



**HAL**  
open science

# Quantification de l'effet des racines d'arbres et des microorganismes associés sur l'altération des minéraux de sols forestiers : observations en forêt et expérimentations

Christophe Calvaruso

► **To cite this version:**

Christophe Calvaruso. Quantification de l'effet des racines d'arbres et des microorganismes associés sur l'altération des minéraux de sols forestiers : observations en forêt et expérimentations. Science des sols. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10129 . tel-01754308

**HAL Id: tel-01754308**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754308>**

Submitted on 30 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)

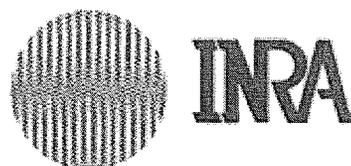
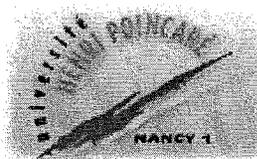
## LIENS

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>



U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement  
Département de Formation Doctorale des Géosciences

Laboratoire de Biogéochimie des  
Ecosystèmes Forestiers (BEF-INRA),  
UR 1138, Centre de Recherche Forestière,  
54280 Champenoux (France)

SCD UHP NANCY 1  
Bibliothèque des Sciences  
Rue du Jardin Botanique - CS 20148  
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I**

en Géosciences

par **Christophe Calvaruso**

**Quantification de l'effet des racines d'arbres et des microorganismes  
associés sur l'altération des minéraux de sols forestiers :  
observations en forêt et expérimentations**

Soutenance publique le 13 novembre 2006

### Membres du jury :

Mr Jacques Berthelin  
Directeur de Recherche au CNRS-UHP, Nancy I  
Mr Michel Aragno  
Professeur à l'Université de Neuchâtel, Suisse.  
Mr Philippe Hinsinger  
Directeur de Recherches à l'INRA de Montpellier  
Mr George Gobran  
Professeur à l'Université du Luxembourg  
Mme Elisabeth Leclerc-Cessac  
Andra, Châtenay-Malabry  
Mr Jacques Ranger  
Directeur de Recherches à l'INRA de Nancy  
Mme Pascale Frey-Klett  
Chargée de recherches à l'INRA de Nancy  
Mme Marie-Pierre Turpault  
Chargée de Recherches à l'INRA de Nancy

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Encadrant  
Encadrant

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Marie-Pierre Turpault, Pascale Frey-Klett et Jacques Ranger pour la qualité et la complémentarité de leur encadrement. Ils ont toujours été disponibles pour me guider tout au long de cette thèse. J'ai appris énormément à leur contact. Je remercie également Stéphane Uroz qui est arrivé en cours d'aventure et qui m'a apporté une petite partie de ses connaissances et a participé à faire progresser ce travail.

Je tiens à remercier l'Andra et tout particulièrement Elisabeth Leclerc-Cessac ainsi que la région Lorraine sans qui cette thèse n'aurait pu se faire.

Je remercie Jean Garbaye et Francis Martin pour la relecture des articles et pour leurs conseils avisés.

Je voudrais également remercier toutes les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer durant ma thèse. Car c'est une chance de travailler à l'INRA de Champenoux. Au contact de gens toujours prêts à rendre service. N'est-ce pas Louissette ? J'espère pouvoir retrouver une telle convivialité et une telle complicité dans le futur. Merci encore à tous : Louissette, Dodo, Gilles, Claude, Carine, Nicolas, Jérôme, Pierre-Emmanuel, Béatrice, Arnaud, Louis, Theodora, Jacqueline, Dominique V., Etienne, Frédéric Gé., Frédéric Gu., Ann-Gret, Nathalie, Christophe R., Christophe N., Vanessa C., Emmanuel, Bernd, Pascal, Isabelle, Aurélie, Sèverine, Serge, Cécile, Christine, Jean-Louis, Patrice, Marc, Daniel, Sébastien.

J'ai passé quatre superbes années dans cet institut.

Bisous à toute ma famille qui m'a encouragé tout au long de cette thèse : maman, papa, Sandra, Vincent, Jean-François et bien sûr Krista, Flora et Luca.

Enfin, je tiens à remercier Michel Aragno et Philippe Hinsinger qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que les membres du jury : Elisabeth Leclerc-Cessac, Jacques Berthelin, Georges Gobran.

## Table des matières

Index des figures

Index des tableaux

Index des annexes

<b>PREAMBULE</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>2</b>
<hr/>	
<b>1. LE CONTEXTE DE NOS RECHERCHES : la disponibilité des éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Le cycle biogéochimique des éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Les minéraux du sol comme réserve de nutriments et le flux d'altération comme moteur de la disponibilité de ces nutriments.</b>	<b>3</b>
<b>2. LE FLUX D'ALTERATION ISSU DES RESERVES MINERALES DU SOL : un processus générateur de nutriments essentiels pour la croissance des plantes sous dépendance des racines et des microorganismes associés</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Les différents réactions d'altération</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Les processus biologiques d'altération des minéraux.</b>	<b>7</b>
2.2.1 <i>Désagrégation physique</i>	7
2.2.2 <i>Stabilité structurale du sol</i>	8
2.2.3 <i>Absorption de nutriments et échange d'ions</i>	8
2.2.4 <i>Production d'agents altérants</i>	9
2.2.5 <i>Production d'agents oxydants et réducteurs et réactions enzymatiques</i>	12
<b>3. LA RHIZOSPHERE : un environnement particulier et un lieu d'interactions privilégiées entre les racines, le sol et les microorganismes</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Historique et définitions</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Impact de la racine sur son environnement : l'effet rhizosphère</b>	<b>14</b>
3.2.1 <i>Caractéristiques physico-chimiques de la rhizosphère</i>	14
3.2.2 <i>Caractéristiques microbiologiques de la rhizosphère</i>	15
<b>3.3 Variabilité spatio-temporelle de la rhizosphère</b>	<b>17</b>

<b>3.4 Les interactions bénéfiques pour la santé et la croissance de la plante au sein de la rhizosphère</b>	<b>18</b>
3.4.1 <i>Les microorganismes promoteurs de la croissance des plantes (PGPM, Plant Growth Promoting Microorganisms)</i>	18
3.4.2 <i>L'interaction plante - champignon mycorhizien</i>	19
3.4.3 <i>Les interactions microorganismes – microorganismes</i>	20
<b>4. OBJECTIFS DE LA THESE ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE</b>	<b>22</b>
<b>CHAPITRE II : IMPACT DE LA RHIZOSPHERE D'ARBRES SUR L'ALTERATION DES MINERAUX EN FORET</b>	<b>24</b>
<hr/>	
<b>1. CONTEXTE ET OBJECTIFS</b>	<b>24</b>
<b>2. ETUDES ET EXPERIMENTATIONS MISES EN ŒUVRE</b>	<b>25</b>
<b>3. RESULTATS</b>	<b>25</b>
3.1 <b>Propriétés physico-chimiques du sol global et de la rhizosphère d'arbres (site de Bure)</b>	<b>25</b>
3.2 <b>Etude en forêt : évolution des minéraux dans le sol global et la rhizosphère d'arbres (site de Breuil)</b>	<b>29</b>
<i>Article : Rapid clay weathering in the rhizosphere of different tree species in an acid forest ecosystem.</i>	30
3.3 <b>Quantification de l'altération de minéraux-tests dans le sol global et la rhizosphère d'arbres (site de Fougères)</b>	<b>43</b>
<b>4. SYNTHÈSE ET DISCUSSION</b>	<b>50</b>

**CHAPITRE III : STRUCTURATION FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES SOLS FORESTIERS EN RELATION AVEC L'ALTERATION DES MINERAUX** 53

---

**1. CONTEXTE ET OBJECTIFS** 53

**2. BIOTESTS *IN VITRO*** 53

**3. RESULTATS** 55

**3.1 Effet de la mycorrhizosphère sur la structuration fonctionnelle des communautés microbiennes du sol en relation avec leur capacité à mobiliser des éléments minéraux *in vitro*.** 55

*Article* : Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization process. 56

**3.2 Effet de la mycorrhizosphère sur la diversité génotypique et métabolique des communautés bactériennes du sol en relation avec leur capacité à altérer un minéral-test *in vitro*** 71

*Article* : Mycorrhizosphere effect on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. 72

**3.3 Effet de différentes essences forestières sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes du sol en relation avec leur capacité à altérer un minéral-test *in vitro*.** 88

*Article* : Forest trees select high mineral weathering bacteria to balance low nutrient availability 89

**4. SYNTHESE ET DISCUSSION** 95

<b>CHAPITRE IV : QUANTIFICATION DE LA PART RESPECTIVE DES DIFFERENTS PARTENAIRES BIOLOGIQUES DE LA RHIZOSPHERE DANS LE PROCESSUS D'ALTERATION DES MINERAUX : EXPERIENCES EN COLONNES</b>	<b>99</b>
<hr/>	
<b>1. CONTEXTE ET OBJECTIFS</b>	<b>99</b>
<b>2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL EN COLONNES</b>	<b>99</b>
<b>3. RESULTATS</b>	<b>104</b>
<b>3.1 Quantification du processus d'altération au cours de l'interaction biotite - microorganismes – solution</b>	<b>104</b>
<b>3.2 Quantification du processus d'altération au cours de l'interaction biotite - arbre forestier - bactéries – solution</b>	<b>108</b>
<i>Article : Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis.</i>	<b>109</b>
<b>3.3 Quantification du processus d'altération au cours de l'interaction biotite - arbre forestier - microorganismes – solution</b>	<b>126</b>
<b>4. SYNTHESE ET DISCUSSION</b>	<b>132</b>
<b>CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE</b>	<b>137</b>
<hr/>	
<b>1. SYNTHESE DES RESULTATS</b>	<b>138</b>
<b>2. ROLE MAJEUR DE LA RHIZOPHERE D'ARBRES FORESTIERS DANS LE PROCESSUS D'ALTERATION DES MINERAUX DU SOL</b>	<b>140</b>
<b>3. LES ARBRES INTERAGISSENT AVEC LEUR ENVIRONNEMENT : UNE QUESTION DE SURVIE</b>	<b>141</b>
<b>4. LA SYMBIOSE ECTOMYCORHIZIENNE COMME MOTEUR DE LA STRUCTURATION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DANS LES SOLS FORESTIERS</b>	<b>142</b>

<b>5. LA DISPONIBILITE DES ELEMENTS MINERAUX CONTROLERAIT L'ACTIVITE RHIZOSPHERIQUE DANS LES ECOSYSTEMES FORESTIERS</b>	<b>143</b>
<b>6. LA COMPLEMENTARITE FONCTIONNELLE PLANTE - MICROORGANISMES : UNE STRATEGIE NUTRITIONNELLE POUR LES ARBRES FORESTIERS</b>	<b>144</b>
<b>7. PLASTICITE ET DURABILITE DE L'ECOSYSTEME FORESTIER : LA BIODIVERSITE MICROBIENNE COMME FACTEUR-CLE</b>	<b>145</b>
<b>8. APPORTS DE CES ETUDES DANS LE CONTEXTE D'UN STOCKAGE A LONG TERME DE DECHETS RADIOACTIFS DANS DES SOLS FORESTIERS</b>	<b>144</b>
<b>9. PERSPECTIVES</b>	<b>147</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>152</b>

## Index des figures

- Figure P.1 :** Contribution de la rhizosphère d'arbres forestiers dans le processus dans le processus d'altération des minéraux du sol **Face p1**
- Figure I.1 :** Les principaux flux d'éléments nutritifs dans les écosystèmes forestiers tempérés. **Face p2**
- Figure I.2 :** Photo de filaments mycéliens de *Scleroderma citrinum* autour de particules de biotite. **Face p8**
- Figure I.3 :** Structures chimiques de différents acides organiques. **Face p11**
- Figure I.4 :** Représentation schématique des différents objectifs de cette étude. **Face p22**
- Figure II.1 :** Concentration en protons (A) et en potassium (B) dans le sol global et la rhizosphère d'un site forestier proche de Bure. **Face p27**
- Figure II.2 :** Modèle conceptuel, à compartiments et à flux, de la dynamique d'un élément minéral dans un sol forestier. **Face p28**
- Figure II.3 :** Représentation schématique de la dynamique du potassium dans un sol forestier. **Face p29**
- Figure II.4 :** Differences between the concentrations of an element in the rhizosphere and in the bulk soil clays in the forest site of Breuil. **Face p37**
- Figure II.5 :** Percentage of elements lost in the rhizosphere of the surface horizon calculated by the method of isoelement chemical weathering balance. **Face p38**
- Figure II.6 :** XRD patterns of Ca saturated oriented bulk clays (B) in layer 1: (i) without pre-treatment (B, Ca), (ii) ethylene glycol solvated (B, Ca, EG), and ethylene glycol solvated and pre-treated citrate (B, Ci, Ca, EG). **Face p38**
- Figure II.7 :** XRD patterns of Ca saturated oriented clay from oak rhizosphere (R, Ca) and bulk soil (B, Ca) in layer 1. **Face p39**
- Figure II.8 :** XRD patterns of Ca saturated oriented clay in layer 1 from Norway spruce bulk soil. **Face p39**
- Figure II.9 :** Relationship between  $\text{SiO}_{2\text{total}}$  and  $\text{Al}_2\text{O}_{3\text{total}}$  in the clay fraction of rhizosphere and bulk soil for Oak and Norway spruce sampled at three depths in the forest site of Breuil. **Face p42**

- Figure II.10** : Représentation schématique du dispositif d'exclusion des racines utilisé sur le site de Fougères. **Face p45**
- Figure II.11** : Photo de la mise en place d'un sachet de minéral-test dans le sol du site de Fougères. **Face p45**
- Figure II.12** : Photos réalisées en microscopie électronique à balayage, de grains d'apatite et de plagioclase après quatre années d'incubation dans le sol du site de Fougères, en présence ou en absence de racines **Face p46**
- Figure II.13** : Nombre de figures de dissolution et d'hyphes observés par microscopie électronique à balayage (x80) sur les surfaces des grains d'apatite dans les traitements témoin et fertilisé après quatre années d'incubation dans le sol du site de Fougères. **Face p47**
- Figure II.14** : Pourcentage de dissolution de l'apatite et du labrador dans les traitements contrôle et fertilisé, et avec et sans racines, après quatre années d'incubation dans le sol du site de Fougères. **Face p47**
- Figure II.15** : Schéma de synthèse résumant le niveau de l'altération des argiles dans le site forestier de Breuil et l'altération de minéraux-tests dans le site forestier de Fougères. **Face p51**
- Figure III.1** : Stratégies d'échantillonnage des souches bactériennes et fongiques sur le site forestier de Breuil. **Face p53**
- Figure III.2** : Photo d'une racine de chêne mycorhizée par le champignon ectomycorhizien *Scleroderma citrinum*. **Face p54**
- Figure III.3** : Photos des tests semi-quantitatifs *in vitro* de mobilisation du fer et du phosphore par les microorganismes. **Face p54**
- Figure III.4a** : Dispositif de micro-incubation en microplaques filtrantes utilisé pour caractériser le potentiel d'altération de souches bactériennes. **Face p54**
- Figure III.4b** : Photo d'une plaque de révélation des résultats du test *in vitro* en microplaque de mobilisation du fer et d'acidification du milieu par l'activité microbienne. **Face p54**
- Figure III.5** : Relationship between the mean values of the discolouration diameters of CAS and TCP media and the mobilization efficacies for the bacterial and fungal strains isolated in the soil of the Breuil forest site. **Face p64**
- Figure III.6** : Distribution of the bacterial isolates according to their compartment of origin and the intensity of their discolouring effect on the CAS and/or TCP media. **Après p64**

- Figure III.7 :** Effect of the soil horizon and the compartment of origin of the bacterial and fungal isolates on the discolouration diameters on CAS medium and on TCP medium. **Face p65**
- Figure III.8 :** Relationship between the mean values of iron released from the biotite, the mean values of pH and the three compartments of origin of the bacterial isolates: PN (Bulk soil), PML (mycorrhizosphere) and PMB (mycorrhiza). **Face p79**
- Figure III.9 :** Projection of the 61 bacterial isolates in function of their individual biotite weathering potential. **Face p79**
- Figure III.10 :** Distribution of the 61 bacterial isolates according to their zone of origin (bulk soil; mycorrhizosphere and mycorrhiza) and their biotite weathering efficacy in three weathering classes **Après p79**
- Figure III.11 :** Phylogenetic tree constructed with the neighbor-joining method showing the relationship between the 61 bacterial isolates of the present study and reference strains from the literature, based on PCR-sequencing of a portion of the 16S rRNA gene (pA-pH primers). **Face p80**
- Figure III.12 :** Influence of the carbon source on the biotite weathering potential. **Face p81**
- Figure III.13 :** Projection of the 61 isolates on the plane defined by the first two principal components. The classification of the isolates into three homogeneous metabolic groups named A, B and C was achieved using the K-means method. **Face p82**
- Figure III.14 :** Component principal analysis of the metabolic profiles of the 61 bacterial isolates. Projection of the 95 carbon substrates from the Biolog GN microplates on the plane defined by the first two principal components. **Face p82**
- Figure III.15 :** Iron and proton concentrations issue from biotite weathering generated by bacterial activity in function of their original compartment under oak II, beech II and Norway spruce II. **Face p92**
- Figure III.16 :** Projection of the bacterial isolates in function of their individual biotite weathering potential. **Face p92**
- Figure III.17 :** Iron and proton concentration issue from biotite weathering in the solution, generated by bacterial activity in function of their original compartment under oak I and oak II. **Face p93**

- Figure III.18** : Schéma de synthèse représentant la structuration des communautés bactériennes isolées du sol du site de forestier de Breuil sous les différentes essences d'arbres testées. **Face p96**
- Figure III.19** : Schéma de synthèse représentant les différences de comportement des racines ectomycorhizées d'arbres forestiers dans la mobilisation des éléments par altération de la phase minérale. **Face p97**
- Figure IV.1** : Photo du dispositif expérimental en colonnes. **Face p99**
- Figure IV.2** : Calcul du bilan d'altération pour des éléments comme le potassium et le magnésium. **Face p102**
- Figure IV.3** : Compartiment d'origine des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) et des souches fongiques PN4(3) et PML2(10). **Face p104**
- Figure IV.4** : Localisation des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) dans le diagramme fer/pH établi à partir des résultats obtenus lors du test en microplaques de l'ensemble des souches bactériennes de la collection réalisée sous le peuplement de chêne en 2001. **Face p104**
- Figure IV.5** : Logarithme des densités de bactéries cultivables mesurées après 21 jours d'expérimentation dans le substrat des colonnes. **Face p105**
- Figure IV.6** : Evolution du pH de la solution percolée au cours du temps pour les différents traitements bactériens et fongiques alimentés en solution nutritive avec glucose et sans glucose. **Après p105**
- Figure IV.7** : Quantités totales de fer (A) et de potassium (B) libérées en solution après 21 jours d'expérimentation. **Face p106**
- Figure IV.8** : Mass-balance of potassium (A) and magnesium (B) released into leaching solution (grey) and taken up by plants (black). **Face p119**
- Figure IV.9** : SEM photography of biotite surfaces without plant and bacteria (A) and with plant inoculated with the bacterial strain PML1(12) (B and C). **Après p119**
- Figure IV.10** : Relation between the magnesium and the potassium quantities leached into the solution and taken up by plants, i.e. mobilised in the biotite. **Face p120**
- Figure IV.11** : Increase of the root (black) and total plant (grey) biomass during the 76 days of the growth chamber experiment in the different treatments. **Face p120**

- Figure IV.12** : Low vacuum SEM photography of a non-inoculated root (A) and a root inoculated with the bacterial strain PML1(12), which presents many root hairs (B). **Après p120**
- Figure IV.13** : Growth of the plants during the 102 days of the greenhouse experiment in the different treatments. **Après p120**
- Figure IV.14** : Augmentation de la biomasse sèche des plants de pin durant l'expérience en colonnes. **Après p127**
- Figure IV.15** : Quantité de potassium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant l'expérience en colonnes. **Face p128**
- Figure IV.16** : Pourcentage de potassium immobilisé par les plants de pin (= quantité de potassium immobilisée par le plant de pin / (quantité de potassium drainée en solution + quantité de potassium immobilisée par le plant de pin)) durant l'expérience en colonnes. **Face p128**
- Figure IV.17** : Augmentation de la biomasse sèche des plants de pin durant l'expérience en colonnes. **Après p128**
- Figure IV.18** : Logarithme des densités de la microflore bactérienne cultivable totale après 56 d'expérimentation. **Après p128**
- Figure IV.19** : Quantité de potassium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant l'expérience en colonnes. **Après p128**
- Figure IV.20** : Pourcentage de potassium immobilisé par les plants de pin (= quantité de potassium immobilisée par le plant de pin / (quantité de potassium drainée en solution + quantité de potassium immobilisée par le plant de pin)) durant l'expérience en colonnes. **Après p128**
- Figure IV.21** : Quantité de césium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant l'expérience en colonnes. **Face p129**
- Figure IV.22** : Quantité de césium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant l'expérience en colonnes. **Après p129**
- Figure IV.23** : Schéma de synthèse résumant tous les effets observés dans les expérimentations en colonne utilisant la biotite comme minéral-test. **Face p132**

**Figure IV.24** : Schéma de synthèse résumant les effets observés dans l'expérience en colonnes lors de l'ajout de composés toxiques comme l'uranium et le cadmium dans la solution nutritive.

**Face p136**

## **Index des tableaux**

- Tableau I.1** : Composition chimique des principaux minéraux présents dans le sol du site forestier de Vauxrenard (Beaujolais). **Face p3**
- Tableau II.1** : Physicochemical characteristics of the soil in the experimental forest site of Breuil (central France) **Face p34**
- Tableau II.2** : Root densities and pH in the rhizosphere (R) and bulk soil (B) at three depths (0 to 3 cm, 3 to 10 cm and 10 to 23 cm) and for the two species (Norway spruce and oak). **Face p36**
- Tableau II.3** : Results of total analysis in the bulk and rhizosphere soil clays of the forest site of Breuil. **Face p37**
- Tableau II.4** : Tableau récapitulatif des principaux artefacts liés à l'utilisation de la méthode des minéraux-test dans un sol forestier. **Face p50**
- Tableau III.1** : Tableau récapitulatif des effectifs de souches bactériennes et fongiques isolées dans le sol du site de Breuil. **Face p53**
- Tableau III.2** : Physicochemical characteristics of the bulk and rhizosphere soils from the oak stand in the experimental forest site of Breuil (central France) **Face p59**
- Tableau III.3** : Origin of the Breuil collections of bacterial and fungal isolates. **Face p60**
- Tableau III.4** : pH in the horizon 3 to 10 cm in the bulk and rhizosphere soil under oak and Norway spruce in the site of Breuil. **Face p93**
- Tableau IV.1** : Les paramètres des différentes expériences d'interactions réalisées à l'aide du dispositif expérimental en colonnes. **Face p100**
- Tableau IV.2** : Résumé des analyses effectuées lors des différentes expériences d'interactions réalisées à l'aide du dispositif expérimental en colonnes. **Face p102**
- Tableau IV.3** : Différents traitements de l'expérience d'interactions microorganismes – minéral – solution. **Face p105**
- Tableau IV.4** : Quantités de fer et de potassium dans la solution percolée et pH de la solution percolée dans les traitements avec et sans glucose. **Après p105**

<b>Tableau IV.5</b> : Capacity of the three bacterial strains selected for the column experiments to mobilise iron and phosphorus in three <i>in vitro</i> tests.	<b>Face p113</b>
<b>Tableau IV.6</b> : Molecular identification of the three bacterial strains.	<b>Face p113</b>
<b>Tableau IV.7</b> : Semi-quantitative estimation of the number of lateral roots and the number of root hairs in the different treatments according to binocular microscopy observations.	<b>Après p120</b>
<b>Tableau IV.8</b> : Traitements de l'expérience d'interactions arbres forestiers - microorganismes – minéral – solution.	<b>Face p127</b>
<b>Tableau IV.9</b> : Taux de mycorhization des racines courtes de plants de pin en début et en fin d'expérience.	<b>Face p127</b>
<b>Tableau IV.10</b> : Augmentation de biomasse sèche des parties aériennes et racinaires des plants de pin en fonction du traitement biologique.	<b>Après p127</b>
<b>Tableau IV.11</b> : Augmentation de biomasse sèche des parties aériennes et racinaires des plants de pin en fonction du traitement chimique.	<b>Après p128</b>
<b>Tableau IV.12</b> : Pourcentage de césium immobilisé par les plants de pin.	<b>Face p129</b>

## **Index des annexes**

**Annexe 1** : Article: Altération microbienne des minéraux, Biofutur (2006).

**Annexe 2** : Le site-atelier de Breuil (Morvan).

**Annexe 3** : Protocole d'analyses des fractions argileuses du site de Breuil.

**Annexe 4** : Synthèse des méthodes d'extraction sélectives utilisées pour l'étude des sols global et rhizosphérique des sites forestiers de Bure et de Breuil.

**Annexe 5** : Composition des milieux de culture utilisés dans les différentes expérimentations.

**Annexe 6** : Protocole d'échantillonnage des mycorhizes *S. citrinum* et du sol global.

**Annexe 7** : Protocoles de préparation des inocula bactériens et fongiques pour les biotests *in vitro* et les expérimentations en colonnes.

**Annexe 8** : Expérience d'interactions champignon – phlogopite en boîtes de Petri.

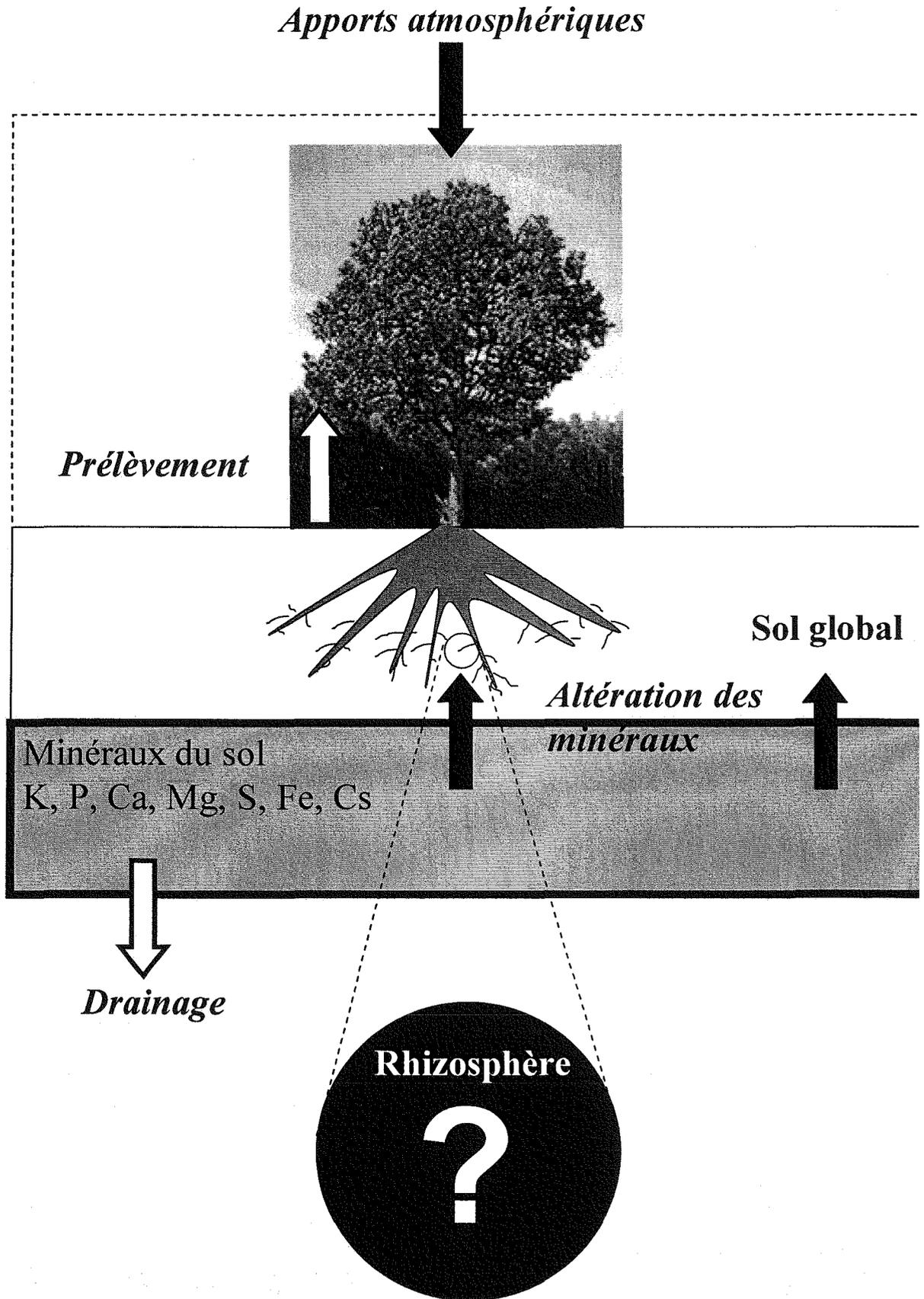
**Annexe 9** : Article en préparation : Alteration of Chrysotile in the Rhizosphere of the Nickel Hyperaccumulator *Leptoplax emarginata*.

