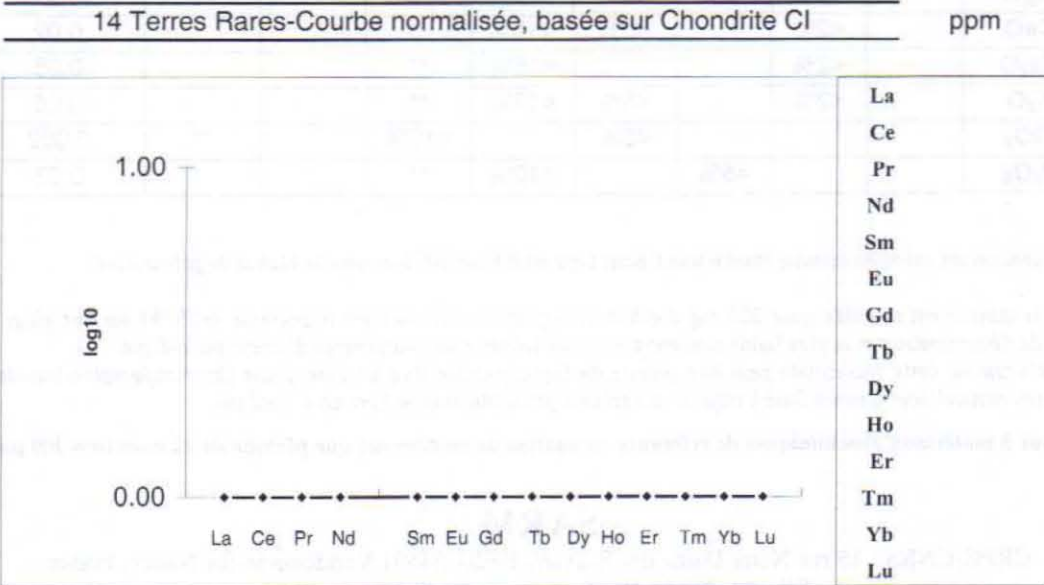
Emission - ICP		ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)	ICP-MS	μg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	1.22						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.031	Be		Lu		W	
MgO	0.11	Bi		Mo		Y	
CaO	0.79	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.54	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.24	Cs		Pr			
Perte au Feu	96.91	Cu		Rb			
Total	99.84	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**  
 < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
 n. d. : Non dosé.





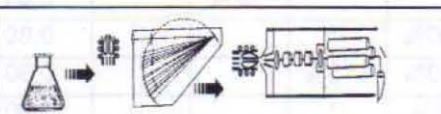
CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902073  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA50

Emission - ICP	
	%
SiO <sub>2</sub>	0.32
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.02
MnO	0.027
MgO	0.17
CaO	0.49
Na <sub>2</sub> O	<l.d.
K <sub>2</sub> O	0.56
TiO <sub>2</sub>	<l.d.
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.35
Perte au Feu	98.56
Total	100.49

ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
As		In		U	
Ba		La		V	
Be		Lu		W	
Bi		Mo		Y	
Cd		Nb		Yb	
Ce		Nd		Zn	
Co		Ni		Zr	
Cr		Pb			
Cs		Pr			
Cu		Rb			
Dy		Sb			
Er		Sm			
Eu		Sn			
Ga		Sr			
Gd		Ta			
Ge		Tb			
Hf		Th			
Ho		Tm			



Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

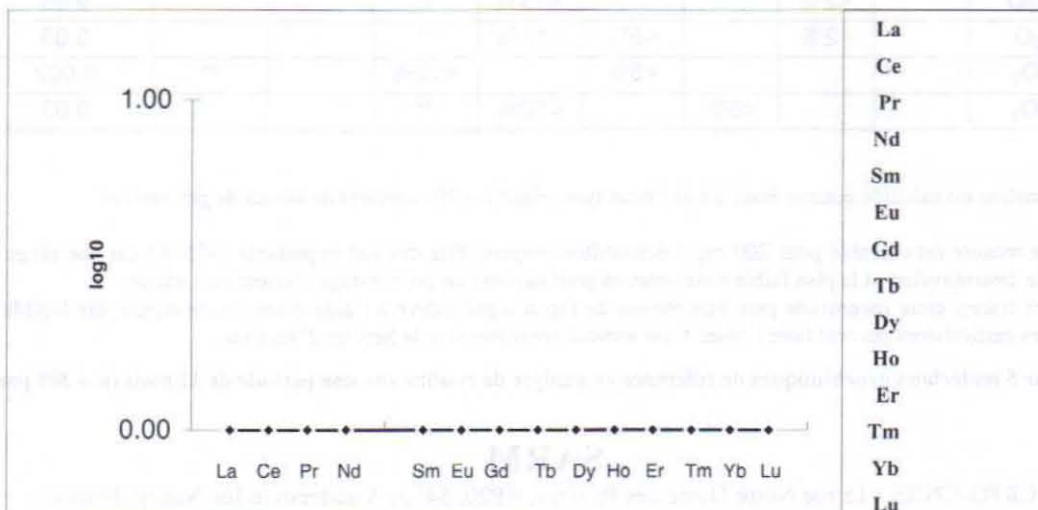
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902074  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA51

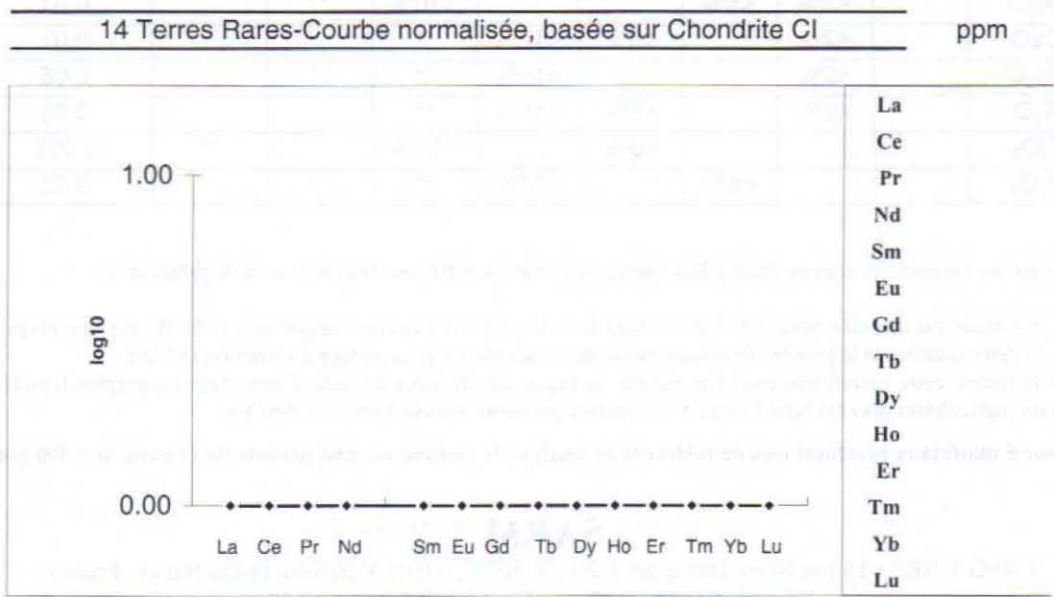
Emission - ICP		ICP-MS		ICP-MS		ICP-MS	
	%		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)
SiO <sub>2</sub>	0.73						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.034	Be		Lu		W	
MgO	0.14	Bi		Mo		Y	
CaO	0.66	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.72	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.33	Cs		Pr			
Perte au Feu	97.81	Cu		Rb			
Total	100.42	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**  
 < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
 n. d. : Non dosé.



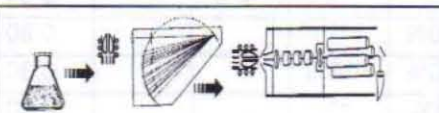


CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel: (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902075  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA52

Emission - ICP		ICP-MS		ICP-MS		ICP-MS	
	%		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)
SiO <sub>2</sub>	0.95	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Be		Lu		W	
MnO	0.035	Bi		Mo		Y	
MgO	0.14	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.73	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.65	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.27	Cu		Rb			
Perte au Feu	96.71	Dy		Sb			
Total	99.49	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			



Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

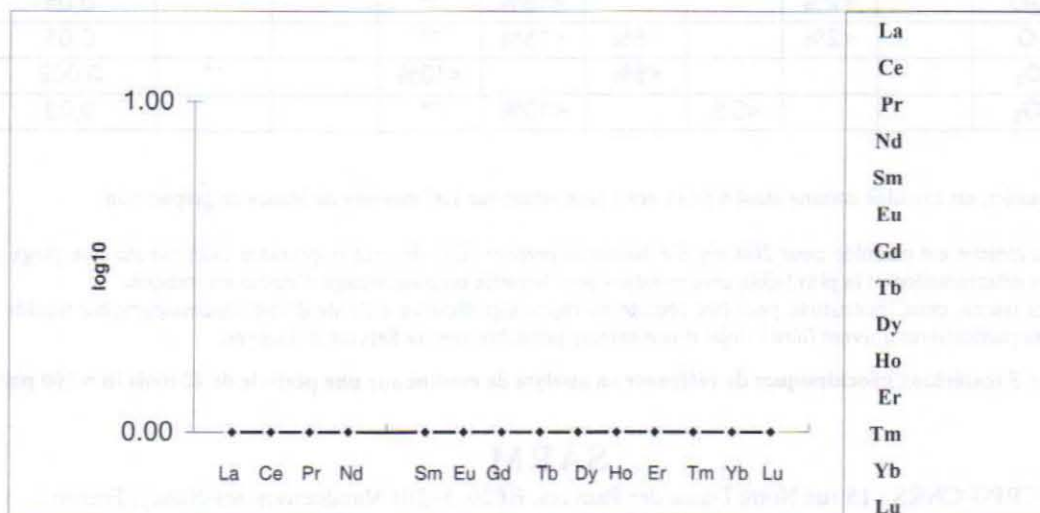
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

Remarques:

- <l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902076  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EA53

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	1.37	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.10	Be		Lu		W	
MnO	0.027	Bi		Mo		Y	
MgO	0.12	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.54	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	0.06	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.56	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.23	Cu		Rb			
Perte au Feu	96.71	Dy		Sb			
Total	99.72	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

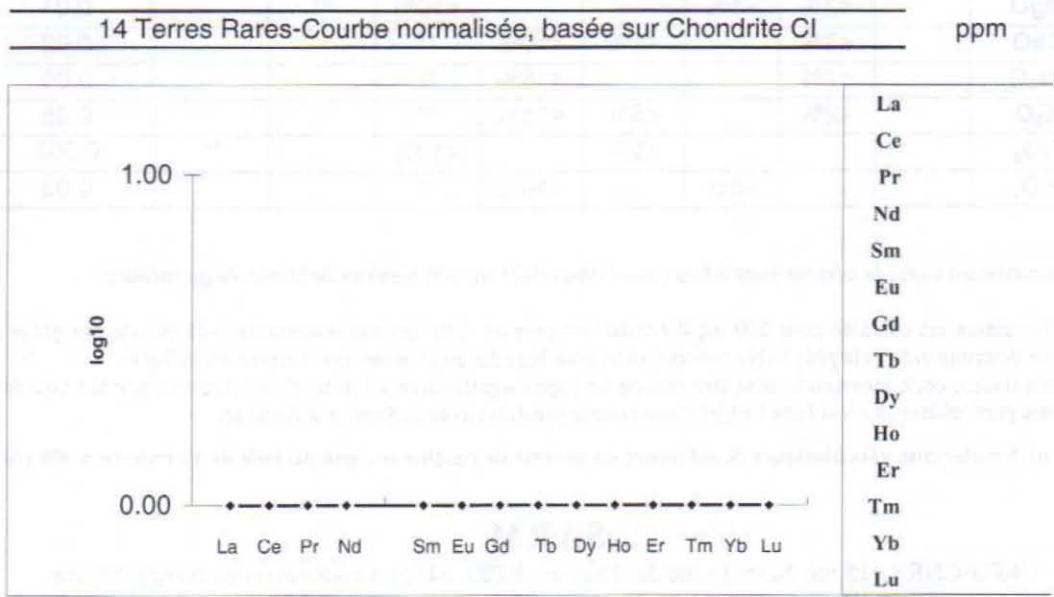
**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.



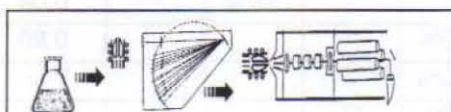


CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902088  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EB10

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	<l.d.						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.0030	Be		Lu		W	
MgO	0.02	Bi		Mo		Y	
CaO	0.06	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
Perte au Feu	100.00	Cu		Rb			
Total	100.08	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			



Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

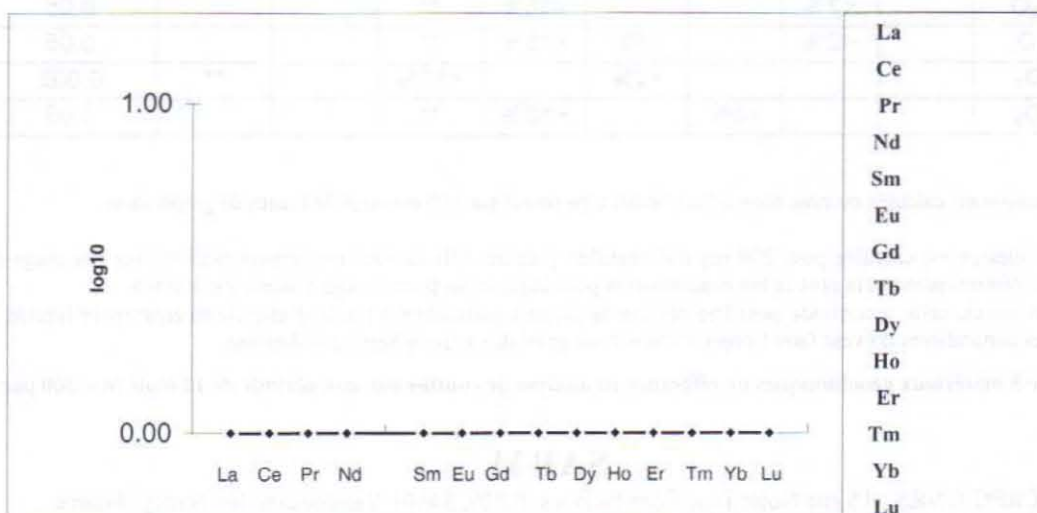
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- <l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm







CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902087  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EB100

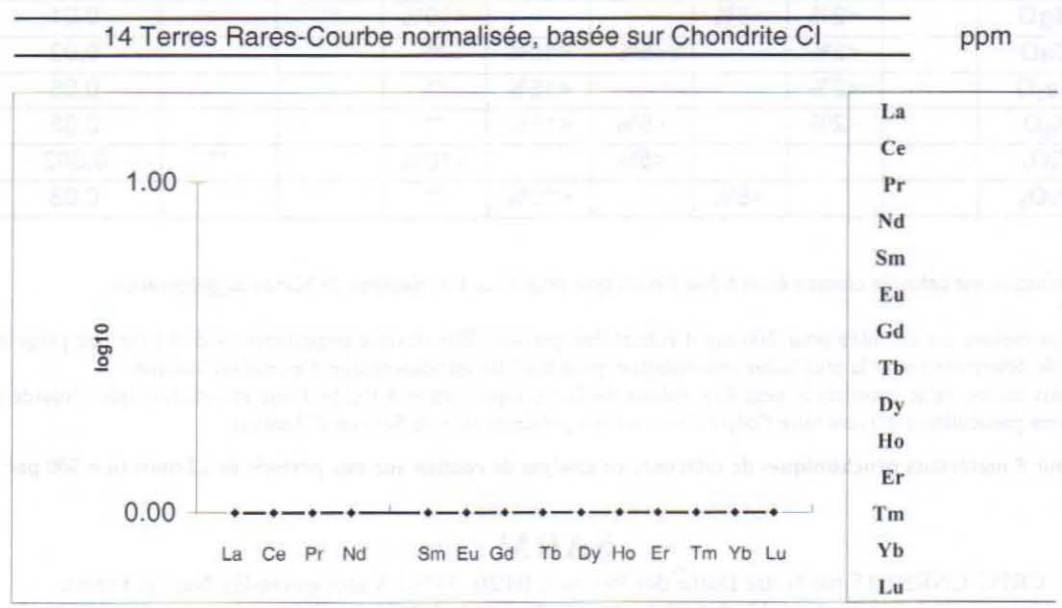
Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	<l.d.						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.0040	Be		Lu		W	
MgO	0.02	Bi		Mo		Y	
CaO	0.08	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
Perte au Feu	99.85	Cu		Rb			
Total	99.95	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**  
 <l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
 n. d. : Non dosé.





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902086  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EB400

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	<l.d.						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.0040	Be		Lu		W	
MgO	0.02	Bi		Mo		Y	
CaO	0.08	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.031	Cs		Pr			
Perte au Feu	99.55	Cu		Rb			
Total	99.69	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

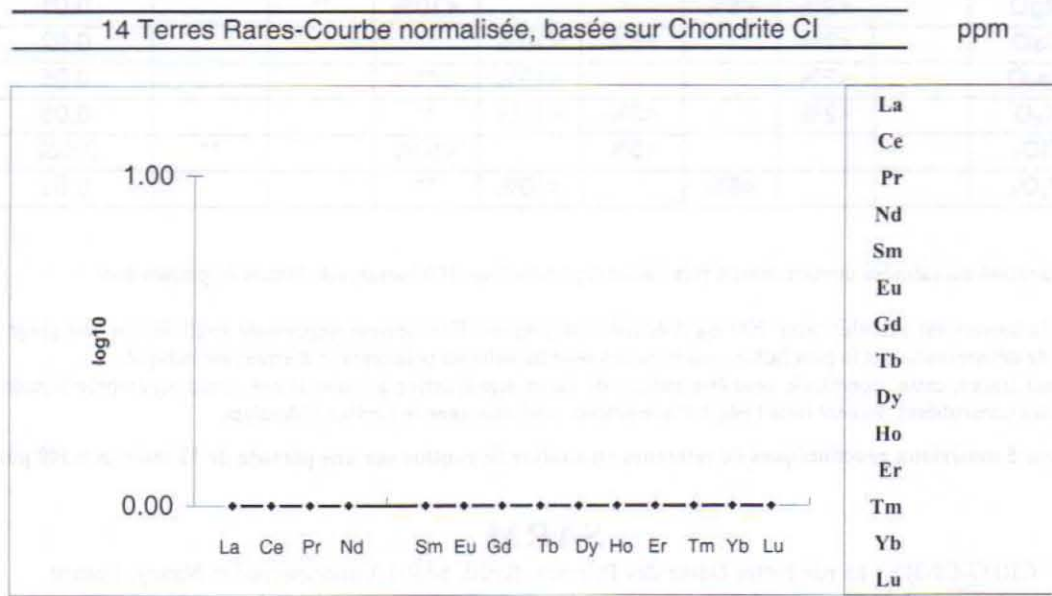
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)

n. d. : Non dosé.





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902085  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# EB500

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	<l.d.						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
MnO	0.0040	Be		Lu		W	
MgO	0.02	Bi		Mo		Y	
CaO	0.08	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.036	Cs		Pr			
Perte au Feu	99.40	Cu		Rb			
Total	99.54	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

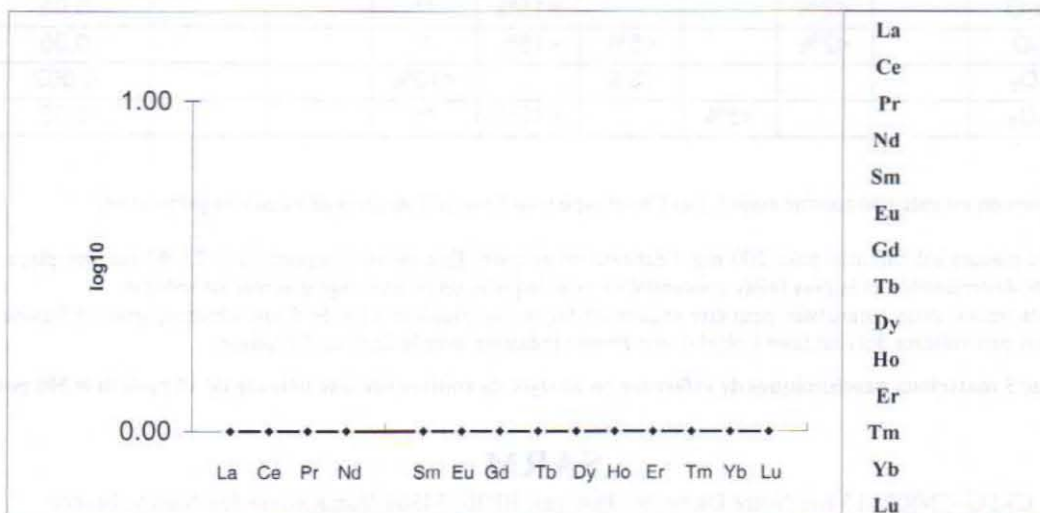
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

<l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902089  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# ER1

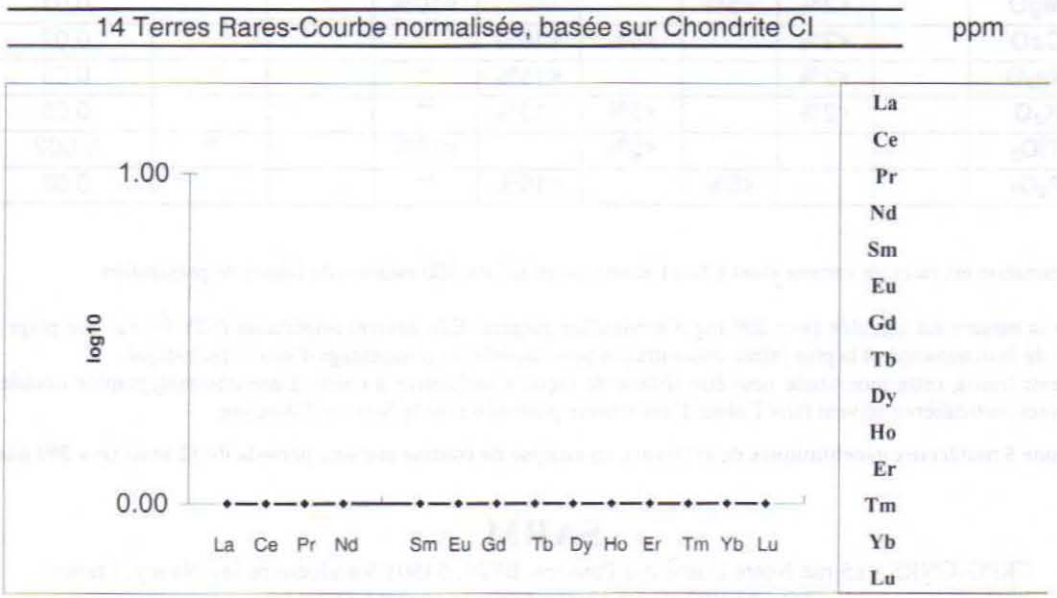
Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	2.97	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.29	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.09	Be		Lu		W	
MnO	0.010	Bi		Mo		Y	
MgO	0.09	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.22	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.16	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	0.025	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.12	Cu		Rb			
Perte au Feu	96.01	Dy		Sb			
Total	100.00	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**  
< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.



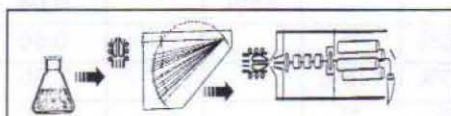


CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902090  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# ER2

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	8.62						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.56	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.26	Ba		La		V	
MnO	0.0090	Be		Lu		W	
MgO	0.08	Bi		Mo		Y	
CaO	0.07	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.35	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	0.12	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.15	Cs		Pr			
Perte au Feu	88.94	Cu		Rb			
Total	100.15	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			



Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

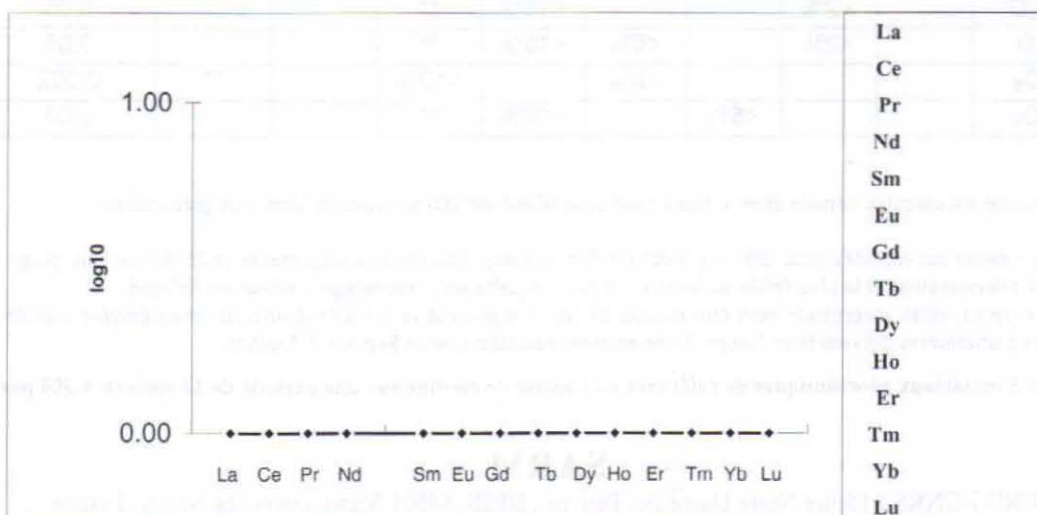
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

Remarques:

- < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm



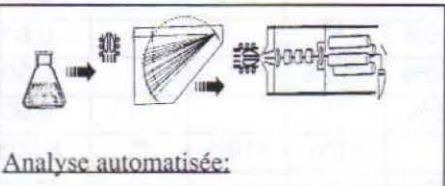


CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902091  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# GF

Emission - ICP		ICP-MS		ICP-MS		ICP-MS	
	%		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)
SiO <sub>2</sub>	0.16	As		In		U	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Ba		La		V	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	Be		Lu		W	
MnO	0.029	Bi		Mo		Y	
MgO	0.16	Cd		Nb		Yb	
CaO	0.15	Ce		Nd		Zn	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co		Ni		Zr	
K <sub>2</sub> O	0.94	Cr		Pb			
TiO <sub>2</sub>	<l.d.	Cs		Pr			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.41	Cu		Rb			
Perte au Feu	97.86	Dy		Sb			
Total	99.70	Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			



Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

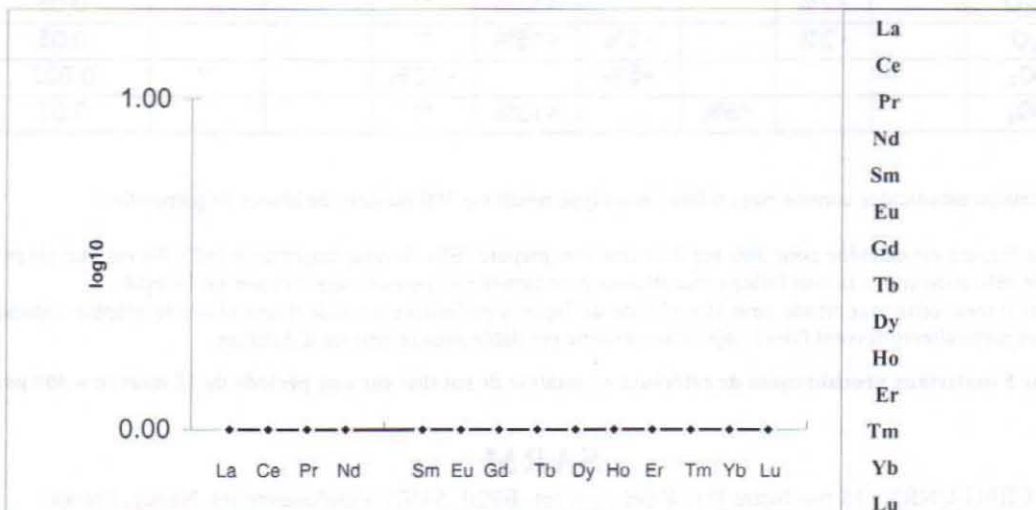
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- < l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 26/02/2009