**Annexe 10** : Propriétés physico-chimiques des sols de Bure, Breuil et Fougères.

**Annexe 11** : Liste des articles issus de ce travail de thèse.

## **PREAMBULE**

Figure P.1 : Contribution de la rhizosphère d'arbres forestiers dans le processus d'altération des minéraux du sol. Les flèches noires représentent les apports d'éléments minéraux dans la solution du sol. Les flèches blanches représentent les pertes d'éléments minéraux dans la solution du sol



## PREAMBULE

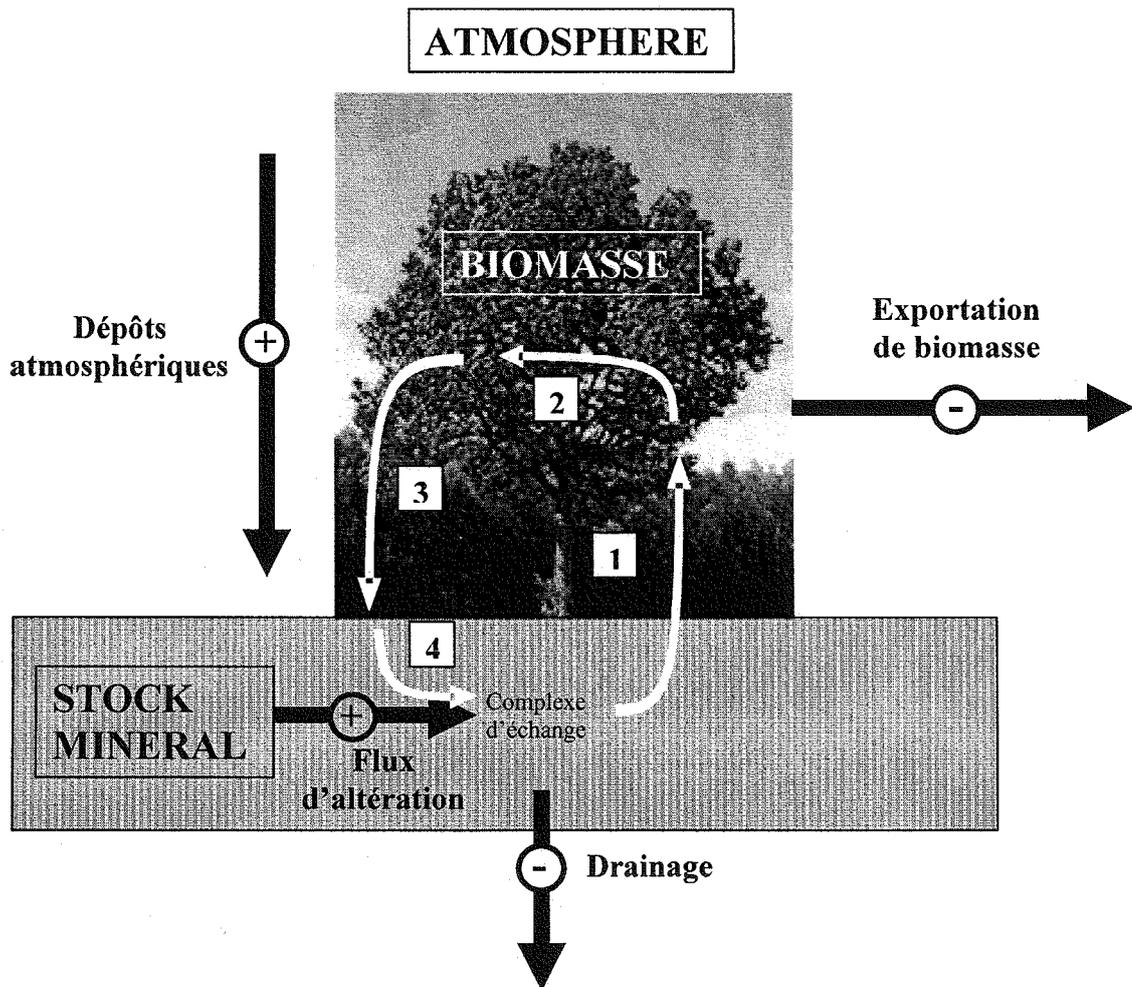
---

Pour croître, les arbres ont un besoin essentiel d'éléments minéraux tels que l'azote, le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le soufre, le fer, le manganèse, le bore, le zinc, le cuivre et le molybdène. Mis à part l'azote, les éléments nutritifs des écosystèmes forestiers non fertilisés proviennent principalement des minéraux présents dans le sol. Cependant, cette réserve d'éléments minéraux est (i) relativement pauvre dans les sols acides qui caractérisent la majorité des forêts françaises et (ii) ne représentent pas une source de nutriments directement accessibles aux arbres car les éléments sont piégés dans la phase minérale. Nous pouvons donc nous demander comment les arbres font pour acquérir ces éléments minéraux et ainsi se développer dans la mesure où, en outre, ils n'ont accès qu'à ceux présents dans l'environnement proche de leurs racines, la rhizosphère. **Le rôle de l'altération des minéraux comme processus favorisant la biodisponibilité des nutriments est aujourd'hui reconnu. En revanche, la contribution du facteur biologique dans ce processus reste à quantifier : qu'en est-il de l'effet des différentes composantes biologiques de la rhizosphère des arbres, racines et microflore associée (Figure P1) ?** L'objectif de notre travail est de répondre à cette question générale.

Etant donné l'interdisciplinarité de ce questionnement, le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à une introduction qui présentera tout d'abord, une analyse des caractéristiques inhérentes au contexte forestier de nos recherches, puis à un état de nos connaissances actuelles sur l'altération des minéraux dans les sols, et enfin nous nous intéresserons plus spécifiquement à la rhizosphère avec une description des particularités et des différentes composantes de ce compartiment du sol. La partie suivante, dédiée aux résultats, comportera trois chapitres consacrés successivement à (i) une quantification de l'altération des minéraux dans le sol global et la rhizosphère d'arbres en forêt, (ii) une évaluation du potentiel d'altération *in vitro*, des communautés microbiennes isolées à partir du sol global et de la rhizosphère de différentes essences d'arbres, et (iii) une détermination de la part respective des différents partenaires biologiques de la rhizosphère dans le processus d'altération des minéraux, à l'aide de dispositifs de culture simplifiés faisant interagir la plante, les microorganismes, le minéral et la solution. Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit présente une synthèse des principaux résultats obtenus, une discussion générale et les perspectives.

**CHAPITRE I :**  
**INTRODUCTION GENERALE**

Figure I.1: Les principaux flux d'éléments nutritifs dans les écosystèmes forestiers tempérés. Les flux avec des signes "+" représentent des entrées d'éléments, les flux avec des signes "-" représentent des sorties d'éléments du sol. Les végétaux assurent leur nutrition minérale en prélevant par leurs racines l'élément minéral dissout dans la solution du sol [1] qui est ensuite distribué dans tout l'arbre [2]. Puis, par des restitutions essentiellement solides [3], l'élément retourne dans le sol [4].



## 1 LE CONTEXTE DE NOS RECHERCHES :

### La disponibilité des éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers

---

D'une manière générale, un écosystème et en particulier l'écosystème forestier se compose d'une série de biocénoses (phytocénose, zoocénose, microbiocénose et mycocénose) en forte interaction avec l'environnement abiotique (climat, sol) (Duvigneaud, 1974). Il se caractérise par une multitude de relations entre le sol, les plantes, la microflore, la faune, le climat et par un mode de fonctionnement à travers une série de cycles (de l'énergie, de l'eau et des éléments minéraux), se traduisant par une productivité plus ou moins élevée selon les conditions offertes par le milieu et les exigences de l'essence considérée.

**Ainsi, l'écosystème forestier fonctionne suivant certaines lois qu'il est nécessaire de connaître afin de prévoir son évolution à plus ou moins long terme. Notamment, l'évolution de la qualité des sols forestiers nécessite la connaissance du fonctionnement minéral de l'écosystème forestier, autrement dit de la dynamique du cycle biogéochimique des éléments nutritifs. Ce dernier représente l'ensemble des mécanismes intervenant dans la biodisponibilité des éléments nutritifs pour la croissance des végétaux. Il constitue une adaptation des écosystèmes forestiers pour produire de la biomasse à partir de réserves minérales limitées et non renouvelées. En effet, les forêts françaises sont principalement développées sur des sols pauvres en nutriments et non fertilisées (Badeau *et al.*, 1999).**

#### 1.1 Le cycle biogéochimique des éléments minéraux dans les écosystèmes forestiers

Le cycle biogéochimique (Figure I.1) d'éléments minéraux tels que l'azote, le phosphore, le potassium ou le magnésium, représente la circulation permanente de ces éléments entre les végétaux et les horizons prospectés par les racines. Ainsi, les éléments prélevés servent à l'élaboration de la biomasse annuelle et pérenne ; une partie de ces éléments est fixée (immobilisation), une autre est restituée au sol (litière et récrétion). Quatre principaux flux peuvent modifier le bilan d'éléments minéraux dans l'écosystème (Duvigneaud, 1974 ; Bormann et Likens, 1979 ; Ranger et Turpault, 1999) : les dépôts atmosphériques et l'altération des minéraux du sol (flux d'entrée), le drainage et l'exportation de biomasse (flux de sortie).



- Les dépôts atmosphériques apportent à l'écosystème des quantités non négligeables d'éléments. Ils peuvent être sous forme de dépôts humides dissous dans la pluie, de dépôts occultes correspondant aux gouttelettes de brouillards ou aux dépôts orographiques (nuages) et de dépôts secs composés de particules ou de gaz se déposant sur la canopée. Leur origine peut être naturelle ou anthropique.
- L'altération des minéraux du sol permet la mise à disposition d'éléments qui étaient jusque là inaccessibles aux organismes de l'écosystème. La quantité de minéraux contenant des éléments nutritifs d'un sol dépend des caractéristiques du matériau parental du sol appelé "roche-mère" et de l'évolution du sol. Elle constitue une ressource limitée non renouvelable (Ezzaïm, 1997 ; Fichter, 1997).
- Lorsque des précipitations efficaces, *i.e.* bilan d'eau positif, atteignent l'écosystème, la migration des eaux gravitaires dans le sol draine en profondeur une partie des éléments du sol solubles ou en suspension, entraînant une acidification du sol.
- Dans les forêts exploitées par l'homme, une partie de la biomasse est périodiquement prélevée à l'écosystème. Cette exportation de biomasse contenant des éléments nutritifs tels que le potassium, le calcium et le magnésium qui tamponnent le pH du sol, constitue donc une perte pour le système (Le Goaster *et al.*, 1991) favorisant l'acidification du sol (Glatzel, 1991).

## **I.2 Les minéraux du sol comme réserve de nutriments et le flux d'altération comme moteur de la disponibilité de ces nutriments**

Le sol constitue la principale réserve en nutriments minéraux pour les arbres. Ainsi, par exemple dans un écosystème forestier comme celui de Vauxrenard (Beaujolais), les réserves de magnésium et de potassium contenues dans le sol sont respectivement estimées à 24 et 127 tonnes par hectare sur une couche de 65 cm. Le tableau I.1 indique les principaux minéraux présents dans le sol de ce site forestier acide et les éléments qu'ils contiennent. Cependant la présence de ces éléments en grande quantité dans les sols ne signifie pas qu'ils sont disponibles pour les racines d'arbre. Le terme "biodisponibilité" a d'ailleurs été introduit pour rendre compte du fait que seule une fraction d'un nutriment dans le sol est susceptible d'être prélevée par un organisme

vivant. Pour un système sol - arbre, la biodisponibilité d'un élément est définie comme l'aptitude de cet élément à être transféré d'un compartiment du sol vers le système racinaire de l'arbre, lieu de son prélèvement. Ce transfert s'effectue essentiellement par l'intermédiaire de l'absorption de l'élément contenu dans la solution du sol par les racines (Marschner, 1995). La biodisponibilité d'un élément dépend donc de la spéciation, de toutes les propriétés physico-chimiques qui gouvernent la spéciation, et par conséquent la mobilité de l'élément dans le sol, mais aussi de l'espèce végétale considérée (Ebbs *et al.*, 1996). La majeure partie de ces éléments étant piégée dans la structure des minéraux, c'est donc le flux lié à l'altération de la phase minérale qui va constituer à long terme la principale source de renouvellement des éléments nutritifs dans la solution du sol.

**Les forêts se caractérisent par un milieu où les éléments nutritifs se recyclent constamment et de manière relativement intense dans les divers compartiments de l'écosystème. La pérennité de la plupart des forêts repose sur l'existence de ce cycle biogéochimique qui optimise l'efficacité des éléments nécessaires à la croissance des arbres. Cependant, l'accumulation dans le bois et le drainage constituent des pertes majeures en nutriments dans le sol. C'est le flux lié à l'altération de la phase minérale du sol qui constitue la principale source de renouvellement de ces nutriments dans les écosystèmes à faibles intrants comme la plupart des forêts françaises.**

## **2. LE FLUX D'ALTERATION ISSU DES RESERVES MINERALES DU SOL :**

### **Un processus générateur de nutriments essentiels pour la croissance des plantes sous dépendance des racines et des microorganismes associés**

---

Depuis leur formation sous des conditions thermodynamiques très différentes de celles régnant à la surface du globe actuellement, les roches sont déstabilisées par les conditions géochimiques et biologiques du sol. Sous l'effet de l'eau de pluie, du gaz carbonique, de l'oxygène et des variations thermiques, elles évoluent jusqu'à l'individualisation d'un nouveau matériau, le sol, qui est constitué par des minéraux qui lui sont propres et qui sont parfaitement stables dans le milieu ambiant. On désigne sous le nom d'altération l'ensemble des phénomènes relatifs à cette évolution qui conduisent à la destruction, la transformation et la néoformation de minéraux.

L'altération des roches et des minéraux étant due à l'action combinée de processus physiques, chimiques et biologiques, nous aborderons tout d'abord les différentes réactions d'altération en nous focalisant sur la dissolution des minéraux silicatés avant de décrire les processus d'altération faisant intervenir les racines des plantes, les bactéries et les champignons du sol.

#### **2.1 Les différents réactions d'altération**

Cinq types de réactions sont mises en jeu lors de l'altération supergène des minéraux du sol : (i) la microdivision, (ii) la dissolution, (iii) la transformation, (iv) la néoformation et (v) l'échange d'ions. La microdivision, c'est-à-dire le fractionnement de la roche en fragments de plus en plus petits sans modification de sa composition minéralogique, est une transformation physique liée aux agents climatiques tels que le vent (abrasion), le gel ou l'eau, mais également aux racines des plantes, aux macroorganismes et aux microorganismes. La microdivision intervient indirectement dans le flux d'altération car elle conduit à une augmentation de la surface des minéraux exposés aux solutions du sol. Trois réactions participent directement au flux d'altération : la dissolution, la transformation et la néoformation. Lors de la dissolution, tous les ions constituant le réseau cristallin du minéral sont solubilisés. Lors des réactions de transformation, seule une partie des ions constitutifs du minéral peut-être extraite et transférée en solution, l'autre partie va servir à la formation d'un minéral

secondaire avec une restructuration partielle du réseau silicaté du minéral primaire. Lors de la néoformation, les minéraux secondaires précipitent uniquement à partir des ions en solution. Le bilan des ions qui passent en solution lors de ces réactions constitue le flux d'altération.

La dissolution, c'est-à-dire l'attaque par l'eau souvent chargée d'éléments plus ou moins agressifs en solution, provoque un réarrangement important des réseaux cristallins. Elle s'effectue de différentes manières : dissolution en milieu alcalin, complexation, dissolution acide. Ainsi, le taux de dissolution d'un minéral silicaté est principalement gouverné par le pH et le potentiel rédox qui influence la solubilisation du fer et du manganèse de la solution (Drever, 1994 ; Welch et Ullman, 1996 ; Harley et Gilkes, 2000). A ces facteurs s'ajoutent deux autres facteurs intrinsèques inhérents au minéral lui-même ((i) et (ii)) ainsi que des facteurs externes ((iii), (iv), (v)) qui participent également au processus de dissolution des silicates :

(i) la surface spécifique du minéral : plus elle est développée, plus la surface d'interaction entre l'eau et le minéral est importante, ce qui implique que la désagrégation physique du minéral favorise sa dissolution chimique,

(ii) la constante de stabilité du minéral : elle est propre à chaque minéral et dépend de sa composition et de sa structure,

(iii) la température : elle influence l'énergie d'activation de la réaction minéral – fluide. Plus la température est élevée, plus la réaction est forte,

(iv) les paramètres hydrologiques : la rétention en eau, par exemple, augmente le temps de contact entre la solution et le minéral et favorise donc la dissolution,

(v) la composition de la solution : la nature des cations et des agents altérants présents en solution et qui interagissent avec la surface du minéral, affecte la dissolution. Par exemple, certains composés d'origine biologique comme les acides organiques ou les polysaccharides, peuvent accentuer la dissolution de la phase minérale (Huang and Keller, 1970 ; Welch *et al.*, 1999).

En conséquence, tous ces paramètres permettent de définir une loi de dissolution  $V_M$  (en moles par an) d'un minéral  $m$  (Madé, 1991) :

$$V_M = k_M \cdot S_M \cdot a_i^n \cdot (1 - (Q_M/K_M)) \quad (1)$$

Avec :

$k_M$  : constante de vitesse intrinsèque au minéral  $M$  (en moles.m<sup>-2</sup>.an<sup>-1</sup>),

$S_M$  : surface de contact effective entre le minéral  $M$  et un kilogramme de solution (en m<sup>2</sup>.kg<sup>-1</sup>),

$a_i$  : activité de l'espèce aqueuse  $i$ ,  $i$  est l'ion  $H^+$  en milieu acide et l'ion  $OH^-$  en milieu basique,

$n$  : exposant qui permet de tenir compte de la dépendance de la vitesse de dissolution du minéral  $M$  par rapport à l'espèce aqueuse  $i$ ,

$(1-(Q_M/K_M))$  : index de saturation du minéral  $m$  en solution, avec  $Q_M$  le produit ionique d'activité du minéral  $M$  et  $k_M$  la constante d'équilibre thermodynamique du minéral  $m$  à la température et la pression fixées.

## 2.2 Les processus biologiques d'altération des minéraux

L'activité biologique contribue non seulement à la dégradation de la matière organique et à la formation de composés organiques spécifiques du sol mais elle participe aussi à l'altération des minéraux du sol. Ce sont essentiellement les microorganismes et les végétaux supérieurs qui interviennent (Berthelin *et al.*, 1994), la faune apparaissant moins active.

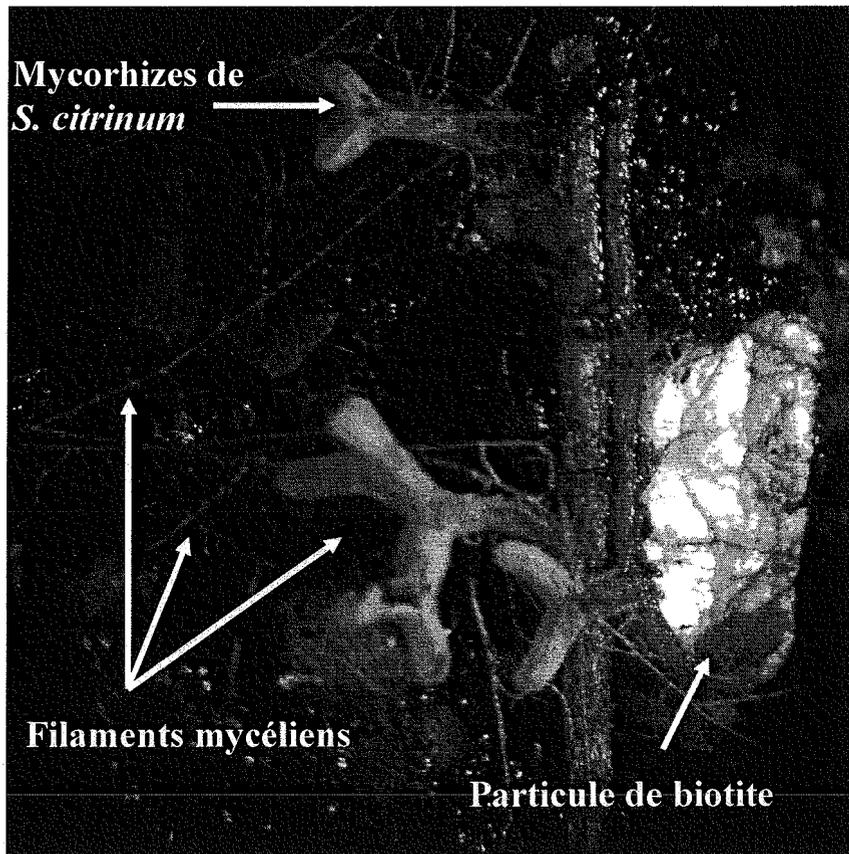
Dès 1845, Ebelmen suggéra que les racines des plantes et les acides organiques qu'elles sécrètent, stimulaient l'altération des roches. En réalité, nous savons aujourd'hui qu'une grande variété de processus biologiques affecte l'altération des minéraux du sol, incluant des actions mécaniques et chimiques directes et des actions indirectes des produits du métabolisme des racines et des microorganismes (Barker *et al.*, 1997 ; Banfield *et al.*, 1999).

### 2.2.1 Désagrégation physique

**Les racines et les hyphes fongiques désagrègent physiquement les minéraux, exposant ainsi de nouvelles surfaces minérales et augmentant de ce fait la quantité de surfaces réactives, i.e. accessibles aux agents altérants.**

Le pivot et les racines charpentières, assurent l'ancrage mécanique des arbres dans le sol. Les racines moyennes et fines, quant à elles, pénètrent dans les pores grossiers et fins du sol. Cette pénétration des racines dans le sol engendre une fragmentation de ce dernier. Denef *et al.* (2002) ont suggéré que la plus forte proportion de petits agrégats dans les sols résultait de la dissociation des gros agrégats par les racines. Par ailleurs, les racines s'associent avec des champignons symbiotiques, les champignons mycorhiziens dont les hyphes, du fait de leur très faible diamètre (quelques micromètres), pénètrent

Figure 1.2 : Photo de filaments mycéliens de *Scleroderma citrinum* autour de particules de biotite.



dans les roches et les minéraux (Jongmans *et al.*, 1997) occasionnant une séparation et une microdivision des minéraux.

### 2.2.2 Stabilité structurale du sol

**La stabilisation du sol augmente la rétention en eau, allongeant la durée de contact entre la solution et la phase minérale et favorisant ainsi les réactions d'altération. De plus, la stabilisation augmente la diffusion d'oxygène et par conséquent stimule la colonisation du sol par les organismes.**

Les pores formés par les racines sont principalement des macropores ( $> 30 \mu\text{m}$ ) (Gibbs et Reid, 1988) qui améliorent la structure du sol (Lesturgez *et al.*, 2004) et la circulation de l'eau (Beven et Germann, 1982). Par ailleurs, pour faciliter leur pénétration et leurs mouvements dans le sol, les racines, au niveau de leurs zones apicales, se couvrent d'une couche de mucilage. Ce composé de haut poids moléculaire a diverses fonctions biologiques : lubrification, protection contre la dessiccation en maintenant une humidité favorable tout en évitant les vides qui isoleraient du sol les surfaces d'absorption (Callot, 1982). Les exopolysaccharides qu'il contient favorisent également l'agrégation du sol dans la rhizosphère en liant les particules d'argiles, créant ainsi des agrégats de tailles et de natures différentes qui vont laisser entre eux une porosité importante (McCully, 1999 ; Czarnes *et al.*, 2000 ; Berge *et al.*, 2004).

Les microorganismes participent également à ces phénomènes de formation et de stabilisation des agrégats des sols et donc d'amélioration de la structure. En effet, de par leur réseau de filaments, les champignons sont responsables de l'enchevêtrement des particules de sol par les champignons filamenteux (Figure I.2). Par ailleurs, les produits du métabolisme microbien, essentiellement exopolysaccharidiques (Amellal *et al.*, 1998) forment parfois des assemblages très stables appelés biofilms qui contribuent à l'agrégation des particules de sol. Les bactéries interviendraient également dans la formation de petits agrégats à l'échelle du micromètre, où elles sont liées aux particules d'argiles, chargées également négativement, par des ponts ioniques *via* des cations divalents (Berthelin *et al.*, 1994).

### 2.2.3 Absorption de nutriments et échange d'ions

**L'absorption et l'échange d'ions liés à l'activité des racines et des microorganismes entraînent des modifications substantielles des concentrations d'éléments en**

**solution. Ces modifications ont pour effet de déplacer les équilibres chimiques régissant la dynamique de ces éléments dans le sol et affectent par conséquent l'altération des minéraux.**

Les plantes prélèvent dans le sol, l'eau dont elles ont besoin. Elles prélèvent aussi dans la solution du sol tous les éléments minéraux nécessaires à leur croissance. Ce prélèvement est sélectif, c'est-à-dire que les flux d'éléments minéraux sont contrôlés par des processus physiologiques complexes qui ont pour fonction d'ajuster précisément ces flux aux besoins des plantes. L'évolution de la concentration de la solution du sol au voisinage des racines résulte à la fois des besoins de la plante et de la disponibilité des éléments dans le sol. Ainsi, certains éléments se trouvent en excès dans la solution du sol, et en quantité très supérieure aux besoins de la plante. Ces éléments vont donc se concentrer et peuvent même précipiter au voisinage des racines, formant des encroûtements périracinaires, des manchons minéraux qui isolent les racines de leur environnement. (Jaillard, 1980). En revanche, d'autres éléments sont peu disponibles et le fort prélèvement exercé par la plante peut engendrer un appauvrissement de la solution au voisinage des racines.

Les parois racinaires et fongiques ainsi que les parois bactériennes et les polymères extracellulaires possèdent des constituants (polysaccharides, protéines, lipopolysaccharides,...) qui portent des groupements fonctionnels (-NH<sub>2</sub>, -COOH, -OH, -PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>,...) leur conférant des propriétés d'échanges anioniques et cationiques, et de complexation des métaux en solution.

Cependant, tous ces composés ou d'autres produits du métabolisme peuvent aussi, dans certaines conditions, inhiber la dissolution minérale. De nombreux composés organiques microbiens sont connus pour s'adsorber irréversiblement sur les surfaces ou pour réagir avec les surfaces et les solutions pour produire des phases secondaires stables. Ces phénomènes d'adsorption et de précipitation peuvent avoir pour effet de limiter les échanges entre la surface minérale et la solution de sol, réduisant ainsi le taux de dissolution (Chou et Wollast, 1985 ; Ullman *et al.*, 1996).

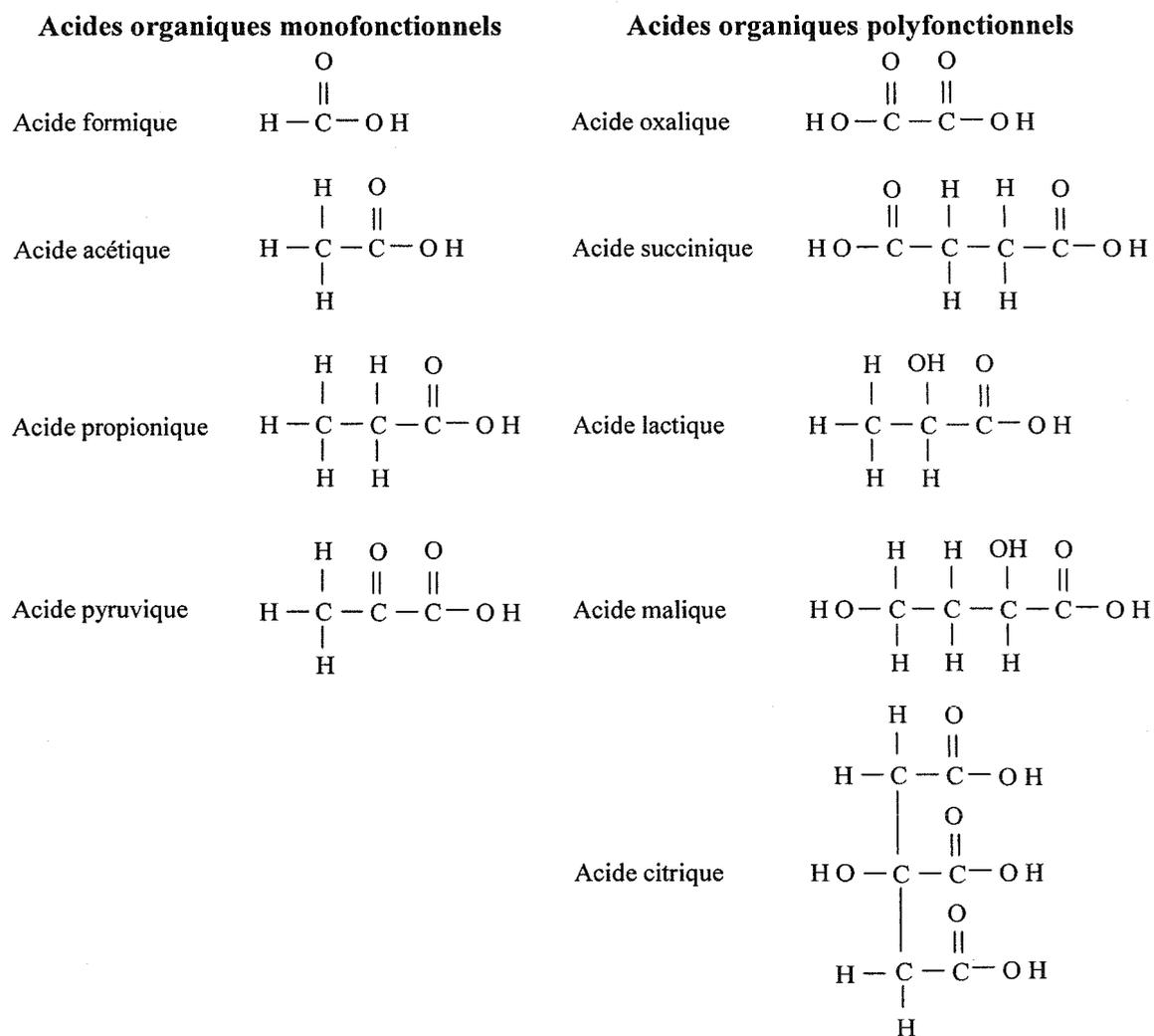
#### *2.2.4 Production d'agents altérants*

**Les plantes et les microorganismes du sol produisent divers composés organiques et inorganiques dotés de propriétés altérantes. Ainsi, les protons altèrent directement la surface minérale. En revanche, l'action des acides et des ligands organiques sur l'altération des minéraux est double : i) ces molécules peuvent se**

**fixer sur les surfaces minérales et en mobiliser les éléments et ii) elles peuvent complexer les éléments en solution, déplaçant ainsi les équilibres solide – solution et accélérant indirectement le taux de dissolution des minéraux.**

- Les protons : lors du phénomène de respiration, les racines produisent du  $\text{CO}_2$ . De son côté, la microflore hétérotrophe oxyde les composés carbonés, conduisant à la minéralisation de la matière organique et en phase finale à la formation de  $\text{CO}_2$ . Ce  $\text{CO}_2$  va réagir avec l'eau pour former de l'acide carbonique qui est un acide faible mais présent en grande quantité dans l'environnement proche de la racine (Schwartzmann et Volk, 1989). Pour sa croissance, la plante absorbe des quantités inégales de cations ( $\text{NH}_4^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Na}^+$ ) et d'anions ( $\text{NO}_3^- + \text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) nutritifs. L'équilibre des charges ioniques en son sein est maintenu par l'excrétion d'une quantité d'ions  $\text{H}^+$  et  $\text{OH}^-$  qui est stoechiométriquement égale à l'excès respectif de cations et d'anions prélevés. Dans la plupart des cas, la plante absorbe plus de cations que d'anions, ce qui conduit à la libération d'ions  $\text{H}^+$  dans la rhizosphère. Par exemple, la forme d'azote fixée ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$ ) par les plantes affecte considérablement l'évolution du pH au sein de la rhizosphère (Marschner et Römheld, 1983). Par ailleurs, le prélèvement actif des ions et leur transport à travers la membrane plasmique nécessite une force conductrice qui est générée par l'extrusion d'ions  $\text{H}^+$  (Haynes, 1990). Enfin, les phénomènes d'oxydation, notamment du fer, induits par la plante et les microorganismes engendrent la libération de protons et par conséquent une acidification de la rhizosphère (Begg *et al.*, 1994).
- les acides inorganiques : les microorganismes produisent des acides inorganiques forts tels que l'acide sulfurique et l'acide nitrique par oxydation de composés sulfurés et azotés réduits. Ces réactions se produisent généralement à l'interface entre des environnements oxygénés et anoxiques comme par exemple les biofilms microbiens et peuvent engendrer localement une sévère chute de pH (Berthelin, 1983). A ce titre, ces acides sont impliqués dans l'altération de la roche (Berthelin, 1985) et entraînent parfois une destruction complète du minéral avec la mise en solution de tous ses éléments constitutifs.
- Les acides organiques : les plantes et les microorganismes excrètent des composés organiques solubles principalement de bas poids moléculaires. Dans la rhizosphère, ces composés sont détectés à de faibles concentrations variant de

Figure I.3 : Structure chimique de différents acides organiques.



1 à 50  $\mu\text{M}$  (Bazira-Makenga *et al.*, 1995) et leur durée de vie est courte vraisemblablement inférieure à 2 heures (Jones et Darrah, 1994 ; Van Hees *et al.*, 2003) car ils sont rapidement dégradés par les microorganismes. Les acides organiques sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupes carboxyles ( $\text{COOH}$ ). Parmi les acides les plus souvent cités comme étant impliqués dans les processus d'altération des minéraux silicatés, on trouve des acides polyfonctionnels comme les acides oxalique, succinique, malique, lactique et citrique et des acides monofonctionnels comme les acides acétique, formique, propionique, pyruvique (Figure I.3). En condition acide, les acides polyfonctionnels sont significativement plus efficaces dans le processus de dissolution des minéraux que les acides monofonctionnels du fait de la présence de plusieurs groupes carboxyliques libérant chacun un ion  $\text{H}^+$  par dissociation. Ces acides organiques agissent par l'intermédiaire de leurs groupes hydroxyles et carboxyles ("ligand-promoted mechanism") et de leurs protons ("proton-promoted mechanism") (Berthelin, 1983; Amrhein et Suarez, 1988; Bennett *et al.*, 1991 ; Welch et Ullman, 1996) et peuvent augmenter la dissolution d'un minéral plus qu'une simple attaque de protons. Par exemple, l'acide oxalique sécrété par les racines forme des complexes solubles avec l'aluminium et le fer. Ce processus augmente la dissolution des minéraux contenant de l'aluminium et du fer en retirant le fer et l'aluminium insolubles de la solution (Drever et Vance, 1994, Berner et Cochran, 1998). En exsudant de l'acide oxalique, les champignons ectomycorhiziens de l'espèce *Pisolithus* sont eux aussi capables par exemple d'altérer un minéral de référence, la phlogopite, par une complexation des ions aluminium associée à une dissolution acide du réseau cristallin (Paris *et al.*, 1995 ; Yuan *et al.*, 2004). Cette altération se constate en diffraction de rayons X par une augmentation de l'espace interfoliaire de la phlogopite (Paris *et al.*, 1995). Le même type d'observation a été réalisé pour un autre champignon ectomycorhizien, *Laccaria laccata*, (Leyval et Berthelin, 1991) ainsi qu'avec des bactéries appartenant aux genres *Acidithiobacillus*, *Agrobacterium* ou *Bacillus*.

- Les ligands organiques : même si dans la plupart des sols, le fer est présent en grande quantité, il l'est sous des formes insolubles donc non disponibles pour les plantes et les microorganismes. C'est pourquoi, les plantes et les

microorganismes ont mis en place des stratégies de mobilisation du fer *via* notamment la libération de sidérophores. Ces molécules très affines du fer, mais qui peuvent également fixer d'autres micronutriments tels que le cuivre, le manganèse et le zinc (Brantley *et al.*, 2001 ; Kalinowski *et al.*, 2004), sont excrétées en condition de carence en fer (Schmidt, 2003). Plus de 200 sidérophores ont été isolés, la majorité étant des hydroxamates ou des phénolates – catécholates. Watteau et Berthelin (1994) et Liermann *et al.* (2000b) ont respectivement montré que la production de sidérophores par le champignon ectomycorhizien *Suillus granulatus* et la bactérie *Streptomyces sp.* était impliquée dans la dissolution d'un hydroxyde et d'un oxyde de fer (goethite et hématite).

### 2.2.5 Production d'agents oxydants et réducteurs et réactions enzymatiques

**Les racines et les microorganismes, en modifiant l'état d'oxydation des métaux vont soit les solubiliser, soit les insolubiliser, affectant ainsi le processus d'altération des minéraux.**

Les conditions rédox déterminent la dynamique des éléments qui possèdent plusieurs degrés d'oxydation. C'est notamment le cas du fer dont la forme réduite  $Fe^{2+}$  est très soluble alors que sa forme oxydée  $Fe^{3+}$  l'est très peu en condition aérobie et aux pH proches de la neutralité.

La plante exsude des acides phénoliques et aliphatiques (Brown et Ambler, 1973) qui peuvent modifier les conditions d'oxydo-réduction au sein de la rhizosphère (Bienfait *et al.*, 1983). Ces dernières induisent des changements dans la solubilité des nutriments qui peuvent parfois provoquer l'accumulation de composés organiques phytotoxiques comme  $Al^{3+}$ . C'est pourquoi les plantes adaptées aux sols engorgés maintiennent un haut potentiel rédox dans la rhizosphère par le transport d' $O_2$  et exsudent également des composés organiques qui vont la protéger en chélatant  $Al^{3+}$  dans la rhizosphère sous forme de complexes non toxiques.

Contrairement aux eucaryotes supérieurs qui misent sur l'oxygène pour leur respiration, de nombreuses bactéries excellent dans l'utilisation d'autres accepteurs d'électrons terminaux pour subvenir aux besoins énergétiques de leur métabolisme. Ces bactéries se rencontrent souvent dans des environnements particuliers dépourvus en oxygène, dans l'eau, dans les sols engorgés ou sur la face inférieure des biofilms qu'elles créent à la surface de minéraux. Parmi ces bactéries, des souches appartenant aux espèces

*Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens* ou *Shewanella oneidensis* ont été caractérisées pour leur capacité à oxyder ou à réduire des éléments chimiques simples comme le fer, le chrome, le manganèse, le mercure, l'arsenic, le sélénium ou l'uranium (Sasaki *et al.*, 1998 ; Weiss *et al.*, 2004). Ces mécanismes d'oxydation et de réduction nécessitent toutefois un contact entre les microorganismes et le minéral (Mustin *et al.*, 2004).

De plus, pour assurer leur nutrition, les racines de la plante produisent des exoenzymes comme les phosphatases ou les phytases qui sont impliquées dans l'hydrolyse catalytique des phosphates organiques et par conséquent dans la biodisponibilité du phosphore dans le sol (Tarafdar et Jungk, 1987 ; Findenegg et Nelemans, 1993). Les champignons ectomycorhiziens et les bactéries du sol produisent également des enzymes extracellulaires qui jouent un rôle important dans le cycle des nutriments tels que le phosphore, l'azote et le soufre (Bowen et Rovira, 1999).

**C'est le processus d'altération des minéraux du sol qui est le principal générateur de nutriments et par conséquent, il a un impact déterminant sur notre environnement et notamment la fertilité des sols. Les géologues ont longtemps considéré l'altération comme une simple interaction eau - roche, négligeant de ce fait l'effet du paramètre biologique. Or les nombreux processus inhérents à l'activité de la racine, des bactéries et des champignons associés sont de mieux en mieux connus. L'importance de leur rôle dans le domaine de l'altération minérale et donc sur la mobilisation des éléments minéraux nutritifs ou non ne fait plus aucun doute aujourd'hui, notamment dans un compartiment particulier du sol : la rhizosphère.**

### **3. LA RHIZOSPHERE :**

**Un environnement particulier et un lieu d'interactions privilégiées entre les racines, le sol et les microorganismes.**

---

#### **3.1 Historique et définitions**

C'est Lorenz Hiltner, bactériologiste du sol et professeur d'agronomie à Munich qui, en 1904, utilise pour la première fois le terme "rhizosphère" pour désigner les interactions entre diverses bactéries et les racines de légumineuses. Il insiste sur le rôle primordial des activités microbiennes au sein de la rhizosphère dans la nutrition et la santé des plantes. Selon lui, la nutrition des plantes dépend de la composition de la microflore du sol au sein de la rhizosphère. Il fait également l'hypothèse que les plantes attirent les bactéries par le biais de leurs "excrétions". Par ces deux hypothèses, Hiltner a déjà identifié deux impacts majeurs de la rhizosphère sur les plantes, à savoir (i) le rôle de la rhizosphère dans la nutrition, la croissance et le développement de la plante et (ii) l'effet sélectif de la rhizosphère sur les communautés microbiennes.

Durant tout le vingtième siècle et notamment durant les trois dernières décennies, de multiples travaux dans des disciplines très variées telles que la minéralogie (April et Keller, 1990 ; Courchesnes et Gobran, 1997), la physico-chimie (Nye, 1981 ; Jones et Darrah, 1994 ; Marschner, 1995 ; Hinsinger *et al.*, 2003) et la microbiologie (Berthelin et Leyval, 1982 ; Linderman, 1988 ; Grayston et Campbell, 1996 ; Frey-Klett *et al.*, 2005) ont été consacrés à la caractérisation la rhizosphère et beaucoup de définitions se sont succédées (Curl and Truelove, 1986). Cependant, de nos jours, une définition générale, formulée par Darrah (1993), est communément acceptée : c'est le volume de sol entourant les racines (*Rhiza* en grec) et soumis à leur influence.

#### **3.2 Impact de la racine sur son environnement : l'effet rhizosphère**

##### *3.2.1 Caractéristiques physico-chimiques de la rhizosphère*

La rhizosphère est considérée comme un environnement spécifique où les flux de matière et d'énergie entre le sol et la plante sont particulièrement intenses, affectant les conditions physico-chimiques et les conditions microbiologiques du sol. Dans la rhizosphère, la plante absorbe l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son

développement et à sa croissance induisant ainsi des modifications importantes du potentiel de l'eau et des concentrations ioniques du sol rhizosphérique (Hinsinger, 1998). Ces échanges ioniques et gazeux entre les racines des végétaux et le sol contribuent à modifier de façon notable le pH (Nye, 1981 ; Hoffland, 1992 ; Hinsinger, 2003) et le potentiel d'oxydo-réduction (Brown et Ambler, 1973 ; Bienfait *et al.*, 1983 ; Marschner, 1995) de la rhizosphère et, par la suite, la biodisponibilité de nombreux éléments minéraux nutritifs ou non (Marschner, 1995; Hinsinger, 1998; Jones, 2003).

De plus, les racines des plantes libèrent divers composés organiques dans le sol environnant. Ce processus, nommé rhizodéposition (Shamoot *et al.*, 1968), comprend les cellules détachées de la coiffe, les lysats, les mucilages et les exsudats. Il est d'importance écologique. En effet, une grande partie du carbone net assimilé par la plante lors de la photosynthèse [15 à 25% selon Kuziakov (2002) et 17% selon NGuyen (2003)] est rhizodéposée sous forme de composés tels que les sucres simples et les polysaccharides, les acides phénoliques, aminés et organiques, les peptides et les protéines, les ectoenzymes (Bowen et Rovira, 1999 ; NGuyen, 2003 ; Jones *et al.*, 2004), qui interviennent dans les processus d'acquisition des nutriments, notamment dans les environnements pauvres (Dakora et Phillips, 2002). Ainsi, selon Marschner (1995), la rhizodéposition semble être stimulée en réponse à des phénomènes de carences nutritives. Ceci suggère que les plantes mettraient en œuvre des stratégies de nutrition pour surmonter les conditions chimiques défavorables du sol. Cette hypothèse est étayée par les résultats de plusieurs équipes de chercheurs. Krafczyk *et al.* (1984) ont par exemple montré qu'en conditions de carence en potassium, les exsudats produits sont enrichis en acides organiques qui interviennent efficacement dans la mobilisation du potassium. De même, Zhang *et al.* (1991) ont montré qu'en conditions de carence en zinc, les exsudats sont enrichis en composés mobilisant le zinc comme les acides aminés et les acides phénoliques. De nombreux facteurs liés à la plante (espèce, âge et stade de développement), à la microflore environnante ou aux conditions du milieu (température, luminosité, humidité, atmosphère et biodisponibilité en nutriments) vont aussi affecter l'exsudation racinaire (NGuyen, 2003).

### 3.2.2 Caractéristiques microbiologiques de la rhizosphère

L'activité microbienne est généralement déterminée par la disponibilité en carbone (Anderson et Domsch, 1978). Logiquement, les interactions microbiennes sont donc

plus intenses dans la rhizosphère où il y a un apport constant de sources de carbone facilement disponibles pour les microorganismes hétérotrophes (Cheng *et al.*, 1993). Ainsi, le processus de rhizodéposition, qui constitue à la fois une source nutritive nécessaire pour former la biomasse microbienne et une source d'énergie pour les microorganismes, stimule la croissance et l'activité microbienne (Lynch, 1990). Bowen et Rovira (1976) ont même montré que les microorganismes vivant dans la rhizosphère ont une activité métabolique élevée et se multiplient très rapidement : les cellules de *Pseudomonas*, par exemple, se divisent en moyenne toutes les 5 heures dans la rhizosphère de *Pinus radiata* contre une division toutes les 77 heures dans le sol non rhizosphérique. Cependant la rhizosphère n'exerce pas uniquement une modification quantitative mais également une modification qualitative des populations microbiennes. Ainsi, Davet (1996) décrit la rhizosphère comme un lieu où les densités de population sont très fortes mais où la diversité des espèces est plus faible que dans le reste du sol. Cette réduction de la diversité bactérienne a été mise en évidence, génétiquement, par Mavingui *et al.* (1992) au sein de populations de *Bacillus polyxyma* dans la rhizosphère de blé, et phylogénétiquement par Marilley et Aragno (1999) au sein de populations bactériennes dans la rhizosphère de *Trifolium* et *Lolium*. Davet (1996) explique que ce sont les conditions de vie dans la rhizosphère qui exercent un effet sélectif sur les populations du sol : seules celles qui sont adaptées aux conditions régnant à la surface des racines pourraient s'y établir et s'y maintenir. Pour s'établir, les microorganismes doivent d'abord percevoir un signal plus ou moins spécifique émis par les racines. Ce signal met en route un processus de chimiotactisme ou de croissance active, dirigée préférentiellement vers la racine. Parce que les bactéries répondent différemment aux composés exsudés par les racines, des différences dans la composition des exsudats peuvent influencer le type de bactéries présent dans la rhizosphère (Grayston et Campbell, 1996). Pour se maintenir, les microorganismes qui auront répondu au signal devront être capables de supporter les conditions particulières qui règnent dans la rhizosphère : pH, toxicité de certains exsudats,.... Ainsi, Ahmad et Baker (1987) définissent un microorganisme capable de croître, de fonctionner et de se maintenir dans la rhizosphère au fur et à mesure que la racine s'allonge, comme rhizocompétent. Un organisme rhizocompétent doit non seulement supporter l'environnement physico-chimique de la racine mais aussi la forte compétition qui y règne. Cette aptitude peut se traduire par la production d'antibiotiques, par la résistance aux antibiotiques étrangers ou par l'utilisation optimale des molécules disponibles. Par exemple, Latour *et al.*

(2003) indiquent que les *Pseudomonas spp.* Fluorescents adaptés à la rhizosphère présentent un métabolisme spécifique, caractérisé par l'efficacité de leur système d'acquisition du fer basé sur les pyoverdines et par leur aptitude à réduire les oxydes d'azote.

### 3.3 Variabilité spatio-temporelle de la rhizosphère

La rhizosphère est un milieu dynamique, ce qui lui confère une grande hétérogénéité aussi bien spatiale que temporelle (Hinsinger *et al.*, 2005).

- L'étendue de cette zone d'influence des racines peut varier du millimètre pour les communautés microbiennes et les nutriments peu mobiles comme les phosphates, quelques dizaines de millimètres pour l'eau et les nutriments mobiles comme les nitrates et le potassium, à plusieurs dizaines de millimètres pour les composés volatiles et les gaz (Gregory, 2006). En plus de cette hétérogénéité radiale, les racines créent des hétérogénéités spatiales sur l'ensemble de leur longueur. En effet, de nombreuses fonctions racinaires impliquées dans les processus biochimiques, chimiques et physiques se produisant dans la rhizosphère, ne se distribuent pas uniformément sur toute la racine, l'apex racinaire se comportant souvent différemment (Hinsinger *et al.*, 2005). Par exemple la libération de protons et l'acidification de la rhizosphère qui en résulte, est plus forte dans la région subapicale des racines (Marschner *et al.*, 1982 ; Marschner, 1995). Ainsi, dans certaines conditions, une acidification de la rhizosphère peut se produire à l'apex des racines alors qu'une alcalinisation se produit dans les parties basales du système racinaire (Vansuyt *et al.*, 2003). Les hétérogénéités spatiales au sein de la rhizosphère résultent également de la spécialisation de certaines parties de la racine. C'est notamment le cas lors de l'association des racines des arbres forestiers avec des champignons ectomycorhiziens qui génère la formation d'un manteau d'hyphes autour des racines courtes des arbres.
- Les activités de la racine sont hétérogènes dans le temps : le prélèvement en eau et la production de phytosidérophores sont des phénomènes principalement diurnes (Marschner *et al.*, 1987 ; Doussan *et al.*, 2003). Un autre facteur d'hétérogénéité temporelle de la rhizosphère réside dans la croissance très dynamique de la racine. Ceci a pour conséquence le fait qu'une fraction de sol

donnée, après avoir été colonisée par une extrémité de racine en croissance, sera successivement exposée à différentes régions de la racine plus ou moins subérisées et possédant des propriétés différentes. Comme il a été estimé qu'une racine peut croître de 3 cm par jour, l'effet de l'extrémité racinaire sera exercée sur une même fraction de sol pendant de courtes périodes (Fischer *et al.*, 1989).

### **3.4 Les interactions bénéfiques pour la santé et la croissance de la plante au sein de la rhizosphère**

De nombreux travaux ont déjà montré l'importance des microorganismes du sol sur la croissance et la santé des plantes (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Davet, 1996 ; Lemanceau et Heulin, 1998). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les interactions entre les plantes et les microorganismes et sur les interactions entre les microorganismes au sein de la rhizosphère, qui s'avèrent bénéfiques pour la plante. Les autres types d'interactions, ne seront pas détaillés.

#### *3.4.1 Les microorganismes promoteurs de la croissance des plantes (PGPM, Plant Growth Promoting Microorganisms)*

Comme leur nom l'indique, les PGPM sont bénéfiques pour les plantes. Ils peuvent promouvoir la croissance de la plante de différentes manières :

- Effet hormonal

La croissance des plantes est dépendante de différents signaux endogènes, en particulier *via* la régulation hormonale. Des composés hormonaux tels que les auxines ou les cytokinines sont produits par certaines cellules végétales aux différents stades de la croissance de la plante (division et différenciation des cellules, élongation et dominance apicale). La plupart des régulateurs de croissance connus chez les végétaux supérieurs peuvent être synthétisés par des microorganismes du sol. Ceux-ci sont donc susceptibles de stimuler le développement racinaire et de promouvoir la croissance des plantes. C'est notamment le cas de la bactérie *Azospirillum* qui produit de l'acide indole-3-acétique (AIA) par différentes voies métaboliques, essentiellement à partir du tryptophane (Zimmer *et al.*, 1991). D'autres bactéries et champignons appartenant à des espèces indigènes de la rhizosphère produisent de l'auxine et/ou de la cytokinine, tels que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alcaligenes*

(Lemanceau, 1992 ; Digat, 1994 ; Garcia de Salamone *et al.*, 2001. ; Egamberdiyeva et Höflich, 2003).

- Effet nutritionnel

La croissance des plantes est également sujette à des facteurs exogènes, telle l'accession aux ressources nutritionnelles du sol. En effet, pour se développer, la plante a besoin de prélever dans le sol des éléments minéraux qui lui sont souvent inaccessibles. Dès le début des années 70, Jackson et Voigt (1971) et Boyle et Voigt (1973), puis Leyval et Berthelin (1989), ont mis en évidence l'action positive de certains microorganismes de la rhizosphère sur la croissance des arbres *via* la mobilisation d'éléments tels que le calcium et le potassium par altération de minéraux silicatés. Plus récemment, Puente *et al.* (2004) ont souligné que l'effet positif de souches bactériennes rhizosphériques telles que *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance de plants de cactus était lié à la production par ces souches d'acides organiques dissolvant non seulement les phosphates mais également les roches ignées extrusives, les marbres et les calcaires, procurant ainsi du phosphore, du potassium, du fer et du magnésium à la plante. De même, Pandey *et al.* (2005) ont montré que l'inoculation de souches de *Pseudomonas aeruginosa* productrices de sidérophores avait significativement réduit les symptômes de chlorose, augmenté le taux de chlorophylle et par conséquent favorisé la croissance de haricots, suggérant que les sidérophores bactériens auraient été captés par la plante (Loper et Henkels, 1999). Enfin, certaines bactéries chimiohétérotrophes de la rhizosphère comme *Azotobacter*, en milieu aérobie alcalin ou neutre, et *Beijerinckia* et *Derxia*, plutôt en milieu aérobie acide, *Clostridium*, en milieu anaérobie, ou chimioautotrophes comme *Thiobacillus ferrooxidans* sont des fixateurs libres d'azote. C'est-à-dire que ces souches bactériennes sont capables de fixer l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) et de le transformer en ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilables par les racines, favorisant donc la croissance de la plante (Paul et Clarck, 1988).

#### 3.4.2 L'interaction plante - champignon mycorhizien

L'interaction plante – champignon mycorhizien, déjà brièvement évoquée précédemment, est un exemple type des connexions qui peuvent s'établir entre différents partenaires de la rhizosphère associant symbiose et effet promoteur de la nutrition. En effet, les plantes, accédant difficilement à certains minéraux du sol, ont établi des interactions fines avec certains champignons dits mycorhizogènes, capables

de former des structures particulières autour (ectomycorhizes) ou à l'intérieur (endomycorhizes) des tissus racinaires. Il s'agit ici d'une symbiose mutualiste, le champignon mycorhizien étant complètement dépendant de son hôte en ce qui concerne les carbohydrates tandis que la plante hôte reçoit l'eau et les nutriments prélevés par les hyphes du champignon (Brunner, 2001 ; Smith et Barker, 2002). Les champignons mycorhiziens sont connus pour leur action bénéfique sur la santé des plantes en favorisant l'acquisition d'eau et de nutriments par la plante par une meilleure colonisation du sol ou par la production de composés favorisant la mobilisation des éléments (Jongmans *et al.*, 1997 ; Van Breemen *et al.*, 2000 ; Landeweert *et al.*, 2001 ; Van schöll *et al.*, 2005), en produisant des hormones de croissance (Rupp et Mudge, 1985 ; Frankenberger et Poth, 1987), et surtout en augmentant leur tolérance aux métaux lourds (Wilkins, 1991 ; Van schöll *et al.*, 2005) et aux maladies (Linderman, 1994).

Dans les écosystèmes forestiers, tempérés et boréaux, la très grande majorité des arbres vit en étroite association avec des champignons ectomycorhiziens. Ceux-ci sont estimés entre 5000 et 6000 espèces et la plupart d'entre eux est capable de s'associer avec une large variété d'espèces de plantes hôtes. Les champignons ectomycorhiziens enveloppent les racines fines des arbres d'un manchon mycélien (le manteau), puis ses hyphes pénètrent entre les cellules du cortex racinaire et génèrent le réseau de Hartig, zone privilégiée des échanges métaboliques entre la plante et le champignon (Smith et Read, 1997). En plus de modifier la morphologie racinaire, la symbiose ectomycorhizienne influence qualitativement et quantitativement l'exsudation racinaire en utilisant certains exsudats et en modifiant les fonctions métaboliques des racines (Leyval et Berthelin, 1993 ; Rambelli, 1973 ; Rygielwicz et Andersen, 1994). La symbiose peut également produire des antibiotiques (Olsson *et al.*, 1996). Elle crée ainsi un environnement particulier, la mycorhizosphère (zone du sol soumise à l'influence des racines mycorhizées) où l'équilibre microbien est différent du sol rhizosphérique (Linderman, 1988 ; Marschner et Baumann, 2003).

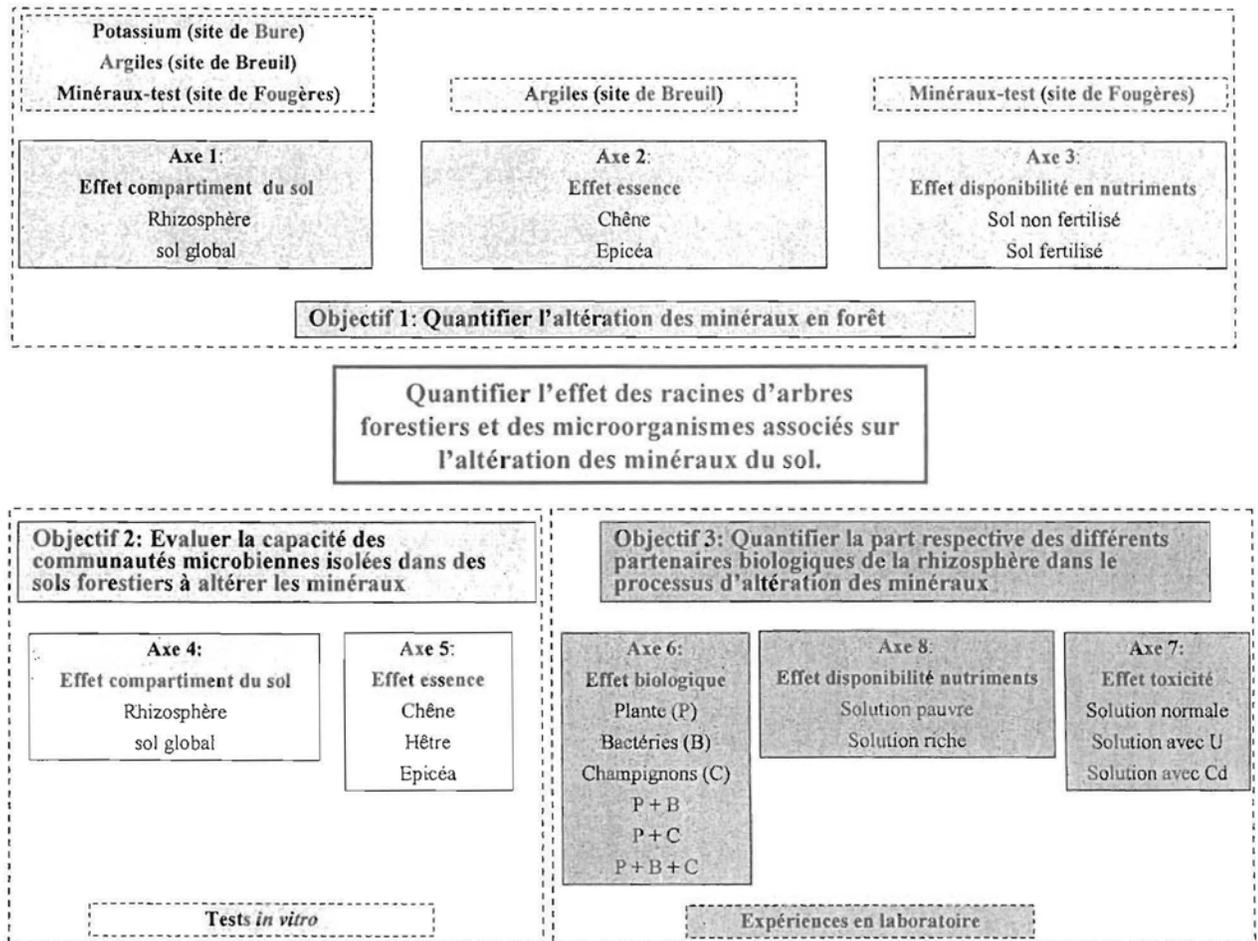
#### 3.4.3 Les interactions microorganismes - microorganismes

Les interactions entre les individus au sein des populations ou des communautés microbiennes peuvent être d'ordre mutualiste, commensale, amensale, antagoniste. Ainsi, certaines populations microbiennes sont favorables à la santé des plantes soit en

exerçant une action antagoniste à l'encontre de champignons phytopathogènes conduisant à une réduction de la fréquence des infections racinaires, soit en stimulant les réactions de défense des plantes (Cook *et al.*, 1995 ; Bano et Musarat, 2003 ; Bevivino *et al.*, 2005). Baker et Cook (1974) ont même démontré que c'est la plante par l'intermédiaire de ses exsudats racinaires qui favorise le développement de bactéries antagonistes du champignon pathogène *Fusarium*. De même, l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne sur les racines d'arbres est affecté par les populations microbiennes de la rhizosphère (Garbaye et Bowen, 1987) et notamment par certaines bactéries qui peuvent favoriser la formation des mycorhizes (Garbaye et Bowen, 1989 ; Bending *et al.*, 2002) qui sont bénéfiques à la plante. Ces bactéries, qui sont capables d'agir à très faibles concentrations dans le sol sont définies comme des bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM) ou mycorrhiza helper bacteria (MHB) (Garbaye, 1994).