CRPG # 0902092  
Demandeur: VIGIER - BOULOU BI  
Echantillon# GR

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	1.16						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<l.d.	As		In		U	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.03	Ba		La		V	
MnO	0.0040	Be		Lu		W	
MgO	0.02	Bi		Mo		Y	
CaO	0.07	Cd		Nb		Yb	
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce		Nd		Zn	
K <sub>2</sub> O	0.16	Co		Ni		Zr	
TiO <sub>2</sub>	0.0020	Cr		Pb			
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.090	Cs		Pr			
Perte au Feu	97.96	Cu		Rb			
Total	99.49	Dy		Sb			
		Er		Sm			
		Eu		Sn			
		Ga		Sr			
		Gd		Ta			
		Ge		Tb			
		Hf		Th			
		Ho		Tm			

**Analyse automatisée:**

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

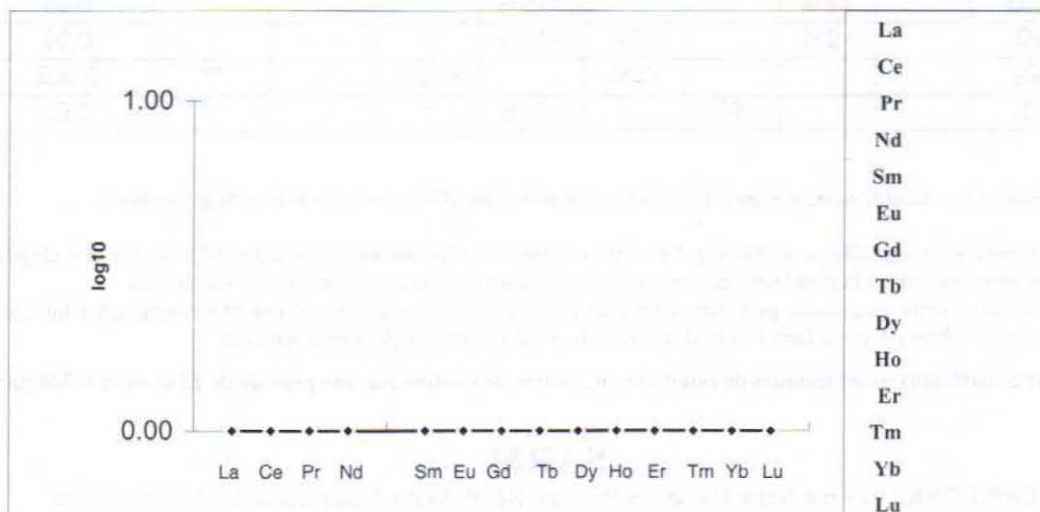
**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI

ppm



# Limites de détermination\* et incertitudes\*\*

( Janvier 2009 )

## Dosage des éléments traces

	>50 ppm	>10 ppm	>1 ppm	>0,1 ppm	>0,01 ppm	* Limites déterm. ppm
As	<5%	<10%	**			1,50
Ba	<5%	<10%	**			2,00
Be	<5%	<10%	**			1,50
Bi			<5%	**		0,10
Cd		<5%	<15%	**		0,15
Ce		<5%	<10%	**		0,15
Co	<5%	<10%	<15%	**		0,60
Cr	<5%	<10%	**			7,00
Cs	<5%		<10%	**		0,25
Cu	<5%	<10%	**			6,00
Dy			<5%	<10%	<15%	0,007
Er			<5%	<10%	**	0,003
Eu				<5%	<10%	0,004
Ga		<5%	<8%	**		0,30
Gd				<5%	<10%	0,03
Ge			<5%	**		0,10
Hf		<5%	<10%	<15%	**	0,025
Ho			<5%	<15%	**	0,002
In			<5%	**		0,15
La				<5%	**	0,10
Lu				<5%	<10%	0,002

	>50 ppm	>10 ppm	>1 ppm	>0,1 ppm	>0,01 ppm	* Limites déterm. ppm
Mo		<5%	<10%	**		0,35
Nb			<5%	<15%	**	0,06
Nd			<5%	<10%	**	0,05
Ni	<5%	**				5,00
Pb		<5%	**			1,00
Pr			<5%	<15%	**	0,015
Rb	<5%	<10%	<15%	**		0,40
Sb		<5%	<10%	**		0,20
Sm			<5%	<10%	**	0,01
Sn		<5%	<10%	**		0,50
Sr	<5%	<15%	**			1,70
Ta		<5%		<10%	**	0,01
Tb				<5%	10%	0,005
Th		<5%	<10%	<15%	**	0,018
Tm			<5%	<10%	**	0,005
U				<8%	**	0,04
V	<5%	<10%	**			0,80
W	<5%	<10%	<15%	**		0,30
Y		<5%	**			0,90
Yb			<5%	<10%	**	0,003
Zn	<8%	**				11,00
Zr	<8%	<15%	**			1,00

## Dosage des éléments majeurs

Oxydes %	>10%	>5%	>1%	>0,5%	>0,1%	>0,05%	>0,01%	>0,005%	* Limites déterm. %
SiO <sub>2</sub>	<1%			<10%	**				0,15
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<1%			<10%		**			0,05
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>			<2%		<5%	<15%	**		0,02
MnO			<1%		<5%		<10%	**	0,001
MgO		<2%	<5%			<10%	**		0,01
CaO		<2%		<5%	<10%	**			0,02
Na <sub>2</sub> O		<2%			<15%	**			0,05
K <sub>2</sub> O		<2%		<5%	<15%	**			0,05
TiO <sub>2</sub>				<5%		<10%		**	0,002
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			<5%		<10%	**			0,03

\* La limite de détermination est calculée comme étant 6 fois l'écart type relatif sur 100 mesures de blancs de préparation.

\*\* L'incertitude sur la mesure est calculée pour 200 mg d'échantillon préparé. Elle devient importante (>25 %) sur une plage de concentration située entre la limite de détermination et la plus faible concentration pour laquelle un pourcentage d'erreur est indiqué.

Pour certains éléments traces, cette incertitude peut être réduite de façon significative à l'aide d'une chromatographie liquide avant passage à l'ICP-MS. Ces analyses particulières doivent faire l'objet d'une entente préalable avec le Service d'Analyse.

Calculs effectués pour 5 matériaux géochimiques de référence en analyse de routine sur une période de 12 mois (n = 300 par matériau).

**SARM**

CRPG-CNRS : 15 rue Notre Dame des Pauvres, BP20, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Tél : 33 (0)3 83 59 42 41 : Fax : 33 (0)3 83 51 17 98



---

---

**Annexes 3 :**  
**Analyse des sols**

---

---



CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803324  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# SV1

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	91.45						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.37	As	4.13	In	<l.d.	U	0.90
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.21	Ba	173	La	10.0	V	6.6
MnO	0.0010	Be	<l.d.	Lu	0.122	W	0.71
MgO	0.04	Bi	0.14	Mo	<l.d.	Y	7.21
CaO	<l.d.	Cd	0.25	Nb	3.11	Yb	0.802
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce	17.3	Nd	9.08	Zn	12.1
K <sub>2</sub> O	0.47	Co	<l.d.	Ni	3.7	Zr	151
TiO <sub>2</sub>	0.17	Cr	11.1	Pb	29.2		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.044	Cs	1.07	Pr	2.36		
Perte au Feu	6.35	Cu	<l.d.	Rb	15.3		
Total	100.09	Dy	1.20	Sb	1.28		
		Er	0.697	Sm	1.68		
		Eu	0.341	Sn	1.79		
		Ga	2.36	Sr	54.3		
		Gd	1.26	Ta	0.32		
		Ge	1.34	Tb	0.186		
		Hf	3.80	Th	2.86		
		Ho	0.242	Tm	0.114		

Analyse automatisée:

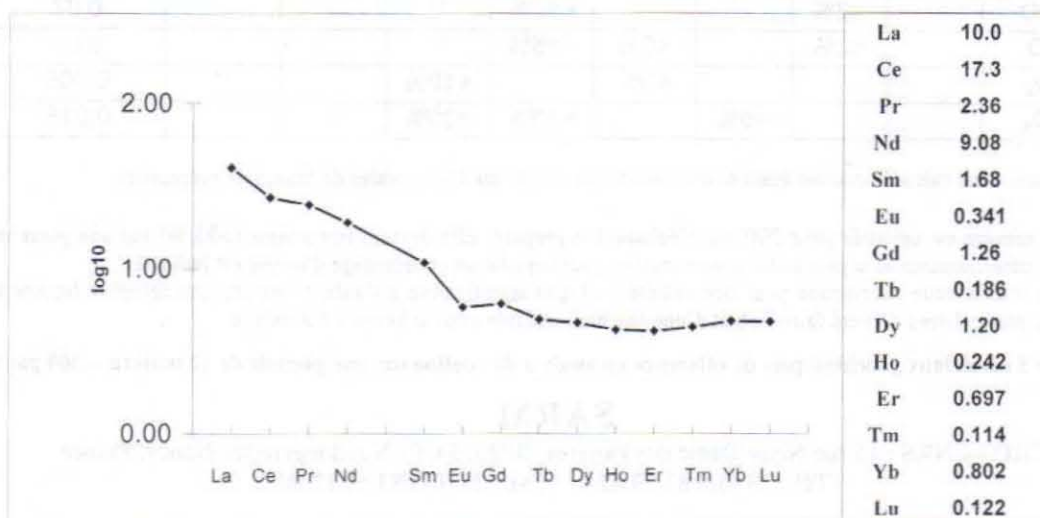
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

<l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803325  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# SV2

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	93.33						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.67	As	3.42	In	<l.d.	U	0.95
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.23	Ba	213	La	11.5	V	7.2
MnO	0.0010	Be	<l.d.	Lu	0.144	W	0.70
MgO	0.04	Bi	<l.d.	Mo	<l.d.	Y	8.79
CaO	<l.d.	Cd	0.18	Nb	3.54	Yb	0.921
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce	20.0	Nd	10.8	Zn	9.5
K <sub>2</sub> O	0.51	Co	0.40	Ni	3.4	Zr	144
TiO <sub>2</sub>	0.18	Cr	11.9	Pb	19.3		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.044	Cs	1.58	Pr	2.78		
Perte au Feu	2.87	Cu	<l.d.	Rb	18.6		
Total	98.88	Dy	1.50	Sb	0.85		
		Er	0.861	Sm	2.14		
		Eu	0.415	Sn	1.16		
		Ga	2.77	Sr	63.3		
		Gd	1.56	Ta	0.36		
		Ge	1.28	Tb	0.238		
		Hf	3.63	Th	3.41		
		Ho	0.292	Tm	0.133		

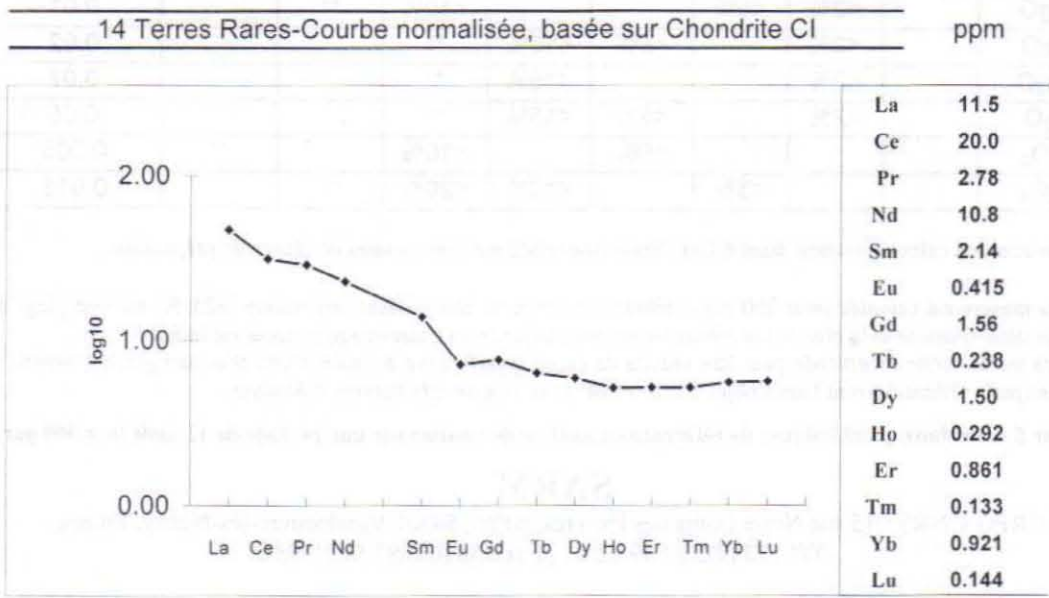
Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

<l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandœuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803326  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# SV3

Emission - ICP		ICP-MS		ICP-MS		ICP-MS	
	%		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)
SiO <sub>2</sub>	87.08						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4.48	As	9.93	In	<l.d.	U	1.03
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.28	Ba	317	La	11.7	V	26.3
MnO	0.0060	Be	<l.d.	Lu	0.136	W	0.88
MgO	0.18	Bi	0.18	Mo	<l.d.	Y	8.16
CaO	<l.d.	Cd	0.19	Nb	4.79	Yb	0.870
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce	20.4	Nd	11.2	Zn	11.4
K <sub>2</sub> O	1.04	Co	0.85	Ni	5.3	Zr	122
TiO <sub>2</sub>	0.20	Cr	19.1	Pb	30.4		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.095	Cs	4.89	Pr	2.94		
Perte au Feu	5.33	Cu	5.6	Rb	49.5		
Total	99.70	Dy	1.47	Sb	1.05		
		Er	0.802	Sm	2.21		
		Eu	0.493	Sn	2.11		
		Ga	8.19	Sr	79.8		
		Gd	1.65	Ta	0.43		
		Ge	1.30	Tb	0.241		
		Hf	3.04	Th	3.56		
		Ho	0.274	Tm	0.126		

Analyse automatisée:

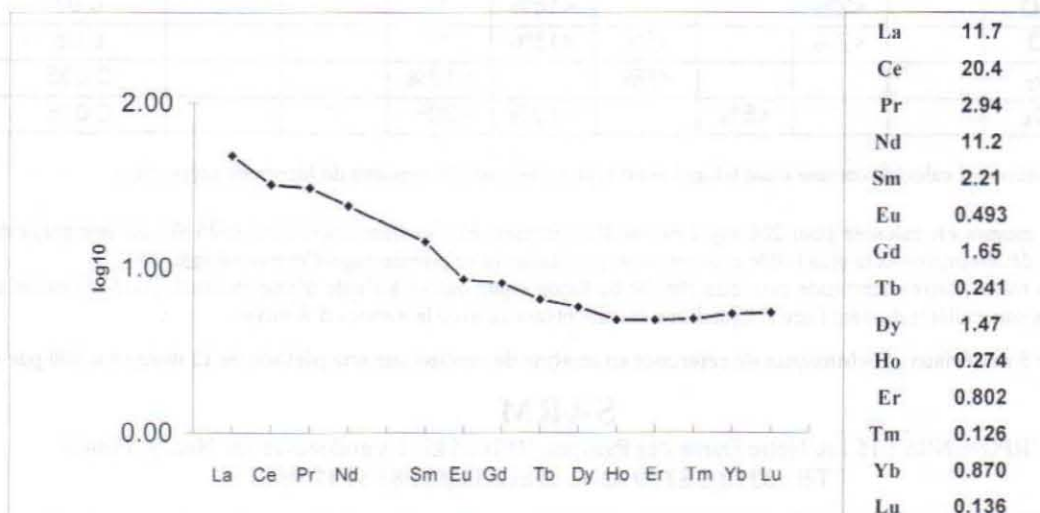
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

- <l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)
- n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803327  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# SV4

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	88.53						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.03	As	6.72	In	<l.d.	U	1.10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.45	Ba	374	La	12.6	V	17.9
MnO	0.012	Be	<l.d.	Lu	0.147	W	0.84
MgO	0.19	Bi	<l.d.	Mo	<l.d.	Y	8.88
CaO	<l.d.	Cd	0.16	Nb	4.01	Yb	0.936
Na <sub>2</sub> O	0.07	Ce	21.8	Nd	12.1	Zn	17.6
K <sub>2</sub> O	1.31	Co	1.51	Ni	6.8	Zr	139
TiO <sub>2</sub>	0.19	Cr	19.0	Pb	32.9		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.065	Cs	3.58	Pr	3.15		
Perte au Feu	2.85	Cu	<l.d.	Rb	52.3		
Total	99.69	Dy	1.63	Sb	1.24		
		Er	0.892	Sm	2.43		
		Eu	0.565	Sn	1.58		
		Ga	6.03	Sr	90.5		
		Gd	1.78	Ta	0.41		
		Ge	1.28	Tb	0.272		
		Hf	3.42	Th	4.30		
		Ho	0.313	Tm	0.135		

Analyse automatisée:

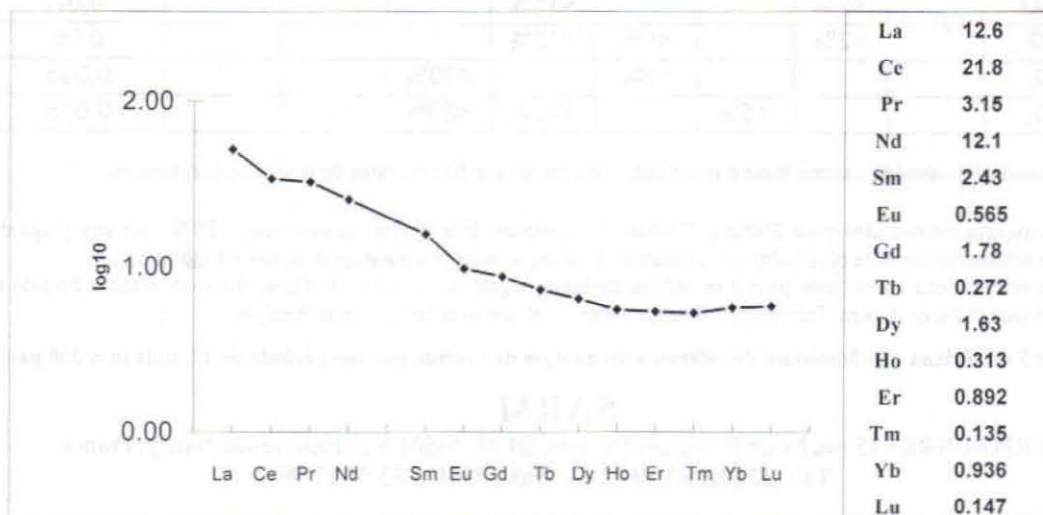
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803328  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# SV5

Emission - ICP		ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)	ICP-MS	µg/g (ppm)
	%						
SiO <sub>2</sub>	89.62						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.49	As	6.49	In	<l.d.	U	1.11
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.05	Ba	466	La	12.8	V	13.2
MnO	0.021	Be	<l.d.	Lu	0.135	W	0.64
MgO	0.20	Bi	0.13	Mo	<l.d.	Y	8.42
CaO	<l.d.	Cd	0.15	Nb	2.71	Yb	0.888
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce	22.2	Nd	13.2	Zn	15.1
K <sub>2</sub> O	1.44	Co	2.42	Ni	7.6	Zr	140
TiO <sub>2</sub>	0.14	Cr	15.1	Pb	38.2		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.074	Cs	3.87	Pr	3.39		
Perte au Feu	2.17	Cu	<l.d.	Rb	51.0		
Total	100.20	Dy	1.59	Sb	1.26		
		Er	0.850	Sm	2.74		
		Eu	0.649	Sn	1.63		
		Ga	5.66	Sr	112		
		Gd	1.96	Ta	0.31		
		Ge	1.20	Tb	0.286		
		Hf	3.54	Th	4.48		
		Ho	0.308	Tm	0.127		

Analyse automatisée:

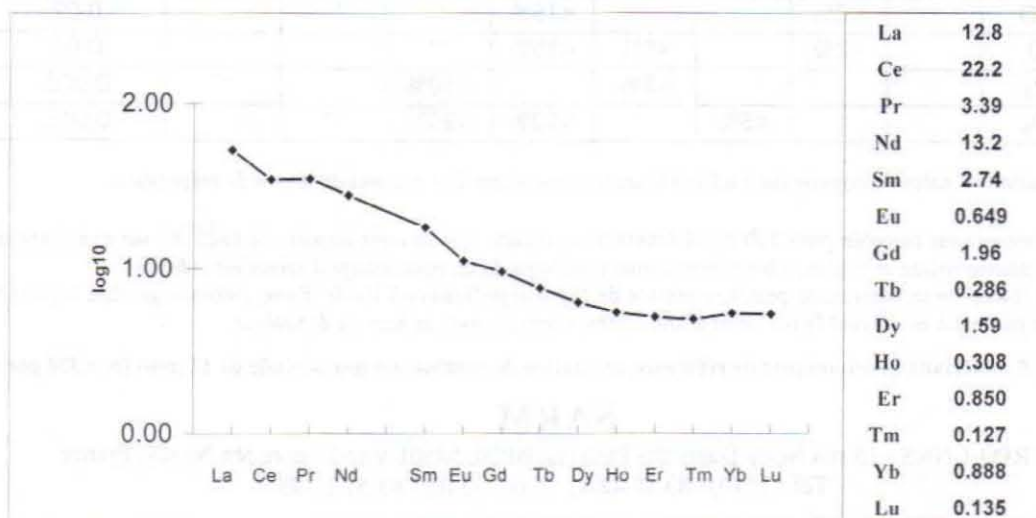
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803329  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# SV6

Emission - ICP		ICP-MS	$\mu\text{g/g}$ (ppm)	ICP-MS	$\mu\text{g/g}$ (ppm)	ICP-MS	$\mu\text{g/g}$ (ppm)
SiO <sub>2</sub>	87.61	As	6.49	In	<l.d.	U	1.31
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6.44	Ba	374	La	14.8	V	14.9
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.12	Be	<l.d.	Lu	0.169	W	0.73
MnO	0.012	Bi	0.12	Mo	<l.d.	Y	10.1
MgO	0.25	Cd	0.26	Nb	3.47	Yb	1.09
CaO	<l.d.	Ce	25.8	Nd	14.9	Zn	17.7
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Co	1.83	Ni	8.3	Zr	230
K <sub>2</sub> O	1.52	Cr	16.0	Pb	38.7		
TiO <sub>2</sub>	0.19	Cs	4.53	Pr	3.82		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.065	Cu	7.0	Rb	54.4		
Perte au Feu	2.46	Dy	1.86	Sb	1.47		
Total	99.67	Er	1.02	Sm	3.00		
		Eu	0.684	Sn	1.78		
		Ga	6.53	Sr	108		
		Gd	2.17	Ta	0.36		
		Ge	1.37	Tb	0.326		
		Hf	5.75	Th	4.80		
		Ho	0.344	Tm	0.154		

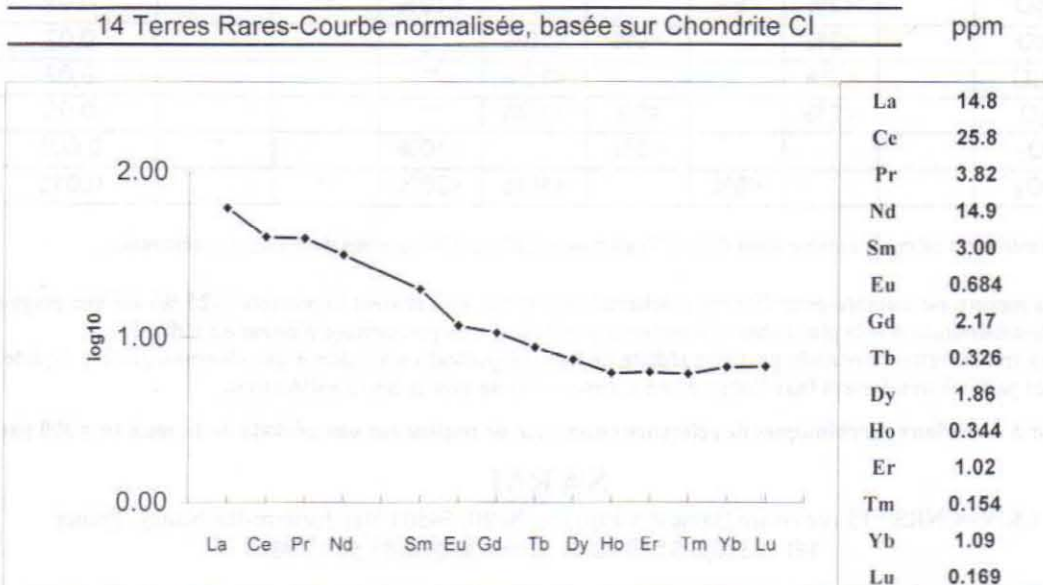
Analyse automatisée:

**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.





CRPG, BP 20,  
attn: J.CARIGNAN  
54501 Vandoeuvre,  
France

Tel : (33) 03 83 59 42 17  
Fax: (33) 03 83 51 17 98  
E-mail: rocanalyse@crpg.cnrs-nancy.fr  
Date: 28/04/2008

CRPG # 0803330  
Demandeur: VIGIER MELLE N. - BO  
Echantillon# RMV

Emission - ICP		ICP-MS		ICP-MS		ICP-MS	
	%		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)		µg/g (ppm)
SiO <sub>2</sub>	95.65						
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2.39	As	5.17	In	<l.d.	U	0.61
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.93	Ba	261	La	5.08	V	6.5
MnO	0.010	Be	<l.d.	Lu	0.071	W	0.40
MgO	0.05	Bi	<l.d.	Mo	<l.d.	Y	5.05
CaO	<l.d.	Cd	<l.d.	Nb	1.19	Yb	0.463
Na <sub>2</sub> O	<l.d.	Ce	8.53	Nd	4.77	Zn	8.7
K <sub>2</sub> O	0.85	Co	1.06	Ni	5.5	Zr	45.7
TiO <sub>2</sub>	0.064	Cr	9.1	Pb	22.5		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.031	Cs	1.54	Pr	1.23		
Perte au Feu	0.91	Cu	<l.d.	Rb	27.6		
Total	100.88	Dy	0.899	Sb	1.04		
		Er	0.491	Sm	1.02		
		Eu	0.262	Sn	0.87		
		Ga	2.37	Sr	45.0		
		Gd	0.889	Ta	0.15		
		Ge	1.16	Tb	0.145		
		Hf	1.21	Th	2.16		
		Ho	0.173	Tm	0.073		

Analyse automatisée:

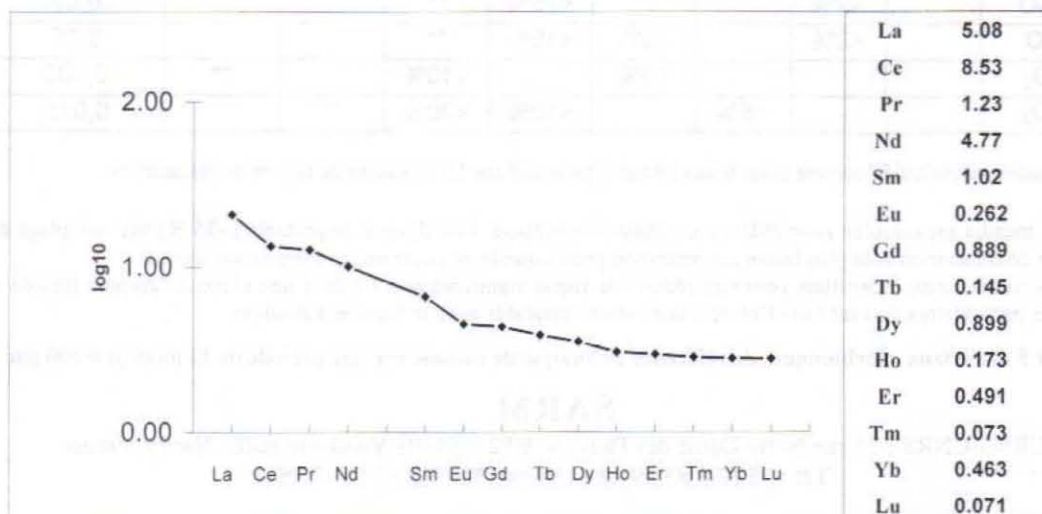
**Préparation:** Fusion de l'échantillon avec LiBO<sub>2</sub> et dissolution par HNO<sub>3</sub>.