**La rhizosphère est un compartiment particulier du sol qui diffère du sol nu (non soumis à l'influence des racines) par un grand nombre de processus biologiques, biochimiques, chimiques et physiques, inhérents à la croissance racinaire, au prélèvement d'eau et de nutriments, à la respiration et à la rhizodéposition (Hinsinger, 2005). Ces changements induits par les racines dans la rhizosphère sont d'une importance décisive dans la mobilisation des nutriments, les plantes étant même capables de moduler qualitativement et quantitativement leur exsudation racinaire afin d'optimiser la disponibilité en nutriments. Les racines vont également s'associer avec certains microorganismes du sol, notamment les bactéries et les champignons ectomycorhiziens afin d'accroître la quantité de nutriments biodisponibles. A ce titre, ces multiples interactions s'avèrent indispensables dans le domaine de la nutrition des arbres.**

Figure I.4 : Représentation schématique des différents objectifs de cette étude.



#### 4. OBJECTIFS DE LA THESE ET DEMARCHE SCIENTIFIQUE

---

Dans cette introduction, nous avons souligné trois faits majeurs : (i) le flux lié à l'altération des minéraux du sol est la principale source de nutriments des arbres forestiers, (ii) cette altération est au moins en partie due à l'activité des racines et des microorganismes du sol et (iii) la rhizosphère est une zone d'intenses activités biologiques. A l'issue de cette introduction, une question reste néanmoins en suspend : quel est l'impact de l'activité biologique rhizosphérique sur la mobilité des nutriments minéraux dans les sols forestiers *via* l'altération des minéraux ?

**Le travail présenté dans cette thèse a pour but de tenter de répondre à cette question, étape nécessaire pour mieux comprendre la durabilité des écosystèmes forestiers qui sont fréquemment développés sur des sols à faibles réserves en nutriments minéraux. Parallèlement à ce travail, une partie de nos recherches a aussi été consacrée à l'analyse de l'impact de la rhizosphère sur la mobilité d'un élément traces tel que le césium à partir des minéraux des sols ainsi qu'à l'étude de l'impact d'éléments toxiques tels que l'uranium et le cadmium sur les acteurs de l'altération biologique.**

Pour répondre à cette problématique, ma démarche scientifique s'est organisée autour de trois objectifs opérationnels (Figure I.4) :

**Objectif 1 : quantifier l'altération des minéraux dans le sol global et la rhizosphère d'arbres en forêt.**

**Objectif 2 : évaluer la capacité des communautés microbiennes isolées dans le sol global et la rhizosphère d'arbres à altérer des minéraux.**

**Objectif 3 : quantifier la part respective des différents partenaires biologiques de la rhizosphère (racines, bactéries et champignons) dans le processus d'altération des minéraux.**

La complexité du fonctionnement des écosystèmes forestiers montre clairement qu'il ne peut pas être élucidé exclusivement à partir d'approches expérimentales réductrices. Celles-ci n'autorisent pas la prise en compte des nombreuses actions, rétroactions et interactions qui régissent le fonctionnement de ces écosystèmes. C'est pourquoi, pour répondre aux trois objectifs opérationnels de mon travail de thèse, j'ai non seulement

mis en œuvre des études et des expérimentations en plantations forestières, mais également des expérimentations en laboratoire ayant pour objectif commun de mieux caractériser et quantifier l'altération de la phase minérale au sein de la rhizosphère.

Dans le but d'évaluer l'impact de la rhizosphère d'arbres sur la dynamique du potassium dans un sol, j'ai réalisé une étude en forêt sur un site proche de Bure en Champagne - Ardennes (Axe 1). Parallèlement à ce travail, j'ai contribué à une étude en forêt sur le site atelier de Breuil en Bourgogne dont l'enjeu était de comparer le niveau d'altération de la fraction argileuse dans le sol global et la rhizosphère d'arbres (Axe 1). Cette étude permettait également de comparer différentes essences et de corréler les données minéralogiques au fonctionnement physico-chimique d'une essence (Axe 2). Afin de quantifier le degré d'altération de minéraux-tests placés dans le sol en présence ou en l'absence de racines (Axe 1), j'ai contribué à un projet en forêt sur le site atelier de Fougères en Bretagne utilisant une approche expérimentale *in situ* : les minéraux-test. Cette expérimentation permettait également de tester l'impact du niveau de fertilisation sur le processus d'altération (Axe 3).

Dans le cadre de nos recherches sur le rôle des microorganismes de sols forestiers dans l'altération des minéraux, j'ai plus particulièrement analysé l'impact du compartiment d'origine des souches microbiennes et l'effet de l'essence forestière sur le potentiel d'altération des microorganismes (Axe 5).

Enfin, dans le but de déterminer la part respective des différents partenaires biologiques de la rhizosphère dans le processus d'altération des minéraux (Axe 6), j'ai mis en place des expérimentations en laboratoire de type colonnes. Ces expériences m'ont permis de tester, en outre, l'impact de différents facteurs comme la richesse en nutriments de la solution (Axe 7) et la présence d'éléments toxiques dans la solution (Axe 8), sur la fonction "altération" et l'activité des microorganismes.

**CHAPITRE II :**  
**IMPACT DE LA RHIZOSPHERE D'ARBRES SUR**  
**L'ALTERATION DES MINERAUX EN FORET**

## 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

---

Les deux sites d'interactions privilégiées entre les plantes, les microorganismes et les minéraux du sol sont la litière et la rhizosphère, où les microorganismes sont stimulés par les apports de carbone et d'énergie d'origine végétale (Rouatt *et al.*, 1963 ; Rovira, 1965). De ce fait, la rhizosphère peut être considérée comme un condensé des processus physiques, chimiques et biologiques qui régissent le fonctionnement des sols (Jaillard et Hinsinger, 1993). De nombreux travaux ont déjà clairement montré l'influence de l'activité rhizosphérique sur le sol et notamment dans les processus d'altération de la phase minérale (Spyridakis, 1967 ; Jackson et Voigt, 1971 ; Boyle et Voigt, 1973 ; Berthelin et Leyval, 1982 ; Callot *et al.*, 1982 ; Barber, 1984 ; Leyval et Berthelin, 1991 ; Hinsinger *et al.*, 1992 ; Bakker *et al.*, 2004). Cependant, la majorité de ces travaux porte sur des plantes agricoles et/ou est réalisée en laboratoire afin de s'affranchir de la complexité du fonctionnement des écosystèmes et de maximiser l'impact des racines sur le minéral en augmentant le rapport racine/sol (Mortland *et al.*, 1956 ; Youssef et Chino, 1987 ; Hinsinger *et al.*, 1993). Ainsi, la rhizosphère n'a été, jusqu'à présent, que très peu étudiée *in situ* dans les écosystèmes forestiers (Kelly et Mays, 1989 ; April et Keller, 1990 ; Clegg *et al.*, 1997 ; Gobran et Clegg, 1998 ; Gobran *et al.*, 2005 ; Séguin *et al.*, 2005). Or, des études réalisées sur la cinétique de dissolution des minéraux ont mis en évidence une forte discordance entre les expériences en conditions contrôlées et les études *in situ* (Paces, 1983 ; Brantley, 1992 ; Swoboda-Colberg et Drever, 1992 ; Velbel, 1993, White et Brantley, 2003) qui peuvent s'expliquer par (i) le vieillissement des surfaces minérales dans la zone altérée due à la diminution de sites réactifs de surface avec le temps (White, 1995), (ii) l'incertitude sur les mesures de la surface en contact avec la solution dans les conditions *in situ* (White, 1995 ; Swoboda-Colberg et Drever, 1992), (iii) les contacts imparfaits entre les minéraux du sol et la solution percolante (Swoboda-Colberg et Drever, 1992), (iv) les solutions naturelles plus complexes qui modifient les équilibres solide – solution (Amrhein et Suarez, 1992) (v) les effets inhibiteurs de l'aluminium dissous (Chou et Wollast, 1985 ; Swoboda-Colberg et Drever, 1992 ; Oelkers *et al.*, 1994) et (vi) l'hétérogénéité du sol 'naturel'.

C'est pourquoi cette partie de notre travail a pour objectif de quantifier l'impact de la rhizosphère sur l'altération de la phase minérale et la dynamique des éléments minéraux

dans les sols en forêt. De plus, dans le contexte des études de sûreté à long terme concernant un stockage géologique profond des déchets nucléaires de haute activité et à vie longue, en formation argileuse, l'Andra a pour objectif de mieux comprendre la mobilité, dans les sols forestiers, d'un élément tel que le césium. Compte tenu du comportement physico-chimique voisin entre césium et potassium, mieux connaître le comportement du potassium dans les sols forestiers et en particulier dans la rhizosphère des arbres devrait permettre d'évaluer les risques d'un stockage souterrain en sous-sol forestier de déchets riches en césium.

Dans ce cadre, l'une de nos études a porté spécifiquement sur l'impact de la rhizosphère sur la dynamique du potassium dans un sol forestier.

## **2. ETUDES ET EXPERIMENTATIONS MISES EN ŒUVRE**

---

Pour répondre à ces objectifs, trois études en forêt ont été mises en œuvre. La première visait à déterminer les propriétés physico-chimiques du sol global et de la rhizosphère sur un site forestier proche de Bure (Haute-Marne). La deuxième avait pour but de caractériser les propriétés minéralogiques et chimiques des argiles du sol global et de la rhizosphère sur le site forestier de Breuil (Bourgogne). La troisième a consisté en la quantification de l'altération de minéraux-test dans le sol global et la rhizosphère sur le site forestier de Fougères (Bretagne).

## **3. RESULTATS**

---

### **3.1 Propriétés physico-chimiques du sol global et de la rhizosphère d'arbres (site de Bure)**

Afin de répondre au questionnement de l'Andra sur la dynamique du césium dans les sols forestiers, cette étude consiste à comparer la dynamique du potassium dans le sol global et dans la rhizosphère dans un écosystème forestier proche du site de Bure (Haute-Marne).

Cette étude a bénéficié des acquis obtenus par l'unité INRA "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers" sur différents sites ateliers, qui ont permis la validation d'un modèle conceptuel à flux et à compartiments de la dynamique des éléments minéraux dans les sols forestiers. Nous avons utilisé ce modèle afin de mieux comprendre la mobilité, dans la rhizosphère des arbres forestiers, d'un élément comme le potassium et d'aborder la question de la dynamique du césium par analogie de comportement.

### **Matériel et méthodes**

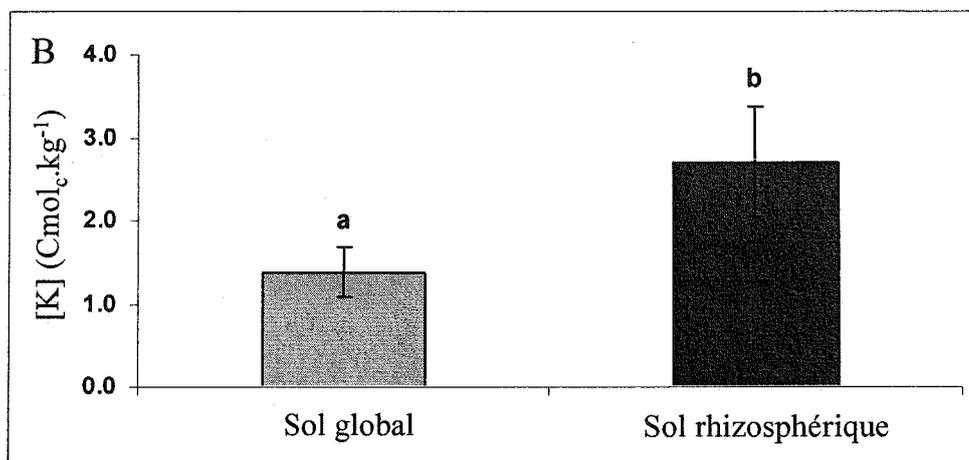
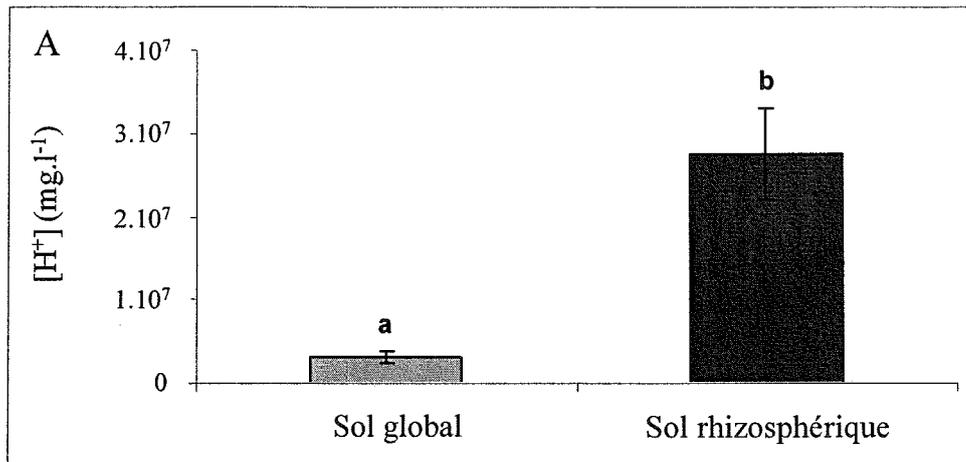
- Choix du site d'échantillonnage

Le choix s'est porté sur un site forestier proche de Bure où se trouve le laboratoire de recherche souterrain de Meuse/Haute-Marne. Une étude préliminaire de la carte pédologique du site de Meuse-Haute-Marne (Bure) et une visite sur ce site nous ont permis de sélectionner une zone appropriée à notre étude, à savoir des sols bruns calcaires marmorisés localement hydromorphes (Maillant, 2003) sous forêt. Ces sols à humus peu épais et développés sous des hêtres centenaires, présentent une structure grumeleuse et contiennent des cailloux calcaires.

- Analyses et préparation des échantillons de sols global et rhizosphérique

Un échantillonnage systématique pour les différents compartiments de sol (rhizosphérique et global), a été effectué en 10 points distants de quelques mètres. L'ensemble des racines de diamètre inférieur à 2 mm a été prélevé manuellement, après avoir brisé tous les agrégats de sol supérieurs à 1 cm. Après tri des racines, le sol restant sur la bêche a été échantillonné et séché durant une semaine dans une étuve ventilée à 30°C. Ce sol a été appelé G (pour sol global). Les racines ont également été séchées durant une semaine dans une étuve ventilée à 30°C. Le sol se détachant spontanément des racines après séchage a été nommé R (pour sol rhizosphérique). Afin d'éliminer les débris de racines dans les échantillons et de comparer des échantillons de granulométrie identique, les sols (G et R) ont été tamisés à 200 µm sur tamis inox (type AFNOR NFX 11504). Les échantillons de granulométrie inférieure à 200 µm ont été séchés durant trois jours à 30°C puis 300 mg de sol ont été introduits dans des tubes de centrifugation pour effectuer les extractions par NH<sub>4</sub>Cl 1N permettant l'extraction du potassium (cf. protocole en annexe 4). Ce dosage a été effectué par spectrométrie d'émission ICP-AES

Figure II.1: Concentration en protons (A) et en potassium (B) dans le sol global et la rhizosphère d'un site forestier proche de Bure. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme représente la moyenne de 10 répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) (compartiment du sol) et le test de Bonferroni-Dunn.



(torche à plasma JY180 ULTRACE). Le  $\text{pH}_{\text{eau}}$  a été mesuré dans la suspension de sol en utilisant le pH mètre Mettler TSDL25 (norme NF ISO 10390).

- Analyses statistiques

L'effet du compartiment d'origine du sol (rhizosphère ou global) sur les concentrations en protons et en potassium des sols a été déterminé en utilisant des analyses de variance (ANOVA) à un facteur (compartiment) à un seuil de  $P = 0.05$  et le test de Bonferroni-Dunn. Le logiciel Superanova a été utilisé pour toutes les analyses.

### Résultats

La quantité de protons extraite à l'eau des sols est significativement plus importante dans la rhizosphère du hêtre comparativement au sol global. Les pH restent toutefois proches de la neutralité : 6.56 pour le sol rhizosphérique et 7.52 pour le sol global (Figure II.1A). La quantité de potassium échangeable est deux fois plus importante dans le sol rhizosphérique comparativement au sol global, respectivement 2.71 et 1.38  $\text{cmol}_c.\text{kg}^{-1}$  (centimole de charge par kilogramme de sol sec) (Figure II.1B).

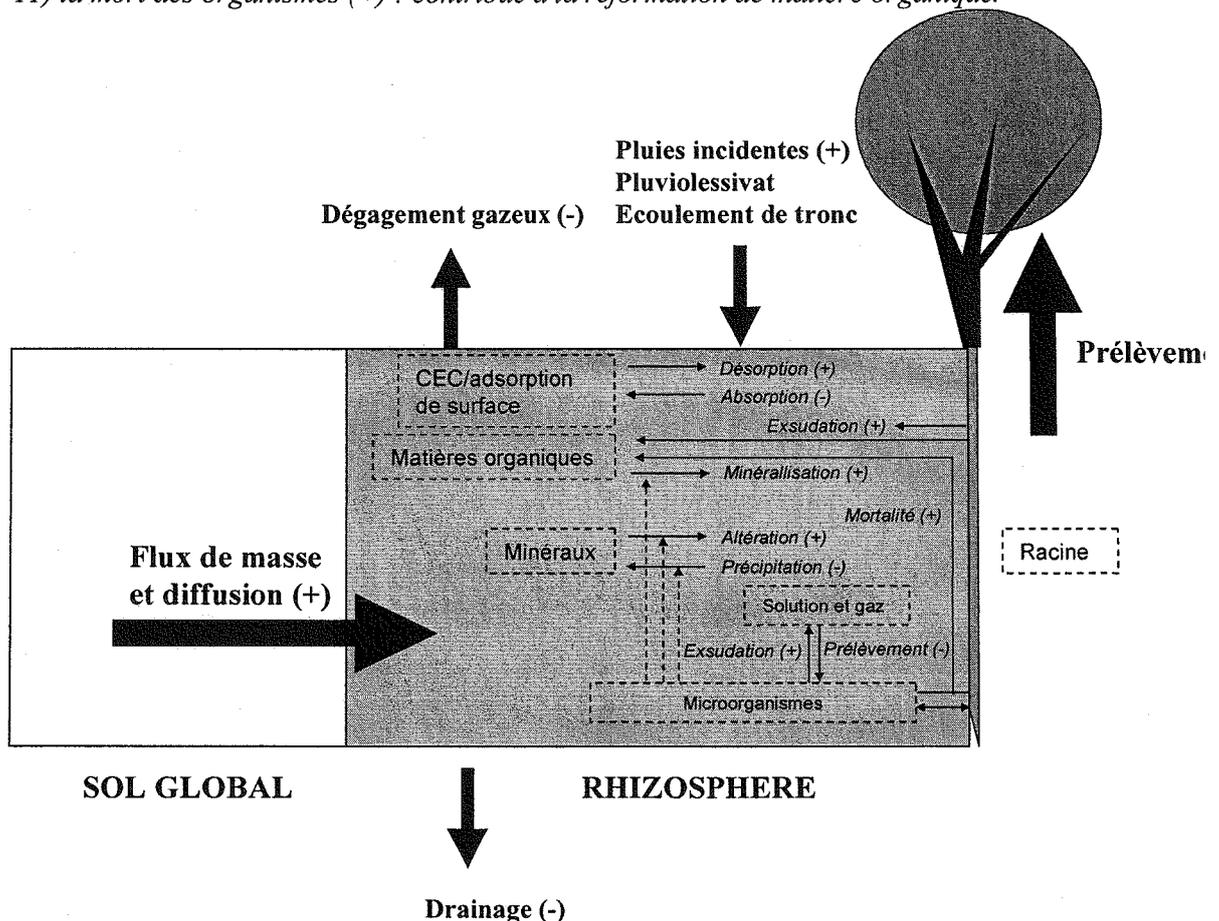
### Interprétation et discussion des résultats

La baisse de pH que nous avons observée dans la rhizosphère est liée à l'activité des arbres forestiers et des microorganismes associés à leurs racines. Elle résulte de la production de  $\text{CO}_2$  par les racines et les microorganismes lors du processus de respiration qui joue un rôle majeur dans le contrôle du pH dans ces types de sol, de l'équilibre de charges qui s'établit au niveau des racines suite à l'absorption d'ions, et/ou de l'exsudation de composés acides par les racines et les microorganismes. Tous ces mécanismes ont déjà été décrits en détails dans les parties "altération biologique des minéraux" et "effet rhizosphère", présentés dans l'introduction générale de ce manuscrit. Le pH du sol rhizosphérique reste toutefois proche de la neutralité car il s'agit d'un sol calcaire dont le pouvoir tampon est élevé.

Les résultats obtenus sur le site de Bure montrent une accumulation de potassium sur la capacité d'échange cationique du sol rhizosphérique. Ces résultats obtenus dans un sol brun calcaire sous une hêtraie sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres écosystèmes forestiers développés sur des sols acides en climat boréal sous épicéa (Clegg et Gobran, 1997 ; Clegg *et al.*, 1997 ; Gobran et Clegg, 1998, Courchesnes *et al.*, 1998 ; Gobran *et al.*, 1999 ; Gobran *et al.*, 2005) et en climat tempéré sous épicéa,

Figure II.2: Modèle conceptuel, à compartiments et à flux, de la dynamique d'un élément minéral dans un sol forestier. Dans la rhizosphère, les différents compartiments du sol (matières organiques, minéraux, microorganismes, racine, solution et gaz) sont représentés par des encadrés en pointillés, les échanges d'éléments entre ces compartiments par des petites flèches et les 5 principaux flux d'éléments minéraux dans un sol (flux de masse, pluie incidente, prélèvement, drainage et dégagement gazeux) par des flèches larges. Les signes entre parenthèses correspondent à l'apport (+) ou à la perte (-) de l'élément dans la solution de sol rhizosphérique.

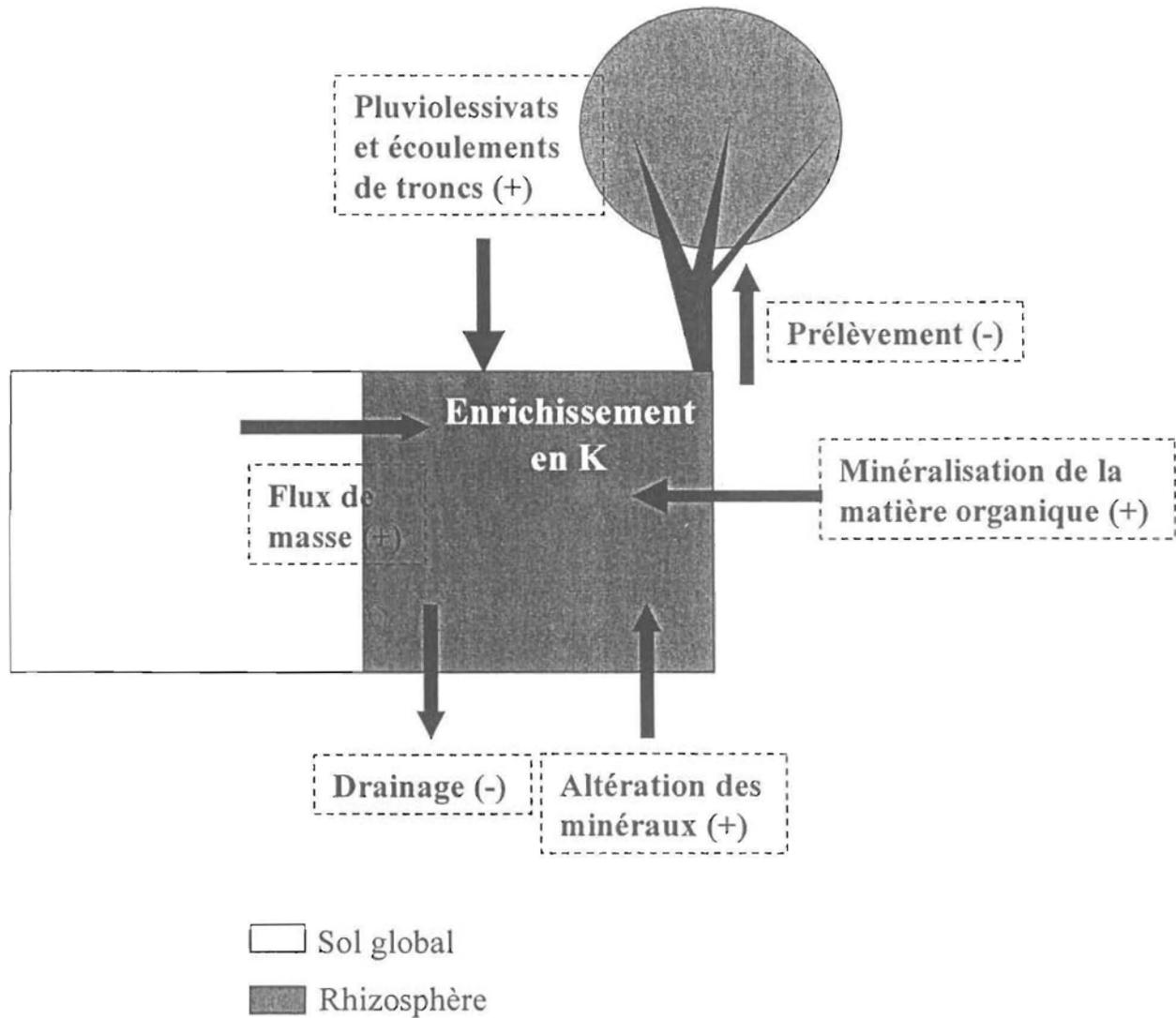
- 1) le flux de masse et la diffusion (+) : la plante, en quête d'eau et de nutriments, agit comme une pompe et puise la solution du sol par l'intermédiaire des ses racines. Ce flux convectif d'eau et d'éléments, appelé flux de masse, est lié à la transpiration des arbres. Le flux de diffusion correspond à un transfert passif d'un élément d'un point de concentration plus élevé vers un point de concentration plus faible.
- 2) les pluies incidentes (+) : l'eau de pluie se charge en éléments minéraux en traversant la canopée et en ruisselant le long des troncs.
- 3) le prélèvement (-) : la plante, absorbe la solution du sol et les éléments qu'elle contient dans le volume de sol prospecté. Cependant, en fonction de ses besoins métaboliques, la plante absorbe sélectivement les éléments. Les microorganismes absorbent également les éléments.
- 4) le drainage (-) : la solution du sol rhizosphérique percole et se trouve évacuée du système.
- 5) le dégagement gazeux (-) : des réactions (respiration, dénitrification, ...) provoquent le dégagement de certains éléments sous forme de gaz.
- 6) l'échange d'ions à la surface de la matière organique et des minéraux avec des phénomènes d'adsorptions (-) et de désorptions (+) en fonction des conditions physico-chimiques régnant.
- 7) la minéralisation de la matière organique (+) : libération d'éléments par voie chimique et biologique (microorganismes).
- 8) l'altération des minéraux (+) : libération d'éléments par voie chimique et biologique (plante et microorganismes) à partir des réserves inaltérées.
- 9) la précipitation de minéraux (-) : formation de minéraux à partir d'éléments en solution.
- 10) l'exsudation par la plante et les microorganismes d'éléments (+).
- 11) la mort des organismes (+) : contribue à la reformation de matière organique.



chêne, Douglas et hêtre (Turpault *et al.*, 2005 ; Turpault *et al.*, données non publiées). Ces observations pourraient résulter d'une colonisation préférentielle des zones de sols riches en potassium par les racines comme le suggère Schöttelndreier et Falkengren-Grerup (1999). Cependant, Turpault *et al.* (données non publiées) ont montré que cette accumulation de potassium dans la rhizosphère des arbres forestiers se produit même sur un sol homogénéisé, *i.e.* sol mélangé afin d'éliminer les hétérogénéités de composition. Ces observations impliquent que cet enrichissement en potassium échangeable de la rhizosphère, observé quels que soient le sol, l'essence et le climat, serait bien dû à l'activité des racines et des microorganismes associés.

L'enrichissement de la rhizosphère des arbres en potassium implique également que la diffusion, qui est le principal mécanisme de transfert du potassium à l'interface sol - racine dans les écosystèmes agricoles (80% ; Barber, 1984), n'est pas le processus dominant dans les écosystèmes forestiers étudiés. En effet, le flux de déplacement d'un élément par diffusion ne peut s'effectuer que d'un point de concentration plus élevé vers un point de concentration plus faible (loi de Fick). Ainsi, au vu de nos résultats, il semble que le mécanisme principal de transfert de potassium du sol vers les racines dans les écosystèmes soit le flux de masse, *i.e.* flux convectif d'eau et de nutriments du sol vers la surface des racines, lié à la transpiration des arbres, dans un système où la solution est relativement riche en potassium. En considérant le modèle conceptuel de la dynamique d'un élément minéral dans un sol forestier défini à partir des données issues des différents sites forestiers étudiés en climat boréal et tempéré (Figure II.2), l'enrichissement de la rhizosphère des arbres forestiers pourrait s'expliquer par un bilan positif entre les flux de potassium entrants et sortants de la rhizosphère. Ainsi, dans les écosystèmes forestiers le transfert de potassium dans la rhizosphère principalement par flux de masse, issu de l'altération des minéraux et de la minéralisation de la matière organique, serait supérieur au flux lié au prélèvement de cet élément par les racines. Il est important de préciser que les écosystèmes forestiers sont caractérisés par un recyclage considérable du potassium par le biais des pluviolessivats et des écoulements de tronc. Les mesures effectuées sur le site de Breuil montrent que les pluies traversant le feuillage et ruisselant le long des troncs de hêtre s'enrichissent considérablement en potassium : 0.25 à 2 mg.l<sup>-1</sup>. Dambrine *et al.* (1998) ont montré que, dans un peuplement d'épicéa, la majeure partie du potassium présent dans les pluviolessivats résultait du phénomène de récrétion, c'est-à-dire la mise en solution d'éléments minéraux à partir de tissus végétaux par dissolution et échange d'ions. Ce potassium très soluble doit

Figure II.3: Représentation schématique de la dynamique du potassium dans la rhizosphère d'un arbre forestier.



participer largement au flux de masse. En conséquence, la solution de sol rhizosphérique s'enrichirait en potassium (bilan flux entrants - flux sortants positif) qui se fixerait alors sur la capacité d'échange cationique des minéraux de la rhizosphère (Figure II.3). Ces observations sont confirmées par les analyses de la composition des solutions de plusieurs sols forestiers qui mettent en évidence une concentration en potassium plus forte dans la solution de sol rhizosphérique comparativement à celle du sol global (Turpault *et al.*, 2005).