**Analyse:** éléments majeurs par ICP-AES, autres éléments en traces par ICP-MS ; contrôle qualité avec géostandards internationaux.

**Remarques:**

< l.d. : Valeur inférieure à la limite de détermination (Voir tableau au verso)  
n. d. : Non dosé.

14 Terres Rares-Courbe normalisée, basée sur Chondrite CI





# Limites de détermination et incertitudes

( Mars 2008 )

## Dosage des éléments traces

	>50 ppm	>10 ppm	>1 ppm	>0,1 ppm	>0,01 ppm	* Limites déterm. ppm
As	<5%	<10%	<15%	**		1,50
Ba	<5%	<10%	<15%	**		2,00
Be	<5%	<10%	<15%	**		1,50
Bi			<5%	<15%	**	0,10
Cd		<5%	<15%	**		0,12
Ce		<5%	<10%	**		0,07
Co	<5%	<10%	<15%	**		0,40
Cr	<5%	<10%	**			5,00
Cs	<5%		<10%	**		0,15
Cu	<5%	<10%	**			5,00
Dy			<5%	<10%	<15%	0,005
Er			<5%	<10%	**	0,005
Eu				<5%	<10%	0,005
Ga		<5%	<8%	**		0,20
Gd				<5%	<10%	0,02
Ge			<5%	<15%	**	0,10
Hf		<5%	<10%	<15%	**	0,02
Ho			<5%	<15%	**	0,005
In			<5%	<15%	**	0,10
La				<5%	<15%	0,07
Lu				<5%	<10%	0,005

	>50 ppm	>10 ppm	>1 ppm	>0,1 ppm	>0,01 ppm	* Limites déterm. ppm
Mo		<5%	<10%	**		0,50
Nb			<5%	<15%	**	0,05
Nd			<5%	<10%	<20%	0,03
Ni	<5%	**				3,00
Pb		<5%	<10%	**		0,70
Pr			<5%	<15%	**	0,01
Rb	<5%	<10%	<15%	**		0,30
Sb		<5%	<10%	**		0,20
Sm			<5%	<10%	**	0,01
Sn		<5%	<10%	**		0,30
Sr	<5%	<15%	**			1,50
Ta		<5%		<10%	**	0,01
Tb				<5%	10%	0,005
Th		<5%	<10%	<15%	**	0,015
Tm			<5%	<10%	**	0,005
U				<8%	**	0,03
V	<5%	<10%	**			1,50
W	<5%	<10%	<15%	**		0,30
Y		<5%	<10%	<15%	**	0,50
Yb			<5%	<10%	**	0,005
Zn	<8%	<15%	**			8,00
Zr	<8%	<15%	**			1,20

## Dosage des éléments majeurs

Oxydes %	>10%	>5%	>1%	>0,5%	>0,1%	>0,05%	>0,01%	>0,005%	* Limites déterm. %
SiO <sub>2</sub>	<1%				<10%	**			0,05
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<1%			<10%			**		0,015
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>			<2%		<5%	<15%	**		0,04
MnO			<2%		<5%		<10%	**	0,001
MgO		<2%	<5%			<10%	**		0,01
CaO		<2%		<5%	<10%	**			0,02
Na <sub>2</sub> O		<2%			<15%	**			0,07
K <sub>2</sub> O		<2%		<5%	<15%	**			0,05
TiO <sub>2</sub>				<5%		<10%		**	0,005
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			<5%		<10%	<20%	**		0,015

\* La limite de détermination est calculée comme étant 6 fois l'écart type relatif sur 100 mesures de blancs de préparation.

NOTE :

\*\* L'incertitude sur la mesure est calculée pour 200 mg d'échantillon préparé. Elle devient importante (>25 %) sur une plage de concentration située entre la limite de détermination et la plus faible concentration pour laquelle un pourcentage d'erreur est indiqué.

Pour certains éléments traces, cette incertitude peut être réduite de façon significative à l'aide d'une chromatographie liquide avant passage à l'ICP-MS. Ces analyses particulières doivent faire l'objet d'une entente préalable avec le Service d'Analyse.

Calculs effectués pour 5 matériaux géochimiques de référence en analyse de routine sur une période de 12 mois (n = 300 par matériau).

## SARM

CRPG-CNRS : 15 rue Notre Dame des Pauvres, BP20, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Tél : 33 (0)3 83 59 42 41 ; Fax : 33 (0)3 83 51 17 98

---

---

**Annexes 4 :**  
**Article 1**

---

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

# **Characterization of elemental release and Mg isotopic signatures during bacteria-phlogopite interactions**

Clarisse Balland <sup>1</sup>, Anne Poszwa<sup>1</sup>, Nathalie Vigier <sup>2</sup>, Christian Mustin <sup>1</sup>, and Emile B. Bolou-Bi <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), Nancy-université-CNRS, P.O. Box 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>2</sup> Centre de Recherches Pétrologiques et Géochimiques (CRPG), 15 rue Notre Dame des Pauvres, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

**Manuscript in preparation**

## 1. INTRODUCTION

28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

Mineral weathering is a key global process releasing mineral elements in soil profiles, controlling the composition of percolating waters and the formation of secondary mineral. This process is a major source of magnesium in soils, plants and waters.

Ninety percent of minerals in the continental crust are silicates. It represents the main reservoir of magnesium at the surface of Earth. Moreover, the weathering of silicate plays an important role in the cycle of carbon, which is involved in the uptake of CO<sub>2</sub> through the formation of carbonates. The mineral weathering was realized by two major processes: physical disintegration and therefore chemical weathering more or less linked to biological processes. Silicate weathering is considered to be the sum of complex set of reactions including mechanical, chemical and biochemical processes.

A lot of studies have demonstrated that bacteria can amplify aluminosilicate weathering reaction (ROBERT and BERTHELIN, 1986; LEYVAL et al., 1990; VANDEVIVERE et al., 1994; BARKER et al., 1998; WELCH and ULLMAN, 1999; HUTCHENS et al., 2003). However, these studies do not demonstrate if silicate dissolution must be considered as an indirect consequence of microbial metabolism (release of protons, metabolites or specific ligands) or as a specific strategy giving a competitive ecological advantage to colonizing bacteria (dissolution serve some physiological functions). Only few studies have been dedicated to the quantitative and qualitative impact of microbial diversity on silicate weathering in soils (BENNETT et al., 1996; BENNETT et al., 2001; ROGERS AND BENNETT, 2004). These experimental results lead the different authors to similar conclusions: mineral chemistry influences strongly the colonization pattern of mineral and rocks by bacteria and their metabolic activities. However, these studies failed to clearly and statistically demonstrate, the influence of mineral properties and environmental parameters on biodissolution rates and weathering mechanism. The methods employed during these previous studies are analysis of

54 elements released into the leach solution, bacterial colonization pattern of minerals and  
55 analysis of structural and chemical alterations of minerals by microscopy or X-ray diffraction.  
56 These methods don't permit to distinguish the direct effect of bacteria or just an effect of the  
57 metabolites that bacteria produce.

58 Recent studies have shown that biological and kinetic processes can induce isotopic shifts  
59 for stable transition metal (Fe, Cu, ...) isotopes (BEARD, 1999; BRANTLEY, 2001; BEARD,  
60 2002; ANBAR, 2003; BRANTLEY, 2004; MATHUR et al., 2005). However, the chemical  
61 behavior of iron and copper is very dependant of the redox conditions and lead difficult to  
62 interpret such isotopic variations. Magnesium is an element much less sensitive to the  
63 physicochemical conditions of the medium because the ion of magnesium ( $Mg^{2+}$ ) has  
64 invariable oxidation state (+II). Recently, magnesium isotopes have been used in weathering  
65 environment and seem to be a good tracer of weathering and some biological processes. In  
66 nature, Mg isotope compositions ( $\delta^{26}Mg$ ) vary from - 6 to 1 ‰. These variations were first  
67 used to study the Mg sources in natural samples such as soils, rocks and river (BRENOT et al.,  
68 2008; TIPPER et al., 2006; TIPPER et al., 2008). Comparisons of Mg isotope composition have  
69 been measured between rocks and soils and rivers indicating a fractionation during rock  
70 weathering. Mg isotopic compositions ( $\delta^{26}Mg$ ) in silicate soils vary from -0.11 to 0.02 ‰,  
71 heavier than silicate rock (-0.4 to -0.8 ‰) and than rivers draining the same rock (-1.8 to -0.7  
72 ‰). These studies didn't measure the impact of living organisms on these fractionation  
73 mechanisms. However, It is known that bacteria and plants have a crucial role on rocks  
74 weathering (BOYLE and VOIGT, 1973; HINSINGER et al., 1992; LEYVAL C. et al., 1990;  
75 ROBERT and BERTHELIN, 1986).

76 In marine environment, recent studies have highlighted a different Mg isotopic  
77 composition of marine microorganisms than seawater. For example, CHANG et al. (2004) and  
78 VON POGGE et al., (2008) showed that marine organisms have a Mg isotopic composition  
79 lighter ( $\delta^{26}Mg = -1.9$  ‰) than seawaters ( $\delta^{26}Mg = -0.8$  ‰). BLACK et al., 2006 and RA and

80 KITAGAWA, 2007 indicate that marine phytoplankton chlorophyll molecules ( $\delta^{26}\text{Mg}$  vary from  
81 0.09 to -0.48 ‰) are slightly enriched in heavier Mg isotope relative to seawater ( $\delta^{26}\text{Mg} = -$   
82 0.83‰). Chlorophyll molecules synthesis can induce Mg isotope fractionation, but the sense  
83 of this fractionation is still debated.

84 In continental systems, BLACK et al., (2008) and BOLOU BI et al., (submitted) have  
85 highlighted a Mg isotope fractionation during plant growth. Indeed, plants grown  
86 experimentally are enriched in the heavy Mg isotope compared to source Mg. On the other  
87 hand, Mg remaining in solution or leached in solution was depleted in heavier Mg. However,  
88 the mechanisms involved in the translocation of Mg into plants have been well investigated  
89 but soil Mg bioavailability still remains to be discussed and in particular the role the micro-  
90 organisms. Indeed, there is no result at present on Mg isotope composition of minerals  
91 weathering influenced by microorganisms. The knowledge of isotopic signature of solution at  
92 the interface bacteria/mineral could give some interesting complementary information on the  
93 impact of microorganisms on Mg isotopic composition of natural waters, rivers and soil  
94 solution.

95 We investigate therefore the impact of bacterial activity on fluxes of Mg and Si  
96 released and on the Mg isotopic composition of solution during weathering. We performed  
97 two types of leaching experiments on phlogopite, in closed systems (1) “bioleaching” with a  
98 mineral media in presence of bacterial strains and (2) chemical leaching experiments with  
99 nitric or organic acids in a sterile mineral media. The Mg and Si fluxes released from  
100 bioleaching were compared to those released abiotically during chemical leaching  
101 experiments. The study aims also to distinguish two processes involved by different bacteria:  
102 proton- and ligand- promoted dissolution through the speciation of organic ligands by-  
103 produced.

104

105

## 2. MATERIALS AND METHODS

106

107

108 Several phlogopite leaching experiments were performed with 4 bacterial strains  
109 (biotic experiments) isolated from rhizosphere of plants and acid soil according to their high  
110 weathering potential. To investigate and model chemical mechanisms linked to the  
111 weathering ability of the bacterial isolates, leaching experiments without bacteria were  
112 performed with different acids:

113 - citric acid ( $10^{-3}$  M, pH adjusted at 3.5 to 6)

114 - gluconic acid ( $10^{-3}$  M, pH adjusted at 3.5 and 5)

115 - nitric acid (concentration adjusted to be at pH 2.5, 3.5, 4, 5.5).

116 Citric and gluconic acids were used as a model of chelating agent, and nitric acid as a model  
117 of acidifying agent. Abiotic experimental conditions (pH, type and concentration of organic  
118 acids) were based on experiments obtained in presence of bacteria to approach these biotic  
119 experimental conditions and to be able to compare more easily between them experiments  
120 performed with and without bacteria.

121

### 122 2.1. Minerals

123 The natural 2:1 phyllosilicate used in this study is phlogopite (from Madagascar –  
124 Vohitrosy). The chemical composition of phlogopite is as follows (g/kg): SiO<sub>2</sub> 390;  
125 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 150; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 52; MnO 0.9; CaO 2.5; MgO 294; K<sub>2</sub>O 110; TiO<sub>2</sub> 11.3; Na<sub>2</sub>O 1.3; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 1.1  
126 (LEYVAL et al., 1990). After wet grinding and sieving, mineral sample was rinsed under  
127 sonication with distilled deionised water at circum neutral pH to remove ultrafine particles.  
128 The dried 50-100 µm fraction is selected to conduct experiments with phlogopite. Its specific  
129 surface area of  $0.5 (\pm 0.3) \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  was determined by an N<sub>2</sub> adsorption Brunauer-Emmet-Teller  
130 method. Before starting experiments, mineral powders is sterilized at 170°C during 2 hours  
131 under dry atmosphere.

## 132 **2.2. Bacterial strains and cultivation**

133 Soil bacteria displaying contrasted phyllosilicates weathering abilities were pre-  
134 selected. Three heterotrophic strains of bacteria (*PAI*, *ARI*, *RAI*), previously isolated from  
135 rhizospheres of beech, pine and wheat, were chosen for their ability to dissolve mineral by  
136 acidification of the media (*ARI and PAI*) or to produce organic acids (*RAI and PAI*)  
137 (LEYVAL et al. 1991). A complementary strain (*PS2*) was isolated from an acidic soil i.e.  
138 podzol (WRB) located in Vosges Mountains (north-eastern of France) and characterized such  
139 as an acidifying bacteria (BALLAND et al., submitted). This pre-selection of soil bacteria  
140 displayed contrasting phyllosilicates weathering abilities. Genus of bacterial strains was  
141 determined by the amplification of 16 S rRNA genes. Polymerase chain reactions were  
142 performed using the universals sets of primers in a total reaction volume of 50 µl containing  
143 1x PCR mastermix (Eppendorf ®), 0,1 µM of primers (966 F and 1401 F) and 1 µl cell  
144 extract (Fleske 1998). Before sequencing by MWG biotech Company (Courtaboeuf, France),  
145 PCR products were purified and concentrated using mini-columns (High Pure™ PCR  
146 product Purification Kit, Roche diagnostic). A blast program was used to compare sequences  
147 with those of the GenBank databases ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). In the last step, the  
148 procedure gives the following identification:

- 149 - *RAI: Rhanella aquatilis*
- 150 - *PAI: Pantoae agglomerans*
- 151 - *ARI: Agrobacterium radiobacter*
- 152 - *PS2: Pseudomonas sp.,*

153 All bacterial strains were cryopreserved at -80 °C in 30 % glycerol and then  
154 precultivated on Petri dishes containing Luna and Bertani agar (LB 20 g.l<sup>-1</sup> from Difco and 15  
155 g.l<sup>-1</sup> agar). Strains were grown at 28 °C. Biotic experiments were conducted with actively  
156 growing culture of bacteria, freshly rinsed and conditioned as describe below. Prior to  
157 deposition in batch's reactors, bacterial isolates were recovered and cultivated in 2 ml LB



158 liquid medium during 1 day. Cells suspension was rinsed three times in deionised water and  
159 then resuspended in 10 ml of the BHm media in order to obtain  $10^7$  cells per ml of suspension.

160

### 161 **2.3. Experimental set-up**

162 Biotic and abiotic or chemical leaching (without bacteria) experiments were performed  
163 in batch reactor closed system in order to follow with time some parameters such as protons,  
164 elements released into solution and bacterial physiology (consumption of glucose, number of  
165 bacteria). Each batch's reactors are sterilized with culture media by autoclaving at  $110^\circ\text{C}$   
166 during 30 min and received 3 g of phlogopite.

167

#### 168 *2.3.1. Culture media*

169 In all experiments, the usual mineral medium as a source of essential mineral nutrients  
170 for bacterial cultures (Bushnell-Hass like) was used in order to simulate a soil solution  
171 chemical composition. This medium was an iron and magnesium free, thus phlogopite was  
172 the only source of these elements. Its depleted composition ( $20\text{ mg.l}^{-1}$  KCl ;  $20\text{ mg.l}^{-1}$   
173  $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  ;  $22.5\text{ mg.l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  ;  $65\text{ mg.l}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ;  $100\text{ mg.l}^{-1}$   $\text{KNO}_3$  ;  $20$   
174  $\text{mg.l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  in distilled deionised water) is reflected by its resulting low ionic strength ( $4.5$   
175 mM).

176 Microbial weathering of phyllosilicate was carried out in presence of glucose as sole  
177 source of carbon and energy. To avoid iron and magnesium input, glucose solutions ( $20\text{ g.l}^{-1}$ ,  
178  $0.8\text{ mM}$  of carbon) were prepared with ultrapure deionised water ( $18\text{M}\Omega.\text{cm}^{-1}$ , Elga Purelab)  
179 and sterilized by filtration at  $0.2\ \mu\text{m}$ .

180

#### 181 *2.3.2. Experimental procedure*

182 In addition of the sterility precautions taken all along experiments, all laboratory  
183 material was precleaned ( $\text{HNO}_3$  weakly concentrated) to avoid any mineral contamination.

184 Biotic and abiotic experiments of phlogopite were run in batch reactors composed by glass  
185 flasks agitated on a shaker (Certomat.u, Braun 120 rpm) at a temperature of 24°C except for  
186 experiments R1, R4, P1, A1, H3 and C2 that were agitated manually once each day for  
187 approximately 30 seconds. Experiments were conducted in aerobic conditions, each batch  
188 was “closed” with carded cotton and greaseproof paper that allowed letting circulate the air  
189 and protecting to bacterial contaminations.

190 Cells suspensions were incubated in mineral filled reactor for 6 at 12 days with  
191 glucose as energy and carbon sources. Operating conditions were 10 ml of cells suspension 80  
192 ml of BHm and 10 ml of glucose solution (Batch’s concentration: 2 g.l<sup>-1</sup>).

193 The number of bacteria (OD<sub>600nm</sub>), the consumption of glucose, the nature and quantities of  
194 metabolites released and the leached elements concentrations were followed with time. All  
195 experiment set-up, the time of sampling and the specific parameters characterized were  
196 summarized in Table 1A.

197 For chelating bacteria, four experiments were performed with RA1 (R1 to R4). A single  
198 experiment was performed in presence of strain PA1. For acidifying bacteria, two  
199 experiments were performed with strain Ps2, the former was stopped at 6 days (B1) and the  
200 second at 12 days (B2). A single experiment was performed in presence of AR1.

201 For chemical weathering experiment (without bacteria), the assay was performed in  
202 the same glass flasks filled with phlogopite and the mineral medium (100 ml) and different  
203 acids. Experiments setup (molarity and pH), the time of sampling and the specific parameters  
204 characterized are compiled table 1B.

205 Four experiments were performed with nitric acid (HNO<sub>3</sub>) at various pH (H1 to H4). Four  
206 experiments were performed with gluconic acid (G1 to G4). Six experiments were performed  
207 with citric acid (C1 to C6)

208 After each sampling, solutions were collected and filtered at 0.2 μm and stored at 4 °C before  
209 analysis.

## 210 **2.4. Elemental analyses**

### 211 *2.4.1. Colorimetric determination of protons and glucose*

212 For pH determination, 10  $\mu\text{l}$  of bromocresol green ( $1 \text{ g.l}^{-1}$ , Sigma) were added to 200  
213  $\mu\text{l}$  of leaching solutions, the reading was realized with the microplate reader (SAFAS Xenius  
214 FLX) at 2 wavelengths 440 and 620 nm. This colorimetric test permitted to measure pH from  
215 3 to 7.

216 Consumption of glucose by bacteria was determined by measuring glucose remaining  
217 in 3  $\mu\text{l}$  filtered solution after addition of 300  $\mu\text{l}$  of GOD-PAP (enzymatic kit, BioLabo), and  
218 after 20 min, glucose concentration was established at  $A_{(520 \text{ nm})}$ . The detection limit for Fe was  
219 0.1 ppm

220 According to the manufacturer's instructions, calibration curves were built to  
221 determine the relationship between the absorbance and the amount of protons and glucose  
222 respectively, for the bromocresol green and GOD-PAP (data not shown). These relationships  
223 were validated in the work of Uroz et al. (2007).

224

### 225 *2.4.2. Metabolites released in leaching solution*

226 Non-acidified samples (R1, B1 and B2) were stored at  $-18^\circ \text{C}$ . The determination and  
227 quantification of 10 organic acids, the most usually released in solution by bacteria, were  
228 realized with an ion chromatography with conductivity detection (ICS 3000, Dionex Corp.)  
229 using an analytical column (AS 11 HC, Dionex corp.). The sample was eluted with KOH  
230 solution of varying concentrations (0.9 mM to 60 mM) over time (step gradient) with a flow  
231 of 1.3 ml/min. The synthetic reference materials used were sodium formate, D-gluconic acid,  
232 Sodium butyrate, pyruvic acid sodium salt, sodium citrate tribasic, sodium oxalate, sodium  
233 propionate, Sodium acetate, Succinic acid disodium salt, DL-malic acid disodium salt (from  
234 Sigma-Aldrich) and Sodium-L-lactate and Malonic acid disodium salt (from fluka).  
235 Uncertainties were better than 0.5% for all organic acids measured.

236 *2.4.3 Mg and Si Concentrations*

237 Concentrations of released cations (Mg and Si) were analyzed by atomic absorption  
238 spectrometry (SAA Perkin Elmer 5000 at CRPG, France) and by inductively coupled plasma  
239 atomic emission spectroscopy (ICP-AES Jobin-Yvon 238 at LIMOS, France). All solution  
240 samples were acidified with HNO<sub>3</sub> for analysis. The detection limit for Mg and Si was 0.05  
241 ppm. Uncertainties with our medium were better than 5 %. Accuracy and reproducibility were  
242 controlled by repeated (5 times) analyses of Mg and Si synthetic reference materials (Spex-  
243 Certiprep).

244

245 *2.4.4 Mg isotopes determination solution and phlogopite*

246 Mg isotopes were measured (i) in leached solution of all experiments without taking  
247 account of the Mg various form into solution (ionic or chelated) and (ii) in initial phlogopite.

248 Mg isotope measurements were realized using two multiple collector inductively coupled  
249 plasma mass spectrometry (MC ICP-MS) the Isoprobe based at CRPG (Nancy) and the Nu  
250 plasma based at ENS Lyon (France). The instrumental mass bias was corrected using  
251 standard-sample bracketing (GALY et al., 2001). To prepare for isotope analysis, a sample  
252 aliquot containing at least 50 µg of Mg was dried in Teflon cups. The elements in solution  
253 were dissolved with peroxide of hydrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) and concentrated nitric acid to  
254 eliminate glucose.

255 A separation by chromatography was required prior to analysis to reduce interference and  
256 matrix effects (GALY et al., 2001). The method used in this work was validated and described  
257 by BOLOU-BI et al. (2009). Briefly, purified Mg fractions were obtained ion chromatography  
258 liquid in two steps. Before these steps, the samples dissolved in 0.5 ml HCl 1N were loaded in  
259 the resin. The first step of separation was performed using an anion exchange resin (Bio-Rad  
260 AG ® MP-1M, 100-200 mesh size) to remove the transition metals, the second step was  
261 performed using a cationic resin (Bio-Rad AG50W-X12, 200-400 mesh size) which allowed

262 to separate Mg from the other cations, in particular K. It was necessary to realize several  
263 passages on this cationic resin to collect 100% of pure Mg initially in the samples. The more  
264 difficult is the K/Mg separations as our sample have high K/Mg (value contained between 0.5  
265 and 17). Thus, reference material NIST SRM980<sub>CRPG</sub> was doped in K with a K/Mg ratio of 17  
266 to control the efficiency of separation of Mg from the other elements. The data obtained  
267 ( $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,97 \pm 0.14$ ;  $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,01 \pm 0.15$ ) was in accordance with the value of  
268 the standard reference material NIST SRM980<sub>CRPG</sub> ( $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,98 \pm 0.05$ ;  $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} =$   
269  $-2,04 \pm 0.05$ ).

270 The reference solution used was NIST SRM980<sub>CRPG</sub> ( $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,98 \pm 0.05$ ;  $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$   
271  $= -2,04 \pm 0.05$ ) using the following relation in the conventional delta unit defined by:

$$272 \delta^{26}\text{Mg} = [({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{sample}} / ({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{standard}} - 1] * 1000$$

273 However, CARRIGNAN et al., 2004 and GALY et al., 2003 showed the heterogeneity of the  
274 reference material NIST SRM980<sub>CRPG</sub>, consequently, the results were reported relative to  
275 DSM3 (Dead Sea Magnesium), new reference material developed by Cambridge University.

276

277

### 3. RESULTS

278

#### 3.1 Glucose consumption, bacterial growth and pH

280 Table 2 showed the pH, glucose concentrations, and cells number measured in the  
281 growth media and experimental reactors. Hereafter, we assumed that initial composition of  
282 the reactor solutions (time = 0 days) was equivalent to those of the respective growth media.  
283 Optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) of solutions permitted to quantify the evolution of the  
284 planktonic bacteria amount during experiments (Figure 1a). Immediately after inoculation,  
285 reactors with bacteria had initial cell number of  $\approx 10^6$  bacteria.ml<sup>-1</sup> corresponding to an  
286  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.05. In presence of bacterial strain RA1, cell numbers increased to an OD  
287 maximum of 0.21 ( $5.10^7$  bacteria.ml<sup>-1</sup>), 0.12 ( $1.10^7$  bacteria.ml<sup>-1</sup>) and 0.1 ( $10^7$  bacteria.ml<sup>-1</sup>)

288 respectively for experiments R1, R3 and R4 at the end of experiments. In presence of  
289 bacterial strain Ps2, cell numbers increased to an OD maximum of 0.06 ( $\approx 10^6$  bacteria.ml<sup>-1</sup>)  
290 and 0.08 ( $5 \cdot 10^6$  bacteria.ml<sup>-1</sup>) respectively for experiments B1 and B2 at the end of  
291 experiments. Ps2 had a constant growth during time in contrast to RA1, the time generation of  
292 the bacterial strain PS2 was weak.

293 Simultaneous, in presence of bacterial strain RA1, glucose concentrations decreased  
294 from 2 g.l<sup>-1</sup> to 0, 1.02 and 1.07 g.l<sup>-1</sup> respectively for experiments R1, R3 and R4 at 6 days  
295 (Table 2, Figure 1b). In presence of bacterial strain Ps2, glucose concentrations decreased  
296 from 2 g.l<sup>-1</sup> to 0.42 and 0.29 g.l<sup>-1</sup> respectively for experiments B1 and B2 after 6 days of  
297 experiments. Within 3-4 days, glucose concentrations decreased strongly to 0.5 and 1 g.l<sup>-1</sup> for  
298 Ps2 and RA1 respectively, suggesting that Ps2 consumed more glucose than RA1.

299 Coincident with the period of cell growth and glucose depletion, the pH in all biotic  
300 reactors rapidly decreased from an initial value of 6.5 (Figure 1c). The pH decreased at the  
301 end of 2 days to a value of 5.2, 5.0, 4.6 and 4.2 respectively for experiments R1, R2, R3 and  
302 R4 in presence of the chelating bacteria RA1 and 3.5 and 3.3 respectively for experiments B1  
303 and B2 with acidifying bacteria PS2. Between days 2 and 12, for all experiments, the pH  
304 remained constant except for experiments R1 where pH increased to 6.7 at 6 days. For  
305 experiments P1 and A1, the pH values at 12 days were 3.9 and 4.5 respectively in presence of  
306 bacterial strains PA1 (chelating bacteria) and AR1 (acidifying bacteria).

307

### 308 **3.2 Organic acids released**

309 During experiments R1, B1 and B2, figure 2 shows the time course dependant of  
310 organic acids (formic, gluconic, butyric, pyruvic, citric, oxalic, propionic, acetic, succinic,  
311 malic, lactic and malonic acid) produced by bacterial strains RA1 and PS2. In all experiments,  
312 propionic, malic and malonic acid were below the detection limit. For experiments R1, the  
313 bacterial strain RA1 produced, at 2 days, about 62 ppm of lactic acid, 77 ppm of acetic acid,

314 2.5 ppm of formic acid, 23.5 ppm of succinic acid, 7.2 ppm of oxalic acid and 3.1 ppm of  
315 citric acid. Between 2 and 6 days, organic acids concentrations decreased slightly to reach 0  
316 for acetic and citric acids, 37.1, 8.3, 4.2 and 5.4 ppm for lactic, formic, succinic and oxalic  
317 acids. For experiments B1 and B2, the bacterial strain Ps2 produced only gluconic (about  
318 1500 ppm) and butyric (2 ppm) acids at 2 days, and the organic acids concentrations increased  
319 to 1675 and 2486 for gluconic acid and 4.7 and 5.4 for butyric acid at 6 and 12 days.

320

321

### 322 **3.3 Dissolved elemental concentrations**

323 Table 2 lists the fraction of Mg and Si leached in solution from phlogopite measured  
324 in the growth media and the experimental reactors. In all experiments, the fraction of Mg, and  
325 Si dissolved into solution from phlogopite were very low, and followed the same tendencies.  
326 Figure 3 represents only the fraction of Mg dissolved from phlogopite as a function of time  
327 for biotic and abiotic reactors.

328 In abiotic conditions, for experiments performed with HNO<sub>3</sub>, the fraction of dissolved  
329 Mg from phlogopite ( $F_{Mg}$ ) reached values of 1.25 ‰ at pH 2.5 (experiment H1), 0.5 ‰ at pH  
330 3.5 (experiment H4) and 0.2 ‰ at pH 4 (experiment H3) at 6 days. Protons concentration  
331 influenced strongly Mg released. For experiments performed with organic acid (citric and  
332 gluconic acid),  $F_{Mg}$  reached same values of 0.43 and 0.49 ‰ at 6 days for experiments G3 and  
333 G4, and 0.30 and 0.53 ‰ at 6 days for experiments C3 and C4. At given pH of 3.5, the  
334 presence of gluconic acid permitted to release the same quantities of Mg from phlogopite. For  
335 a given pH, about 6 at 10 days,  $F_{Mg}$  was three times more important in presence of citric acid  
336 (experiment C1 = 0.90‰) than nitric acid (experiment H3 = 0.27‰).

337 In biotic experiments,  $F_{Mg}$  increased slightly in the course of time and reached a value  
338 of 0.29, 0.38, 0.43, 0.20 ‰ 0.80 and 0.76 ‰, respectively for experiments R1, R2, R3, R4, B1  
339 and B2 at 6 days and 0.49, 0.51, 0.53 and 0.76 ‰ respectively for experiments R2, P1, A1,

340 and B2 at 9 days. Ps2 permitted to released two times more Mg and Si leached into solution  
341 from phlogopite that facultative anaerobic bacterial strains (PA1, RA1, AR1)  
342 Comparing bioleaching and leaching experiments at similar pH,  $F_{Mg}$  was greater in presence  
343 of bacteria or citric acid than with nitric and gluconic acid experiments. Experiments, which  
344 were agitated constantly released significantly more Mg and Si to solution than non-agitated  
345 experiments; indeed, experiments R2 and R3 had two times more elements leached into  
346 solution from phlogopite than experiments R1 and R4, previously observed in the  
347 experiments of BRANTLEY et al. (2004).

348

### 349 **3.4 Mg isotope compositions**

350 The Mg isotopic composition of phlogopite and Mg leached into solution during  
351 experiments are summarized in Table 2 and Table 3. The Mg isotopic composition of  
352 phlogopite is  $\delta^{26}Mg = -1.22 \pm 0.24$ . In biotic conditions,  $\delta^{26}Mg$  in solution were -1.41, -1.31, -  
353 1.39, -1.23, -1.09 and -0.88 for experiments R2 at 3 and 6 days, P1 and A1 at 12 days and B1  
354 and B2 at 6 and 12 days respectively.

355 In abiotic conditions,  $\delta^{26}Mg$  in solution were -0.82, -1.02, -1.22, -1.52, -1.43, -1.42 for  
356 experiments H1, G3, G4, C1, C3 and C4 respectively at 6, 9, 6, 13, 6, 6 days. Except for  
357 experiments H1 ( $HNO_3$  at pH 2.5, 6 days), and B2 (Ps2 at 12 days), the magnesium isotopic  
358 compositions of solutions were very close between them and to the  $\delta^{26}Mg$  value of phlogopite  
359 (about -1.22) indicating no change of the isotopic composition of Mg leached into solution.

360

361

## 4. DISCUSSIONS

362

### 363 **4.1. Origin of the acidity and organic acids in biotic experiments**

364 The bacterial strains RA1 (chelating bacteria) and PS2 (acidifying bacteria) did not  
365 have the same behavior during experiments. The former had a low growth bacterial, acidified



366 weakly the medium (pH = 4.5), consumed moderately the glucose and released several  
367 organic acids such as lactic, acetic, formic, succinic, oxalic and citric acids. The second had a  
368 very low growth bacterial, acidified strongly the medium (pH = 3.5), consumed a great part of  
369 the glucose and released few organic acids (gluconic and butyric acids). The glucose, cell  
370 numbers trends was interpreted to reflect bacterial growth followed by a prolonged stationary  
371 phase most likely sustained by the internal recycling of organic matter and nutrients.

372 In our experiments, bacteria used glucose as both an energy source (electron donor)  
373 and a carbon source for biomass synthesis. There was a link between glucose consumption  
374 and acidification depending on bacterial metabolism. Our hypothesis to explain the lowered  
375 pH was that bacteria produced organic acids. Previous works have shown that the partial  
376 glucose oxidation can lower pH via the production of gluconic acid (VANDEVIVERE et al.  
377 1994; WELCH and ULLMAN, 1999; WU et al., 2008). The metabolites produced by bacterial  
378 strains have been measured in our experiments (Figure 2). The production of organic acids  
379 depended on many factors such as the nutritional, physiological and growth conditions of  
380 cultures. In presence of RA1, organic acids produced were citric, oxalic acid and especially  
381 lactic, formic and acetic acid. The organic acid produced mainly by aerobic bacteria Ps2 was  
382 gluconic acid.

383 For the facultative anaerobic bacteria (RA1 and PA1), under stress conditions, the  
384 oxidation continued beyond the glucose intermediate. The lack of required enzymes led  
385 some bacteria to accumulate or expel as waste various intermediate acids (GOTTSCHALK,  
386 1986), such as fumaric, citric, oxalic acid and especially lactic, pyruvic and acetic acid  
387 resulting from fermentation. Thus, these strains had an anabolism not very requiring in energy  
388 and consequently, a catabolism relatively not very effective requiring a low amount of initial  
389 carbon source. In the contrary, the strain Ps2 is an aerobic bacteria that had an anabolism  
390 requiring sufficient energy and a catabolism relatively effective requiring a great initial source  
391 carbon.

392 For experiments R1 performed with RA1, glucose was quickly and entirely consumed  
393 at 3 days, and pH increased strongly to 7 due to protons consumed by buffering capacity of  
394 phlogopite because bacteria cannot maintain pH at 5 for lack of carbon source. For  
395 consequence, this experiment will not be taken into account in the rest of this study.

396 As shown by protons and organic acids released, results confirmed that RA1 and PA1 are a  
397 chelating bacteria and PS2 an acidifying bacteria, and that bacterial metabolism induced  
398 substantial changes in solution pH; these changes had important consequences for the  
399 elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions.

400

#### 401 **4.2 Elemental release rates**

402 The influence of pH, organic acids and bacteria on release rate of Mg and Si was  
403 evaluated using the linear rate law describe by MALMSTRÖM and BANWART, (1997) and  
404 MALMSTRÖM et al., (1996) given by the equation:

$$405 \quad r_M = k_H (a_{H^+})^n + K_{O^+} k_{OH} (a_{OH})^m + k_{L,M} (a_L)^l \text{ (eq 1)}$$

406 where k is the rate constant,  $a_{H^+}$ ,  $a_{OH}$  and  $a_L$  the activity of protons, hydroxyl and ligand  
407 respectively and n, m, and l experimentally obtained orders of reaction with respect to proton,  
408 hydroxyl and ligand. The model supposed that (1) the ligand-promoted reaction mechanism  
409 operates in parallel with and independently of, the hydroxyl or proton-promoted mechanisms  
410 (2) ligand-promoted rates are additive. In the present study concerning phlogopite weathering  
411 in acid environment, terms  $K_{O^+}$  and  $k_{OH,M} (a_{OH})^{n,M}$  are negligible. Thus, experimental data  
412 were fitted to rate law yielding the following equation:

$$413 \quad r_M = k_H (a_{H^+})^n + k_{L,M} (a_L)^l \text{ (eq. 2)}$$

414 The form of this empirical rate equation is characteristic of dissolution rate laws to proton  
415 adsorption or ligand complexation at the mineral surface. In biotic or abiotic experiments,  
416 apparent initial release rates of Mg and Si were calculated using equation 2 in the course of  
417 time. For all, experiments, the elemental (Mg Si) release rate decreased slightly with time

418 (data not show) frequently observed in dissolution experiments were fresh mineral samples  
419 were used, similar to the observation of FURRER and STUMM, (1986) and MALMSTRÖM and  
420 BANWART, (1997). It could be attributed to dissolution of ultrafine particles decreasing the  
421 dissolving surface area and more reactive surface sites.

422 Figures 4 represent Mg ( $r_{Mg}$ ) and Si ( $r_{Si}$ ) release rate in function of pH. Plotting  $r_{Mg}$  and  $r_{Si}$   
423 versus average pH confirmed that elemental release was largely pH control. This graph  
424 showed that the highest elemental release occurred at low pH, whereas the lowest rates  
425 occurred at near neutral pH.

426 Bioleaching and chemical leaching performed with citric acid permitted higher release rates  
427 relative to chemical leaching performed with  $HNO_3$  and gluconic acid. For a given pH, Mg  
428 release rates were ~ 2 to 3 fold higher in bioleaching compared to chemical leaching  
429 performed with  $HNO_3$  and Si release rates were also ~ 1.5 fold higher. Acidifying bacteria  
430 (PS2 and AR1) amplified Mg and Si release rate more than  $HNO_3$ . As shown by organic acids  
431 analysis, PS2 produced into solution about 1 mM of gluconic acid at pH 3.5. At this given pH,  
432 Mg and Si release rates were similar for experiments performed with gluconic acid (G1, G2  
433 and G3 at similar conditions that experiments with PS2) and  $HNO_3$  (H4) ( $\sim 1.43 \cdot 10^{-10}$  and  
434  $1.38 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  respectively); indeed, at this pH, gluconic acid (pKa 3.86) acted like a  
435 strong acid. The enhanced elemental released rates in presence of PS2 and AR1 can be  
436 explained that other process must be take into account to interpret such variations.

437 VANDEVIVERE et al., (1994) have highlighted that at the contact bacteria-mineral,  
438 microreaction zones were formed where the chemical compositions of the solution in these  
439 site was strongly different that the bulk solution with high protons and organic acids  
440 concentrations.

441 Bacterial strains (acidifying PS2, AR1 and chelating PA1 and RA1 bacteria) used in this work  
442 accelerate elemental (Mg and Si) release from phlogopite principally through pH lowering  
443 and the production of chelating agent such as organic acids. A similar conclusion was

444 previously reported in several other studies (VANDEVIVERE et al., 1994; BAKER et al., 1998;  
445 WU et al., 2008).

446 In our experiments, the growth of bacteria during experiments was not correlated to the Mg  
447 and Si released into solution during phlogopite bioleaching indicating that the growth of  
448 bacteria was not a crucial factor for highlighting bacterial effectiveness to weather phlogopite.  
449 Ps2 had a generation time less important than RA1. Simultaneously, elemental release was  
450 significantly more important ( $2.22 \cdot 10^{-10}$  and  $2.51 \cdot 10^{-10}$  mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> respectively for Mg and Si  
451 release rates) in presence of bacterial strain Ps2 than bacterial strain RA1 ( $1.06 \cdot 10^{-10}$  and  
452  $7.23 \cdot 10^{-11}$  mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> respectively). However, only planktonic bacteria were enumerated in  
453 our experiments, whereas adhering bacteria are known to play an important role in the  
454 enhancing mineral weathering (VANDEVIVERE et al. 1994).

455 To conclude, viable bacteria (exponential and stationary growth phase) were necessary to  
456 maintain low pH in our experiments releasing protons, organic acids and CO<sub>2</sub> into solution  
457 (WELCH and ULLMAN 1993; VANDEVIVERE et al. 1994). As shown by experiments R1, in  
458 absence of glucose, bacteria in decline growth phase didn't maintain production of protons  
459 and other organic acids, and pH increased due to the uptake of protons by phlogopite. Thus,  
460 the growth conditions of bacteria affects chemistry of solution directly through to excretion of  
461 protons and organics acids and as an indirect consequence the elemental release during  
462 mineral dissolution (HUTCHENS et al. 2003).

463

### 464 **4.3 Stoichiometry of dissolution**

465 The reaction stoichiometry is presented in figure X in the form of the ratios of the  
466 elements released (Mg and Si), together with the elements ratios of the initial phlogopite in  
467 the course of time. The proportion of Mg/Si for experiments H1, H2, H4 performed with  
468 HNO<sub>3</sub> at pH 2.5, 3.5 and 4 were very close to the bulk ratio (0.97); even if it seemed that the  
469 ratio Mg/Si decreased slightly with increasing pH (0.98, 0.92 and 0.92 respectively at pH 2.5,

470 3.5 and 4 at 6 days). Values of Mg/Si are in good agreement with those obtained by  
471 KALINOWSKI et al. (1994) for phlogopite. All experiments (bio- and chemical leaching) had  
472 Mg/Si values below to the bulk ratio except for experiments performed with chelating  
473 bacterial strains RA1 (Mg/Si about 1.5).

474 In presence of RA1 (experiments R2 and R3), Mg was preferentially released in  
475 compare to Si, indicating a great dissolution of octahedron compared with tetrahedron. ACKER  
476 and BRICKER (1992) had demonstrated that at pH superior at about 3 (R1 to R4 experiments  
477 had pH value close to 4.5), biotite octahedrons were preferentially destructed. Moreover,  
478 BARMAN et al., (1992) had demonstrated that biotite weathering in presence of strong  
479 chelating agent preferentially such as citric and oxalic acids released Mg into solution than Si;  
480 indeed, for experiments R1, low amounts of oxalic and citric acids had been quantified (about  
481 7 and 3 ppm respectively for oxalic and citric acid).

482 When phlogopite bioleaching by RA1 is compared to chemical leaching in presence of  
483 citric acid, results obtained for experiments C1 to C6 were not consistent with literature data  
484 (BARMAN et al., 1992) demonstrating, in presence of citric acid, that Mg was preferentially  
485 released in compare to Si due to high solubility of Mg and the fact that Mg was situated in  
486 octahedron easily accessible to the solution. In our experiments, Mg/Si ratios (0.95) were  
487 slightly below to the bulk ratio (0.97), indicating that in contrast to literature data, Si was  
488 preferentially released. Indeed, at a given pH,  $F_{Mg}$  and  $F_{Si}$  were the same for experiments C4  
489 and H4 (about 0.5 and 0.56 ‰ respectively for  $F_{Mg}$  and  $F_{Si}$ ). BARMAN et al., 1992 realized  
490 experiments with citric acid at pH 1, and demonstrated that the preferential elemental released  
491 occurring in their experiments was  $Mg > Fe > Al > Si$ . In our experiments at pH 3.5, the  
492 preferential elemental released occurring was  $Fe > Al > Mg = Si$  with  $F_{Fe}$  2.02;  $F_{Al}$  1.82;  $F_{Mg}$   
493 0.53 and  $F_{Si}$  0.56 ‰; This can be explain (i) by the fact that at this pH (3.5), only two  
494 carboxylic groups of citric acid were dissociated ( $pK_a = 3.13; 4.76; 6.4$ ), and it is known that  
495 citrate have strong affinity for iron to the detriment of magnesium; (ii) by a high

496 concentration of citric acid (1 mM) used in chemical experiments that didn't reflect the  
497 concentration in bioleaching experiments in presence of RA1 (about 3 ppm or 0.02 mM).  
498 Experiments performed with high concentration of organic acids can caused saturation of  
499 rates and consequently of surface complexation processes related to the number of surface  
500 reactive sites (GOLUBEV et al., 2006). This observation were confirmed by experiments C5  
501 and C6 performed with high concentration of citric acid (10 to 100 mM) where Mg/Si ratios  
502 were significantly lower (about 0.7) than experiment C2 (0.95) and a similar  $r_{Mg}$  value of  
503  $8.10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{m}^{-1}$ .

504 For experiments B2 (bacterial strain PS2) and G4 (gluconic acid), Mg/Si ratios were very  
505 close to the bulk ratio (0.97) and the experiment H4. This observation was in accordance with  
506 the results on Mg and Si released rate indicating that pH lowering control Mg and Si leaching  
507 from phlogopite.

508

#### 509 **4.4 Magnesium isotopic fractionation with and without bacteria**

510 The change of  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$  (‰) in function of the fraction of dissolved Mg from  
511 phlogopite (‰) for bio- and chemical leaching are shown in Figure 5. Results indicated that  
512 Mg isotope compositions of the solutions during or at the end of the experiments were all  
513 closed to initial phlogopite particles (-1.22 ‰).

514 However, two tendencies can be distinguished. First, phlogopite weathering in the  
515 presence of  $\text{HNO}_3$  (experiment H1) and acidifying bacterial strain Ps2 (experiments B1 and  
516 B2) released Mg into solution heavier by as much as 0.4 ‰ than phlogopite. Second, Mg  
517 released during dissolution with citric acid was lighter than phlogopite by as much as 0.2 ‰.

518 For experiments performed with bacteria (RA1 et PS2), released Mg tended to be  
519 lighter at day 6 than 9 suggesting perhaps Rayleigh fractionation of phlogopite. Indeed,  
520 Rayleigh fractionation is considered as the process that fractionates Mg isotopes in the most

521 effective way. A series of curves can be calculated to fit most of the data by a Rayleigh  
522 fractionation equation (Figure 5b) :  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{sample}} = \delta^{26}\text{Mg}_{\text{phlogopite}} + 1000 (\alpha - 1) * \ln f$  (eq. 3)  
523 where f is the fraction of Mg released from phlogopite,  $\alpha$  the Mg isotopic fractionation factor  
524 between leached Mg and phlogopite. The lines represent Rayleigh distillation model that uses  
525 more appropriate empirical  $\alpha$  values comprised between 1.00002 and 0.9998; there is 0.05 to  
526 -0.2 ‰ difference between leached solution and phlogopite. The fractionation factor required  
527 to best fit the data is  $\alpha = 1.00002$ . This value is very low indicating a negligible fractionation  
528 during bioleaching experiments. However, it seemed that when the fraction of Mg leached is  
529 more important ( $f > 1$  ‰ for H1 and B2), the fractionation factor required to fit the data ( $\alpha =$   
530 0.9998) is significantly greater than those observed for our other experiments. These results  
531 can indicate that more Mg is leached from phlogopite; more the Mg isotopic fractionation  
532 factor is great.

533 According to a very low fractionation factor with Rayleigh distillation equation, the  
534 data can be fitted by an equilibrium fractionation equation (Figure 5c) in a closed  
535 system:  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-phlogopite}} = (\delta^{26}\text{Mg}_{\text{sample}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}}) \cdot x + \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}}$  (eq. 4)  
536 where x corresponding to the element leached fraction. The value of  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}}$  that  
537 best fitted the data were comprised between -1.23 to -1.19 ‰ closed to initial phlogopite (-  
538 1.22 ‰) indicating a very low fractionation between leached Mg and phlogopite ( $\Delta \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-phlogopite}}$   
539 ranged from 0.01 to -0.03 ‰). To fit data obtained in presence  
540 of  $\text{HNO}_3$ , citrate and *Pseudomonas sp.* (experiments H1, C1 et B2), it was necessary to  
541 obtained at the end of experiments a  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}}$  value of 0.5 ‰. The  $\Delta (\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-phlogopite}})$   
542 was 1.72 ‰. This value is the same range found in the nature,  
543 thus the equilibrium fractionation can explained this variation.

544 Whatever the model used to fit the majority of the data, the Mg isotopic fractionation  
545 factor was very low indicating no or a negligible fractionation during the first event of

546 bioleaching of phlogopite whatever experiments (bio- or chemical leaching). Several  
547 mechanisms could explain this low isotopic fractionation in the experiments: (1) the silicate  
548 weathering all the more the Mg leached fraction is weak, (2) the incorporation of Mg into  
549 bacterial cells, but the biomass obtained in our experiments was so weak that this could not be  
550 explained our results.

551 In nature, the system is not closed with an infinite reservoir and solutions replenished  
552 continuously permitting a Mg released more important with several leaching events and  
553 perhaps a fractionation factor more significant. Moreover, if these results were representative,  
554 mineral leaching by bacteria would not explain the Mg isotopes signatures measured in river  
555 waters isotopically light when compared to rock and soils (TIPPER et al., 2006a; TIPPER et al.,  
556 2006b; BRENOT et al., 2008; TIPPER et al., 2008).

557 Whatever the experiments (bio- or chemical leaching) considered, average  $\delta^{26}\text{Mg}$   
558 generally increased with decreasing pH (Figure 6a), the correlation is 0.62. More pH is acid;  
559 more Mg released into solution is enriched in the heavy isotope. In neutral to basic domain,  
560 POGGE VON STRANDMANN et al., (2008) have demonstrated a pH dependence of the Mg  
561 isotopic composition of direct-runoff rivers largely controlled by the formation and stability  
562 of secondary phases. With a high pH (about 9), direct-runoff rivers have higher  $\delta^{26}\text{Mg}$  than  
563 basalt; with a low pH (about 6), direct-runoff rivers have low  $\delta^{26}\text{Mg}$  relative to basalt. In other  
564 word, more pH is basic; more  $\delta^{26}\text{Mg}$  relative were enriched in heavier isotopes relative to  
565 basalt (Figure 6b). It seemed that Mg isotopic composition in natural water was controlled by  
566 pH of solution that drained rock and soils. Moreover,  $\delta^{26}\text{Mg}$  can be correlated to the mineral  
567 dissolution rates that increase with decreasing pH. Average  $\delta^{26}\text{Mg}$  generally increased with  
568 increasing mineral dissolution rate except for experiments performed with citric acid (C3 and  
569 C4) and experiment with chelating bacterial strain RA1 (R4), where Mg released into solution  
570 is enriched in the light isotope. These observations are different to POGGE VON STRANDMANN  
571 et al., (2008) where More Mg was leached into solution (low pH between 7.5 and 8.5), more



572  $\delta^{26}\text{Mg}$  relative were enriched in lighter isotopes relative to basalt. In compare to iron isotope  
573 fractionation, our results are coherent to those BRANTLEY et al., (2001) where  $\delta^{57}\text{Fe}$  decreased  
574 with increasing release rate of iron indicating that stronger chelates preferentially lighter iron.  
575 Recently, BOLOU-BI et al., (submitted) have highlighted that during phlogopite weathering by  
576 plants, the Mg leached into solution was enriched in light isotope, but the bulk plant was  
577 enriched in the heavy isotope. The Mg isotopic composition of the leached solution is due to  
578 the Mg incorporation and adsorption in plants. The action of plant through the organic acids  
579 secretion (such as citric acid) is not negligible in the phlogopite weathering (HINSINGER et al.,  
580 1992) indicating a possible influence of chelating bacteria on isotopic signature of Mg  
581 leached from phlogopite.

582

583

## 5. CONCLUSIONS

584

585 This study demonstrated that pH lowering and metabolites by produced during  
586 heterotrophic bacterial activities could greatly accelerate Mg and Si release from phlogopite.  
587 Comparing bioleaching and leaching experiments at similar pH, the fraction of elements  
588 released into solution was greater in presence of bacteria or citric acid when compared with  
589 nitric and gluconic acid experiments. Indeed, bacterial metabolism different for one strain to  
590 another induced substantial changes in solution pH; these changes had important  
591 consequences for the rate of elemental release from phlogopite compared to abiotic  
592 conditions. In our experiments, aerobic bacterial strains were more efficient to leach Mg  
593 during phlogopite weathering than facultative anaerobe bacteria.

594 A very small Mg isotopic fractionation linked to phlogopite leaching was highlighted for all  
595 experiments. However, two tendencies can be distinguished and seemed to be accentuated  
596 when the leached Mg fractions were more important. For experiments performed with  $\text{HNO}_3$   
597 and acidifying bacteria PS2, the Mg leached into solution was enriched in heavy isotope

598 compared to phlogopite. Second for experiments performed with citric acid, the Mg leached  
599 into solution was enriched in light isotope compared to phlogopite. However, whatever the  
600 model used to fit the majority of the data, the Mg isotopic fractionation factor was very low  
601 indicating no or a negligible fractionation during the first event of bioleaching of phlogopite.  
602 Moreover, for all experiments, the Mg isotopic composition of leached solution was  
603 correlated to the pH and the phlogopite dissolution rate with enrichment in heavy isotope  
604 when pH is acid, except for experiments performed with chelating bacteria and citric acid  
605 where the Mg leached into solution from phlogopite was enriched in light isotope.  
606 These results have to be still investigated (1) with experiment times occurred on a long-life to  
607 have several events bioleaching, a characterization (2) of secondary phases formed in the  
608 course of experiments with several spectroscopic techniques such as X ray diffraction and (3)  
609 of the influence of plants versus bacteria on silicate weathering in particular on Mg  
610 biogeochemical cycle using Mg isotopes.

611

## 6. REFERENCES

- 612  
613  
614 Acker, J.G. and Bricker, O.P., 1992. The influence of pH on biotite dissolution and alteration  
615 kinetics at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(8): 3073-3092.
- 616 Anbar, A.D., 2003. Iron stable isotopes : beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science*  
617 *Letters* 217, p223-236.
- 618 Babu-Khan, S. et al., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from  
619 *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 972-978.
- 620 Barker, W., Welch, S., Chu, S. and Banfield, J., 1998. Experimental observations of the  
621 effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* 83, p 1551-  
622 1563
- 623 Barman A. K., Varadachari C., and Ghosh K. (1992) Weathering of silicate minerals by  
624 organic acids. I. Nature of cation solubilisation. *Geoderma* **53**(1-2), 45-63.
- 625 Beard, B., Johnson, C., Cox L., Sun, H., Neelson, K., and Aguilar C., 1999. Iron isotope  
626 biosignatures. *Science* 285, p1889-1892.
- 627 Beard, B., Johnson, C., Neelson, K., Skulan, J., Cox L., and Sun H., 2002. Application of Fe  
628 isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology*  
629 195, p87-117
- 630 Bennett, P.C., Hiebert, F.K. and Joo Choi, W., 1996. Microbial colonization and weathering  
631 of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology*, 132(1-4):  
632 45-53.
- 633 Bennett, P.C., Rogers, J.R. and Choi, W.J., 2001. Silicates, Silicate Weathering, and  
634 Microbial Ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18: 3-19. Black J. R., Epstein E.,  
635 Rains W. D., Yin Q. Z., and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope fractionation  
636 during plant growth. *Environmental science and technology* **42**(21), 7831-7836.
- 637 Black J. R., Yin Q.-z., and Casey W. H. (2006) An experimental study of magnesium-isotope  
638 fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*  
639 **70**(16), 4072-4079.

640 Black J. R., Epstein E., Rains W. D., Yin Q. Z., and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope  
641 fractionation during plant growth. *Environmental science and technology* **42**(21),  
642 7831-7836.

643 Bolou Bi E. B., Poszwa A., and Vigier N. (2008) Experimental determination of magnesium  
644 isotope fractionation during higher plant growth. *Geophysical Research Abstracts*  
645 **10**(EGU2008-A-08852).

646 Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Brenot, A. and Poszwa, A., 2009. Magnesium Isotope  
647 Compositions of Natural Reference Materials. *Geostandards and Geoanalytical*  
648 *Research*, 33(1): 95-109.

649 Boyle J. R. and Voigt G. K. (1973) Biological weathering of silicate minerals. *Plant and Soil*  
650 **38**(1), 191-201.