Ces résultats suggèrent qu'un élément comme le césium, analogue du potassium pourrait s'accumuler dans la rhizosphère des arbres. Ce résultat sera discuté dans la partie consacrée à la problématique Andra, présentée dans le chapitre "discussion générale".

### **3.2 Evolution des minéraux dans le sol global et la rhizosphère d'arbres (site de Breuil)**

Etant donné le faible nombre de données sur l'évolution des minéraux dans la rhizosphère d'arbres forestiers, nous avons entrepris une étude sur le site-atelier de Breuil dans l'objectif de comparer qualitativement et quantitativement, l'évolution chimique et minéralogique des argiles du sol global et de la rhizosphère. Afin de déterminer si cet effet rhizosphère est généralisable sur des essences à fonctionnements nutritionnels contrastés, nous avons choisi d'étudier le chêne, qui est développé sur un sol contenant de l'azote principalement sous forme nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) et l'épicéa, qui est développé sur un sol contenant de l'azote très majoritairement sous forme ammoniacale ( $\text{NH}_4^+$ ). (Colin-Belgrand, 2003).

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Louis Mareschal, étudiant en thèse de l'unité INRA "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", dont le thème de recherche est l'impact des essences forestières sur l'altération des minéraux du site de Breuil.

**Article : Rapid clay weathering in the rhizosphere of different tree species in an acid forest ecosystem.**

Calvaruso Christophe<sup>1</sup>, Mareschal Louis<sup>1</sup>, Turpault Marie-Pierre<sup>1,\*</sup>, Leclerc Elisabeth<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> INRA, UR 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

<sup>2</sup> ANDRA, Direction Scientifique/Service Transferts, 92298 Châtenay-Malabry, France

*En préparation*

### Résumé

La source majeure de nutriments des arbres dans les écosystèmes forestiers réside dans les éléments libérés par l'altération des minéraux du sol. De nombreux tests *in vitro* ont déjà démontré la capacité des plantes et des microorganismes (champignons et bactéries) à augmenter l'altération des minéraux. En complément, des études en forêt ont montré que la rhizosphère des arbres possède des propriétés physico-chimiques et biologiques très différentes de celles du sol global du fait de l'activité des racines, des bactéries et des champignons (prélèvement, équilibre de charge, exsudation, respiration). L'effet de la rhizosphère sur l'évolution des minéraux présents dans les sols forestiers ayant été très peu abordé, nous avons entrepris de déterminer l'impact des racines d'arbres et des microorganismes sur les propriétés physico-chimiques, chimiques et minéralogiques du sol d'une plantation forestière (site de Breuil, Morvan en France) développé sur un sol acide. Dans ce but, nous avons comparé les sols globaux et rhizosphériques dans trois horizons de sol distincts (0-3 cm; 3-10 cm; 10-23 cm), à partir d'un échantillonnage portant sur 18 à 20 points.

Les analyses physico-chimiques, chimiques et minéralogiques de sol ont été réalisées pour deux essences : le chêne sessile (*Quercus petraea*) et l'épicéa (*Piceas abies*). Sur la fraction de sol inférieure à 200  $\mu\text{m}$ , le pH et le rapport K/CEC ont été mesurés. Sur la fraction argileuse (< 2  $\mu\text{m}$ ), les analyses totales, les extractions sélectives d'aluminium par citrate de sodium à chaud et du fer par citrate - bicarbonate - dithionite ont été entreprises et la composition minéralogique a été étudiée par diffraction de rayons X. Afin de quantifier l'altération des argiles, la méthode du bilan iso-zirconium d'altération chimique a été appliquée.

Les différents résultats obtenus dans cette étude à partir des analyses physico-chimiques, des extractions sélectives, des analyses chimiques totales, des analyses de diffraction de rayons X et du bilan iso-zirconium d'altération chimique, convergent et mettent en évidence des processus de dissolution et de transformation des minéraux argileux plus marqués dans la rhizosphère des deux essences étudiées par rapport aux sols globaux respectifs. Ces observations peuvent être expliquées par l'activité des racines et des microorganismes associés, notamment la production de composés altérants et le prélèvement racinaire. Nos résultats soulignent également que cet effet de la rhizosphère sur l'évolution des argiles se produit sous des essences à fonctionnements contrastés, à savoir l'épicéa qui exude une grande quantité de protons dans la rhizosphère pour compenser l'absorption massive d'ions  $\text{NH}_4^+$  et le chêne qui acidifie nettement moins la rhizosphère. Cette dernière observation suggère l'implication de mécanismes d'altération différents en fonction de l'essence forestière.

**Mots-clés:** arbres forestiers, minéralogie, phyllosilicates, physico-chimie, quantification du bilan d'altération, rhizosphère.

### **Abstract**

The elements released during the soil mineral weathering remain the primary nutrient source of trees in the forest ecosystems. Numerous tests *in vitro* have already shown the capacity of plants and microorganisms (fungus and bacteria) to increase mineral weathering. Furthermore, forest studies have shown that the rhizosphere of trees possesses physicochemical and biological properties very different from those of the bulk soil due to the activity of roots, bacteria and fungi (uptake, charge balance, exudation and respiration). The effect of the rhizosphere on the evolution of minerals present in the forest soils having been little studied, we have strived to determine the impact of tree roots and microorganisms on the soil chemical and mineralogical properties in a forest stand (site of Breuil, Morvan in France) developed on an acidic soil. For this purpose, we have compared the bulk and rhizosphere soils in three distinct soil horizons (0 to 3, 3 to 10 and 10 to 23 cm), from samples taken from 18 to 20 points. Soil chemical and mineralogical analyses have been realised for two species: the oak (*Quercus petraea*) and the Norway spruce (*Piceas abies*). On the soil fraction inferior to 200  $\mu\text{m}$ , the pH was measured. On the clay fraction ( $< 2 \mu\text{m}$ ), total analyses, selective extractions of aluminium by hot Na-citrate and iron by dithionite-citrate-bicarbonate were realised and the mineralogical composition was assessed by X-ray diffraction. In

order to quantify clay mineral weathering, the isozirconium chemical weathering balance method was used.

The results obtained in this study from the selective extractions, total chemical analyses, X-ray diffraction and isozirconium chemical weathering balance converge and underline dissolution and transformation processes of the clay minerals more important in the rhizosphere for the two species studied compared to those of the bulk soil. These observations could be explained by root and associated microorganism activity, notably the production of weathering agents and the root uptake. Our results equally show that this rhizosphere effect on the clay evolution under species possessing contrasting functioning, *i.e.* the Norway spruce which exudes a great quantity of protons in the rhizosphere to balance massive absorption of  $\text{NH}_4^+$  and the oak which doesn't acidify its rhizosphere. This last observation suggests the existence of different weathering mechanisms depending on the forest tree species.

**Key-words:** forest trees, mineralogy, phyllosilicates, physicochemistry, rhizosphere, weathering budget quantification.

## **Introduction**

The soil serves as a water and nutrient reserve from which organisms can draw, as well as a support into which the plants may grow. Furthermore, root development is linked to soil properties (Barber, 1984) and conversely, root growth modifies the soil properties, making the soil a particularly heterogeneous environment (Marschner, 1995). The biological and physicochemical properties existing at the soil-root interface differ in many aspects from those existing at a distance from the roots (Angers and Caron, 1998; Hinsinger, 2005; Gregory, 2006) due to the penetration, respiration, absorption (water and nutrients) and exudation (protons, mineral ions, organic and complexing acid compounds) of the roots. Darrah (1993) called this zone of soil affected by the roots, the rhizosphere, and the root-free material surrounding the rhizosphere soil, the bulk soil. The conditions existing in the rhizosphere stimulate bacterial and fungal activities and particularly the release of microbial organic and complexing compounds. The vast majority of trees, notably, in temperate and boreal forest ecosystems, are associated with symbiotic fungi which form a connection between tree roots and the soil environment *via* a broad network of hyphae. This network contributes to plant nutrition by carrying water and the nutrients they released

by weathering the primary minerals, far away from the roots and very small pores, (Landeweert *et al.*, 2001). These soil modifications induced by the roots and their associated microorganisms play a key-role in the mineral weathering processes (Kelly *et al.*, 1998; Welch *et al.*, 1999; Van Breemen *et al.*, 2000) and element mobility in the soil (Mengel and Kirkby, 1987; Jones *et al.*, 2003) particularly in forest ecosystems (April and Keller, 1990; Tice *et al.*, 1996; Gobran *et al.*, 1998; Nordborg and Olsson, 1999), and make the nutrients from the minerals more accessible to the plants (Ochs *et al.*, 1993; Grayston *et al.*, 1996; Dakora and Phillips, 2002). In an experimental forest, Bormann *et al.* (1998) demonstrated that red pine (*Pinus resinosa*) plants improved the quantities of calcium and magnesium released by the weathering of primary minerals in a forest soil by factors of 2.4 and 1.8 respectively.

However, only a few studies have determined the impact of the forest-tree rhizosphere, which is the most reactive soil fraction because of its large specific surface, on clay mineral evolution. For example, Courchesnes and Gobran (1997), who studied the effect of the rhizosphere of Norway spruce on the clay mineralogy, demonstrated that the rhizosphere soil contained lower amounts of amphibole and expandable phyllosilicates than the bulk soil. Furthermore, the relationship between mineral evolution in the rhizosphere of mature trees in the forest and the quantitative mobility of nutrients was not established.

The first aim of this study was to determine the clay evolution and the clay mineral weathering rates in the bulk soil and in the rhizosphere under two tree species in a temperate forest ecosystem, Norway spruce and oak. To achieve this, we associated different methods: X-Ray Diffraction, total analyses, selective extractions and the iso-zirconium chemical weathering budget method. The latter method consists of determining the quantitative losses or gains of an element (Si, Fe, Al, Mg, K,...) by normalizing concentrations to that of an invariant element such as Zr (Chadwick *et al.*, 1990; Bain *et al.*, 1994), considered to be unaffected by weathering processes. The second aim consisted of determining possible correlations between the clay mineral weathering rate and tree function, *i.e.* its effect on the soil properties, by comparing clay mineralogical and soil physicochemical data.

*Table II.1: Physicochemical characteristics of the soil from the native forest stand in the experimental forest site of Breuil (central France), at three different depths (Turpault et al., in preparation).*

Depth (cm)	pH (water)	Particle size distribution				C ‰	N ‰	Exchangeable cations			CEC cmol <sub>c</sub> .kg <sup>-1</sup>	S/T
		% mineral Clay	Fine Silt	Coarse Silt	Fine Sand			cmol <sub>c</sub> . kg <sup>-1</sup> Fine Earth	Ca	Mg		
0-8	4.3	16	10	5	5	7.9	n.d.	0	0.5	0.3	12.2	7.7
10-18	4.6	13	19	7	8	1.2	n.d.	0	0.3	0.2	10.5	5
20-28	4.7	14	18	6	7	0.9	n.d.	0	0.2	0.1	8.9	3.5

## Materials and methods

- Site description

The soil samples were collected from the Breuil-Chenue experimental forest site established in 1976 and located in the Morvan (47°18'N, 4°5'E, France). The forest is situated on a shelf at an altitude of 638 m, on a slight, north-west facing slope. Mean annual air temperature is 9°C and the annual precipitation averages 1280 mm.yr<sup>-1</sup>. The native forest was clear-felled and replaced by monospecific plantations distributed in plots of 10 ares of different species (oak, beech, Norway spruce and Douglas-fir). The soil is classified as a "Typic dystrochrept" (USDA, 1994), developed on a thin layer of loamy deposits covering the "Pierre qui Vire" granite (Seddoh, 1973). It has a sandy texture (60% sands), is desaturated with a saturation rate of 5 to 15% depending on the soil horizon and has a pH of about 4 (Table II.1). The humus form is a moder in the native forest.

- Soil sampling

In this study, we compared soil samples taken under two adjacent stands of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) and oak (*Quercus sessiflora* Smith). After removing the forest floor, systematic soil sampling was carried out in June at three depths (0-3, 3-10 and 10-23 cm) in 18 (Norway spruce) and 20 (oak) calibrated pits (80 x 35 cm) distributed throughout each plantation plot. On site, roots with diameters less than 2 mm were removed carefully by hand. Root free soil fractions were collected and immediately air-dried to give the bulk soil fraction (B). Roots with adhering soil aggregates < 1 cm were dried immediately in a steam-air dryer at 30°C. The soil fraction that came off spontaneously from the roots after drying was collected to give the rhizosphere soil sample (R). After soil removal, the collected roots were weighed. In order to exclude the root debris and to compare samples with the same particle size distribution, the bulk and rhizosphere soils were sieved at 200 µm. The pH<sub>water</sub> of these soil samples with diameter less than 200 µm was measured in a soil suspension using a Mettler TSDL25. Given the cost and preparation time of each soil sample for the mineralogical analyses, a composite soil sample was made from the individual samples (0-200 µm) for each species, compartment and layer. Thus, 12 soil samples were treated: 2 species (Norway spruce and oak) x 2 compartments (B and R) x 3 depths (0-3, 3-10 and 10-23 cm). After organic matter removal by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dispersion with NaOH,

the clay (< 2 µm) and fine silt (2-20 µm) fractions of the 12 composite samples were separated by sedimentation. The coarse silt (20-50 µm) and fine sand (50-200 µm) were subsequently isolated by wet sieving in order to establish the particle size distribution.

- Analyses on the 0-2 µm fraction (clay fraction)

#### *Chemical analyses*

The sub-samples of 0-2 µm fractions were treated with Na-citrate at 100°C (Tamura, 1958) and by dithionite-citrate-bicarbonate (Mehra and Jackson, 1960). The Al and Fe extracted by hot Na-citrate ( $Al_2O_{3(c)}$  and  $Fe_2O_{3(c)}$ ) and by dithionite-citrate-bicarbonate ( $Al_2O_{3(d)}$  and  $Fe_2O_{3(d)}$ ) were analysed by Inductively Coupled Plasma spectrometry (ICP-AES; JY180 ULTRACE). The total chemical analyses of the 12 soil samples were carried out after Ba-saturation by Inductively Coupled Plasma spectrometry (ICP-AES) for the major elements ( $SiO_{2tot} \pm 1\%$ ,  $Al_2O_{3tot} \pm 1\%$ ,  $Fe_2O_{3tot} \pm 2\%$ ,  $MgO_{tot} \pm 5\%$ ,  $K_2O_{tot} \pm 5\%$ ,...) and by Inductively Coupled Plasma spectrometry (ICP-MS) for trace elements ( $Zr_{tot} \pm 8\%$ ,...), after using  $LiBO_2$  and dissolution by  $HNO_3$ . These total chemical analyses were recalculated in order to consider the residual organic carbon, measured by elementary analyser CHN Thermoquest NCS 2500, remaining in the soil samples after organic matter destruction.

The iso-zirconium chemical weathering budget method was used to estimate the element release rate. Usually, the weathering balance with iso-zirconium method is used at the profile scale and allows one to compare a soil horizon with its reference (parent material). It is assumed that the original parent material is uniform; however, according to Green (1966), this assumption can have a large effect on the calculation of gains and losses. In our case, the clay fraction of the bulk soil was used as the reference and this concept was applied to the estimation and the comparison of the weathering intensity in both rhizosphere and bulk soil for the clay fraction. Zirconium (Zr) was chosen as the index element, rather than another invariant element like titanium (Ti), because Zr concentrations increased (like silicon) in the clay fraction towards the profile surface both in the rhizosphere and the bulk soil. The calculation of the latter is in accordance with the following modified formula from Busacca (1989):

$$\text{Percentage of elements lost} = 100 - [(X_r.S_b)/(X_b.S_r).100]$$

Where  $X_r$  is the concentration of the element of interest in the rhizosphere,  $X_b$  is the concentration of the same element in the bulk soil,  $S_r$  is the concentration of an index

Table II.2: Root densities and pH in the rhizosphere (R) and bulk soil (B), at three depths (0 to 3 cm, 3 to 10 cm and 10 to 23 cm) and for two species (Norway spruce and oak). Values represent the mean of 18 replicates for Norway spruce and 20 replicates for oak. After a one-factor (compartment of soil) ANOVA ( $P < 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test: the 0 to 3 cm horizon values with different letters (a or b), the 3 to 10 cm horizon values with different letters (A or B) and the 10 to 23 cm horizon values with different letters ( $\alpha$  or  $\beta$ ) are significantly different.

	Root densities (g.dm <sup>-3</sup> )		pH			
	Norway spruce	Oak	Norway spruce		Oak	
Depth (cm)	R	R	R	B	R	B
0 to 3	9.8	2.5	3.8 <sup>a</sup>	4.1 <sup>b</sup>	4.1 <sup>a</sup>	4.1 <sup>a</sup>
3 to 10	1.7	0.6	4.0 <sup>A</sup>	4.3 <sup>B</sup>	4.3 <sup>A</sup>	4.3 <sup>A</sup>
10 to 23	1.0	0.5	4.5 <sup><math>\alpha</math></sup>	4.7 <sup><math>\beta</math></sup>	4.7 <sup><math>\alpha</math></sup>	4.7 <sup><math>\alpha</math></sup>

element (Zr) in the rhizosphere while Sb is the concentration of that element in the bulk soil.

### *Mineralogical analyses*

X-ray diffraction (XRD) was carried out using a Siemens D5000 diffractometer, equipped with a graphite monochromator and selecting Cu K $\alpha$  radiation (30 mA/40 kV). Diffractograms were recorded using a DACO-MP recorder associated with a microcomputer using Diffrac AT software (Socabim). Clay fractions were analysed as oriented deposits on glass slides after Ca saturation, followed by ethylene glycol solvation (EG); and K saturation, followed or not by heating to 110, 220, 330, 440, 550°C before and after hot Na-citrate and dithionite-citrate-bicarbonate treatments, that is to say 288 diffractograms. The intensity ratios of 1.0 and 1.4 nm peaks saturated with Ca were calculated for the different clay samples. The peak intensity was measured after background removal.

The Student-Fischer test was used to establish significant differences between soil types at the 10% (\*) and 5% (\*\*) level (R and G) for SiO<sub>2tot</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3tot</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3tot</sub>, MgO<sub>tot</sub>, K<sub>2</sub>O<sub>tot</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3(c)</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3(c)</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3(d)</sub> and Fe<sub>2</sub>O<sub>3(d)</sub>.

## **Results**

- Root densities

The fine root densities measured in the Norway spruce and oak soils decreased with depth from about 10 in the surface horizon (0 to 3 cm) to 1 g. dm<sup>-3</sup> in the deepest horizon (10 to 23 cm) for the Norway spruce and from 2.5 in the surface horizon to 0.5 g. dm<sup>-3</sup> in the deepest horizon for the oak (Table II.2).

The fine root density was more higher in the Norway spruce soil in comparison with that of the oak at all depths and more particularly in the surface horizon where the values were about 3 times greater (Table II.2).

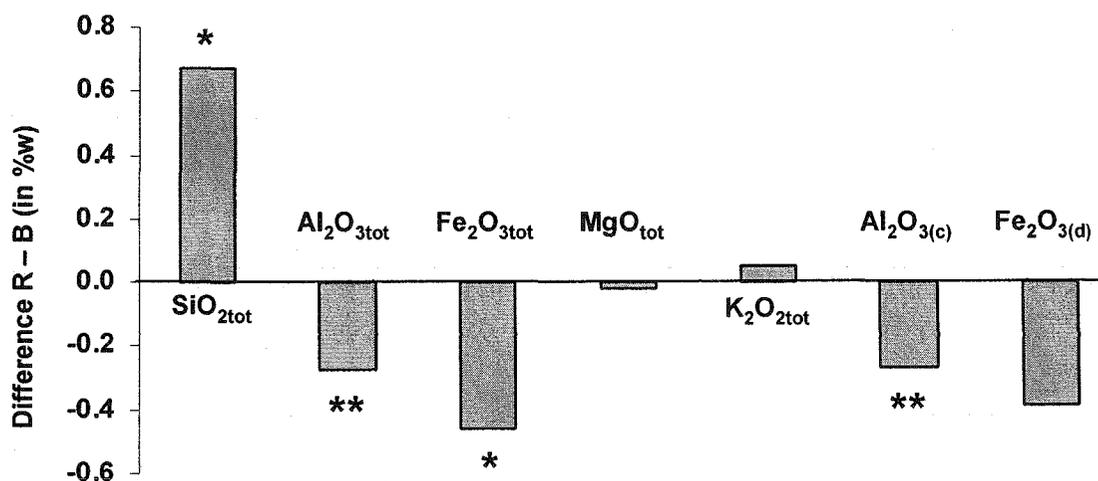
- Particle size distribution

The proportion of the clay-sized fraction (% mineral weight) in the rhizosphere of the 0 to 23 cm soil horizon was not different from that of the bulk soil, being 17.0 % and 17.2 % respectively for the Norway spruce, and, 19.2% and 19.6 respectively for the oak.

Table II.3: Results of total analyses obtained for the bulk soil (B) and the rhizosphere (R) clays sampled at three depths in oak and Norway spruce stands in the forest site of Breuil.

Tree Species	Soil compart.	Depth (cm)	Zr <sub>tot</sub> (ppm)	SiO <sub>2</sub> <sub>tot</sub> (% w.)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sub>tot</sub> (% w.)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sub>tot</sub> (% w.)	MgO <sub>tot</sub> (% w.)	K <sub>2</sub> O <sub>tot</sub> (% w.)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (c) (% w.)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (d) (% w.)
Oak	B	0-3	121	51.3	30.0	6.1	1.0	2.3	1.0	3.4
		3-10	112	48.9	30.7	7.6	1.1	2.2	1.7	4.8
		10-23	111	48.0	31.4	8.3	1.1	2.2	2.9	5.6
	R	0-3	136	52.1	29.7	5.6	1.0	2.4	0.9	3.0
		3-10	110	49.1	30.5	7.3	1.1	2.3	1.5	4.3
		10-23	110	48.2	31.4	8.2	1.1	2.2	2.6	5.4
N. spruce	B	0-3	138	51.8	28.3	6.3	1.1	2.4	1.0	3.6
		3-10	120	49.5	29.5	8.3	1.2	2.4	1.9	4.6
		10-23	123	48.1	30.3	9.1	1.2	2.3	3.1	5.9
	R	0-3	166	53.8	28.1	5.0	1.0	2.5	0.8	2.4
		3-10	121	49.8	29.1	7.9	1.2	2.4	1.6	4.6
		10-23	121	48.5	29.9	9.0	1.2	2.3	2.6	5.9

Figure II.4: Differences between the concentrations of an element in the rhizosphere (R) and in the bulk soil (B) clays in the forest site of Breuil. Histograms represent the mean value of six replicates (2 species and 3 depths). Values are significantly different according to a Student-Fischer analyse, respectively  $p = 0.05$  (\*\*) and  $p = 0.10$  (\*).



- pH of the 0-200  $\mu\text{m}$  soil fraction (Table II.2)

The pH was significantly lower in the rhizosphere in comparison with the bulk soil at all depths for the Norway spruce whereas there was no difference for the oak. A more acidic pH was observed in the surface horizon for both species. The pH was significantly lower in the Norway spruce rhizosphere compared to that of the oak at all depths.

- Chemical analyses of the clay fraction (Table II.3)

The percentage weights of  $\text{SiO}_{2\text{tot}}$  varied between 45 and 54% in the soil samples. Its concentrations decreased with depth and increased in the rhizosphere soil for both species. In contrast, for  $\text{Al}_2\text{O}_{3\text{tot}}$  (28.1 to 31.4%),  $\text{Fe}_2\text{O}_{3\text{tot}}$  (5 to 9.1%),  $\text{Al}_2\text{O}_{3(\text{c})}$  (0.8 to 3.1%) and  $\text{Fe}_2\text{O}_{3(\text{d})}$  (2.4 to 5.9%), the concentrations increased with depth and decreased in the rhizosphere soil for both species. Whatever the depth and the soil compartment,  $\text{K}_2\text{O}_{\text{tot}}$  and  $\text{MgO}_{\text{tot}}$  concentrations remained relatively stable, between 2.2 and 2.5% and 1.0 to 1.2%, respectively.

The results presented in Figure II.4 correspond to the average concentrations calculated from 6 samples for each soil compartment (2 species and 3 depths) of the differences between the concentration for one element in the rhizosphere and that of the same element in the bulk soil. A significant increase in the proportions of  $\text{SiO}_{2\text{tot}}$  ( $P = 0.10$ ) was observed in the rhizosphere clay. Conversely, significant decreases in the proportions of  $\text{Al}_2\text{O}_{3\text{tot}}$  ( $P = 0.05$ ),  $\text{Fe}_2\text{O}_{3\text{tot}}$  ( $P = 0.10$ ),  $\text{Al}_2\text{O}_{3(\text{c})}$  ( $P = 0.05$ ) were observed in the rhizosphere clay. The increase or decrease in the proportion of one element in the rhizosphere clay was always higher in the surface horizon for both species (Table II.3).

- Iso-zirconium chemical weathering budget

This method was only applied to the surface horizon, as the differences in Zr concentrations between bulk and rhizosphere clays obtained in deeper horizons fell into the  $\pm 8\%$  level of uncertainty of analyses. Element budgets calculated by this method underlined a loss of  $\text{SiO}_{2\text{tot}}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_{3\text{tot}}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_{3\text{tot}}$ ,  $\text{MgO}_{\text{tot}}$ ,  $\text{K}_2\text{O}_{\text{tot}}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_{3(\text{c})}$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_{3(\text{d})}$  in the rhizosphere of both species (Figure II.5). These losses varied as a function of the element considered: 7 to 13% for  $\text{K}_2\text{O}_{\text{tot}}$ , 10 to 14% for  $\text{SiO}_{2\text{tot}}$ , 12 to 18% for  $\text{Al}_2\text{O}_{3\text{tot}}$ ,

Figure II.5: Percentage of elements lost in the rhizosphere of the surface horizon for the two species calculated by the isoelement chemical weathering balance method. In white, oak and in grey, Norway spruce.

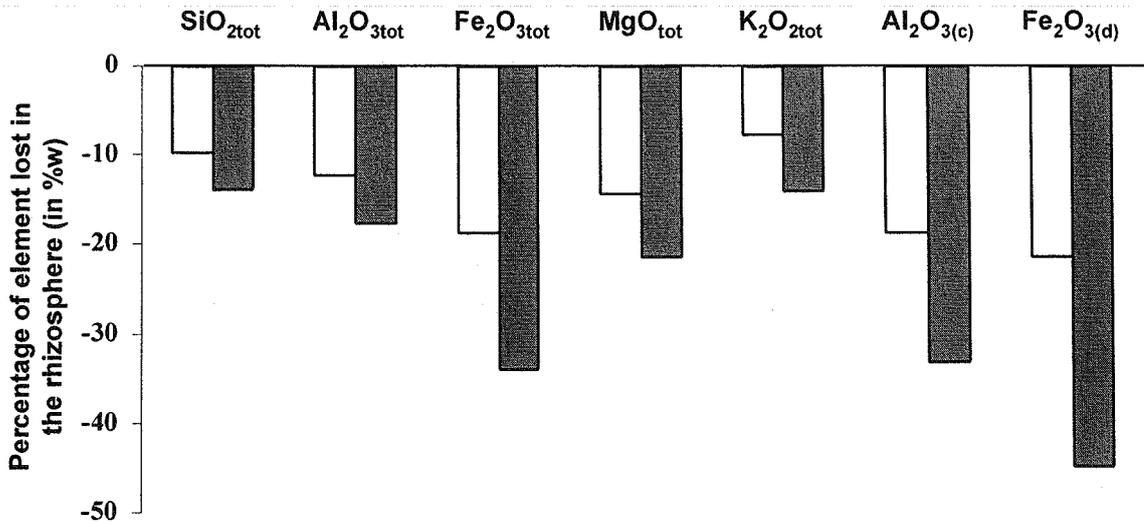
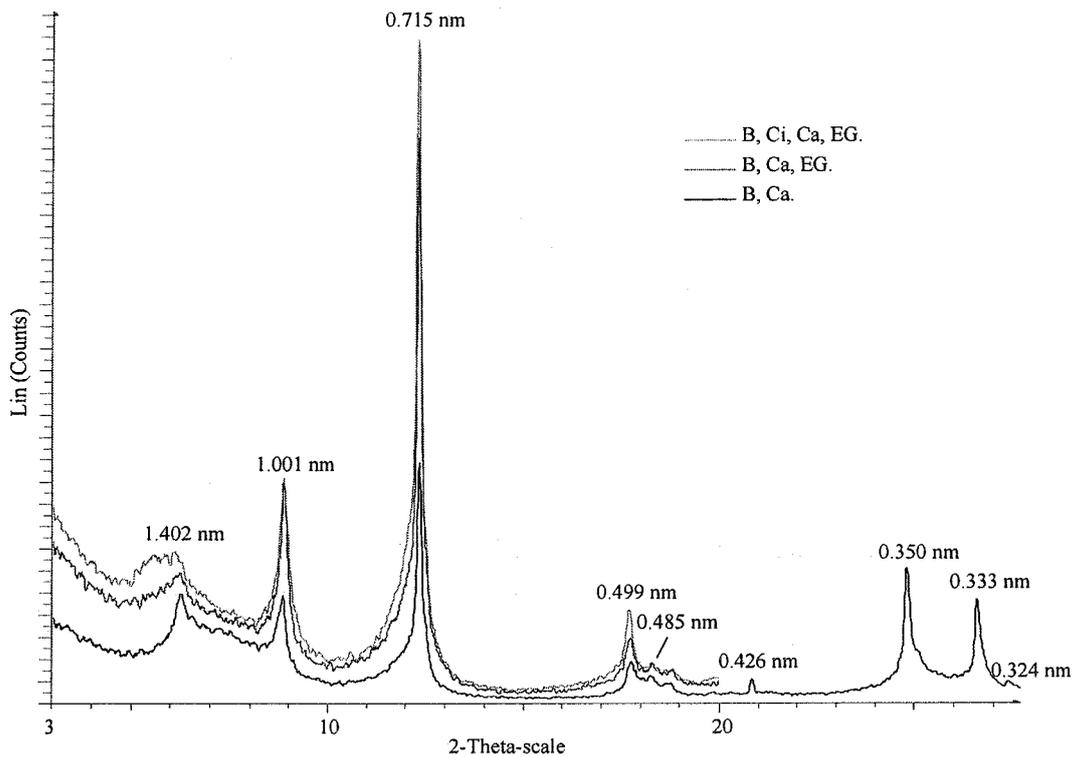


Figure II.6: XRD patterns of Ca saturated oriented bulk clays (B) in layer 1: (i) without pre-treatment (B, Ca), (ii) ethylene glycol solvated (B, Ca, EG), and (iii) ethylene glycol solvated and pre-treatment with citrate (B, Ci, Ca, EG).