651 Brantley, S., Liermann L., and Bullen T., 2001. Fractionation of Fe isotopes by soil microbes  
652 and organic acids. *Geology* 29, p535-538

653 Brantley, S., Liermann L., Guynn R., Anbar A., Icopini G., and Barling J., 2004. Fe isotopic  
654 fractionation during mineral dissolution with and without bacteria. *Geochimica et*  
655 *Cosmochimica Acta* 68, p3189-3204.

656 Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J. and France-Lanord, C., 2008. Magnesium  
657 isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France.  
658 *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(20): 5070-5089.

659 Carignan, J. et al., 2004. Reflection on Mg, Cd, Ca, Li and Si Isotopic Measurements and  
660 Related Reference Materials *Geoanalytical Research*, 28: 139-148.

661 Chang, V.T.C., Williams, R.J.P., Makishima, A., Belshaw, N.S. and O'Nions, R.K., 2004.  
662 Mg and Ca isotope fractionation during CaCO<sub>3</sub> biomineralisation. *Biochemical and*  
663 *Biophysical Research Communications*, 323(1): 79-85.

664 Galy, A., Bar-Matthews, M., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2002. Mg isotopic composition of  
665 carbonate: insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters*,  
666 201(1): 105-115.

667 Galy, A., Belshaw, N.S., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2001. High-precision measurement of  
668 magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass  
669 spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 208(1-3): 89-98.

670 Galy, A. et al., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and  
671 new reference materials for magnésium isotope ratio measurements. *Journal of*  
672 *Analytical Atomic Spectrometry*, 18, p 1352-1356.

673 Ganor, J., Mogollûn, J.L. and Lasaga, A.C., 1995. The effect of pH on kaolinite dissolution  
674 rates and on activation energy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(6): 1037-1052.

675 Golubev, S.V., Bauer, A. and Pokrovsky, O.S., 2006. Effect of pH and organic ligands on the  
676 kinetics of smectite dissolution at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17):  
677 4436-4451.

678 Gottschalk, G., 1986. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag New York.

679 Hinsinger P., Jaillard B., and Dufey J. E. (1992) Rapid weathering of a trioctahedral mica by  
680 the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* **56**(3), 977-982.

681 Hutchens, E., Valsami-Jones, E., McEldowney, S., Gaze, W. and McLean, J., 2003. The role  
682 of heterotrophic bacteria in feldspar dissolution - an experimental approach.  
683 *Mineralogical Magazine*, 67(6): 1157-1170.

684 Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, g. and berthelin, J., 1990. Weathering of micas in the  
685 rhizosphere of maize, pine and beech seedlings influenced by myccorhizal and  
686 bacterial inoculation. *Symbiosis*, 9: 105-109.

687 Malmström, M. and Banwart, S., 1997. Biotite dissolution at 25°C: The pH dependence of  
688 dissolution rate and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(14): 2779-  
689 2799.

690 Malmström, M., Banwart, S., Lewenhagen, J., Duro, L. and Bruno, J., 1996. The dissolution  
691 of biotite and chlorite at 25°C in the near-neutral pH region. *Journal of Contaminant*  
692 *Hydrology*, 21(1-4): 201-213.

693 Mathur, R. et al., 2005. Cu isotopic fractionation in the supergene environment with and  
694 without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol 69, p 5233-5246.

695 Murakami, T., Utsunomya, S., Yokoyama, T. and Kasama, T., 2003. Biotite dissolution  
696 processes and mechanisms in the laboratory and in nature: Early stage weathering  
697 environment and vermiculization. *American mineralogist* 88: 377-386.

698 Ra, K. and Kitagawa, H., 2007. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in  
699 marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic*  
700 *Spectrometry*, 22: 817-821.

701 Robert, M. and Berthelin, J., 1986. Role of biological and Biochemical factors in soil mineral  
702 weathering. *Soil science society of america*, 12: 453-495.

703 Rogers, J.R. and Bennett, nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1-2): 91-108.

704 Tipper, E.T., Galy, A. and Bickle, M.J., 2006. Riverine evidence for a fractionated reservoir  
705 of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and*  
706 *Planetary Science Letters*, 247(3-4): 267-279.

707 Tipper, E.T., Galy, A. and Bickle, M.J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in  
708 rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation  
709 control? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4): 1057-1075.

710 Vandevivere, P., Welch, S.A., Ullman, W.J. and Kirchman, D.L., 1994. Enhanced dissolution  
711 of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial Ecology*, 27(3): 241-251.

712 Welch, S.A. and Ullman, W.J., 1999. The effect of microbial glucose metabolism on  
713 bytownite feldspar dissolution rates between 5° and 35°C. *Geochimica et*  
714 *Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3247-3259.

715 Wieland, E. and Stumm, W., 1992. Dissolution kinetics of kaolinite in acidic aqueous  
716 solutions at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(9): 3339-3355.

717 Wollast, R., 1967. Kinetics of the alteration of K-feldspar in buffered solutions at low  
718 temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 31(4): 635-648.

- 719 Wombacher, F., Eisenhauer A., Heuser A. and Weyer S., 2006. Magnesium stable isotope  
720 compositions in biogenic CaCO<sub>3</sub>. *Geophysical Research abstracts*, 8, A06353.
- 721 Wu, L., Jacobson, A.D. and Hausner, M., 2008. Characterization of elemental release during  
722 microbe-granite interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4):  
723 1076-1095.
- 724
- 725
- 726
- 727

728 Table captions

729

730 Table 1. Analysis and operating conditions description of bio- and chemical leaching

731 experiments.

732

733 Table 2. General characteristics of bioreactors solutions.

734 \* “ppm”; + Ratios between Mg and Si leached into solution and Mg and Si contained in  
735 phlogopite, exprimed in permil; "-" below detection

736 \$ MC-ICP-MS data were obtained using the Nu instrument (ENS, Lyon, 2 $\sigma$  external precision

737 0.15‰). Reported values are the means of two or more replicate analysis of each sample

738

739 Table 3. General characteristics of reactors solutions in abiotic conditions.

740 \* “ppm”; + Ratios between Mg and Si leached into solution and Mg and Si contained in  
741 phlogopite, exprimed in permil ; "-" below detection

742 \$ MC-ICP-MS data were obtained using the Nu instrument (ENS, Lyon, 2 $\sigma$  external precision

743 0.15‰). Except for data in italic, which were obtained, using the Isoprobe (CRPG, Nancy, 2s

744 external precision 0.20 ‰). Reported values are the means of two or more replicate analysis

745 of each sample. "#" Organic acid concentration of 0.001M; "##" Organic acid concentration

746 of 0.01M;"###" Organic acid concentration of 0.1M



747 Figure captions

748

749 Figure 1. Optical densities at 600 nm (a), Glucose concentrations (b) and pH (C) versus time  
750 for biotic experiments reactors. Data for experiments AR1 and PA1 only appear in panel (c);  
751 data for RA1 exp d only appears in panels (b) and (c).

752

753 Figure 2. Organic acids concentrations versus time for R1 experiments performed with RA1  
754 and B1 experiments performed with Ps2.

755

756 Figure 3. Fraction of Mg leached into solution from phlogopite versus time for bio- and  
757 chemical leaching experiments.

758

759 Figure 4. Mg and Si release rates versus pH for all experimental reactors.

760

761 Figure 5.  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$  versus the fraction of dissolved Mg from phlogopite for (A) all  
762 experimental reactors indicated in table 2 and table 3, (B) Rayleigh distillation model to fit  
763 data calculated from equation 3 and (C) equilibrium fractionation equation calculated from  
764 equation 4.

765

766 Figure 6. (a)  $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$  and phlogopite dissolution rates versus pH for all experimental  
767 reactors, (b) Comparison of  $\Delta \delta^{26}\text{Mg}_{\text{Mg leached in solution}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-rocks*}}$  and Mg leached in  
768 solution versus pH for our data and data of Pogge von Strandmann et al., (2008).

769 \* rocks = phlogopite for our data and basalt for those of Pogge von Strandmann et al., (2008).

770

771

772

Weathering agents	Experiments names	Taking time (days)	Analysis					
			pH	OD600nm	Mg, Si l concentrations	Glucose remaining	Organic acids	$\delta^{26} \text{Mg}_{\text{DSM3}}$
RA1	R1	1,2,3,4,5,6	x	x	x	x	x	
RA1	R2	1,2,3,6,9,13	x	x	x			x
RA1	R3	2,3,5,6,7,8,9,10,12	x	x	x	x		
RA1	R4	1,3,4,5,6	x	x	x	x		
PA1	P1	9,12	x	x	x			
AR1	A1	9,12	x	x	x			
PS2	B1	2,4,6	x	x	x	x	x	x
PS2	B2	2,4,6,9,12	x	x	x	x	x	x
HNO <sub>3</sub>	H1	1,2,3,4,5,6	x		x			x
HNO <sub>3</sub>	H2	1,2,3,4,5,6	x		x			
HNO <sub>3</sub>	H3	6,9	x		x			
HNO <sub>3</sub>	H4	3,6,9,12	x		x			
Gluconic acid <sup>##</sup>	G1	2,3,6	x		x			
Gluconic acid <sup>##</sup>	G2	2,3,6	x		x			
Gluconic acid <sup>##</sup>	G3	2,3,6,9	x		x			x
Gluconic acid <sup>#</sup>	G4	1,2,3,4,5,6	x		x			x
Citric acid <sup>#</sup>	C1	10,13	x		x			x
Citric acid <sup>#</sup>	C2	6	x		x			
Citric acid <sup>#</sup>	C3	1,2,3,5,6	x		x			x
Citric acid <sup>#</sup>	C4	1,2,3,5,6	x		x			x
Citric acid <sup>##</sup>	C5	1,2,3,5,6	x		x			
Citric acid <sup>###</sup>	C6	1,2,3,5,6	x		x			

Bacterial strains	Experiments names	Times (day)	pH	DO <sub>600nm</sub>	F <sub>Mg</sub> <sup>+</sup>	F <sub>Si</sub> <sup>+</sup>	glc *	Gluconate *	Lactate *	Acetate *	Butyrate *	Formate *	Succinate *	Oxalate *	Citrate *	δ <sup>26</sup> Mg/DSM3 <sup>§</sup>		
RA1	R1	1	5.2	0.120			1100	-	15.0	38.3	-	1.3	4.7	3.4	3.1			
		2	5.2	0.125			900	-	62.0	77.1	-	2.5	23.5	7.2	-			
		3	6.7	0.140	0.19	0.23	250	-	54.2	152.4	-	16.8	6.2	4.9	-			
		4	6.7	0.210			200	-	41.0	36.8	-	11.0	5.3	4.7	-			
		5	6.5	0.200			150	-	43.1	2.9	-	9.8	4.3	5.1	-			
		6	6.7	0.210	0.29	0.30	100	-	37.1	0.0	-	8.3	4.2	5.4	-			
RA1	R2	2	5.0															
		3	5.1		0.30	0.19											-1.41 +/- 0.07	
		6	4.8		0.38	0.29												
		9	4.7		0.49	0.31												-1.31 +/- 0.03
		13	4.6		0.59													
RA1	R3	2	4.6	0.118			1261											
		3	4.6	0.147	0.31		1231											
		5	4.8	0.127			1017											
		6	4.6	0.120	0.43	0.29	1020											
		9	4.6	0.127			970											
		10	4.4	0.118	0.57	0.40	900											
		13	4.5	0.117	0.60		800											
RA1	R4	3	4.2	0.076	0.15													
		4	4.2	0.081														
		5	4.2	0.091			1080											
		6	4.2	0.096	0.20	0.22	1070											
PA1	P1	9	4.7		0.51	0.35												
		12	3.9		0.74	0.57												-1.39 +/- 0.09
AR1	A1	9	4.5		0.53	0.39												
		12	4.5		0.56	0.44												-1.23 +/- 0.03
PS2	B1	2	3.5	0.050			940	1400.8	-	-	2.4	-	-	-	-			
		4	3.5	0.043	0.55	0.60	640	1635.3	-	-	4.4	-	-	-	-			
		6	3.5	0.055	0.80	1.01	420	1675.2	-	-	4.7	-	-	-	-			-1.09 +/- 0.03
PS2	B2	2	3.3	0.050			600	1607.8	-	-	2.1	-	-	-	-			
		4	3.5	0.054	0.53	0.58	450	2155.7	-	-	3.9	-	-	-	-			
		6	3.5	0.055	0.76	0.96	290	2360.1	-	-	3.1	-	-	-	-			
		9	3.5	0.050	0.97	1.21	280	2257.5	-	-	2.6	-	-	-	-			
		12	3.5	0.080	1.26		260	2486.4	-	-	5.4	-	-	-	-			-0.88 +/- 0.05

776 Table 2.

Weathering agent	Experiments names	Times (day)	pH	F <sub>Mg</sub> <sup>+</sup>	F <sub>Si</sub> <sup>+</sup>	Gluconate *	Citrate *	$\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$
HNO <sub>3</sub>	H1	1	2.5	0.41	0.41			
		2	2.5	0.67	0.67			
		3	2.5	0.82	0.81			
		4	2.5	0.95	0.96			
		5	2.5	1.10	1.09			
		6	2.5	1.20	1.19			-0.82 +/- 0.02
HNO <sub>3</sub>	H2	1	4.0	0.05				
		2	4.2	0.14				
		3	4.0	0.18	0.19			
		4	4.0	0.19				
		5	4.0	0.20				
		6	4.0	0.21	0.22			
HNO <sub>3</sub>	H3	6	5.4					
		9	5.6	0.27				
HNO <sub>3</sub>	H4	3	3.5	0.32	0.35			
		6	3.6	0.51	0.56			
		9	3.5	0.57				
		12	3.5	0.63	0.67			
Gluconic acid ##	G1	2	3.4			1669		
		3	3.2	0.38	0.36	1669		
		6	3.5	0.45	0.42	1669		
Gluconic acid ##	G2	2	3.5			1669		
		3	3.4	0.32		1669		
		6	3.6	0.43		1669		
Gluconic acid ##	G3	2	3.4			1669		
		3	3.5	0.32	0.35	1669		
		6	3.4	0.49	0.52	1669		
		9	3.4	0.56	0.6	1669		-1.02 +/- 0.25
Gluconic acid #	G4	1	3.5			166.9		
		2	3.6			166.9		
		3	3.6	0.30	0.32	166.9		
		5	3.6			166.9		
		6	3.6	0.38	0.40	166.9		-1.22 +/- 0.05
Citric acid #	C1	10	5.7	0.9	0.94		163.9	
		13	6.2	0.9	0.98		163.9	-1.52 +/- 0.06
Citric acid #	C2	6	5.2	0.30			163.9	
Citric acid #	C3	1	4.6				163.9	
		2	4.6				163.9	
		3	4.6	0.25	0.24		163.9	
		5	4.6				163.9	
		6	5.7	0.30	0.31		163.9	-1.43 +/- 0.02
Citric acid #	C4	1	3.5				163.9	
		2	3.5				163.9	
		3	3.6	0.42	0.43		163.9	
		5	3.7				163.9	
		6	3.6	0.53	0.56		163.9	-1.42 +/- 0.07
Citric acid ##	C5	1	5.2				1639	
		2	5.3				1639	
		3	5.3	0.21	0.37		1639	
		5	5.2				1639	
		6	5.2	0.29	0.50		1639	
Citric acid ###	C6	1	5.3				16390	
		2	5.4				16390	
		3	5.3	0.23	0.39		16390	
		5	5.3				16390	
		6	5.3	0.3	0.51		16390	

Table 3

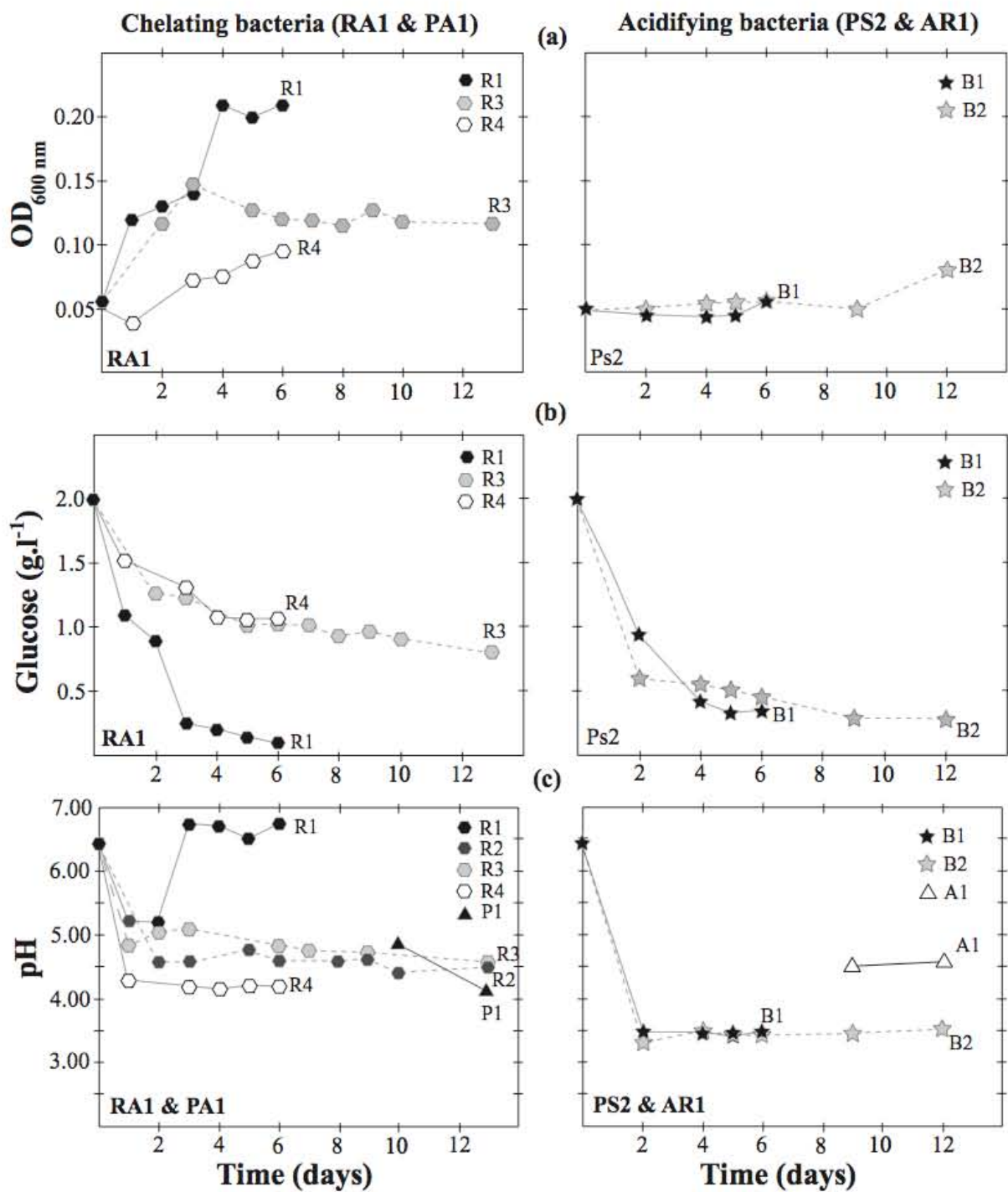


Figure 1.

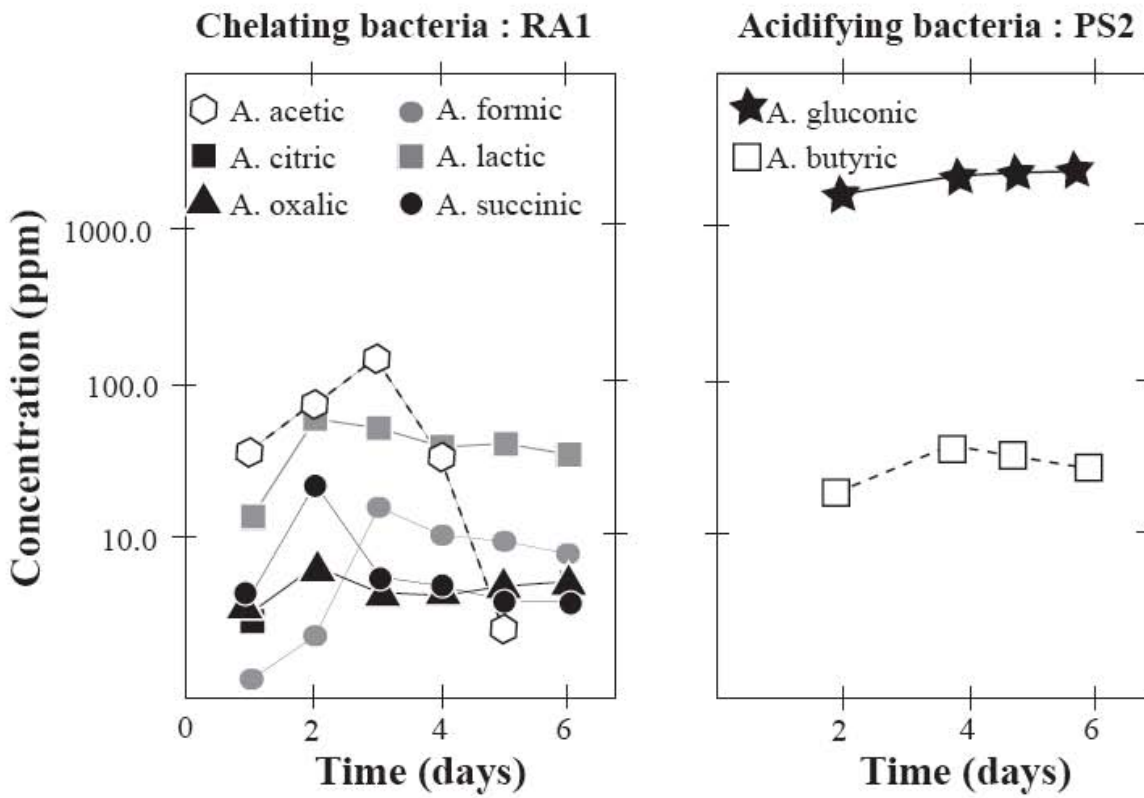


Figure 2.

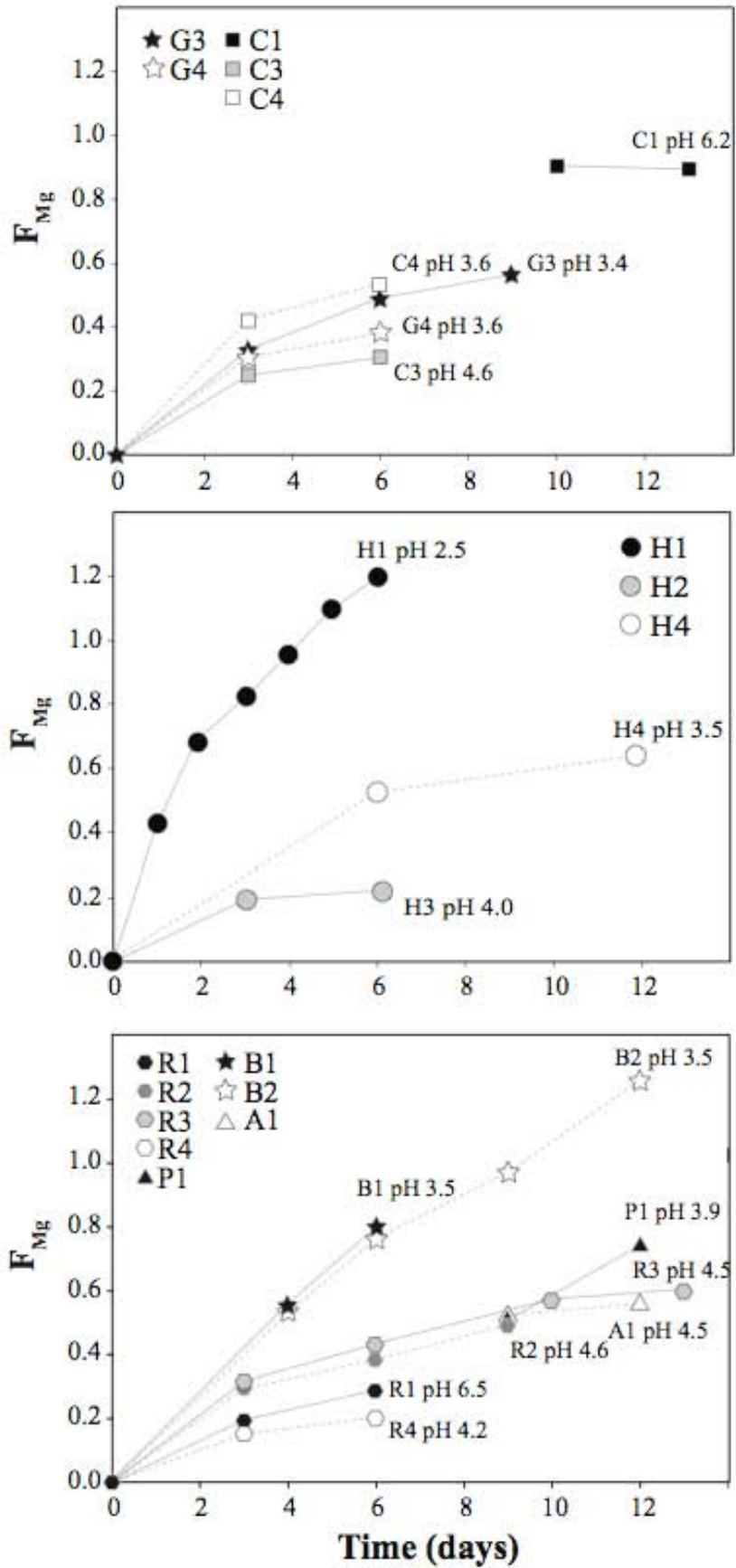


Figure 3.

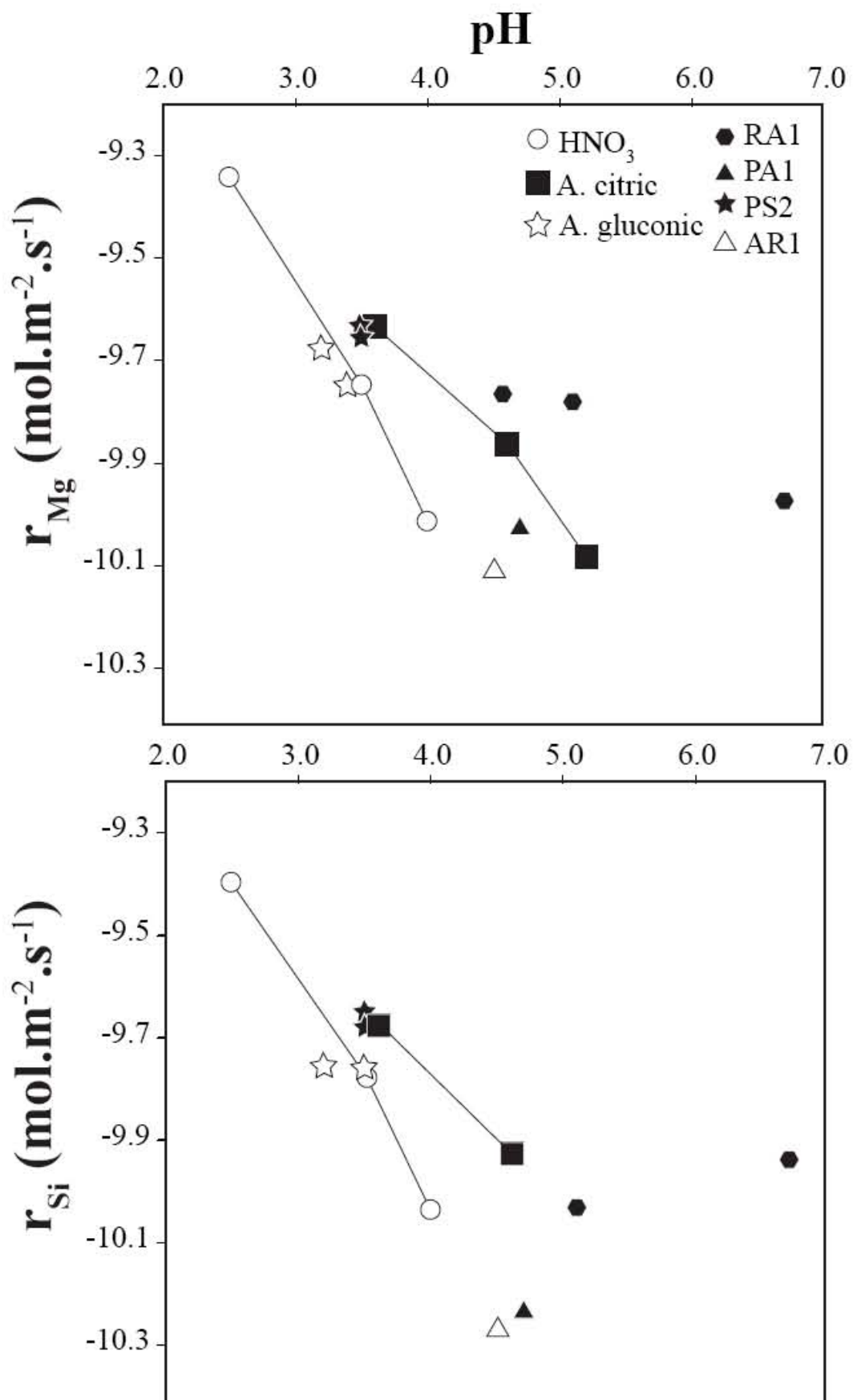


Figure 4.