14 to 22% for  $\text{MgO}_{\text{tot}}$ , 19 to 33 for  $\text{Al}_2\text{O}_{3(\text{e})}$ , 19 to 34% for  $\text{Fe}_2\text{O}_{3\text{tot}}$  and 21 to 46% for  $\text{Fe}_2\text{O}_{3(\text{d})}$ .

- XRD analyses of the clay fraction

#### *Identification of the different constituent minerals of the clay fraction*

From 288 XRD patterns, similar clay minerals were identified in the rhizosphere and the bulk soil under Norway spruce and oak.

XRD patterns of oriented Ca saturated samples exhibited peaks of mica (1.0, 0.5 and 0.333 nm), kaolinite (0.715 and 0.350 nm; the decrease in the 0.715 nm peak after K saturation and heating at 440°C was observed but not shown), gibbsite (0.484 nm; the disappearance of this peak after K saturation and heating at 330°C was observed but not shown), K-feldspar (0.323 nm) and quartz (0.426 and 0.333 nm) (Figure II.6).

The 1.4 nm peak corresponded to different minerals:

- chlorite was identified by the persistence of the 1.4 nm peak after K saturation and heating at 550°C (data not shown).
- smectite layers were identified by swelling after Ca saturation and EG solvation (Figure II.6).
- vermiculite was identified in layers 1 and 2 by the partial collapse of the 1.4 nm peak to 1.0 nm after K saturation without heating.
- hydroxy-interlayered phyllosilicate occurrence was shown by progressive collapse as temperatures increased (data not shown). The hydroxy-interlayered-smectite (HIS) was identified in layer 1 because swelling increased after Ca saturation, citrate pre-treatment and EG solvation but the swelling did not increase without citrate pre-treatment (Figure II.6). The hydroxy-interlayered-vermiculite (HIV) was identified by an increase in the intensity ratio of 1.0 and 1.4 nm peaks after citrate pre-treatment and K saturation but the intensity ratio of 1.0 and 1.4 nm peaks did not increase without citrate pre-treatment. This increase was present for all depths but was more marked in layer 3 (not shown).

The different treatments of the clay fraction demonstrated the presence of complex interstratified minerals (with micas, vermiculite, smectite, HIS and HIV layers) in the 6-8 2 $\theta$  scale region which were not studied in detail in this paper.

#### *Rhizosphere effect on the clay minerals*

Figure II.7: XRD patterns of Ca saturated oriented clay from oak rhizosphere (R, Ca) and bulk soil (B, Ca) in layer 1.

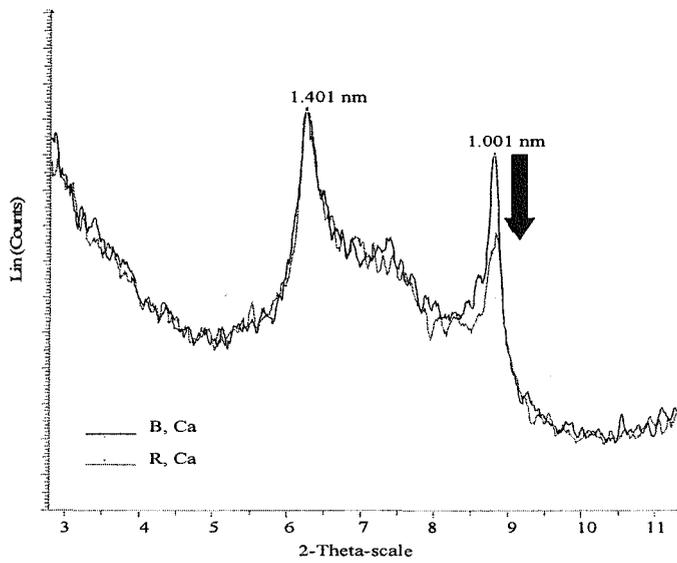
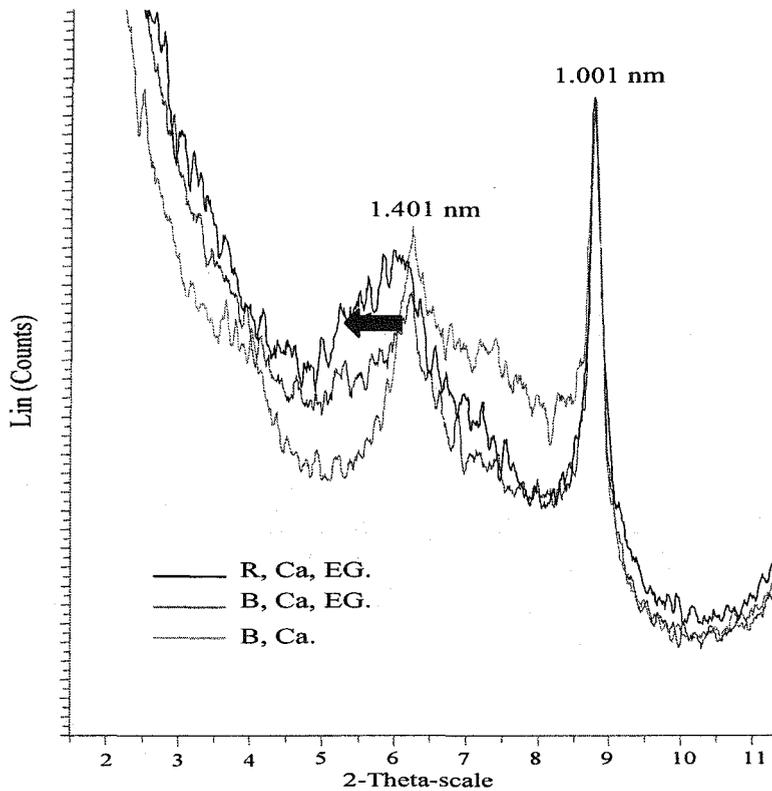


Figure II.8: XRD patterns of Ca saturated oriented clay in layer 1 from Norway spruce bulk soil: (i) without treatment (B, Ca) and (ii) ethylene glycol solvated (B, Ca, EG) and from the rhizosphere: (iii) ethylene glycol solvated (R, Ca, EG).



An increase of the intensity ratio of 1.0 and 1.4 nm peaks treated with Ca saturation was observed in the rhizosphere clay minerals in comparison with that of the bulk soil, for five out of six soil samples. The Figure II.7 represents one of these soil samples.

The diffractograms of clay treated with Ca saturation and EG solvation showed greater swelling near the 1.4 nm peak in the surface horizon rhizosphere compared to that of the bulk soil, but only for the Norway spruce (Figure II.8).

## Discussion

In this study we chose to assess the effect of the rhizosphere under mature trees, on clay mineral weathering. To that end, we used different analytical methods, namely selective extractions, total chemistry and XRD analyses and an iso-zirconium chemical weathering budget which allowed us to qualify and quantify mineral weathering. The different results obtained with these methods, were concordant and showed (i) the transformation process of clays in the rhizosphere, (ii) the dissolution process of clays in the rhizosphere and (iii) the impact of the rhizosphere on pedogenesis.

- Transformation process of clays in the rhizosphere

### *Al mobility*

The extractions by hot Na-citrate clearly demonstrated that the rhizosphere clay had lost greater amounts of aluminium hydroxide than that of the bulk soil. This extraction of aluminium hydroxide can result from the release of aluminium hydroxide minerals and/or from the destabilisation of interlayer aluminium polymers. Moreover, the observation of the diffractograms revealed the presence of a swelling after EG solvation for the Norway spruce rhizosphere clays. This swelling after EG solvation indicated a destabilisation of interlayer aluminium polymers in the rhizosphere phyllosilicates.

### *K fixation on the clay fraction*

The presence of a higher proportion of mica-like-layer observed on the diffractograms, underlined the fixation of potassium on the clay fraction. These results confirmed observations under other tree species in the same experimental forest site at Breuil (Turpault *et al.*, in preparation) and at other experimental forest sites (Clegg et Gobran, 1997 ; Clegg *et al.*, 1997 ; Gobran et Clegg, 1998, Courchesnes *et al.*, 1998 ; Gobran *et*

*al.*, 1999 ; Gobran *et al.*, 2005, Turpault *et al.*, 2005). In fact, they showed an increase in the potassium concentrations in the tree rhizosphere compared to the bulk soil. This increase in potassium concentrations could be due to positive differences between element input fluxes, principally by mass flow, mineral weathering and organic matter mineralization, and element output fluxes, principally by plant uptake in the rhizosphere (Turpault *et al.*, 2005).

The formation of mica-like-layers in the rhizosphere could thus be explained by a two-step mechanism. The acid and complexing compounds produced in the rhizosphere release the interlayer aluminium of the hydroxy-interlayered vermiculite and generate the formation of vermiculite which is characterized by a free interlayer space. Then, the potassium, present in large quantities in the rhizosphere solution due to a positive transfer budget, and possessing a strong affinity for the high charge phyllosilicate like vermiculite, becomes fixed in the interlayer space to form mica-like-layer (Turpault *et al.*, 2005).

- Dissolution process of clays in the rhizosphere

The results obtained by total chemical analyses showed that the rhizosphere clays contained significantly more silicon and less iron and aluminium than the bulk soil, showing that there had been dissolution of the minerals containing iron and aluminium. Effectively, the results of selective extractions confirmed a decrease in the amorphous phases (aluminium hydroxide) in the rhizosphere. Moreover, use of the iso-zirconium method, which allowed us to estimate the gain or loss of an element in the soil in comparison with an element considered as invariant, *i.e.* unweatherable, demonstrated a partial loss of all elements in the rhizosphere compared to the bulk soil.

All these observations were in concordance and revealed more intense dissolution of the clay minerals in the rhizosphere of Norway spruce and oak. April and Keller (1990) also observed preferential dissolution of biotite close to root surfaces in some forest soils in the eastern United States. This impact of the rhizosphere results from the production of weathering agents by the roots and their associated micro-organisms (Barker *et al.*, 1997). Thus, organic acid and complexing compounds contained in the root and microbial exudates are implicated in mineral weathering (Drever, 1994; Ström, 1997; Jones, 1998; Liermann *et al.*, 2000; Arocena and Glowka, 2000; Rufyikiri *et al.*, 2004).

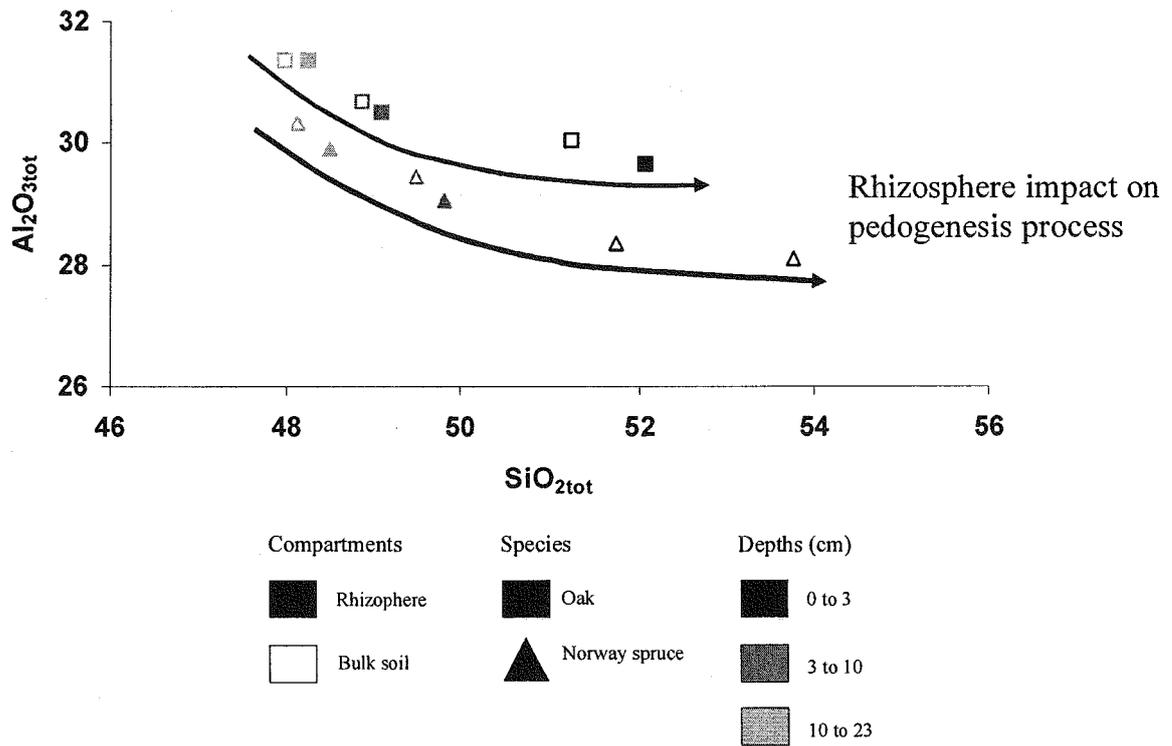
However, the two species seemed to accelerate clay mineral weathering by different mechanisms. The soil pH obtained at the Breuil experimental site, clearly demonstrated acidification in the rhizosphere of the Norway spruce at all depths, notably in the surface horizon ( $|\text{pH}(\text{R} - \text{B})| \sim 0.3$ ). Thus, the increase in clay mineral weathering in the rhizosphere of the Norway spruce seemed to be due to the exudation of large quantities of acid compounds which are considered to be the principal factors controlling mineral dissolution (Drever, 1994). According to Haynes (1990), the pH of the rhizosphere differs from that of the bulk soil mainly because of the predominant form of nitrogen taken up. Thus, the lower pH observed in the Norway spruce rhizosphere soil compared to that of the bulk soil, might be due to the type of N uptake by the trees. In fact, the majority of the N present in the Norway spruce soil is the  $\text{NH}_4^+$  form (Colin-Belgrand *et al.*, 2003, Zeller *et al.*, in preparation), implying that the Norway spruce principally consumes  $\text{NH}_4^+$ . So, by way of charge balance, the Norway spruce roots exude protons and therefore acidify their surrounding environment (Turpault *et al.*, in preparation).

Conversely, our results showed that the oak does not acidify the surrounding environment ( $|\text{pH}(\text{R} - \text{B})| \sim 0$ ). One explanation could be that the clay mineral weathering observed in the oak rhizosphere depends on different mechanisms to those of the Norway spruce. In particular, the rhizosphere effect could principally result from element uptake by the oak roots which depend on the nutritional requirements of the trees. Element uptake generates disequilibrium between the solution and the mineral phase and therefore accelerates mineral dissolution. We could equally well propose that oak and Norway spruce root exudates differ greatly, both qualitatively and quantitatively, from each other. In fact, as well as producing large numbers of protons, the Norway Spruce roots is known to produce abundant quantities of soluble organic compounds, principally polycarboxylic acids, such as malic, oxalic and shikimic acids (Heim *et al.*, 2000). In contrast, oak root exudation could be more local, less abundant and could contain compounds which are less acidic, like monocarboxylic acids such as acetic and lactic acids.

- Effect of the rhizosphere on pedogenesis

Minerals change when they are subjected to attack by chemical and the biological weathering agents. However, the weatherability varies with the mineral considered.

Figure II.9: Relationship between  $\text{SiO}_{2\text{tot}}$  and  $\text{Al}_2\text{O}_{3\text{tot}}$  in the clay fraction of rhizosphere and bulk soil for Oak and Norway spruce sampled at three depths in the Breuil forest site.



Quartz is one of the most resistant minerals to weathering in temperate soils, and this is why the proportion of this mineral in a soil increases as the weathering increases. Figure II.9 compares the concentrations of  $Al_2O_{3tot}$  and  $SiO_{2tot}$  in the clay minerals sampled at three distinct depths in the rhizosphere and in the bulk soil of oak and Norway spruce. The proportion of the Si-content in the clay fraction is higher (i) in the surface horizon compared to the deeper one for the same soil compartment and the same tree species, (ii) in the rhizosphere of Norway spruce compared to the oak for the same depth and the same soil compartment and (iii) in the rhizosphere compared to the bulk soil for the same depth and the same species.

These results demonstrate three tendencies:

- (i) Processes in soil are depth dependent in the bulk and in the rhizosphere soils: mineral weathering increases towards the surface. The presence of greater amounts of organic matter and roots in the surface horizon could explain this observation.
- (ii) Forest tree species affect the pedogenesis in the bulk soil and in the rhizosphere: mineral weathering is more intense under Norway spruce. This is probably linked to the functioning of the biological cycle of the different species, *i.e.* exudation, water and nutrient uptake, litter quality and decomposition.
- (iii) Pedogenesis is influenced by the root and associated microorganism activities: mineral weathering is more intense in the rhizosphere.

Our results confirmed that the rhizosphere is a zone of intense activity in which mineral weathering is accelerated (Spyridakis *et al.*, 1967; April and Keller, 1990) and these processes have a considerable impact on the pedogenesis, notably in the surface horizon.

### **Acknowledgements**

We thank G. Nourrisson, P. Bonnaud and J. Marchand for their technical help and the analyses. This work was supported by the Andra (Agence Nationale de Gestion des Déchets Radioactifs), the Ministry of French Research (ACI quantitative ecology project) and the "Lorraine" Region.

### 3.3 Quantification de l'altération de minéraux-tests dans le sol global et la rhizosphère d'arbres (site de Fougères)

En complément de l'étude de la fraction argileuse du site de Breuil, une expérimentation en forêt visant à quantifier l'altération de minéraux-tests incubés quatre années dans le sol en présence ou en absence de racines, a été mise en place sur le site de Fougères (Bretagne) et de Breuil (Bourgogne), respectivement en 2000 et 2002 par Marie-Pierre Turpault. Le niveau d'altération des minéraux-test placés sur le site de Breuil étant trop faible pour être interprétable, nous avons alors décidé d'utiliser, dans cette thèse, les données obtenues sur le site de Fougères car elles apportent un certain nombre d'éléments clés permettant d'affiner la réflexion issue de nos autres études. Les objectifs des expériences étaient de (i) quantifier la dissolution des minéraux-tests en présence ou en absence de racines d'arbres et de (ii) comparer le niveau de dissolution de ces minéraux dans un sol fertilisé ou non.

Les résultats présentés par la suite sont extraits d'une publication en préparation, intitulée : Biological, environmental and anthropogenic effects on the test-mineral dissolution in a forest ecosystem (Turpault M.-P., Nys C. et Calvaruso C).

#### Matériel et méthodes

- Description de l'écosystème

Le choix du site forestier de Fougères a été motivé par i) l'homogénéité, l'acidité et la pauvreté en nutriments (particulièrement le calcium) du sol, ii) la présence de parcelles non fertilisées et de parcelles fertilisées établies en 1973 (Le Tacon et Oswald, 1977) et (iii) des mesures intensives depuis 1997 sur les dépôts atmosphériques, la litière, l'immobilisation dans la biomasse, la chimie de la solution du sol et les propriétés du sol.

Ce site forestier de 1660 ha à dominance hêtre, est localisé en Ille et Vilaine (Bretagne, France, 48°23'N, 1°9'W, altitude de 150m). Le climat est océanique avec des températures moyennes annuelles de 12.9°C et des précipitations moyennes annuelles de 868 mm, bien réparties tout au long de l'année (Lebret, 2002). Les sols sont des alocrisols - néoluvisols (AFES, 1995) développés sur des limons éoliens non carbonatés (Van Vliet-Lanoë *et al.*, 1995), d'une épaisseur de 1.5 m, contenant environ 15%

d'argiles et 75% de limons et couvrant le granite tardiconyen Vire (600MA). L'humus est de type dysmull dans les parcelles étudiées.

- Les peuplements de hêtre étudiés

Deux peuplements de hêtres de 86 ans en 2000 ont été sélectionnés. Ils font partie d'un site expérimental du ORE F-ORE-T (Observatoire de Recherche Environnementale), instrumenté pour l'étude des cycles biogéochimiques. Les deux parcelles sont adjacentes dans un site très uniforme (Lecoite *et al.*, 2006). La parcelle fertilisée correspond à un des quatre blocs du traitement de fertilisation complète (NPKCa) de l'expérience mise en place en 1973 (Le Tacon et Oswald, 1977) : 100 kg.ha<sup>-1</sup> de N (nitrate d'ammonium) répandus en mai 1973 et renouvelés en mai 1974 ; 150 kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (triple super phosphate) répandus en avril 1973 ; 1500 kg.ha<sup>-1</sup> de CaO (carbonate de calcium) répandus en avril 1973 ; 150 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (sulphate de potassium) répandus en avril 1973. La parcelle témoin correspond à un peuplement âgé de 86 ans, sans fertilisation.

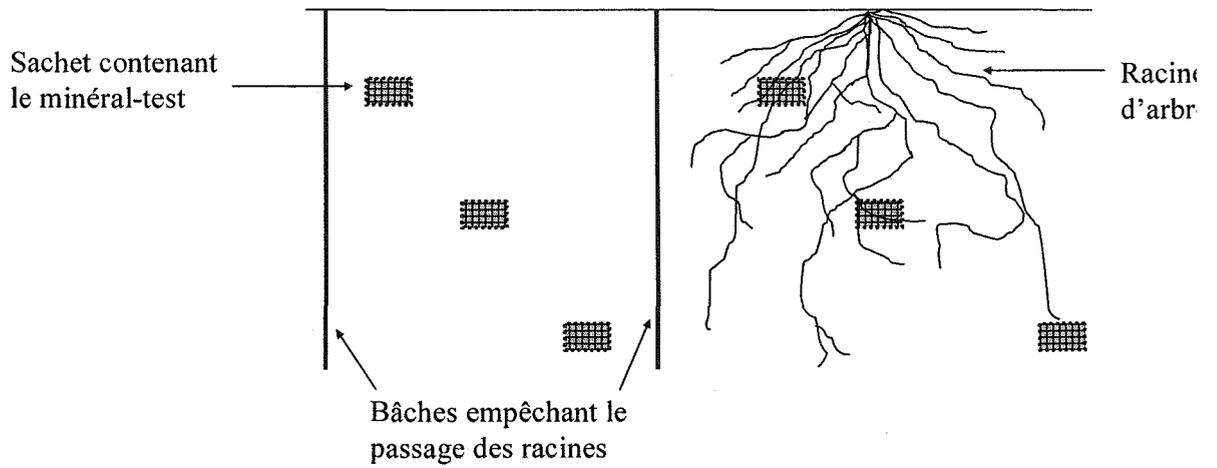
- Les minéraux-test :

Ils ont été choisis sur les critères suivants :

- 1) leur présence dans ces sols,
- 2) ils constituent la principale source de calcium dans ces sols acides,
- 3) leur altération est assez rapide,
- 4) la disponibilité dans le commerce de minéraux chimiquement et minéralogiquement purs et homogènes.

Deux minéraux-test ont été choisis, un plagioclase labrador provenant de Norvège et une fluoro-apatite provenant du Mexique (Durango). Les minéraux-test ont été fournis par la Compagnie Générale de Madagascar (Paris). Le plagioclase initial est composé à 99.9% de labrador et à 0.1% d'ilménite (Augusto *et al.*, 2000). Les analyses chimiques montrent que l'apatite contient cinq fois plus de CaO que le plagioclase. La formule structurale du labrador est Si<sub>2,49</sub> Al<sub>1,49</sub> K<sub>0,02</sub> Ca<sub>0,52</sub> Na<sub>0,45</sub> O<sub>8</sub> (Augusto *et al.*, 2000). La fluoroapatite de Durango (Mexico) se présente en cristaux individuels. Son système cristallographique est hexagonal (Young *et al.*, 1969; Hughes *et al.*, 1989; Elliot 1994).

*Figure II.10: Représentation schématique du dispositif d'exclusion des racines utilisé sur le site de Fougères.*



*Figure II.11: Photo de la mise en place d'un sachet de minéral-test dans un sol forestier.*



Sa formule structurale est  $(Ca_{9.77}La_{0.03}Ce_{0.04}Sr_{0.007}Fe_{0.003}Si_{0.06})(P_{1.02}O_4)_6 F_{2.08} Cl_{0.12}$  (Park *et al.*, 2004)

Les grains minéraux initiaux ou les cristaux ont été concassés dans un broyeur à mâchoires. Les labradors et les apatites ont ensuite été tamisées à 100 – 200  $\mu m$  et 0.5 - 1 mm, respectivement. La fraction 100 – 200  $\mu m$  de labrador a été triée magnétiquement afin de retirer les grains contenant de l'ilménite. Les grains de labrador et d'apatite ont alors été traités par ultrasons et lavés dans de l'eau distillée afin de retirer les particules fines. Nous avons utilisé une fraction plus fine pour le labrador car sa constante de dissolution est plus faible. La surface spécifique du labrador (100 - 200  $\mu m$ ) mesurée par la méthode BET était de  $0.11 \pm 0.01 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (Augusto *et al.*, 2000). Comme la surface spécifique de l'apatite (0.5 - 1 mm) était trop faible pour être mesurée par la méthode BET, elle a été calculée en utilisant le modèle de la sphère :  $0.0023 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

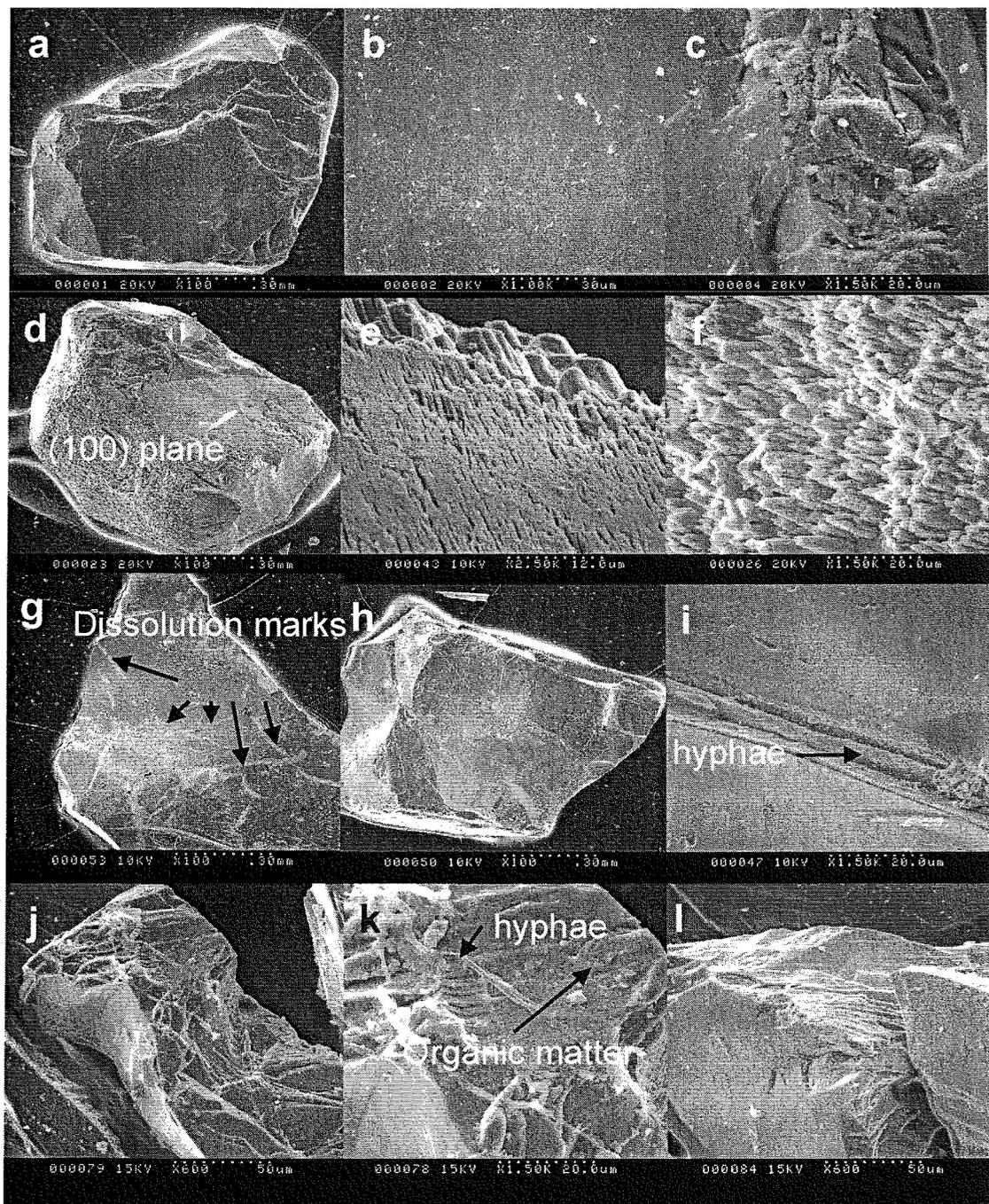
Trois grammes ( $\pm 0.0005 \text{ g}$ ) de labrador (100 - 200  $\mu m$ ) et d'apatite (0.5 - 1 mm) ont été placés dans des sachets (10 x 5cm) de mailles de 20  $\mu m$  et 300  $\mu m$ , respectivement. Les mailles de 300  $\mu m$  permettent la pénétration des racines tandis que les mailles de 20  $\mu m$  ne permettent que la pénétration des hyphes de champignons et des bactéries associées.

- Le dispositif expérimental

Dans le but de tester l'effet rhizosphère nous avons créé pour les deux traitements (témoin et fertilisé) une zone d'exclusion des racines de 15 mètres sur 3.5 mètres. Au moment de l'installation, une tranchée de 40 cm de large sur 1 mètre de profondeur a été creusée dans une zone forestière sans arbre. La bâche en plastique a été introduite dans le sol autour de cette zone et la tranchée a été bouchée coté extérieur de la fosse (Figure II.10).

Quatre sachets d'apatite et six sachets de labrador ont été insérés horizontalement dans chaque fosse à trois profondeurs de sol : -2.5, -10 et -20 cm (Figure II.11). Les fosses ont ensuite été rebouchées couche par couche. Dans les zones d'exclusion, la végétation a été arrachée régulièrement ou traitée avec un herbicide de type glyphosate.

Figure II.12: Photographies réalisées au microscope électronique à balayage, de grains d'apatite et de plagioclase incubés durant quatre années dans le sol du site de Fougères, en présence ou en absence de racines: (a) Grain d'apatite avant incubation dans le sol ; (b) Détail de la photo a, une surface plane d'un grain d'apatite ; (c) Détail de la photo a, une arête d'un grain d'apatite ; (d) Grain d'apatite après incubation dans le sol à 2.5 cm (traitement fertilisé sans racine) ; (e) Détail de la photo d, intersection de deux surfaces planes de grain d'apatite ; (f) Détail de la photo d, surface présentant des aiguilles résiduelles d'altération ; (g) Grain d'apatite présentant des figures linéaires de dissolution courbes (traitement contrôle avec racines à 10 cm) ; (h) Surface de grain couverte par des hyphes (traitement contrôle avec racines à 10 cm) ; (i) Hyphes dans une structure linéaire de dissolution à la surface d'un grain d'apatite (traitement contrôle avec racines à 10 cm) ; (j) Surface de grain de plagioclase couverte d'hyphes et de matière organique (traitement contrôle avec racines à 2.5 cm) ; (k) Détail de la photo j ; (l) Grain de plagioclase qui présente de petites figures de dissolution.



- Analyses des minéraux-test après incubation

Après 4 années d'incubation dans le sol, les sachets de minéraux ont été collectés ainsi qu'un échantillon de sol afin de déterminer l'humidité. Les minéraux ont été lavés et traités aux ultrasons afin d'éliminer le sol accolé. Ils ont ensuite été séchés et pesés avec une précision de 0.0005 g.

Le pourcentage de dissolution de chaque minéral correspond à la perte de masse durant les 4 années d'incubation. Plusieurs échantillons ont été observés après lavage par microscopie électronique à balayage (Hitachi S 2500 LB). Afin de déterminer le nombre d'hyphes et de figures linéaires de dissolution, quatre sous-échantillons d'apatite introduits à 2.5 cm de profondeur dans le sol avec racines ont été prélevés dans deux sacs dans les traitements témoins et fertilisés. Dix grains de chaque sous-échantillon orientés aléatoirement, ont été photographiés (x 80) et les figures linéaires de dissolution et les hyphes présents ont été comptés sur la face observée de chaque grain (soit 20 par traitement).

- Analyses statistiques

Les données de dissolution des minéraux ont été analysées par analyses de variance et le test t de Student-Fisher. Le programme Unistat 5.2 a été utilisé pour les analyses statistiques. La signification des tests statistiques est notée ainsi: \* =  $P < 0.05$ , (\*) =  $P < 0.10$  et n.s. =  $P > 0.10$ .

## Résultats

- Observation des minéraux-test

Les grains de minéraux avant introduction dans le sol étaient ovoïdes pour l'apatite (Figure II.12A) et plus tabulaire pour le labrador. Ils avaient des cassures nettes fréquemment conchoïdales. L'état de surface était généralement lisse (Figures II.12B et II.12C). Après quatre années dans le sol, des figures d'altération sont bien visibles sur les surfaces des grains d'apatite et de plagioclase (Figures II.12D, II.12E, II.12F, II.12G et II.12J). Pour un même traitement, les grains peuvent être plus ou moins altérés (Figures II.12G et II.12H) et les figures d'altération ne sont pas uniformément réparties à la surface des grains (Figures II.12D et II.12G). Des hyphes sont très fréquemment observés sur la surface des grains d'apatite et de labrador en ce qui concerne les

Figure II.13: Nombre de figures de dissolution et d'hyphes observés par microscopie électronique à balayage (x80) sur les surfaces des grains d'apatite dans les traitements témoin et fertilisé après quatre années d'incubation dans le sol du site de Fougères. Chaque histogramme représente la moyenne de 20 observations. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon un test t de Student - Fischer ( $P = 0.05$ ).

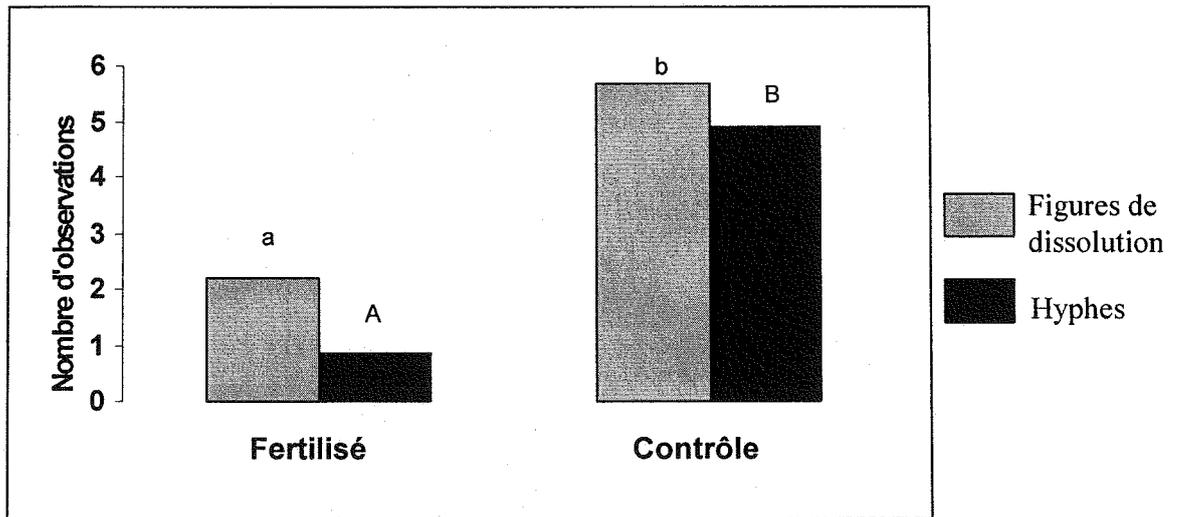
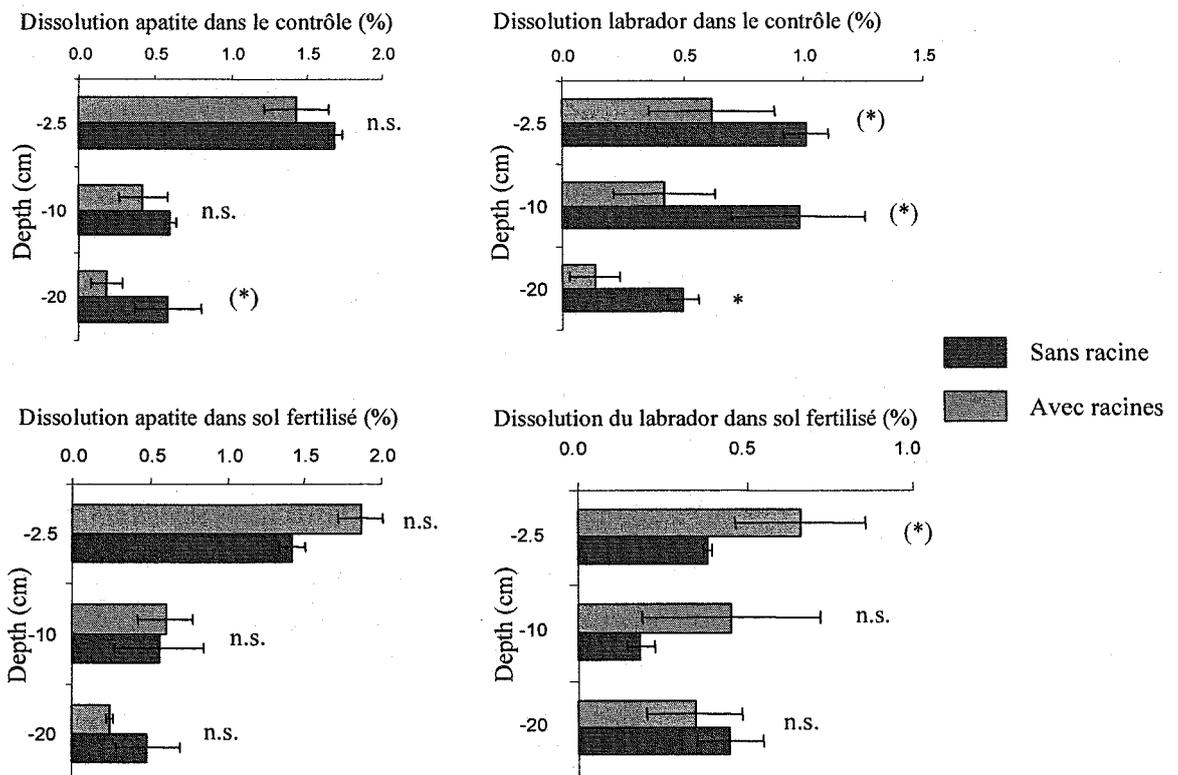


Figure II.14: Pourcentage de dissolution de l'apatite (A et C) et du labrador (B et D) dans les traitements témoin (A et B) et fertilisé (C et D) en présence ou en absence de racines après quatre années d'incubation dans le sol du site de Fougères. Les barres représentent les écart-types. Les histogrammes représentent la moyenne de quatre répétitions pour l'apatite et de six répétitions pour le labrador. Les données de dissolution des minéraux ont été analysées par analyses de variance et le test t de Student-Fisher. La signification des tests statistiques est notée ainsi: \* =  $P < 0.05$ , (\*) =  $0.05 < P < 0.10$  et n.s. =  $P > 0.10$ .



traitements avec racines (Figures II.12H, II.12I, II.12J et II.12K). Par ailleurs, des figures généralement courbes plus ou moins larges (0.1 à 1.6 mm) et profondes apparaissent fréquemment (Figure II.12G) dans le traitement témoin avec racines. La figure II.13 montre que ces traces sont environ trois fois plus nombreuses sur les apatites dans le traitement témoin par rapport au traitement fertilisé. Ces figures d'altération sont absentes des traitements sans racine. Dans le traitement témoin avec racines, nous avons mis en évidence des figures de dissolutions plus fines (10 - 100  $\mu\text{m}$ ) dans lesquelles ont pu être observés des hyphes (Figure II.12I) qui peuvent également traverser ces structures altérées ou cheminer sur des surfaces non altérées (figure II.12K). Les grains d'apatite du traitement témoin sont environ six fois plus colonisés par des hyphes que les grains du traitement fertilisé (Figure II.13). Pour l'apatite, la fréquence et la géométrie de ces figures de dissolution sont de plus dépendantes de l'orientation cristallographique (Figures II.12E et II.12F). Les surfaces dans les plans (100) sont moins corrodées que les faces perpendiculaires, ce qui laisse apparaître des aiguilles résiduelles de dissolution (Figures II.12E et II.12F).

- L'effet rhizosphère

Dans le traitement témoin, la dissolution du labrador est significativement plus forte en présence des racines comparativement au traitement sans racine et ce quelle que soit la profondeur (Figure II.14A). De même, la dissolution de l'apatite est toujours plus forte en présence des racines comparativement au traitement sans racine, et notamment en profondeur où la différence y est significative (Figure II.14B). Le pourcentage de dissolution du labrador et de l'apatite est même trois fois plus important en présence des racines à 20 cm de profondeur.

Dans le traitement fertilisé, la présence de racines n'augmente pas la dissolution du labrador, au contraire, la dissolution est même significativement plus importante en l'absence de racines à 2.5 cm de profondeur (Figure II.14C). De même, aucune différence significative de dissolution de l'apatite entre les traitements avec et sans racine n'est observée (Figure II.14D).

## Discussion

L'utilisation de minéraux-tests incubés durant quatre années dans le sol du site de Fougères nous a permis de tester l'effet de la rhizosphère et l'effet de la fertilisation chimique sur le niveau d'altération des minéraux:

- L'effet rhizosphère

La géométrie des figures de dissolution observées sur l'apatite semble être contrôlée par deux facteurs :

(i) un facteur cristallographique qui s'applique à l'ensemble des traitements. La dissolution de l'apatite a conduit à la formation d'aiguilles résiduelles sur la face basale, comme cela a déjà été observé par Thirioux (1990) sur cette même fluoroapatite. Ce qui traduit vraisemblablement une forte contribution de cette face à la dissolution du minéral, comme cela a été montré pour d'autres types de minéraux tels que les inosilicates (Xie et Walther, 1994) ou les phyllosilicates (Turpault et Trotignon, 1994).

(ii) un facteur "contact biologique" qui ne concerne que les grains introduits dans les traitements avec racines. En effet, en présence de racines, les grains présentent des figures de dissolution continues qui semblent correspondre à des empreintes de racines. Des figures similaires dues à l'activité des racines ont déjà été observées dans les calcaires (Trolldenier, 1987; Hinsinger *et al.*, 2003). Dans notre étude, le contact entre la racine et le minéral n'a pas été conservé lors de l'observation au MEB car les minéraux ont été préalablement ultrasoniqués. Etant données les formes et les tailles des figures observées et la localisation uniquement dans les traitements avec racines, ces figures sont clairement attribuables au fonctionnement des racines et des microorganismes associés.

De plus, ces empreintes sont beaucoup plus nombreuses dans le traitement témoin par rapport au traitement fertilisé ; ce qui pourrait traduire des activités rhizosphériques locales dépendantes du niveau de fertilisation du sol. Des figures plus fines sont également observables dans l'ensemble des traitements avec racines. Certaines figures colonisées par des hyphes fongiques suggèrent fortement le rôle de ces champignons dans la formation de ces figures de dissolution. Un tel résultat a déjà été mis en évidence par le passé, par plusieurs auteurs (Paris *et al.*, 1995, Jongmans *et al.*, 1997 ; Wallander et Wickman, 1999).

Dans le traitement témoin, la dissolution des minéraux observée dans la zone avec racines est plus forte que dans la zone sans racine. Cette différence augmente en profondeur pour atteindre un facteur trois dans l'horizon le plus profond. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en surface, la plus forte humidité dans le traitement sans racine (en moyenne  $11\% \pm 5\%$  soit environ un tiers de plus d'humidité, D. Epron, communication personnelle), liée à l'absence de prélèvement, accentue l'altération de la phase minérale et génère par conséquent une sous-estimation de la différence de dissolution des minéraux entre les traitements avec racines et sans racine.

Dans l'étude réalisée sur la parcelle témoin développée sur un sol acide et pauvre en nutriments, nous mettons donc clairement en évidence que les racines et les microorganismes associés accélèrent la dissolution des minéraux. Ces résultats confirment ceux obtenus par Gobran *et al.* (2005) qui avaient déjà montré dans des forêts boréales composées d'épicéas que la dissolution de la fluoroapatite était augmentée en présence de racines. En conséquence, la rhizosphère des arbres forestiers semble jouer un rôle considérable dans les processus d'altération des minéraux, de mobilisation des nutriments minéraux et par conséquent de nutrition des arbres forestiers dans les écosystèmes tempérés et boréaux.

- L'effet de la fertilisation chimique

Aucun effet stimulant de la rhizosphère sur la dissolution des minéraux n'est observé dans le traitement fertilisé. Il semble donc que l'activité rhizosphérique contribuant à l'altération des minéraux soit régulée par la disponibilité des nutriments dans le sol. Ce même effet de régulation a également été observé dans un site forestier expérimental au sud de la Suède (Gobran *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent un haut degré de plasticité de l'activité rhizosphérique en ce qui concerne la production d'agents altérants, contribuant ainsi à maintenir une certaine disponibilité des nutriments pour les plantes. De nombreux autres exemples peuvent être cités pour illustrer ce type de régulation comme la production de phytosidérophores induite par des carences en fer dans le milieu (Römheld, 1991), la production d'acides organiques induite par la toxicité aluminique (Zheng *et al.*, 1998) et la production de phosphatases dans des milieux carencés en phosphore (Tadano et Sakai, 1991).

*Tableau II.4 : Tableau récapitulatif des principaux artefacts liés à l'utilisation de la méthode des minéraux-test dans un sol forestier. Le signe + indique une surestimation du flux d'altération de la phase minérale.*

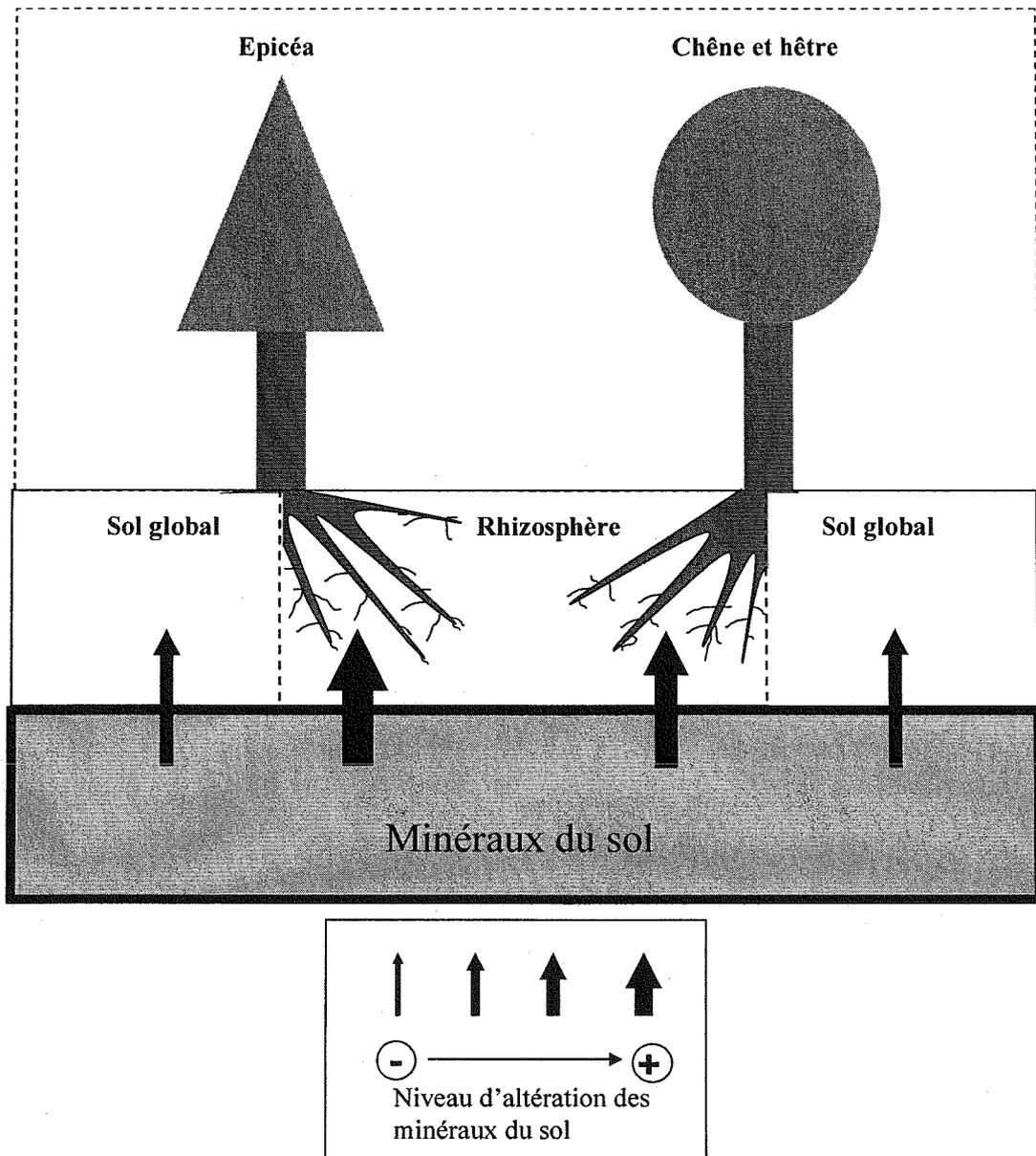
Artefacts	Compartiment du sol	
	Rhizosphère	Sol global
Perturbation du sol (creusement d'une fosse)	+	+
Sachet (propriétés capillaires)	+	+
Surfaces fraîches	+	+
Absence de racines (absence de prélèvement d'où augmentation d'humidité)		+
Attraction des racines et augmentation de leur activité (prélèvement et exsudation)	+	
Attraction des microorganismes et augmentation de leur activité (prélèvement et exsudation)	+	

#### **4 SYNTHÈSE ET DISCUSSION**

Notre étude des sols calcaires du site de Bure a démontré que la rhizosphère des arbres forestiers s'enrichit en potassium, confirmant, une fois encore, que la dynamique de cet élément dans les sols forestiers est très différente de celle observée dans les sols agricoles où des appauvrissements de la rhizosphère en cet élément sont observés. Ainsi, dans la rhizosphère d'arbres forestiers, le bilan des flux de potassium entrant, principalement par le flux de masse et par le flux d'altération des minéraux, et sortant par le biais du prélèvement racinaire, est positif.

La méthode des minéraux-test, choisie car elle permet de quantifier la dissolution de minéraux après seulement quelques années d'incubation dans le sol, a nettement mis en évidence un effet positif de la rhizosphère d'arbres sur l'altération des minéraux-test dans le site de Fougères : les pourcentages de dissolution de l'apatite (phosphate de calcium) et du labrador (feldspath calco-sodique) indiquent que l'altération y est multipliée par des facteurs variant de 1.2 à 3 suivant la profondeur et le minéral étudiés. Cependant, l'utilisation de cette méthode pour la quantification de l'altération des minéraux dans les sols forestiers, combinant la mise en place de minéraux-test et d'une zone d'exclusion des racines, amplifie les processus d'altération soit dans la rhizosphère soit dans le sol global, ce qui peut aboutir à des surestimations ou à des sous-estimations de l'effet de la rhizosphère sur le taux de dissolution des minéraux (Tableau II.4). Ainsi, l'absence de prélèvement par les racines dans la zone d'exclusion a pour conséquence d'augmenter l'humidité du sol dans la zone d'exclusion. Étant donné que la vitesse de dissolution des minéraux est proportionnelle à la surface minérale en contact avec la solution du sol, cette augmentation d'humidité dans la zone d'exclusion peut accroître la dissolution des minéraux. Cette augmentation de la dissolution des minéraux dans le sol global va par conséquent engendrer une sous-estimation de l'effet de la rhizosphère sur le taux de dissolution des minéraux. D'autre part, les minéraux-test sont des minéraux riches en éléments nutritifs et possédant des surfaces fraîches, qui pourraient exercer un effet attractif sur les racines. Cet "effet minéralosphère" a d'ailleurs déjà été mis en évidence par Robinson (2001) qui a démontré que des zones de sol riches en phosphore et en azote engendraient non seulement une prolifération des racines latérales à leur contact mais également une stimulation du prélèvement, impliquant une augmentation de l'altération de la phase minérale. De plus, selon Bennett *et al.* (2001), cet "effet minéralosphère" ne se limiterait pas aux racines mais affecterait également les

Figure II.15: Schéma de synthèse résumant le niveau de l'altération des argiles dans les sites forestiers de Breuil et de Fougères.



microorganismes du sol. En effet, ces auteurs expliquent que dans des environnements pauvres en phosphates, les bactéries peuvent coloniser et altérer plus particulièrement un minéral contenant du phosphore. L'utilisation de minéraux-test ne permet donc qu'une estimation de l'effet de la rhizosphère sur l'altération des minéraux, impliquant que cette approche permet d'estimer les processus d'altération des minéraux dans un sol, mais n'est pas facilement extrapolable au niveau de l'écosystème.

C'est pourquoi, une approche complémentaire, sans perturbation du sol et sans interférence avec les composantes biologiques, basée sur l'utilisation de la fraction argileuse des sols comme marqueur de l'altération de la phase minérale des sols forestiers a été utilisée sur le site de Breuil. Cette étude a confirmé l'augmentation significative de la dissolution des minéraux dans la rhizosphère comparativement au sol global, déjà observée avec la méthode des minéraux-test. En effet, une perte en silice supérieure de 10 à 14% à celle du sol global, a pu être mesurée à l'aide de la méthode du bilan iso-zirconium d'altération chimique, dans la rhizosphère de l'horizon de surface (0-3 cm). De plus, cette étude a mis en évidence des processus de transformation de la fraction argileuse dans la rhizosphère de cet horizon, reposant sur une déstabilisation des polymères alumineux interfoliaires et une fixation de potassium plus importante concernant les argiles de la rhizosphère. Cette approche reste cependant réductrice car la fraction argileuse représente moins d'un cinquième du sol du site de Breuil. Toutefois, c'est cette fraction du sol qui, de par sa surface développée importante lui conférant une forte sensibilité au processus d'altération, représente la fraction minérale la plus réactive et de plus, c'est la fraction porteuse de la majorité des nutriments dans le sol.

C'est pourquoi, à défaut de permettre une quantification précise de l'effet de la rhizosphère sur l'altération des minéraux dans les sols forestiers, l'utilisation de ces deux méthodes complémentaires met tout de même en évidence un résultat majeur : quel que soit le site, les processus d'altération sont plus poussés dans la rhizosphère que dans le sol avoisinant, et ce pour trois essences d'arbres différentes : chêne, hêtre et épicéa (Figure II.15). A partir des analyses chimiques totales de la fraction argileuse, il nous est tout de même possible d'estimer la perte d'un élément dans une couche de sol pour une surface et sur une période données. Les résultats obtenus sur le site de Breuil montrent que, sur les 23 premiers centimètres de sol, la perte en magnésium dans la rhizosphère du chêne et de l'épicéa est comprise entre 1.3 et 6.3 kilogrammes par hectare. A l'aide du modèle PROFILE, Ezzaïm (1997) et Fichter *et al.* (1997) ont

montré que, dans des écosystèmes forestiers comparables à celui de Breuil, les pertes en magnésium dans les 60 premiers centimètres du sol global étaient comprises entre 0.3 et 3 kilogrammes par hectare et par an. Bien qu'approximatives, ces données montrent que le flux d'altération lié à la rhizosphère serait équivalent au flux d'altération dans le sol global de l'horizon de surface d'un sol forestier, alors que la rhizosphère représente moins de 10% du volume de sol total dans cet horizon. Cette évaluation n'étant basée que sur quelques observations, des analyses complémentaires sur d'autres sites forestiers sont nécessaires avant de donner un caractère générique à ces résultats.

Ces études démontrent toutefois que la rhizosphère joue un rôle important dans la biodisponibilité des éléments minéraux dans les sols forestiers. Si l'on considère l'action des différents partenaires biologiques de la rhizosphère tels que les racines, les bactéries, les champignons mycorhiziens et saprophytes, la rhizosphère correspond donc à une juxtaposition d'une multitude de microsystemes d'altération.

Notre travail a également démontré que l'impact de la rhizosphère dans la biodisponibilité des nutriments variait considérablement en fonction du niveau de fertilité des sols. En effet, nous n'avons pas observé d'effet stimulant de la rhizosphère sur la dissolution des minéraux-test dans les sols soumis à une fertilisation minérale.

De même, si pour l'épicéa, l'exsudation massive de composés acides peut expliquer cette augmentation de l'altération des minéraux dans la rhizosphère, en revanche d'autres mécanismes, peut-être plus localisés, semblent impliqués en ce qui concerne le chêne. C'est pourquoi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la microflore présente dans les sols forestiers sous ces différentes essences et notamment, la capacité de la microflore de la rhizosphère et du sol global à altérer la phase minérale, qui constituera notre chapitre suivant.

**CHAPITRE III :**

**STRUCTURATION FONCTIONNELLE DES**

**COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES**

**SOLS FORESTIERS EN RELATION AVEC**

**L'ALTERATION DES MINERAUX**



## 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

---

Les bactéries et les champignons, de par leur très grande diversité génétique et fonctionnelle et leurs propriétés physico-chimiques, sont des composantes essentielles de la communauté biotique des sols forestiers. En effet, ils contribuent au fonctionnement de l'écosystème, *via* notamment leur capacité à mobiliser les nutriments par minéralisation de la matière organique et par altération de la phase minérale du sol (Paul et Clarck, 1985). Il est déjà clairement établi que la rhizosphère influence significativement la diversité génétique des populations microbiennes environnantes (Davet, 1996). Mais qu'en est-il de l'effet de la rhizosphère sur la diversité fonctionnelle de ces populations, et notamment en ce qui concerne la fonction "altération des minéraux" ? C'est pour répondre à cette question que nous avons réalisé une étude *in vitro* visant à analyser le potentiel de souches microbiennes isolées dans le sol global et la rhizosphère d'arbres forestiers, à altérer des minéraux. En parallèle, les souches bactériennes ont été décrites génotypiquement et métaboliquement, dans le but de définir si les souches possédant un fort potentiel d'altération des minéraux appartenaient majoritairement à un ou plusieurs groupes taxonomiques particuliers. Enfin, cette étude aura également pour objectif de comparer la structuration des communautés bactériennes sous des essences d'arbres forestiers à nutrition azotée contrastée.

## 2. BIOTESTS *IN VITRO*

---

Dans le but de répondre à ces différentes questions, nous avons procédé à l'isolement d'une collection de 745 souches microbiennes, d'une part dans le sol global et d'autre part dans l'ectomycorhizosphère du champignon ectomycorhizien *Scleroderma citrinum* (Figure III.1) associé à différentes essences forestières, et ce à une ou deux profondeurs distinctes dans l'horizon organo-minéral (Tableau III.1). Le protocole d'échantillonnage des mycorhizes *S. citrinum* et du sol global est décrit en annexe 5. Le choix s'est porté sur le champignon ectomycorhizien *S. citrinum* car c'est un champignon ubiquiste qui forme des carpophores et dont les mycorhizes sont

Figure III.2: Photo d'une racine de chêne mycorhizée par le champignon ectomycorhizien *Scleroderma citrinum*.

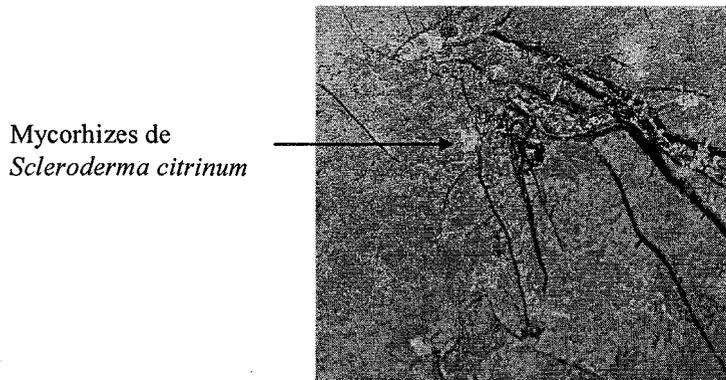


Figure III.3: Photos des tests semi-quantitatifs *in vitro* de mobilisation du fer et du phosphore par les microorganismes.