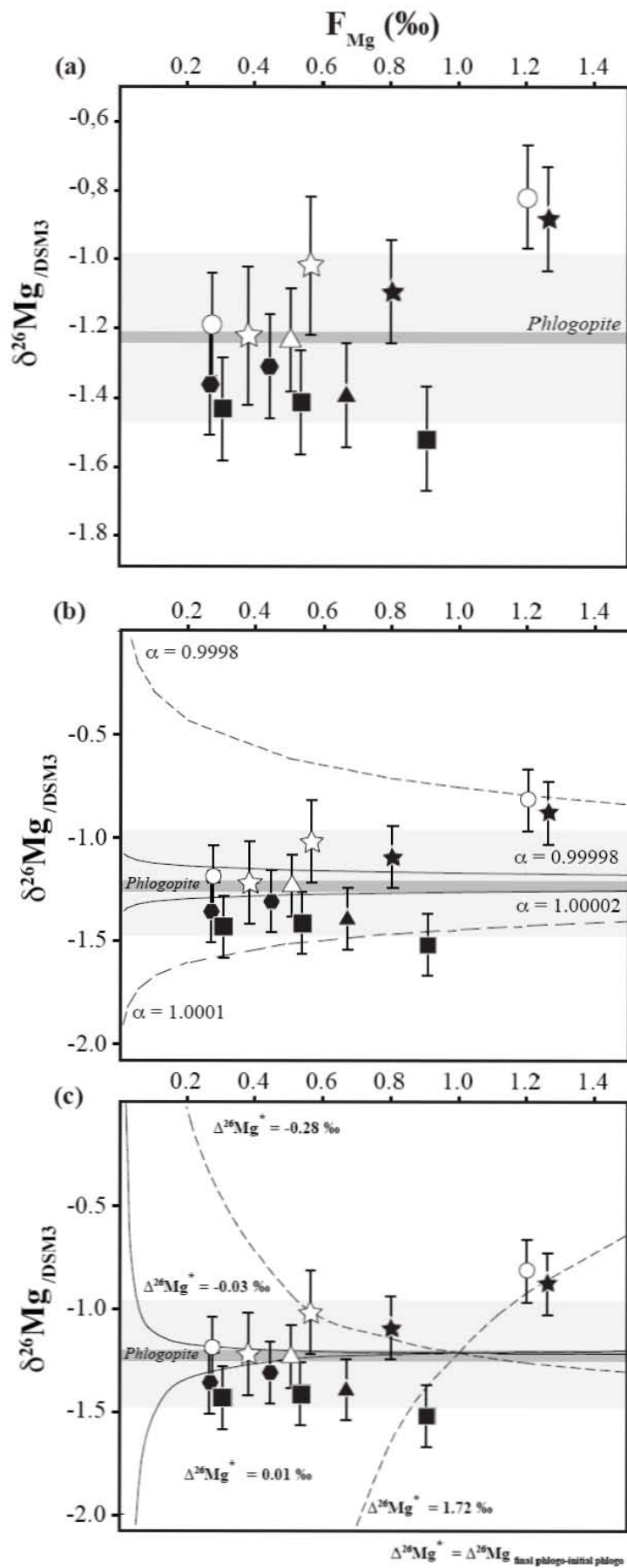


Figure 5.

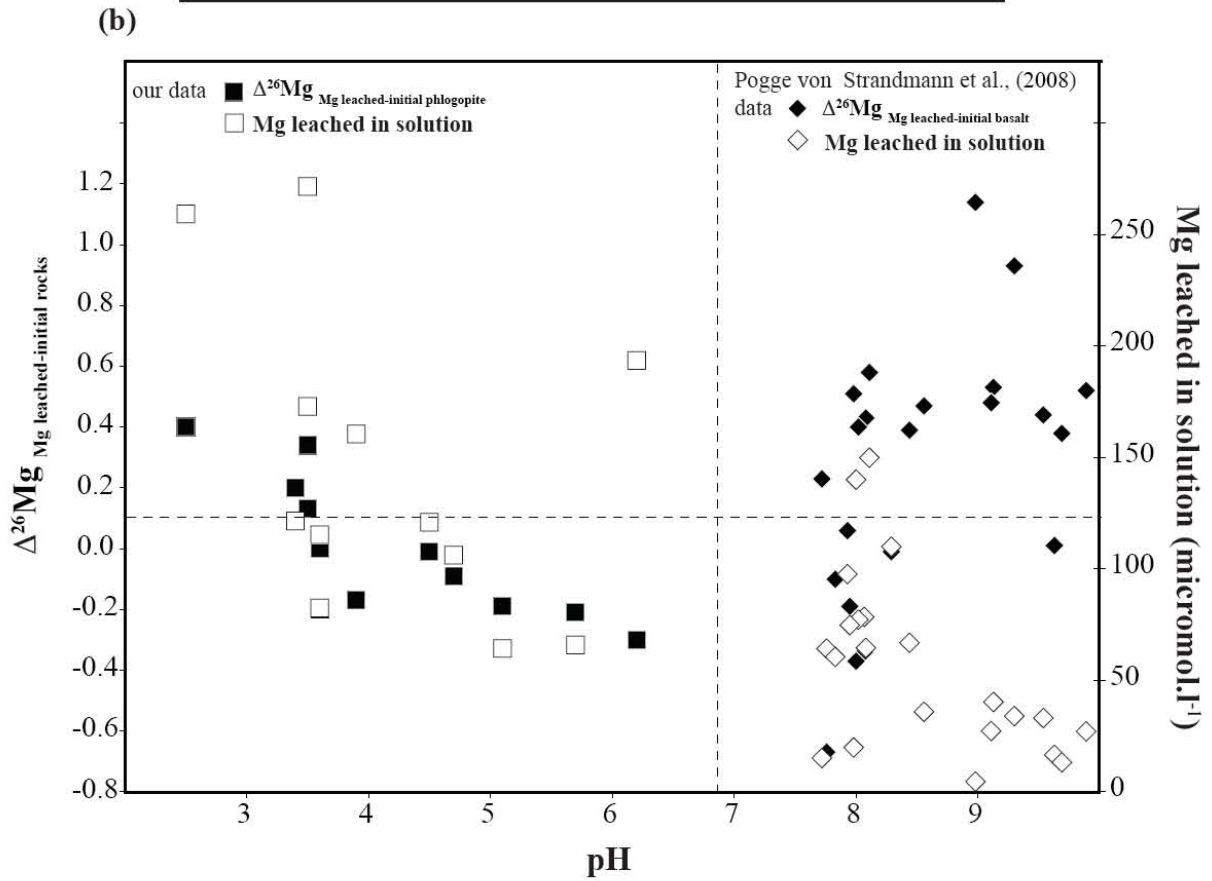
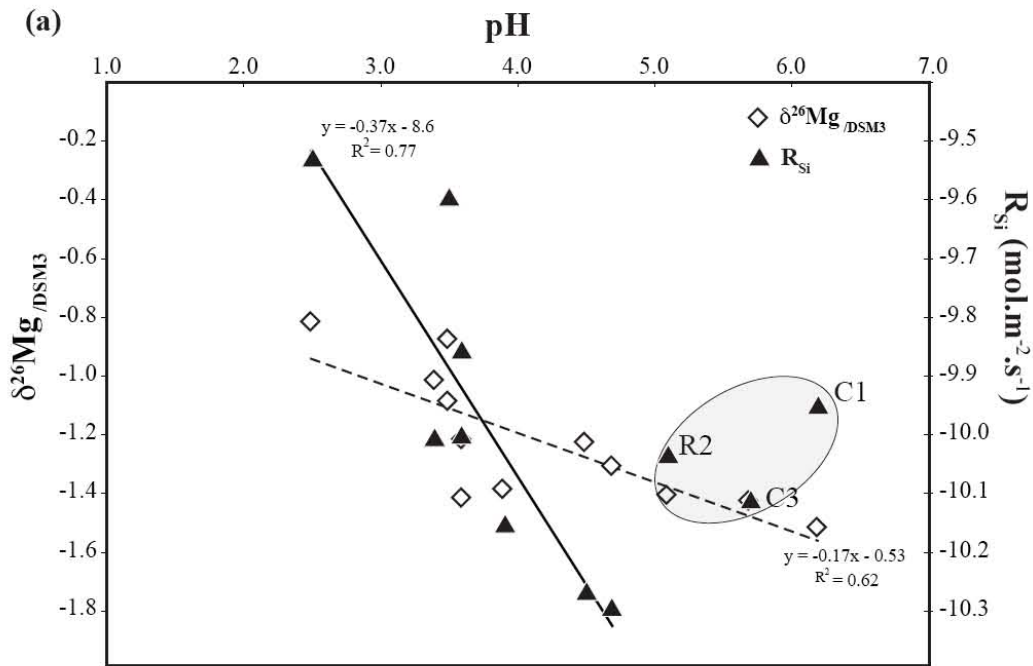


Figure 6.

---

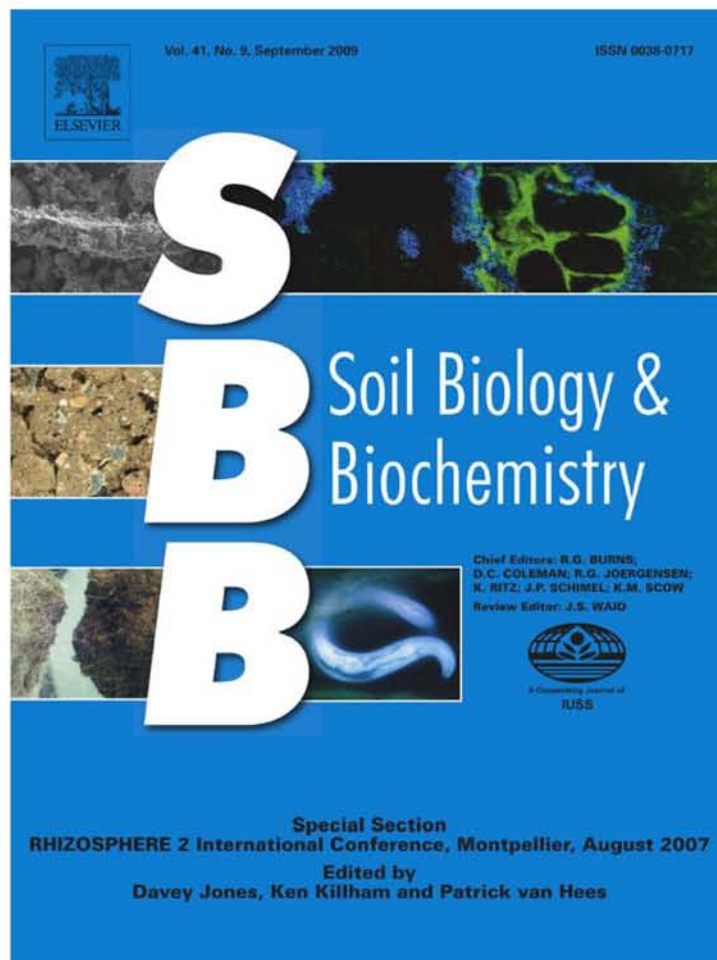
---

**Annexes 5 :**  
**Article 2**

---

---

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Soil Biology &amp; Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/soilbio](http://www.elsevier.com/locate/soilbio)

## Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere

Nora Alkama<sup>a,b,c,\*</sup>, Emile Bolou Bi Bolou<sup>a,1</sup>, Hélène Vailhe<sup>a</sup>, Lucien Roger<sup>a</sup>, Sidi Mohamed Ounane<sup>c</sup>, Jean Jacques Drevon<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup>SupAgro-INRA Montpellier UMR Biog eochimie des Sols et de la Rhizosph ere, 01 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

<sup>b</sup>Université Mouloud Mammeri, Faculté des sciences biologiques et agronomiques, Département d'agronomie, Tizi Ouzou, Algeria

<sup>c</sup>Institut National Agronomique, Département de phytotechnie, Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 September 2007

Received in revised form

22 November 2008

Accepted 25 November 2008

Available online 16 December 2008

## Keywords:

Cowpea

Genotype

Nodule respiration

Phosphorus

Proton efflux

Symbiotic nitrogen fixation

## ABSTRACT

*Vigna unguiculata* sp., or cowpea, varieties vary in their adaptation to low-P soils. In order to investigate to what extent this variation may be related to P use efficiency and proton efflux by nodulated roots, three genotypes, 26-73, Danila and Melakh, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *Vigna* CB756 were grown in hydroaerobic culture in a glasshouse at two levels of phosphorus supply corresponding to P sufficiency or P deficiency. After 4 weeks, individual symbiotic-plants were transferred to a reference-soil layer in a rhizotron, and harvested after 2 further weeks. Nodule and shoot biomass were less when P was deficient. The effect of P deficiency on biomass production followed the trend Danila > 26-73 > Melakh. Under P deficiency, the proton efflux for the P-efficient genotype 26-73 was 43% and 60% greater than for the P-inefficient Danila in hydroaerobics and in soil, respectively. This increase in proton efflux was associated with an increase in nodule specific respiration that was 115% greater for Danila than for 26-73. It is concluded that the genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with a variation in nodulated-root proton efflux and respiration in cowpea rhizosphere, and that these parameters should be measured for more contrasting genotypes in order to test whether they correlate with the adaptation of N<sub>2</sub>-dependent legumes to low-P soils.

  2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Vigna unguiculata* (L.) Walp commonly called cowpea is the most widely cultivated seed-legume in tropical savanna of Africa semi-arid and arid areas. It is also cultivated in Asia, America, and the South of Europe (Ehlers and Hall, 1997). According to FAO (2001), 64% of the world production of cowpea is produced in West Africa on approximately 10 million ha, where it is essential to restore soil fertility in the traditional culture systems. However, the production of cowpea in the savanna zones, and sahelian West Africa in particular, is insufficient for the food security (Ehlers and Hall, 1997). The yields are low compared with those recorded in North

\* Corresponding author. SupAgro-INRA Montpellier UMR Biog eochimie des Sols et de la Rhizosph ere, 01 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France. Tel.: +33 (0) 4 99 61 23 32; fax: +33 (0) 4 67 63 26 14.

\*\* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 4 99 61 23 32; fax: +33 (0) 4 67 63 26 14. E-mail addresses: [alkamanora@yahoo.fr](mailto:alkamanora@yahoo.fr) (N. Alkama), [drevonjj@supagro.inra.fr](mailto:drevonjj@supagro.inra.fr) (J.J. Drevon).

<sup>1</sup> Now at: LIMOS, Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, UMR 7137 CNRS, UHP, Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-Les-Nancy Cedex, France

America, largely because of water deficiency (Sarr et al., 2001) and low-P availability (Summerfield et al., 1974).

Phosphorus is present in small quantities in the lithosphere (0.1%), with two major forms in soils: the organic P form; the inorganic P (Pi) of which the soluble orthophosphates anions, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> and HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> are taken up by plants. The concentration of plant-available orthophosphate in soil solution varies between 0.1 and 10 µM as a function of (i) hydrolysis of organic P, (ii) dissolution–precipitation of P-bearing minerals, and (iii) adsorption–desorption of phosphate on soil surfaces, i.e. Fe- and Al hydroxylate surfaces at low pH, or Fe- and Al oxides, calcium carbonate, and clay minerals at high pH (Hinsinger, 2001; Mengel and Kirkby, 2001). In common bean, soyabean, lupin and alfalfa, P deficiency has been shown (i) to reduce the number and biomass of nodules as well as their nitrogenase activity (Ribet and Drevon, 1995; Vadez et al., 1996; Qiao et al., 2007), (ii) to increase the absorption surface and density of the roots resulting in more exploration of the soil volume (Vance, 2001), and (iii) to acidify the rhizosphere by root exudates (Neumann and Römheld, 1999) and H<sup>+</sup> efflux (Tang et al., 2001a,b, 2004).

Some cowpea genotypes are tolerant to P deficiency and aluminium toxicity in tropical acid soils (Kolawole et al., 2000; Sangina, 2003).

In addition, the best adapted genotypes increased the soil P availability by about 50% after a culture-cycle (Ankomah et al., 1995; Rajput and Singh, 1996). The later was associated with an increase in symbiotic nitrogen fixation (SNF) covering 89% of the plant N requirement (Bado, 2002, unpublished) and an accumulation of 200 kg/ha N in the soil (Sanginga, 2003). However, few publications describe the physiological mechanisms by which cowpea adapts to P deficiency. In particular, the relation between the genotypic variation in P use efficiency (PUE) for the SNF and the  $H^+$  efflux is not well documented. The aim of the present work was to investigate whether the genotypic variability in PUE for SNF among three cowpea genotypes is correlated with two rhizospheric functions of the nodulated roots, namely the proton efflux and the oxygen uptake linked with SNF, measured under P sufficiency and P deficiency at the flowering stage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material, soil and culture conditions

From a preliminary test of 6 cowpea (*V. unguiculata* L. Walp.) genotypes (kindly supplied by IITA, Ibadan, Nigeria) among which IT82D-716 and IT86D-715 did not nodulate, we chose Danila as a traditional genotype, and Melakh and 26-73 as being adapted to water deficiency. The seeds were sterilized with 3% calcium hypochlorite for 5–7 min and rinsed by 5 washings with sterile distilled water. They were then transferred for germination on soft agar, consisting of 100 ml Bergersen solution containing 5 g mannitol and 7 g agar in 1 l of distilled water with sterilization at 120 °C for 20 min (Vincent, 1970).

After germination, the inoculation was performed by soaking 4 d-old seedlings for 30 min in a suspension of *Bradyrhizobium* sp. *Vigna* CB756 (kindly supplied by CSIRO, Canberra, Australia) containing  $10^9$  bacteria  $ml^{-1}$ . The inoculum was prepared from rhizobia culture preserved in tubes at 4 °C on the following 120 °C sterilized agar YEM (Yeast Extract Mannitol) medium: 900 ml distilled water; 100 ml of Bergersen concentrated solution (which is prepared with a mixture of 1 g of KCl; 0.1 g of  $FeCl_3$ ; 0.4 g of  $CaCl_2$ ; 4.5 g of  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  and 1 g of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , firstly in 100 ml of distilled water then adjusted to 1 l); 1 g Yeast extract, 10 g of mannitol and 15 g of agar (Vincent, 1970). From one of the preserved tubes, some strains are taken and put on 100 ml of liquid YEM (without agar), and maintained at 28 °C for 24 h. Seeds are, then, inoculated by maintaining them into the inoculum for few minutes.

For each P treatment (50, 100, 150, and 250  $\mu mol$   $plant^{-1}$   $week^{-1}$ ) 20 inoculated plants were transferred into each 45-l container, 0.2 m large, 0.4 m long and 0.4 m high, for hydro-aeroponic pre-culture for 28 d. Based on work of Vadez et al. (1996) P was supplied weekly in the form of  $KH_2PO_4$  to the following nutrient solution that was changed every 2 weeks:  $CaCl_2$  (1650  $\mu M$ );  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1000  $\mu M$ );  $K_2SO_4$  (700  $\mu M$ );  $Fe$  EDDHA (8.5  $\mu M$  Fe as sequestrene);  $H_3BO_3$  (4  $\mu M$ );  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (6  $\mu M$ );  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (1  $\mu M$ );  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$  (1  $\mu M$ );  $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$  (0.1  $\mu M$ ). The oxygenation of the culture solution was ensured by a permanent flow of 400  $ml$   $l^{-1}$   $min^{-1}$  of compressed air. The pH was adjusted daily to a value of 6.8 with KOH (0.1 M). A supply of urea was provided with 2  $mmol$   $plant^{-1}$  in the initial solution and 1  $mmol$   $plant^{-1}$  at the first change of solution after two weeks, in order to optimize nodulation (Hernández and Drevon, 1991). The plants were then grown in N-free nutrient solution.

The whole experiment was carried out in a glasshouse under temperature conditions of 28/20 °C during 16/8 h day/night cycle with an additional illumination of 400  $\mu mol$  photons  $m^{-2}$   $s^{-1}$  and 70% relative humidity during the day.

### 2.2. Measurement of proton efflux in rhizotrons

In order to evaluate the influence of the nodulated root on the pH of the soil, 5 plants representing the mean growth in containers of each P treatment, namely P sufficiency and P deficiency, were transferred individually at 28 DAS into the rhizotron shown in Fig. 1. The soil was characterized by high cation exchange capacity (CEC), neutral pH and low content of available P, in spite of its rather large total P content (Table 1). It was sampled at a depth of 5–20 cm in Cazeville (South of France), and was sieved (<2 mm) after removing stones and plant residues. It is classified as a fersiallitic soil, i.e. chromic cambisols according to FAO–UNESCO (1989). A polyamide mesh of 30  $\mu m$  (Nytrel 0.2SPN, Fyltis-U.G.B., Lyon, France) separated the soil from roots without limiting the exchange of water and chemical with the nodulated roots (Hinsinger and Gilkes, 1997). Each 24 g of soil used in each rhizotron was incubated for 4 d at 20 °C. The rhizotrons were fixed vertically into 5 l buckets, with a filter paper as wick bathing in the previously described nutrient solution.

The initial pH of the soil was measured in an aqueous suspension with a soil/water 1/5 (v/v), after having calculated the water content of each sample. At harvest, a fraction of soil of each replicate was weighed then dried at 105 °C for 24 h to estimate the water content of each soil sample. The  $H^+$  efflux, expressed in  $\mu mol$   $plant^{-1}$   $d^{-1}$ , was calculated as:  $QH^+ = (\beta_s \Delta H Ma) t^{-1}$ ; where,  $\beta_s$  is buffer capacity of the soil in  $\mu mol$   $OH^-$   $g^{-1}$  soil unit pH;  $\Delta H$  is difference between the final pH at harvest and initial pH before the culture;  $Ma$  is mass of soil used in g;  $t$  is the duration of culture in d. The soil buffering capacity was assessed by decreasing or increasing soil pH by 1 unit after addition of a solution of  $H_2SO_4$  or KOH. According to the proton balance, the soil pH depends upon the amount of  $H^+$  added or depleted from soil solution and the intensity of the soil buffer that depends on the contents of clay and organic matter (Conyers et al., 1995).

### 2.3. Measurements of proton efflux and nodulated-root $O_2$ uptake in serum bottle

In order to compare the growth of the plants and the  $H^+$  efflux of the nodulated roots in rhizotron and hydroaeroponics, and to assess nodulated-root gas exchanges, more than 5 plants representing the mean growth in containers for each P treatment were transferred individually at 28 DAS in 1 l serum bottles receiving the previously described nutrient solution according to Drevon et al. (1988). To compensate for acidification of the

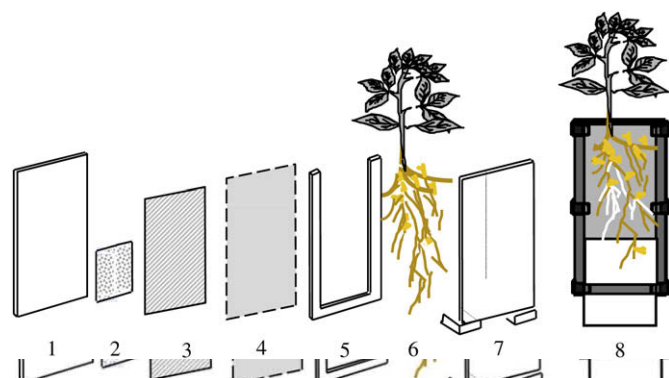


Fig. 1. Rhizotron: (1) plate of glass, (2) filter paper used as a link between the soil and the nutrient solution, (3) layer of soil, (4) polyamide of 30  $\mu m$  mesh, (5) PVC block of 3 mm thickness, 20 cm length and 1 cm width, (6) cowpea, (7) plate of glass fixed vertically and (8) plant in rhizotron. The soil was calculated on the basis of apparent dry density of the soil. It was distributed homogeneously.

**Table 1**  
Chemical and physical properties of the soil used in the study.

Characteristics	Value
Clay (%)	48.60
Fine silt (%)	21.80
Coarse silt (%)	17.80
Fine sand (%)	11.60
Coarse sand (%)	3.00
pH <sub>H2O</sub>	7.00
pH <sub>KCl</sub>	6.10
$\beta_s$ ( $\mu\text{mol OH}^{-1}(\text{g soil})^{-1}(\text{pH unit})^{-1}$ )	53.73
CaCO <sub>3</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	0
Organic matter (g kg <sup>-1</sup> )	24.1
CEC (cmol kg <sup>-1</sup> )	21.60
Ca <sup>2+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	18.50
Na <sup>+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	0.13
Mg <sup>2+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	1.00
K <sup>+</sup> (cmol kg <sup>-1</sup> )	0.38
P <sub>total</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	0.90
P <sub>ass</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	0.007

nutrient solution, the pH was measured daily, like in containers, and corrected to 6.8, if necessary, by adding a quantity  $Q$  (mol) of the KOH solution determined as  $Q = CV \times 10^{-3}$  where  $C$  is concentration of the solution in M and  $V$  is volume of solution used in ml.

The consumption of O<sub>2</sub> by the nodulated roots (Conr) was measured with two-way oxymeter (Abiss, Verpillère, France) at 39–44 DAS. One day before the measurement of Conr, the level of the nutrient solution in the bottle was reduced to one-third of the volume so that the whole nodule population was in direct contact with the gas phase (Fig. 2). Gaseous exchange was measured using the oxymeter connected to a recorder and the evolution of O<sub>2</sub> consumption of the biological material followed by monitoring O<sub>2</sub>

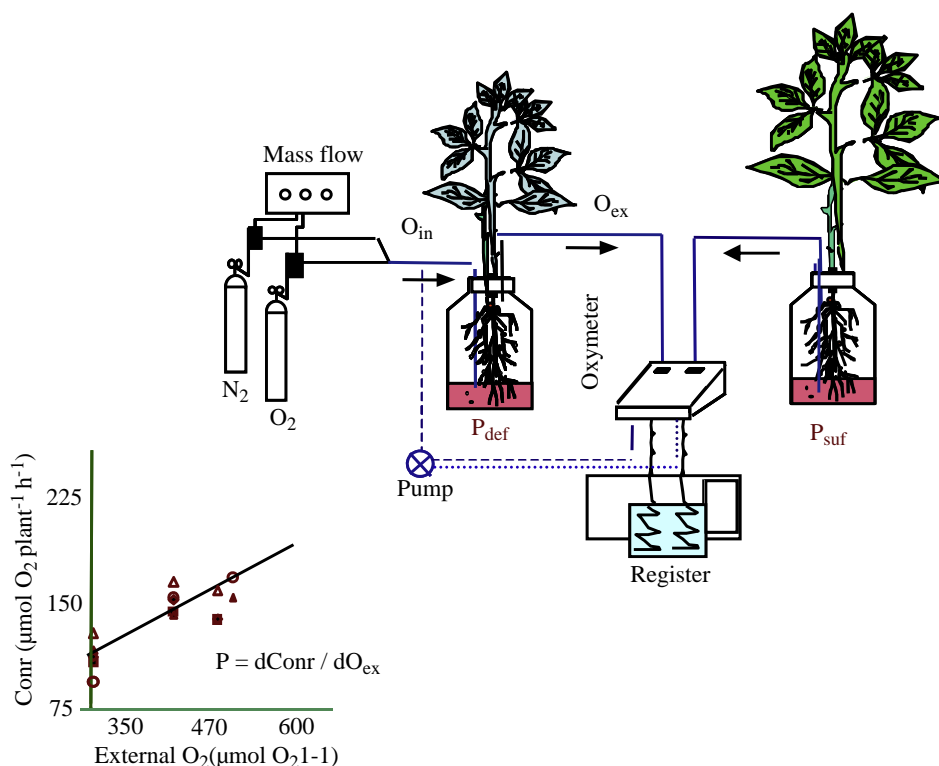
in the known volume of the serum bottle plus tubing (Jebara and Drevon, 2001). A peristaltic pump ensured the circulation and continuous homogenisation of the gas phase between the nodulated roots and the oxymeter, with 400 ml min<sup>-1</sup> of flow. Successive measurements were performed after 15 min with an initial  $p\text{O}_2$  of 21, 25, 30, 40, 50 kPa O<sub>2</sub>. The consumption of O<sub>2</sub> was calculated as  $\text{Conr} = \Delta p\text{O}_2(V/24.2)(60/t)$ , with  $\Delta p\text{O}_2 = p\text{O}_2 \text{ initial} - p\text{O}_2 \text{ final}$  in % of atmospheric pressure;  $V$  in l, volume of the gas phase under the experimental conditions;  $t$  in min, time between the initial and final measurement of O<sub>2</sub>; 24.2 in l, volume of 1 pure gas mol under the experimental conditions (Schulze and Drevon, 2005). Conr is expressed in  $\mu\text{mol O}_2 \text{ consumed plant}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### 2.4. Analysis at harvest and statistical data processing

The plants were harvested at the flowering stage with the first pod measuring 2 cm long. The shoot was separated from the root at the cotyledonary node, then weighed after 48 h at 80 °C. Nodules were separated from the roots, counted and weighed separately.

Soil samples used were dried at 105 °C for 24 h. Their pH was measured in an aqueous suspension shaken at 1200 rotations min<sup>-1</sup> for 30 min with a soil:solution of 1:5. The available P of the soil was measured by the Olsen method according to standard NF ISO 11263 after extraction by soil agitation with a solution of 0.5 N sodium bicarbonate with pH 8.5.

In order to determine the contribution of P supply to plant growth, the response curves were established from biomass values with the software Excel Microsoft Office XP. The corresponding models were polynomial type  $a + bx - cx^2$ . From this model were deduced the critical P, by the relation  $P = b/2c$ , and the corresponding maximum growth. Coefficients  $a$  and  $b$  expressed, respectively, the growth potential of the plants without P supply



**Fig. 2.** Hydroaerobic culture and *in situ* measurement of oxygen uptake by nodulated roots of cowpea. O<sub>ex</sub> = oxygen efflux; O<sub>in</sub> = oxygen influx; Conr = oxygen uptake by nodulated roots according to Jebara and Drevon (2001).

and the potential of production of biomass per unit of P. For regressions shown in various figures, covariance analysis was performed for the calculation of the *F* value, with decision of significance for  $p < 0.05$ .

Differences between means of all parameters for sufficient versus deficient P treatments were determined by two-way analysis of variance (ANOVA) and utilized the Fisher's LSD test. Factors and interactions with  $*p < 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Growth and nodulation of cowpea genotypes at different P levels

From the models shown in Fig. 3A, the critical P supply for shoot growth of 26-73 and Danila was close to  $140 \mu\text{mol plant}^{-1} \text{week}^{-1}$  which was significantly greater than for Melakh. However, the maximum growth was significantly greater for 26-73 than for Danila or Melakh. This resulted in a significantly larger potential of shoot biomass per unit of P for 26-73 and Melakh ( $280 \text{ mg DW } \mu\text{mol}^{-1} \text{P}$ ) than for Danila.

Melakh and Danila apparently required a larger critical P than 26-73 for root growth but the differences were not significant (Fig. 3B). The maximum root growth of Melakh was significantly larger than that of 26-73 and Danila. Root-growth potentials of Melakh and Danila, without external P supply were lower than that of 26-73.

The critical P supply for nodule growth was significantly larger for Melakh and Danila than for 26-73 (Fig. 3C). The potentials of nodule biomass per unit of P for Melakh and Danila were lower than for 26-73 ( $5 \text{ mg DW } \mu\text{mol}^{-1} \text{P}$ ).

From the response curves in Fig. 3 it was possible to choose two levels of P, namely  $100 \mu\text{mol plant}^{-1} \text{week}^{-1}$  for P sufficiency versus  $30 \mu\text{mol plant}^{-1} \text{week}^{-1}$  for P deficiency. Results of shoot, root and nodule dry weight  $\text{g}^{-1}$  plant in individual serum bottle are shown in Fig. 4A, B and C. The two-way ANOVAs for the biomass (shoot, root and nodules) of the plants grown in the serum bottles are given in Tables 2–4. These results indicate that P level and cowpea variety affect significantly the shoot, root and nodule biomass. However, the interaction between the P level and cowpea variety does not influence the cowpea plant organ. So, for all plant parts, the P-sufficiency treatment always yielded statistically significant more biomass than the P deficiency one (Table 3); and, irrespectively of the P level, the 26-73 genotype produced significantly higher biomass than the other two genotypes, except for shoot dry weight where there is no significant difference with Melakh (Table 4).

#### 3.2. Growth and nodulation in rhizotron

In the rhizotron experiment, the shoot biomass was greater than in hydroaeroponics for the 3 genotypes (Fig. 4D). Like in hydroaeroponics, 26-73 produced more biomass than Melakh and Danila and significantly more biomass under P sufficiency than P deficiency ( $p = 0.0041$ ). Under P sufficiency, the shoot biomass for 26-73

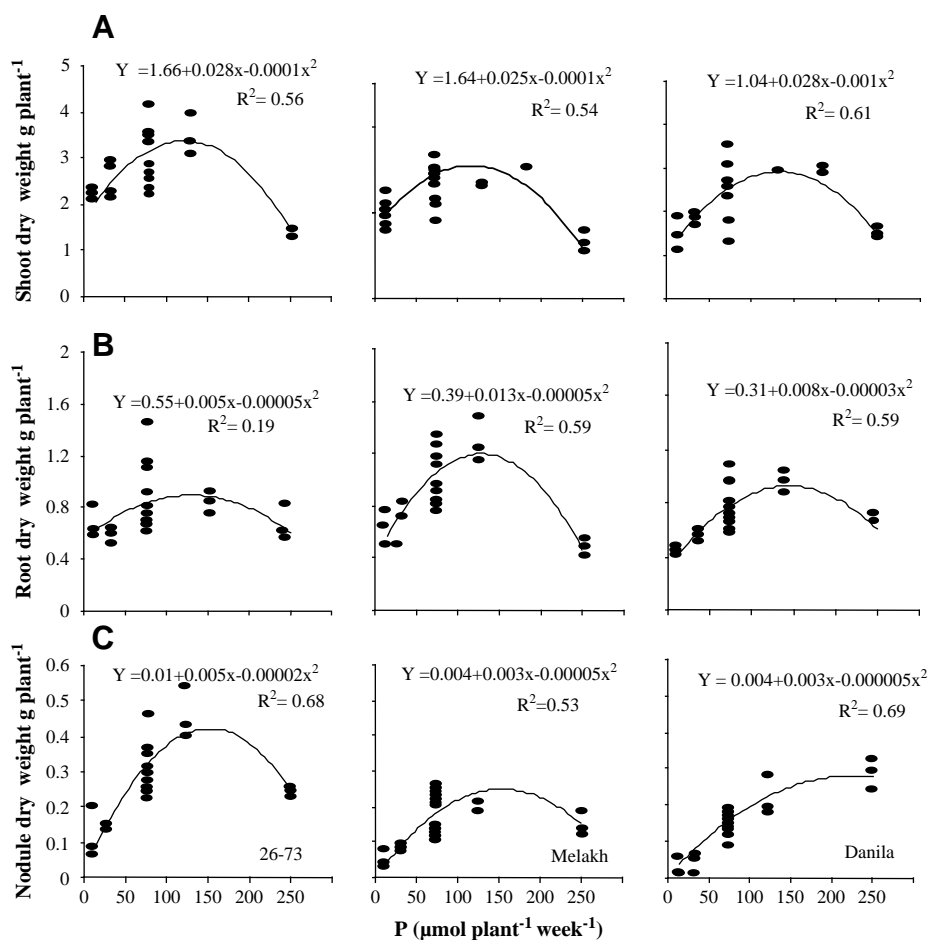
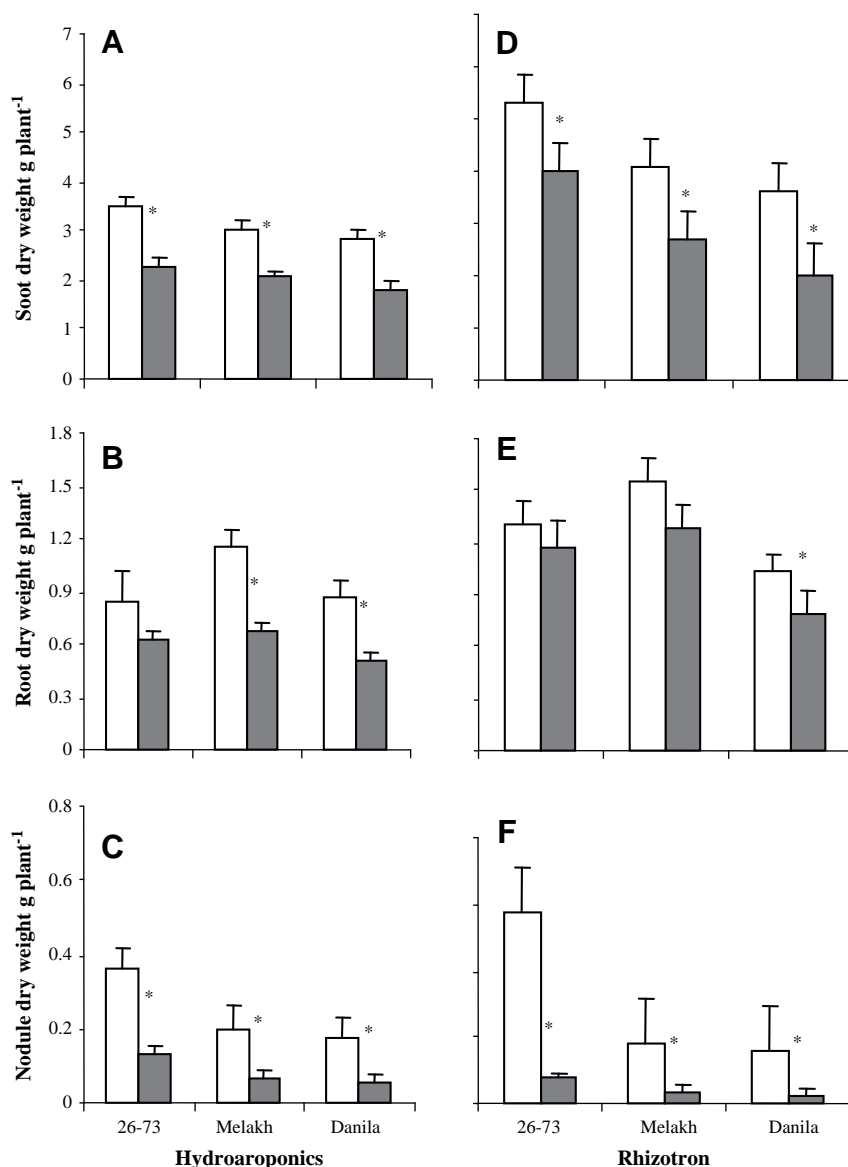


Fig. 3. Response curves of growth of shoot (A), root (B) and nodule (C) as a function of P weekly supplies. Data are individual values for 3 cowpea genotypes harvested at 45 DAS. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .





**Fig. 4.** Shoot, root and nodule growth of 3 cowpea genotypes under P sufficiency □ versus P deficiency ■ under hydroaerponic conditions and in rhizotrons. Data are means  $\pm$  SD of 9 and 6 replicates, respectively, at 45 DAS. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

was significantly greater than under P deficiency ( $p = 0.0418$ ) whereas for Melakh and Danila it was larger under P sufficiency than under P deficiency ( $p = 0.115$ ,  $p = 0.117$ , respectively). Thus, Danila appeared less P-efficient than 26-73, Melakh being intermediate between the other genotypes. The root biomass was also highly significant than in hydroaerponics for the 3 genotypes ( $p = 0.0065$ ) (Fig. 4E). Melakh produced significantly more root biomass than 26-73 and Danila irrespective of P supplies. Under P sufficiency the root biomass for 26-73 and Melakh was not highly significant than under

P deficiency. By contrast, the root biomass of Danila grown under P sufficiency was significantly larger than under P deficiency ( $p = 0.0292$ ). The nodule biomass was larger for 26-73 than for Melakh and Danila, but the differences between the genotypes were significant only under P sufficiency ( $p = 0.043$ ). The two-way ANOVAs for the biomass (shoot, root and nodules) of the plants grown in the rhizotron are given in Table 5. The nodule biomass of 26-73 under P sufficiency was 6-fold greater than under P deficiency whereas it was 4- and 5-fold for Melakh and Danila (Fig. 4F).

**Table 2**

Influence of P levels and genotypes on shoot, root and nodule biomass of *Vigna unguiculata* in serum bottles. *F*-ratios from two-way ANOVAs are shown with accompanying measures of statistical significance  $0.01 \leq p < 0.05$ ;  $0.001 \leq p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ .

	DWs	DWr	DWn	Nod
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Var	0.0277	0.0298	<0.0001	0.0002
P $\times$ Var	0.9244	0.3024	0.1240	0.5032

**Table 3**

Influence of P levels on genotypes on shoot, root and nodule biomass of *Vigna unguiculata* in serum bottles. *F*-ratios from two-way ANOVAs are shown with accompanying measures of statistical significance  $0.01 \leq p < 0.05$ ;  $0.001 \leq p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ .

	DWs	DWr	DWn	Nod
P sufficiency	3.1456 a	0.9495 a	0.2451 a	179.15 a
P deficiency	2.0644 b	0.5982 b	0.0444 b	105.83 b

**Table 4**

Influence of P levels within genotypes on shoot, root and nodule biomass of *Vigna unguiculata* in serum bottles. F-ratios from two-way ANOVAs are shown with accompanying measures of statistical significance  $0.01 \leq p < 0.05$ ;  $0.001 \leq p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ .

	DWs	DWr	DWn	Nod
26-73	3.0168 a	0.9569 a	0.2680 a	197.20 a
Melakh	2.6631 ab	0.7574 b	0.1470 b	138.47 b
Danila	2.4596 b	0.7126 b	0.1268 b	113.87 b

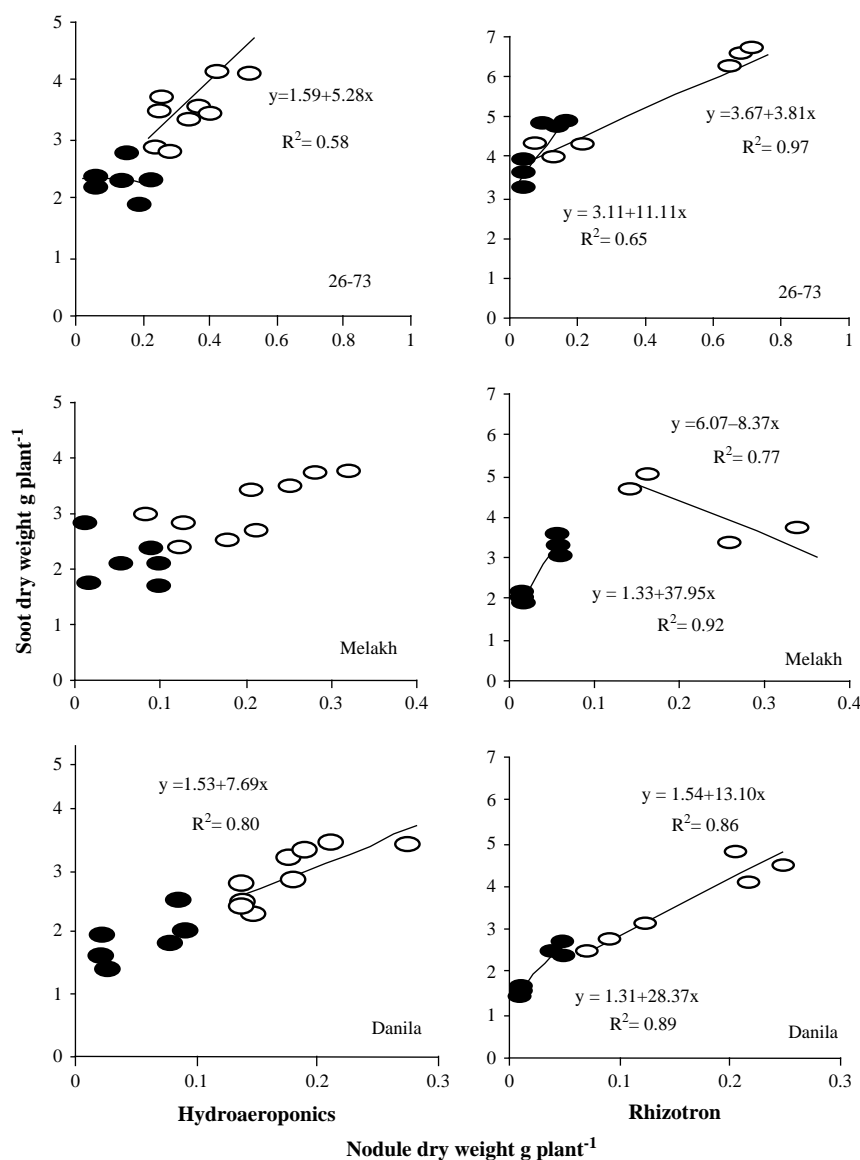
In order to evaluate the efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS), the values of the shoot biomass were plotted as a function of those of nodule biomass in Fig. 5 where the slope of the regressions is an estimate of the EURS. Under hydroaerobic conditions, and with P sufficiency, a significant correlation was observed between these parameters only for Danila although deficiency in Danila and 26-73 was not significantly different but significantly lower than that of Melakh. In the rhizotron, the EURS of

26-73 was 66% lower under P sufficiency than under P deficiency (Fig. 5). The EURS of Danila under P sufficiency was 54% lower than under P deficiency. Melakh had a negative EURS under P sufficiency, though its EURS was the greatest under P deficiency (Fig. 5).

### 3.3. Proton efflux in rhizotron and hydroaerobic culture

In the rhizotron after 2 weeks, plant growth decreased soil pH significantly more under P sufficiency than P deficiency, except for Danila (Fig. 6A). The  $H^+$  efflux calculated from soil buffer capacity was larger for 26-73 than for Melakh and Danila under P deficiency (Fig. 6B). The expression of  $H^+$  efflux per unit of root biomass was larger for 26-73 than for Melakh and Danila, under P deficiency (Fig. 6C). For Danila the  $H^+$  efflux was significantly larger under P sufficiency than under P deficiency.

The contact with plants significantly increased soil P Olsen content for both P treatments and each genotype (Fig. 6D). This increase was significantly larger when P was deficient, but there was no significant difference between the genotypes.



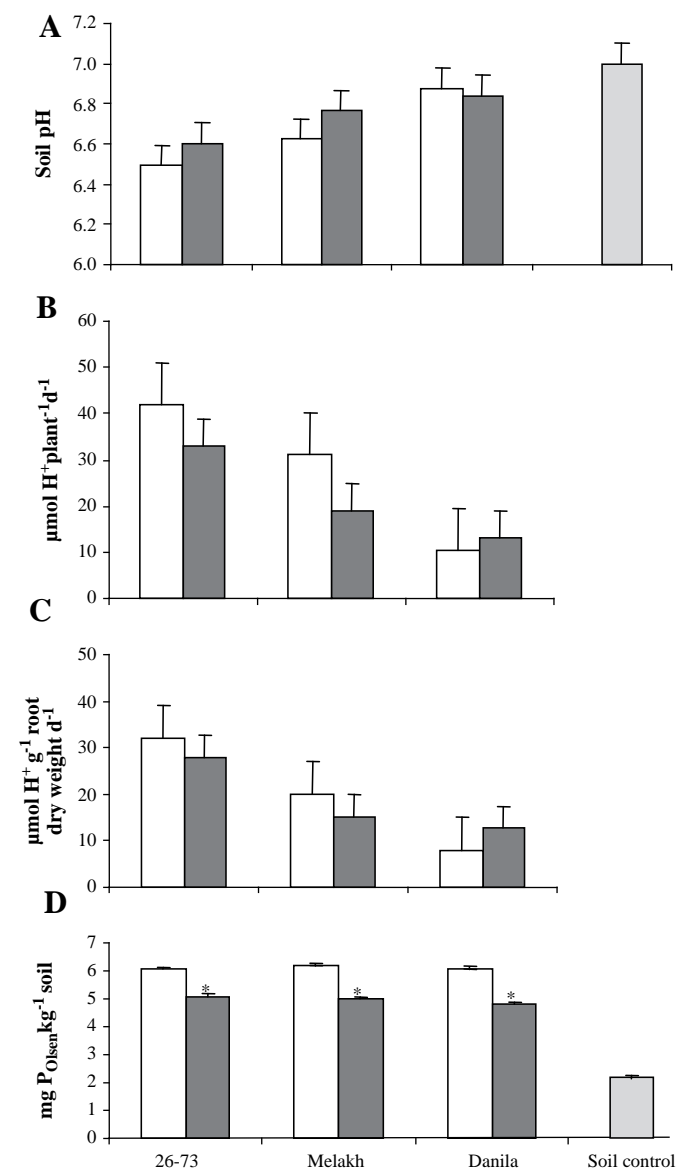
**Fig. 5.** Efficiency in use of rhizobial symbiosis of 3 cowpea genotypes under P sufficiency □ versus P deficiency ■ under hydroaerobic conditions and in rhizotrons. Data are individual values for 3 cowpea genotypes harvested at 45 DAS. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

**Table 5**  
Influence of P levels and genotypes on shoot, root and nodule biomass of *Vigna unguiculata* in rhizotron. *F*-ratios from two-way ANOVAs are shown with accompanying measures of statistical significance  $0.01 \leq p < 0.05$ ;  $0.001 \leq p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ .

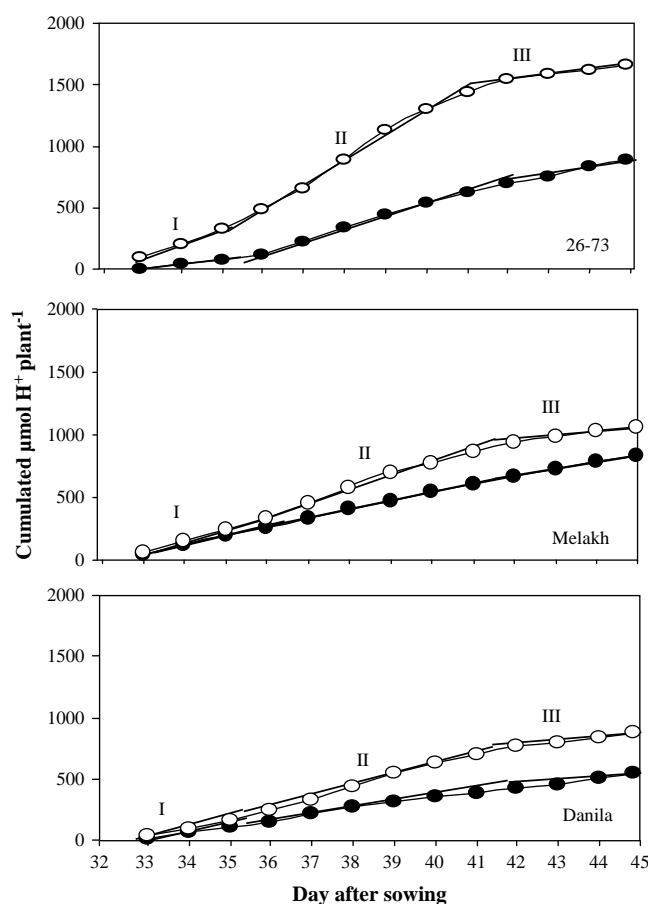
	DWs	DWr	DWn	Nod
P	<0.0001	<0.0057	<0.0001	<0.0001
Var	<0.0001	<0.0001	0.0024	0.0219
P × Var	0.9486	0.6681	0.0187	0.0374

Note: DWs: shoot Dry Weight; DWr: root Dry Weight; DWn: nodule Dry Weight; Nod: Nodules.

In serum bottles the  $H^+$  efflux, either daily or cumulated, was significantly greater under P sufficiency than under P deficiency (Fig. 7). The detailed analysis of Fig. 7 shows temporal variations in acidification of the rhizospheric environment by the nodulated roots on the basis of the regression of the  $H^+$  efflux as a function of time. Thus, the  $H^+$  efflux for 26-73 was significantly greater than for Melakh and Danila by 82% and 100% under P sufficiency and by 35% and 95% under P deficiency (Fig. 8A). The expression of  $H^+$  efflux



**Fig. 6.** Soil pH (A),  $H^+$  efflux per plant (B) and per root dry weight (C), and Olsen P (D) in the rhizosphere under P sufficiency  $\square$  versus P deficiency in  $\blacksquare$  rhizotron. Data are means  $\pm$  SD of 18 replicates at 45 DAS. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

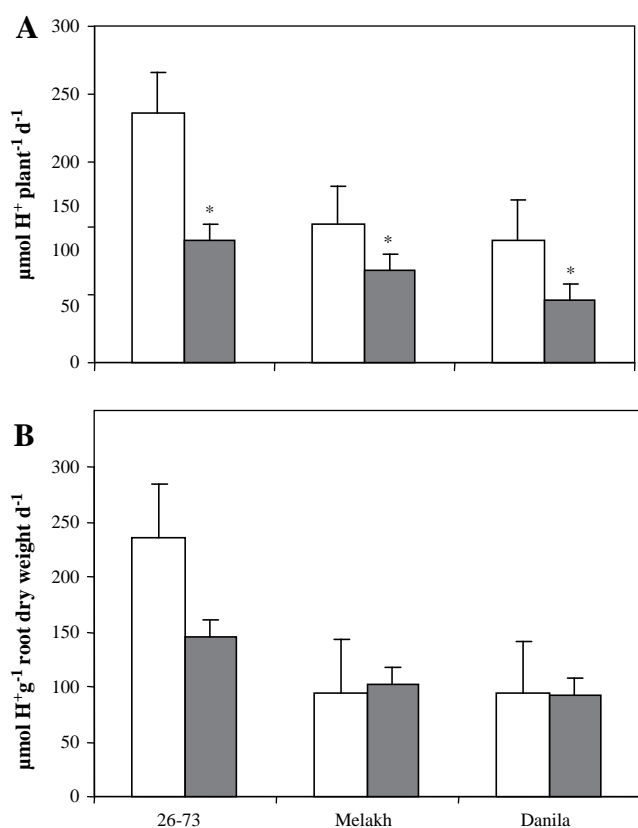


**Fig. 7.** Temporal evolution of cumulated  $H^+$  efflux of 3 cowpea genotypes during 13 d in serum bottles under P sufficiency  $\circ$  versus P deficiency  $\bullet$ . Data are the means of 9 replicates. Under P sufficiency we observed 3 phases. Data are given, respectively, for 26-73, Melakh and Danila: Phase I, from 33 to 35 DAS with mean value of  $110 \pm 18$ ,  $83 \pm 23$  and  $56 \pm 15 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$ , Phase II, from 36 to 41 DAS, with  $185 \pm 41$ ,  $102 \pm 18$  and  $90 \pm 16 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$ , Phase III, from 42 to 45 DAS, with values of 55, 52 and  $44 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Under P deficiency for 26-73 the mean values for the phases are  $26 \pm 20 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$ ,  $91 \pm 27 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$  and  $66 \pm 12 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$  for the phases I, II and III, respectively. For Melakh and Danila the  $H^+$  efflux was  $66 \pm 24$ ,  $68 \pm 12$  and  $54 \pm 14 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$  for Melakh versus  $38 \pm 25$ ,  $46 \pm 11$  and  $41 \pm 9 \mu\text{mol H}^+ \text{plant}^{-1} \text{d}^{-1}$  for Danila during the three phases.

per unit of nodulated-root biomass in Fig. 8B was 29% greater under P sufficiency than under P deficiency for 26-73 but for Melakh, it was 23% lower under P sufficiency than under P deficiency. Values for Danila were not significantly different between P treatments. In comparison between genotypes, the  $H^+$  efflux per unit of biomass of nodulated roots for 26-73 was 104 and 75% greater under P sufficiency and 29 and 43% under P deficiency than for Melakh and Danila, respectively.

### 3.4. Respiration of nodulated roots in hydroaerobic culture

In order to know whether the  $H^+$  efflux is correlated with the symbiotic nitrogen fixation, the nodulated-root respiration in hydroaerobics and the pH were measured simultaneously as illustrated in Fig. 9. The examination of the response curves of the consumption of  $O_2$  by the nodulated root (Conr) as a function of the concentration of  $O_2$  shows that raising  $pO_2$  induced an increase in Conr to a maximum value corresponding to the critical oxygen pressure (COP). For 26-73 P deficiency induced a significant decrease in maximum Conr. By contrast for Melakh, and to a lesser extent for Danila, the maximum Conr was significantly increased by P deficiency.



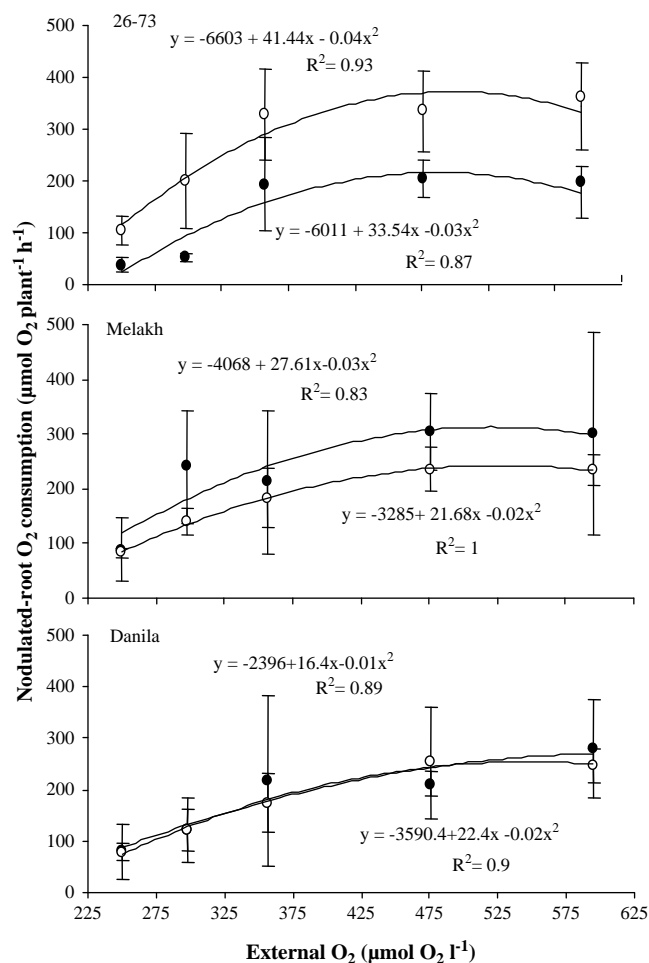
**Fig. 8.** Mean of daily H<sup>+</sup> efflux per plant (A) and per root dry weight (B) for 3 cowpea genotypes cultivated 13 d in serum bottles. Data are means ± SD of 9 replicates. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

Under ambient  $pO_2$ , the Conr per unit root biomass was significantly greater than under P deficiency without significant difference among genotypes (Fig. 10A). The respiration per unit of nodule biomass was significantly more increased under P deficiency for Melakh and Danila than for 26-73 (Fig. 10B).

Nodule permeability was calculated as the slope of the linear response of Conr as a function of  $pO_2$  as explained in detail in Jebara and Drevon (2001). The corresponding values were significantly greater for 26-73 than for both other genotypes under P sufficiency (Fig. 10C). Nodule permeability was significantly increased by P deficiency for 26-73, but it was decreased for Danila, without significant difference for Melakh.

#### 4. Discussion

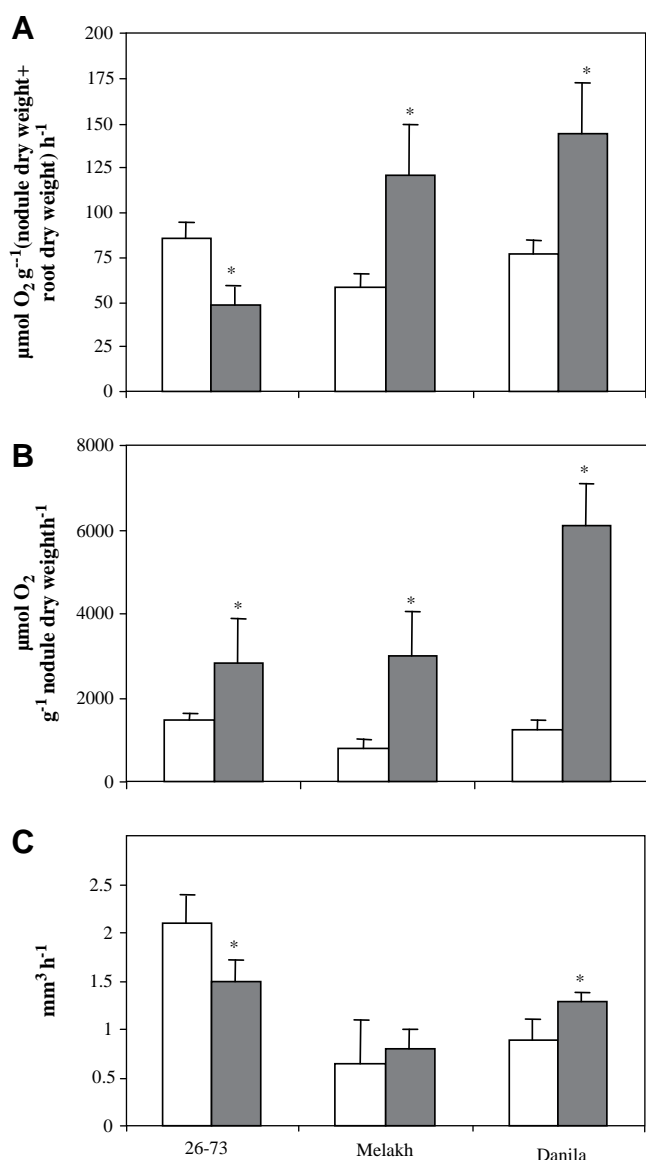
The aim of this research was to investigate the relation between P nutrition and proton efflux by nodulated roots of three genotypes of cowpea in hydroaerobic and rhizotron cultures in order to address whether a P-efficient genotype may have more proton efflux than a P-inefficient one. Differences in P requirements between 26-73, Melakh and Danila in our work (Fig. 3–4) agree with previous descriptions of genotypic variations for cowpea P-requirement in pots or in field by Kolawole et al. (2000), Krasilnikoff et al. (2003) and Sanginga et al. (2000). Although the plants might compete for P acquisition during the pre-culture in hydroaerobic container, most difference in growth was established during the individual culture in serum bottle. The later allows a rigorous control of the P availability for each plant. It ensures expression of growth potential without any competition, and with N<sub>2</sub> as the major source of N in addition to seed N and



**Fig. 9.** Nodulated root O<sub>2</sub> consumption as a function of rhizospheric O<sub>2</sub> concentration for 3 cowpea genotypes under P sufficiency ○ versus P deficiency ●. Data are means ± SD of 6 replicates between 40 and 44th DAS in serum bottles. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

starter urea. The relatively low efficiency of Danila contrast with field results of Jemo et al. (2006) in low-phosphorus soils of southern Cameroon where Danila was among the best genotypes found. This discrepancy may be due to (i) the microsymbiont since some variability has been found among the rhizobia that nodulate cowpea (Zablutowicz and Focht, 1981; Fall et al., 2003), (ii) the rhizobia-genotype interaction since genotypic variations among cowpea genotypes have been observed for nodulation and N<sub>2</sub> fixation (De Souza et al., 1999; Jemo et al., 2006), (iii) differences between acquisition efficiency determined in field and in glasshouse experiments.

Our results also show that the P requirement for the N<sub>2</sub>-dependent growth of *V. unguiculata* is lower than for other legume species such as *Glycine max* (Ribet and Drevon, 1995), *Acacia mangium* (Ribet and Drevon, 1996) or *Phaseolus vulgaris* (Vadez, 1996; Vadez et al., 1999) in similar hydroaerobic conditions, although with lower biomass for cowpea. The later discrepancy may be due to (i) the microsymbiont since some variability has been found among the rhizobia that nodulate cowpea (Zablutowicz and Focht, 1981; Fall et al., 2003), (ii) the temperatures of the glasshouse that might have been too low by comparison with experiments performed by Gómez et al. (2002) in Cuba or Ogbonnaya et al. (2003) in Senegal with mean day/night temperatures of 35/30 °C, (iii) the natural illumination period that was less than 10 h, although complementary light was added for a diurnal



**Fig. 10.** Nodulated root O<sub>2</sub> consumption on Contr (A), nodule permeability (B), specific nodule respiration (C) of 3 cowpea genotypes under P sufficiency □ versus P deficiency ■. Data are means ± SD of 6 replicates between 40 and 44th DAS in serum bottles. \*Significant difference at  $p < 0.05$ .

cycle of 16 h, and (iv) the nutrient solution might not be perfectly adapted to cowpea which is consistent with greater growth in rhizotron (Fig. 4). Thus the nutrient solution for hydroaerobic culture of nodulated legume was developed initially for *G. max* (Drevon et al., 1988) and subsequently adapted to *P. vulgaris* (Vadez et al., 1996) and *M. truncatula* (Aydi et al., 2004) and *M. sativa* (Schulze and Drevon, 2005).

#### 4.1. Phosphorus use efficiency

The greater tolerance of 26-73 compared to Danila is related to a greater phosphorus use efficiency (PUE) that is illustrated by greater growth of nodules, shoot and roots for 26-73 than for Danila with the same amount of available P (Fig. 3 and 4). The greater P requirement for nodules than shoot or roots (Fig. 3 and 4) agrees with the previous observation that the P content is threefold larger in nodules than in shoots for *A. mangium* (Ribet and Drevon, 1996) and *G. max* (Ribet and Drevon, 1995). The particularly large PUE for SNF found in our work

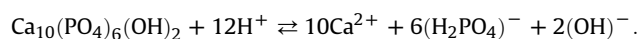
may be related to low-P demand of *Bradyrhizobium* sp. *Vigna* that proved to be P-efficient (Beck and Munns, 1984).

The high requirement of P for nodules might be related to high energy requirement of the SNF process (Israel, 1987), i.e. the equivalent of 30 ATP per N<sub>2</sub> reduced (Salsac et al., 1984). This high demand in respiratory energy for the SNF is confirmed by the curvilinear responses of the nodulated-root consumption of O<sub>2</sub> in response to the variation of pO<sub>2</sub> (Fig. 10) like in previous application of this methodology to *G. max* (Ribet and Drevon, 1995), *P. vulgaris* (Jebara et al., 2004) or *M. truncatula* (Aydi et al., 2004). The COP level close to 40 kPa O<sub>2</sub> (Fig. 9) confirms that the energy metabolism supporting SNF in cowpea nodules is limited by ambient O<sub>2</sub> that is equal or lower than 21 kPa O<sub>2</sub> in soils. The increase in nodule respiration under P deficiency (Fig. 10) agrees with the finding by Ribet and Drevon (1995) for *G. max*, and Vadez et al. (1996) for *P. vulgaris*. Genetic variations in response to external pO<sub>2</sub> among cowpea genotypes (Fig. 9) substantiate genetic variations previously described among genotypes of *P. vulgaris* (Jebara et al., 2004).

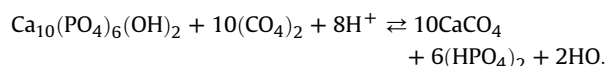
#### 4.2. Proton efflux

The greater H<sup>+</sup> efflux for the P-efficient 26-73 than for the P-inefficient Danila (Fig. 7) agrees with previous conclusion of Tang et al. (2001a) with *P. vulgaris*. The low variations of pH in rhizotron (Fig. 6) could be related to a less dense root-system for cowpea than *P. vulgaris* and a stronger tap-root that limited the contact with soil. The later may explain the negative value of the EURS of Melakh under P sufficiency (Fig. 5). The greater H<sup>+</sup> efflux under P sufficiency than deficiency (Fig. 8) is consistent with the finding in genotypes of *G. max* (Tang et al., 2007) but contrasts with previous observations of a stimulation of the H<sup>+</sup> efflux by P deficiency under the same conditions with *M. sativa* (Tang et al., 2001b) and *P. vulgaris* (Alkama, 2004, unpublished). Thus the greater H<sup>+</sup> efflux under P sufficiency with cowpea may be due to the 10-fold greater SNF than under P deficiency (Fig. 5). By contrast, the latter would induce a decrease in nitrogenase activity (Robson et al., 1981) that would limit the N-dependent growth of the plant and its subsequent SNF.

The acidification of the cowpea rhizosphere could be related to an excess of cation absorption (Tang, 2001a; Hinsinger et al., 2003). The rhizospheric acidification could contribute to the adaptation of legume genotypes and species to P deficiency through the effects on P bioavailability. In the soil of our study, the P that is fixed in the calcic-phosphatic complexes can be solubilized according to the following equation for hydroxyapatite which shows the solubilizing effect of H<sup>+</sup> (Hinsinger and Gilkes, 1997):



However, the genotypic difference in the H<sup>+</sup> efflux did not result in a difference of Olsen P in rhizotron culture (Fig. 6) suggesting that other mechanism such as organic anions may be involved in P mobilization. Indeed, such anions like oxalate can solubilize P according to the following equation:



Alternatively, the supply of P from the nutrient solution to soil solution might have been large enough to dominate changes in solution composition due to rhizosphere acidification.

In conclusion, the results of this work show that for cowpea (i) the H<sup>+</sup> efflux is greater in the rhizosphere of the most P-efficient genotype, though it is not stimulated by the later; (ii) the P external requirements for nodulation in cowpea are lower than for other

legume species under similar hydroaerobic culture, although it remains larger than for shoot and root growths. Further work is needed to optimize the hydroaerobic nutrient solution for cowpea and to adapt the rhizotron device to the large tap-root, in order to explore the relationships between H<sup>+</sup> efflux, nodule respiration and P solubilization in cowpea rhizosphere with a larger collection of contrasting genotypes.

### Acknowledgements

This work was supported by the Grain Legume Integrated Project of the European Union. Cowpea genotype seeds were kindly provided by Dr. Bir Singh, IITA, Kano, Nigeria, Jean-Charles Evrard, CIRAD, Montpellier, France and Ousmane Ndoye, ISRA, St. Louis, Senegal.

### References

- Ankomah, A.B., Zapata, F., Danso, S.K., Axmann, H., 1995. Cowpea varietal difference in uptake of phosphorus from Gafsa phosphate rock in a low-P ultisol. *Fertilizer Research* 41, 219–225.
- Aydi, S., Drevon, J.J., Abdelly, C., 2004. Effect of salinity on root-nodule conductance to oxygen diffusion in *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 833–840.
- Bado B.V., 2002. Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada. 210p.
- Beck, D.D., Munns, D., 1984. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 415–421.
- Conyers, M.K., Uren, N.C., Helyar, K.R., 1995. Causes of changes in pH in acidic mineral soils. *Soil Biology & Biochemistry* 27, 1383–1392.
- De Souza, A.A., Burity, H.A., Figueiredo, M.D.V., Da Silva, M.L.R.B., Melotto, M., Muitsai, S., 1999. Eficiência simbiótica de estirpes HUP+, Huphr E Hupde *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* em cultivares de caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34, 1925–1931.
- Drevon, J.J., Kalia, V.C., Heckmann, M.O., Pédalhore, P., 1988. In situ open-flow assay of soybean root nodular acetylene reduction activity: influence of acetylene and oxygen. *Plant Physiology and Biochemistry* 26, 73–78.
- Ehlers, J.D., Hall, A.E., 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 53, 187–204.
- Fall, L., Diouf, D., Fall-Ndiaye, M., Badiane, F.A., Gueye, M., 2003. Diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes determined by ARA and RAPD techniques. *African Journal of Biochemistry* 2, 48–50.
- FAO–UNESCO, 1989. *Soil Map of the World at 1:5 000 000*, second ed. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- FAO, 2001. Cowpea Processing Project 685-0281. USAID, Dakar, 140 pp.
- Gómez, L., Vadez, V., Hernández, G., Sánchez, T., 2002. Evaluación de la tolerancia al estrés de fósforo en caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en Cuba. I. Cultivo en Solución Nutritiva. *Agronomía Mesoamericana* 13, 59–65.
- Hernández, G., Drevon, J.J., 1991. Influence of oxygen and acetylene during *in situ* open-flow assay of nitrogen activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) in *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Journal of Plant Physiology* 38, 587–590.
- Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes – a review. *Plant and Soil* 13, 173–195.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their response to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248, 48–59.
- Hinsinger, P., Gilkes, R.J., 1997. Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma* 75, 231–249.
- Israel, D.W., 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology* 84, 835.
- Jebara, M., Aouani, M.E., Payré, H., Drevon, J.J., 2004. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under phosphorus sub-deficiency. *Journal of Plant Physiology* 162, 309–315.
- Jebara, M., Drevon, J.J., 2001. Genotypic variation in nodule conductance to oxygen diffusion in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie* 21, 667–674.
- Jemo, M., Abaidoo, R.C., Nolte, C., Horst, W.J., 2006. Genotypic variation for phosphorus uptake and dinitrogen fixation in cowpea on low-phosphorus soils of southern Cameroon. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169, 816–825.
- Kolawole, G., Tian Guang, L., Singh, B.B., 2000. Differential response of cowpea lines to aluminium and phosphorus application. *Journal of Plant Nutrition* 23, 731–740.
- Krasilnikoff, G., Gahoonia, T., Nielsen, N., 2003. Variation in phosphorus uptake efficiency by genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata*) due to differences in root hair length and induced rhizosphere processes. *Plant and Soil* 251, 83–91.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., 2001. *Principles of Plant Nutrition*, fifth ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 849 pp.
- Neumann, G., Römheld, V., 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211, 121–130.
- Ogbonnaya, C., Sarr, B., Brou, C., Diouf, O., Roy-Macauley, H., 2003. Selection of cowpea genotypes in hydroponics, pots and fields for drought tolerance. *Crop Science* 43, 1114–1120.
- Qiao, Y.F., Tang, C., Han, X.Z., Miao, S.J., 2007. Phosphorus deficiency delays the onset of nodule function in soybean (*Glycine max* Murr.). *Journal of Plant Nutrition* 30, 1341–1353.
- Rajput, A.L., Singh, T.P., 1996. Response of nitrogen and phosphorus with and without *Rhizobium* inoculation on fodder production of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Indian Journal of Agronomy* 41, 91–94.
- Ribet, J., Drevon, J.J., 1995. Increase in permeability to oxygen diffusion and oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiologia Plantarum* 94, 298–304.
- Ribet, J., Drevon, J.J., 1996. The phosphorus requirement of N<sub>2</sub>-fixation and urea-fed *Acacia mangium*. *New Phytologist* 132, 383–390.
- Robson, A.D., O'Hara, G.W., Abbott, L.K., 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* 8, 427–436.
- Salsac, L., Drevon, J.J., Zengbe, M., Cleyet-Marel, J.C., Obaton, M., 1984. Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physiologie Végétale* 22, 509–521.
- Sanginga, N., 2003. Role of biological nitrogen fixation in legume based cropping systems; a case study of West Africa farming systems. *Plant and Soil* 252, 25–39.
- Sanginga, N., Lyasso, O., Singh, B.B., 2000. Phosphorus use efficiency and nitrogen balance of cowpea breeding lines in low phosphorus soil of the derived savanna zone in West Africa. *Plant and Soil* 220, 119–128.
- Sarr, B., Diouf, O., Diouf, M., Macauley, R., Brou, C., 2001. Utilisation de paramètres agronomiques comme critères de résistances à la sécheresse chez trois variétés de niébé cultivées au Sénégal et au Niger. *Sécheresse* 12, 259–266.
- Schulze, J., Drevon, J.J., 2005. P-deficiency increases the O<sub>2</sub> uptake per N<sub>2</sub> reduced in alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 56, 1779–1784.
- Summerfield, R., Huxley, P., Steele, W., 1974. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 27, 301–312. Abstract.
- Tang, C., Hinsinger, P., Jaillard, B., Rengel, Z., Drevon, J.J., 2001a. Effect of phosphorus sub-deficiency on growth, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and proton efflux by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21, 683–689.
- Tang, C., Hinsinger, P., Drevon, J.J., Jaillard, B., 2001b. Phosphorus sub-deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton efflux in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals of Botany* 88, 131–138.
- Tang, C., Drevon, J.J., Jaillard, B., Souche, G., Hinsinger, P., 2004. Proton efflux of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by nitrogen nutrition and phosphorus sub-deficiency. *Plant and Soil* 260, 59–68.
- Tang, C., Qiao, Y.F., Han, X.Z., Zheng, S.J., 2007. Genotypic variation in phosphorus utilization of soybean (*Glycine max* (L.) Murr.) grown in various sparingly soluble P sources. *Australian Journal of Agricultural Research* 58, 443–451.
- Vadez, V., Rodier, F., Payré, H., Drevon, J.J., 1996. Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase – linked respiration in bean lines varying in tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 34, 871–878.
- Vadez, V., Lasso, J., Beck, D., Drevon, J.J., 1999. Variability of N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P sub-deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica* 106, 231–242.
- Vance, C., 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition, plant nutrition in world of declining renewable resources. *Plant Physiology* 127, 390–397.
- Vincent, J.M., 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*. I.B.P. Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd, Oxford.
- Zablutowicz, M., Focht, D.D., 1981. Physiological characteristics of cowpea *Rhizobium*: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 679–685.

## Résumé

La connaissance des cycles biogéochimiques dans les écosystèmes, et celle des processus biologiques responsables de la mobilité des éléments dans les sols reste encore aujourd'hui un challenge. Un certain nombre de travaux montrent bien le rôle important des plantes sur l'altération des minéraux et la mobilisation des éléments dans l'environnement. Cependant, l'identification et la quantification des mécanismes biologiques à l'origine de la dynamique du cycle des éléments restent encore à améliorer. A l'échelle globale, ou même à celle, plus petite, d'un bassin versant, l'impact des plantes sur les flux d'éléments dissous transportés par les rivières demeure difficile à quantifier. L'objectif de cette thèse était de développer, puis d'exploiter un nouveau traceur isotopique pour permettre une identification plus précise des phases minérales altérées et des processus biologiques impliqués. Parmi les éléments dont on peut, depuis peu, caractériser la signature isotopique de façon précise, le magnésium (Mg) a été choisi (1) en raison de son lien avec le cycle du carbone, et (2) parce qu'il représente un macroélément essentiel pour les organismes vivants : il est particulièrement très important pour la croissance des plantes. Ainsi, la dynamique du cycle du magnésium va dépendre des mécanismes biologiques et physico-chimiques mis en œuvre pour le mobiliser ou l'assimiler. La première partie de cette thèse a été consacrée au développement d'un protocole chimique et analytique pour l'analyse des isotopes du Mg, dans une large gamme d'échantillons. Ce protocole a été validé par la mesure des compositions isotopiques en Mg de divers matériaux de références incluant des roches typiques de la croûte continentale, des plantes et des eaux. Il a ensuite été appliqué à l'étude du rôle de la végétation sur le cycle biogéochimique du Mg. Une première étude a permis de quantifier les fractionnements isotopiques du Mg lors de la croissance en conditions contrôlées de plantes réalisée avec deux espèces végétales et deux sources de Mg différentes (disponible (en solution) ou peu (dans la structure de minéraux)). Les deux espèces de plantes sont systématiquement enrichies en isotopes lourds par rapport aux sources de nutriments. Au sein de la plante, les isotopes légers migrent préférentiellement depuis les racines vers les feuilles. Ce fractionnement, lors de la translocation du Mg à l'intérieur de la plante, semble d'autant plus fort que la source est pauvre en Mg, suggérant un rôle clé du milieu de croissance. Pour la première fois, des analyses isotopiques en Mg de plantes naturelles sont réalisées, et affichent une gamme non significativement distincte de celle des roches et eaux de la croûte continentale. Une étude menée sur un petit bassin versant silicaté vosgien (Nord-Est de la France) démontre que la composition isotopique en Mg des végétaux de la strate herbacée ou de jeunes épicéas s'explique par les mêmes fractionnements isotopiques que ceux identifiés expérimentalement. Pendant la saison de végétation, la composition isotopique du Mg des solutions de sol dans les horizons de surface n'est pas le résultat d'un simple mélange et s'explique par le rôle essentiel du prélèvement et du recyclage biologique. La composition isotopique du ruisseau fluctue avec le débit. Elle est alimentée, soit par les eaux de ruissellement, soit par des eaux ayant un trajet plus long reflétant les interactions eau-roche en profondeur, et qui masquent, sur ce site d'étude, l'effet de la végétation observé dans les horizons supérieurs du sol. L'ensemble de ces études démontre l'intérêt d'exploiter ce nouveau traceur isotopique à l'échelle d'un sol ou d'un écosystème, mais met également en évidence ses limites à plus grande échelle.

**Mots clé :** Magnésium, Isotopes, Fractionnement isotopique, Plantes, Sols, Cycle biogéochimique, Grès

## Abstract

The knowledge of biogeochemical cycles in ecosystems and the biological processes responsible for the mobility of elements in soil is still a challenge. Some studies show the important role of plants on mineral weathering and mobilization of elements in the environment. However, identification and quantification of biological mechanisms behind the dynamics of the elements are still improving. On a global scale, or even a smaller scale such as a watershed, the impact of plants on dissolved elements carried by rivers is difficult to quantify. Therefore, the objective of this thesis was to develop and use a new isotopic tracer to allow more precise identification of altered mineral phases and biological processes involved. Among the elements for which it is now possible to characterize accurately the isotopic signatures, magnesium (Mg) has been chosen (1) because of its link with the carbon cycle, and (2) because it represents a macronutrient essential for living organisms: it is particularly important for plant growth. Thus, the dynamics of Mg will depend on the biological and physico-chemical mechanisms implemented to its mobilization and/or assimilation. The first part of this thesis has been devoted to the development of a protocol for chemical and analytical analysis of Mg isotopes in a wide range of samples. This protocol was validated by measuring the Mg isotope compositions of various reference materials including typical continental crust rocks, plants and waters. It was then applied to study the role of vegetation in the biogeochemical cycling of Mg. A first study was carried out under controlled conditions to quantify the Mg isotope fractionation during plant growth, using two plant species and two different sources of Mg (directly available for plant nutrition (in solution) or not (in the structure of minerals)). Both plant species are systematically enriched in heavy isotopes relative to Mg initial sources. Within the plant, the light isotopes preferentially migrate from roots to leaves. This fractionation during the translocation of Mg within the plant seems even stronger the source is poor in Mg, suggesting a key role in the growth environment. For the first time, Mg isotope compositions of natural plants were analyzed, and show a range not significantly different from that of the continental rocks and silicate rivers. A study conducted on a small silicate watershed in Vosges (Northeast of France) shows that the Mg isotope compositions of the herbaceous plant or young spruce reflects the same sense of fractionation than those identified experimentally. During the growing season, the Mg isotopic composition of soil solutions in the surface horizons cannot be explained by a simple mixture and reflect the essential role of Mg uptake by plant and biological recycling *via* litter degradation. The isotope composition of Mg of the stream varies with the discharge. The streamwater results from either soil surface runoff or water, with a long residence time in the saprolith reflecting water-rock, precipitation-dissolution, interactions. All these studies demonstrate the interest to exploit this new tracer isotope at a soil or ecosystem scale, but also highlight its limits on a larger (continental) scale.

**Keywords** : Magnesium, isotopes, fractionation, plants, soils, biogeochemical cycles, Sandstone