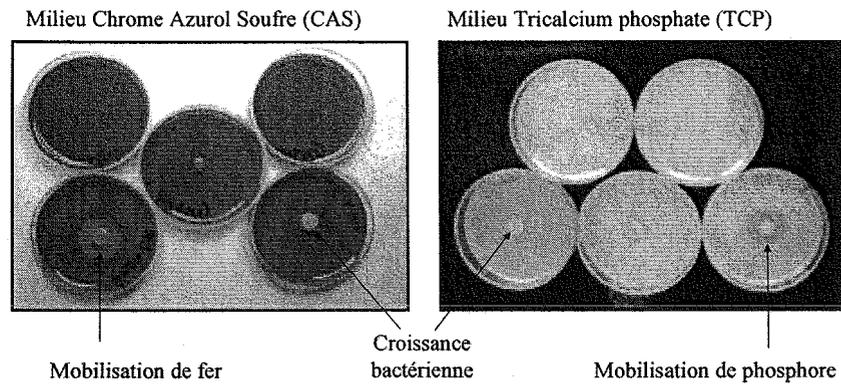


Figure III.4a: Dispositif de micro-incubation en microplaques filtrantes utilisé pour caractériser le potentiel d'altération de souches bactériennes.

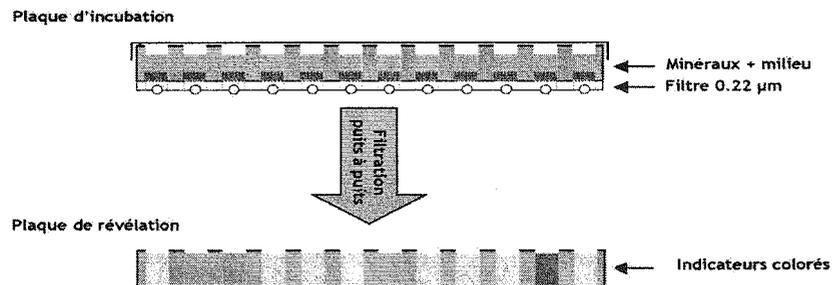
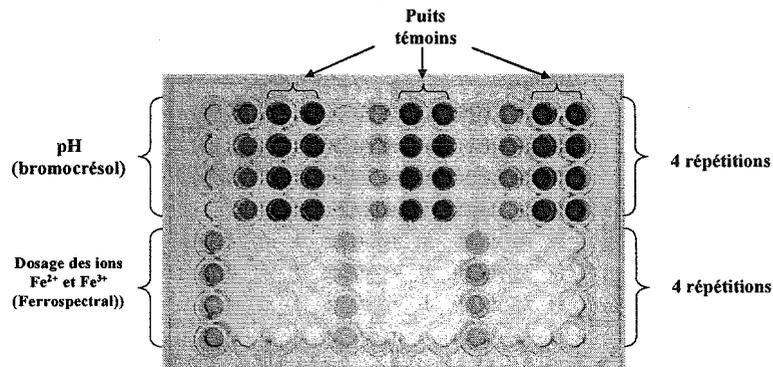


Figure III.4b: Photo de la plaque de révélation du test quantitatif *in vitro* d'altération bactérienne de la biotite basé sur le dosage de la quantité d'ions ferriques et ferreux mobilisés à partir du minéral et sur le dosage des ions  $H^+$  libérés en solution



facilement identifiables sur le terrain du fait de leur présence à proximité des carpophores, de leur couleur blanche et de leur odeur très caractéristique (Figure III.2). Les protocoles d'isolement des souches bactériennes et fongiques sont détaillés dans la partie "matériel et méthodes" de la publication intitulée "Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization process". Les souches de la collection ont ensuite été caractérisées au moyen de deux tests *in vitro* :

(i) des tests en boîtes de Petri sur milieu gélosé contenant soit du fer insoluble (milieu Chrome Azurol Soufre) soit du phosphore insoluble (milieu Tri Calcium Phosphate). Ces tests sont basés sur la détection d'activités bactériennes et fongiques pouvant jouer un rôle dans l'altération minérale, à savoir la production de protons, d'acides organiques complexants et de sidérophores impliqués dans la mobilisation du fer et du phosphore. Ils consistent à rechercher le changement d'aspect de deux milieux de culture, sous l'effet de l'activité bactérienne (Figure III.3). Le milieu CAS (Alexander *et al.*, 1990) contenant du fer insoluble, initialement bleu, devient orange en présence d'une souche capable de mobiliser le fer par la production d'acides organiques complexants et/ou de sidérophores. Le milieu TCP contenant un phosphate tricalcique insoluble, initialement trouble, devient limpide en présence d'une souche capable de solubiliser le phosphore par la production d'acides et d'acides organiques.

(ii) un test en microplaques est le fruit de la collaboration entre Christian Mustin, chercheur au "Laboratoire des Interactions Microorganismes - Minéraux - Matière Organique dans les Sols" (LIMOS) et nos unités INRA "Interactions Arbres – Microorganismes" (IAM) et "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers" (BEF). Une publication relative à la mise au point de ce biotest est en cours de rédaction par Christian Mustin et Stéphane Uroz. Ce test, dont le protocole est décrit dans la partie "matériel et méthodes" de la publication intitulée "Mycorrhizosphere effect on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil" vise à quantifier l'altération d'un minéral test au contact d'une suspension bactérienne. Il est réalisé grâce à un dispositif de micro-incubation utilisant des microplaques filtrantes inertes de 96 puits. Comme chacun des puits peut être filtré séparément, une analyse conjointe des solutions d'équilibre et des minéraux qu'ils contiennent peut être entreprise (Figure III.4a). Le test est basé sur l'utilisation d'indicateurs colorés réagissant à la quantité d'ions ferriques et ferreux libérée (ferrospectral) et au pH de la solution (bromocrésol vert) (Figure III.4b). Il consiste à

mesurer la quantité de fer libérée et le pH engendré par l'activité d'une souche bactérienne incubée en présence d'un minéral-test, la biotite. Ce dernier a été choisi parce que c'est un minéral relativement rapidement altérable et porteur de nutriments fréquemment présents dans les sols acides et notamment sur le site de Breuil. Ce test permet de mettre en évidence la production par les bactéries d'acides, d'acides organiques et d'acides organiques complexants qui vont altérer la biotite et donc mobiliser le fer. La valeur de pH mesurée dans la solution permet d'apprécier la quantité de protons présents en solution, libérés par les microorganismes, et donc de déterminer les différents mécanismes mis en jeu par les bactéries : acidification ou complexation.

### 3 RESULTATS

---

#### **3.1 Effet de la mycorrhizosphère sur la structuration fonctionnelle des communautés microbiennes du sol en relation avec leur capacité à mobiliser des éléments minéraux *in vitro*.**

L'objectif de cette partie est de comparer la capacité de souches bactériennes et fongiques isolées dans le sol global et dans l'ectomycorrhizosphère d'un arbre forestier à mobiliser des nutriments (fer et phosphore) insolubilisés dans un milieu gélosé.

**Article : Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization process.**

Calvaruso Christophe<sup>1,2</sup>, Turpault Marie-Pierre<sup>1</sup>, Leclerc-Cessac Elisabeth<sup>3</sup>, Frey-Klett Pascale<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>INRA, UR 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux.

<sup>2</sup>INRA, UMR 1136 "Interactions Arbres-Microorganismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux.

<sup>3</sup>ANDRA, Direction Scientifique/Service Transferts, 92298 Châtenay-Malabry, France.

*Soumis pour publication à Microbial Ecology le 11 septembre 2006*

### Résumé

La symbiose ectomycorhizienne modifie les conditions physico-chimiques et biologiques dans le sol environnant, créant ainsi un environnement particulier appelé ectomycorhizosphère dont l'effet sur l'équilibre microbien pourrait jouer un rôle dans le cycle des nutriments. Afin d'évaluer l'impact de l'ectomycorhizosphère sur la structure des communautés microbiennes potentiellement impliquées dans la mobilisation des nutriments à partir des minéraux du sol, nous avons comparé la diversité fonctionnelle de communautés fongiques et bactériennes du sol et de l'ectomycorhizosphère dans un peuplement forestier. Deux cents soixante quatre souches bactériennes et 118 souches fongiques ont été isolées à partir du sol global d'un peuplement de chêne (*Quercus petraea*) ainsi qu'à partir de l'ectomycorhizosphère et des ectomycorhizes du couple *Scleroderma citrinum* – chêne, dans deux horizons organo-minéraux de sol (0 à 3 cm et 5 à 10 cm). Les souches ont ensuite été caractérisées en utilisant deux tests *in vitro* relatifs à leurs capacités à mobiliser le fer et le phosphore.

Nous avons démontré que l'ectomycorhizosphère du couple *S. citrinum* - chêne structure significativement les communautés bactériennes cultivables dans les deux horizons de sol analysés, en sélectionnant des souches très efficaces dans la mobilisation du fer et du phosphore. Un tel effet a aussi été observé sur la diversité des communautés fongiques solubilisant le phosphore dans l'horizon de sol le plus profond. Comparé à une étude antérieure qui démontrait que l'ectomycorhizosphère du couple

*Laccaria bicolor* - Douglas fir structure la diversité fonctionnelle d'une population de *Pseudomonas fluorescens* en pépinière, notre travail souligne la généralité de l'effet mycorrhizosphère sur la diversité fonctionnelle des communautés fongiques et bactériennes en relation avec les processus d'altération minérale, quels que soient l'âge du symbionte fongique, l'âge et l'espèce de la plante hôte et l'environnement (pépinière vs forêt). Nous avons par ailleurs également démontré que les intensités de mobilisation du fer et du phosphore par les bactéries de l'ectomycorhizosphère sont significativement plus fortes pour les isolats prélevés dans l'horizon de sol le plus profond, comparativement aux isolats échantillonnés dans l'horizon supérieur. Ceci révèle, pour la première fois, une stratification verticale de la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes cultivables en relation avec le potentiel de mobilisation du fer et du phosphore.

**Mots-clés:** bactéries, champignons, diversité fonctionnelle, "effet ectomycorhizosphère", mobilisation du fer et du phosphore, peuplement forestier.

### Abstract

The ectomycorrhizal symbiosis alters the physicochemical and biological conditions in the surrounding soil, thus creating a particular environment called ectomycorrhizosphere, the effect of which on microbial equilibrium is suspected to play a role in gross production and nutrient cycling. In order to assess the ectomycorrhizosphere effect on the structure of microbial communities potentially involved in the mobilization of nutrients from the soil minerals in a poor-nutrient environment, we compared the functional diversity of soil and ectomycorrhizosphere bacterial communities in a forest stand. Two hundred and sixty four bacterial strains and 107 fungal stains were isolated from the bulk soil of an oak (*Quercus petraea*) stand and from oak-*Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere and ectomycorrhizae, in two soil organo-mineral horizons (0 to 3 cm and 5 to 10 cm). They were characterized using two *in vitro* tests related to their capacities to mobilize iron and phosphorus. We demonstrated that the oak - *S. citrinum* ectomycorrhizosphere significantly structures the culturable bacterial communities in the two soil horizons by selecting very efficient strains for phosphorus and iron mobilization. This effect was also observed on the diversity of the phosphate-solubilizing fungal communities in the lower soil horizon. Comparing to a previous study which demonstrated that *Laccaria bicolor* - Douglas fir

ectomycorrhizosphere structures the functional diversity of *Pseudomonas fluorescens* population in a forest nursery, our work highlights the consistency of the mycorrhizosphere effect on the functional diversity of bacterial and fungal communities in relation to the mineral weathering process, no matter the fungal symbiont, the age and species of the host tree, or the environment (nursery vs forest). We also demonstrated that the intensity of phosphorus and iron mobilization by the ectomycorrhizosphere bacteria isolated from the lower soil horizon was significantly higher as compared to that which was isolated from the upper horizon. This reveals for the first time a stratification of the functional diversity of the culturable soil bacterial communities as related to phosphorus and iron mobilization.

**Key-words:** bacteria, fungi, functional diversity, ectomycorrhizosphere effect, forest stand, iron and phosphorus mobilization.

## Introduction

In temperate and boreal forest ecosystems, the vast majority of trees lives in close association with symbiotic fungi, primarily the ectomycorrhizal ones. These fungi connect tree roots to the surrounding soil *via* a broad network of hyphae and contribute to plant nutrition by more particularly weathering the soil minerals and mobilising the nutrients required for tree growth (Landeweert *et al.*, 2001 ; Van Breemen *et al.*, 2000). In addition, the ectomycorrhizal fungi modify root exudation qualitatively as well as quantitatively (Leyval and Berthelin, 1993 ; Rambelli, 1973 ; Rygiewicz and Andersen, 1994). Furthermore, some mycorrhizal fungi associated with plant roots produce antibiotics (Olsson *et al.*, 1996). As a consequence, ectomycorrhizal fungi modify the physical, chemical and microbiological characteristics of the surrounding soil and create a special environment called mycorrhizosphere, in which the microbial equilibrium is different from that of the rhizosphere soil. Linderman (1988) qualified these modifications of the microbial equilibrium, as "mycorrhizosphere effect", which concerns a number of different organisms, notably microfungi (Neal *et al.*, 1964) and bacteria (Assigbetse *et al.*, 2005 ; Heinonsalo *et al.*, 2000).

To date, the impact of this "mycorrhizosphere effect" on soil fungal and bacterial communities in terms of plant nutrition and plant health is poorly documented although some studies have suggested that plants, by means of their root exudates (Bais *et al.*, 2004), alter the structure and activity of microbial communities. These exudates can attract pathogens (Back *et al.*, 2002) and, at the same time, selectively favour microbial

Table III.2: Physicochemical characteristics of the soil from the oak stand in the experimental forest site of Breuil (central France), at two different depths and in two soil compartments (Turpault et al., in preparation). The rhizosphere compartment corresponds to the soil that was spontaneously removed from the oak roots (diameter < 2 mm) after 3 days at 30°C.

Soil compartment	Depth (cm)	pH* (water)	Particle size distribution				C* %	N* %	Exchangeable cations* cmolc. kg <sup>-1</sup> Fine Earth				S/T*
			% mineral Fine Earth						Ca	Mg	K	Fe	
			Clay	Fine Silt	Coarse Silt	Fine Sand							
Bulk soil	0-3	4.1 (0.2)	19.4	17.5	4.8	10.2	n.d.	n.d.	0.7 (0.4)	0.5 (0.1)	0.9 (0.2)	0.3 (0.1)	15 (4)
Rhizosphere	0-3	4.1 (0.2)	19.1	17.5	5.2	10.0	n.d.	n.d.	1.3 (0.6)	0.8 (0.2)	2.0 (0.5)	0.6 (0.1)	25 (6)
Bulk soil	3-10	4.3 (0.2)	20.0	17.3	3.5	11.1	68 (8)	4.0 (0.4)	0.2 (0.1)	0.3 (0.2)	0.6 (0.2)	0.2 (0.1)	8 (2)
Rhizosphere	3-10	4.3 (0.2)	20.5	16.9	2.3	12.1	83 (9)	4.9 (0.4)	0.3 (0.1)	0.4 (0.2)	1.6 (0.4)	0.4 (0.2)	16 (3)

communities which are beneficial to the plant (Cook *et al.*, 1995 ; Dakora and Phillips, 2002). In nutrient-poor soils, microorganisms are beneficial for their contribution to the mobilization of the nutrients required for plant nutrition from soil minerals (Marschner, 1995). In this context, the aim of the study was to assess, in adult tree plantations and nutrient-poor forest soils, the impact of the ectomycorrhizosphere on the functional diversity of culturable bacterial and fungal communities potentially involved in the mobilization of iron and phosphorus from soil minerals.

For this purpose, we chose a forest stand planted with 25 year-old oak trees. We isolated bacterial and fungal strains from bulk soil, soil-ectomycorrhiza interface and ectomycorrhizae formed by *Scleroderma citrinum*, a widely distributed ectomycorrhizal fungus in the experimental site. In order to assess the impact of the abiotic environment on the structure of the microbial communities, the bacterial and fungal isolates were isolated at two different depths in the organo-mineral soil horizon. We compared the functional activity potentials of the microbial isolates with two *in vitro* tests related to phosphorus and iron mobilization, an important function in the ectomycorrhizosphere that is expected to be involved in mineral weathering and plant nutrition control.

## Methods

- Experimental site and soil properties

The experimental site, located in Breuil (central France), is heavily instrumented in order to allow intensive measurements on atmospheric deposition, litter fall, biomass immobilization, drainage, weathering flux and nutrient budgets. The oak (*Quercus petraea*) stand which was studied contained 2694 trees per ha, with an average height of 13 m. The oaks were 25 year-old. The soil cover was bare, with extremely few herbaceous plants. The soil is an alocrisol derived from granite covered by loess. It is very sensitive to acidification and nutrient deficiencies. Its physicochemical characteristics are homogenous in each soil compartment (rhizosphere or bulk soil) and in each soil horizon (0-3 cm or 3-10 cm) (Table III.2).

- Biological material

### *Collections of microbial isolates*

Soil samples and *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizae were collected in autumn under four sporocarps of *S. citrinum* (approximately five meters apart) and at two different depths: at 0 to 3 cm in the upper horizon (named S) and at 5 to 10 cm in a

Table III.3: Origin of the collections of bacterial and fungal isolates.

	Bacterial isolates			Fungal isolates	
	N <sup>b</sup>	ML	MB	N	ML
<b>S</b> <sup>a</sup> horizon	<b>43</b> <sup>c</sup> (15, 31)	<b>39</b> (27, 31)	<b>42</b> (17, 34)	<b>27</b> (20, 22)	<b>26</b> (13, 16)
<b>P</b> horizon	<b>48</b> (33, 35)	<b>48</b> (29, 31)	<b>44</b> (41, 28)	<b>31</b> (19, 15)	<b>23</b> (21, 16)
<b>Total</b>		<b>264</b>		<b>107</b>	

a: Soil horizon of origin of the microbial isolates. S for upper horizon and P for lower horizon.

b: Compartment of origin of the microbial isolates. N for bulk soil, ML for soil-mycorrhiza interface and MB for mycorrhizae.

c: In bold, the total number of microbial isolates tested. Between brackets, the number of isolates that were retained for the analysis of the results on CAS and TCP media, respectively: the isolates that did not grow on these media and the ones that were tested in experiments where the behaviour of the reference strain was not reproducible along time, were rejected.

lower horizon (P). The ectomycorrhizal fungal species *S. citrinum* was chosen because it is a ubiquitous fungus, widely distributed in the experimental forest site. Moreover its mycorrhizae can be unambiguously identified *in situ* because of its colour, morphology and typical smell. In the experimental forest site, an inventory of the epigeous sporocarps, performed three times each autumn during five years, revealed 138 ectomycorrhizal species (Buée *et al.*, 2006). Among them, *S. citrinum* represented the 9<sup>th</sup> most abundant. The frequency of its mycorrhizae on oak roots was 6% at the two different depths in the organo-mineral horizon (Buée, communication personnelle).

Two hundred and sixty four bacterial strains were isolated from three different compartments and 107 fungal strains were isolated from only two compartments (Table III.3) as follows: (1) bulk soil, *i.e.* soil remaining after picking out the roots (Marilley *et al.*, 1998) and the extramatrical mycelium of *S. citrinum* aggregated in thick white strands; 50 mg of fresh bulk soil was suspended in 1 ml sterile distilled water and shaken manually (5 times up and down). The resulting suspension was called "N". (2) Ectomycorrhizosphere soil *i.e.* soil adherent to oak-*S. citrinum* ectomycorrhizae; 20 mg of fresh ectomycorrhizae were manually shaken in order to remove the non-adherent soil particles. Then, the ectomycorrhizae were suspended in 1 ml sterile distilled water and manually shaken (5 times up and down). The resulting suspension was called "ML". (3) *S. citrinum* ectomycorrhizae; 20 mg of fresh ectomycorrhizae were suspended in 1 ml sterile distilled water and manually shaken (5 times up and down). The supernatant was discarded and replaced by 1.3 ml sterile distilled water. The suspension was vortexed 1 min and the supernatant was discarded. This operation was repeated four times. The washed ectomycorrhizae were crushed in 200 µl of sterile distilled water, after which 800 µl of sterile distilled water were added in order to obtain 1 ml of suspension. The resulting suspension was called "MB".

One milliliter of each suspension (N, ML and MB) was sampled and serial dilutions were spread onto a TSA medium 10% (3 g.l<sup>-1</sup> Tryptic Soy Broth, from Difco and 15 g.l<sup>-1</sup> agar) + 100 mg.l<sup>-1</sup> Propianazole (Tilt125, a fungicide from CIBA-GEIGY) for the isolation of culturable bacterial strains, and onto malt acid + Rose Bengal + chloramphenicol medium (10 g.l<sup>-1</sup> malt, 25 mg.l<sup>-1</sup> Rose Bengal, 200 mg.l<sup>-1</sup> citric acid, 100 mg.l<sup>-1</sup> chloramphenicol and 15 g.l<sup>-1</sup> agar) for the isolation of culturable fungal strains. Plates were incubated at 25°C for 7 days. No fungal isolates grew on the selective malt acid medium within 7 days after plating the MB suspensions. The bacterial strains were purified by three successive platings on TSA 10%, then stored at -

80°C in LB medium + 20% glycerol (Sambrook *et al.*, 1989). The pure fungal plugs were stored at 4°C in sterile ultra-pure water + 10% glycerol. These mainly corresponded to fast growing and sporulating microfungi. The bacterial isolates were identified by partial *rrs* gene sequence analysis and their BIOLOG<sup>®</sup> metabolism, as members of the *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* genera (Uroz *et al.*, submitted).

After fungal and bacterial isolations, PCR-RFLP analyses (Di Battista *et al.*, 1996) using Hinf I restriction enzyme were performed on several *S. citrinum* ectomycorrhizae. The identity of the ectomycorrhizae was confirmed by comparing their PCR-RFLP profiles to the one of the pure *S. citrinum* strain which was isolated from a sporocarp sampled in the experimental forest site.

#### *Reference strains*

The *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 strain, which promotes the symbiosis between Douglas fir and the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*, was selected by Frey-Klett *et al.* (1997). It has been used as a reference strain in the different *in vitro* biotests due to its great capacity to mobilize iron and phosphorus in these tests. Preliminary experiments revealed that the fungal strain PML2(10), isolated from the *S. citrinum*-oak ectomycorrhizosphere (ML) in the 5-10 cm horizon (P), presents a great capacity to mobilize iron and phosphorus in the different *in vitro* tests. Therefore, this fungal strain was also used as a reference strain.

- *In vitro* tests

The ability of the bacterial and fungal isolates to solubilize tricalcium orthophosphate *via* the production of acid compounds and to mobilize iron *via* the production of complexing acids and/or siderophores was assessed on the TCP and CAS media, respectively, following a modified protocol of Frey-Klett *et al.* (2005). Briefly, the different steps were as follows:

#### *Bacterial inocula*

Each bacterial isolate was grown on 10% TSA medium at 25°C for 48h. The bacteria were then collected and suspended in 2 ml of sterile ultra-pure water in order to obtain a

suspension with  $A_{600nm} = 0.3$  (about  $4.10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>). Ten microliters of this inoculum were dropped in the centre of three plates containing either 15 ml of CAS or TCP medium.

#### *Fungal inocula*

For each fungal isolate, one plug from the +4°C tube collection was placed in the centre of a Petri dish containing PDA medium (39 g.l<sup>-1</sup> of Potato Dextrose Agar from Difco). After seven days of incubation at 25°C, 6 mm-diameter fungal plugs were sampled in the periphery of the fungal colonies and transferred to the centre of three plates containing either CAS or TCP medium covered with a cellophane membrane which was previously boiled in ultra-pure water + EDTA (372 mg.l<sup>-1</sup>) during 15 minutes, washed abundantly with ultra-pure water and sterilised twice by autoclaving.

#### *Analysis of the test reproducibility*

Because of the number of the bacterial strains to be tested, 17 independent experiments were performed for the analysis of the behaviour of the entire microbial collection on the CAS and TCP media. The reproducibility in time of the data from the two *in vitro* tests was assessed by the analysis of the variability of the effects of the reference strains BBc6R8 and PML2(10) on CAS and TCP media in the successive experiments.

#### *Parameters measured for the tested bacterial isolates*

Only the bacterial isolates that grew on CAS and TCP media were retained for the functional analyses. After incubation for 7 days at 25°C on the CAS medium or 16 days on the TCP medium, two perpendicular diameters of the discolouration areas were measured and the mean values of these diameters calculated. According to these values, the bacterial isolates were distributed into three classes differing by the discolouration intensities on the CAS or TCP media (0, + and ++). The bacterial spots growing on each plate were collected by washing twice with 500 µl of sterile ultra-pure water in order to quantify the bacterial densities which were present on the media at the end of the experiment. Appropriate dilutions of the bacterial suspensions were spread on TSA 10% medium. Iron and phosphorus mobilization efficacies were then calculated for each bacterial isolate: mean value of the discolouration area diameter (cm) / (log(CFU/ml at the end of the experiment)+1). Fifty-nine and 96 bacterial isolates from the upper

horizon were tested on CAS and TCP media respectively (Table III.3). One hundred and three and 94 isolates from the lower horizon were tested on CAS and TCP media respectively (Table III.3).

#### *Parameters measured for the tested fungal isolates*

Only the fungal isolates that grew on CAS and TCP media were retained for the functional analyses. After incubation for 7 days at 25°C on the CAS medium or 16 days on the TCP medium, the perpendicular diameters of the discolouration areas were measured and the mean values of the diameters were calculated. The fungal colonies that had colonized the cellophane membrane were collected and dried 48H at 100°C in order to determine the fungal biomass. Iron and phosphorus mobilization efficacies were then calculated for each fungal isolate: mean value of the discolouration area diameter (cm) / dry biomass of the fungal colony at the end of the experiment (mg). Statistical analyses revealed that the behaviour of the reference strain PML2(10) was not reproducible in three of the nine independent experiments. Therefore all the fungal isolates that had been tested in these three experiments were discarded. Only 33 and 38 isolates from the upper horizon, 40 and 31 isolates from the lower horizon were retained for the analysis of their behaviour on the CAS and TCP media, respectively (Table III.3).

- Statistical analyses

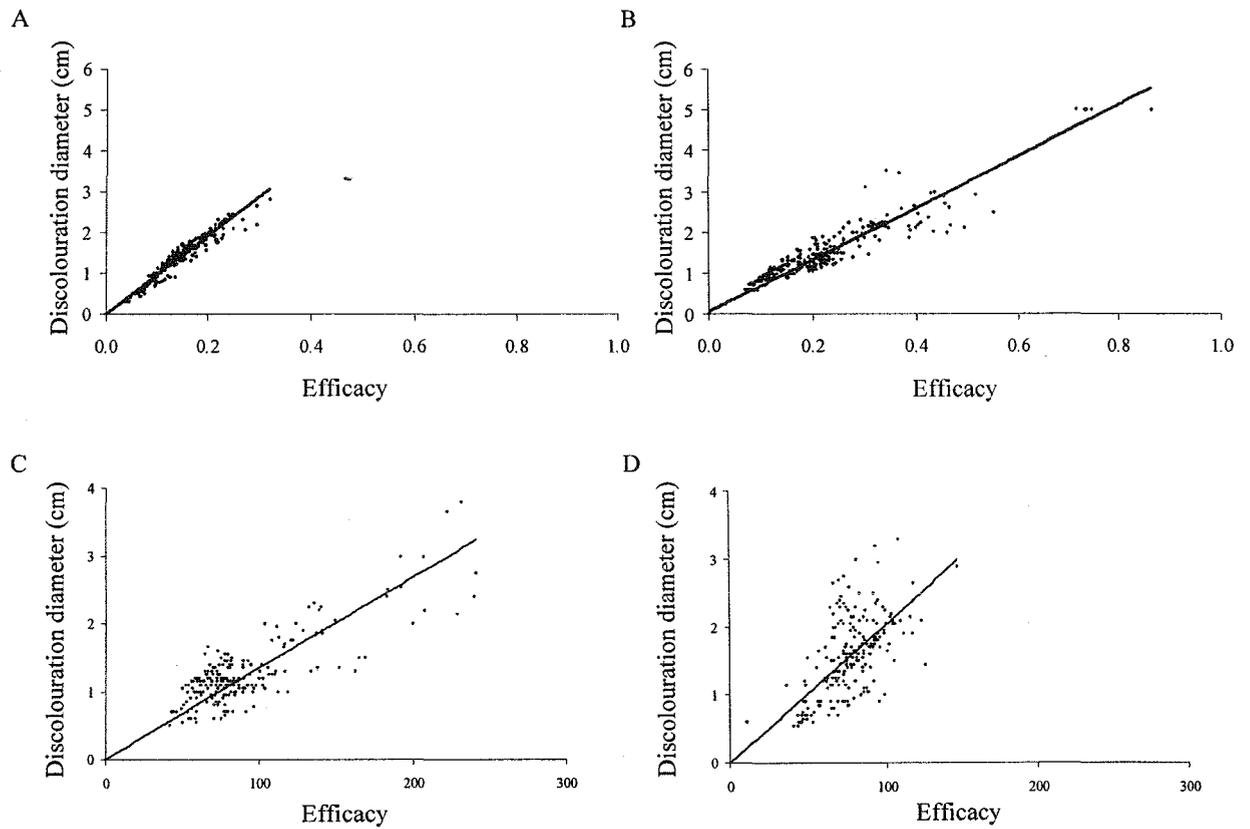
The mean diameters of the discolouration areas on CAS and TCP media were analysed with two one-factor (date of experiment or origin compartment of the bacterial isolates) ANOVAs. The different dates of experiment were compared with the Bonferroni-Dunn test at the threshold level of  $P = 0.05$ . The different compartments of origin were compared with the same test. The proportion of bacterial isolates per class, differing by the discolouration intensities on CAS or TCP media (0, + and ++), were compared between the different isolate origin compartments using a  $\chi^2$  test ( $P = 0.05$ ).

## **Results**

- Reproducibility of the data from the *in vitro* tests

In the case of the reference bacterial strain *P. fluorescens* BBc6R8, the mean values of the diameters of the discolouration areas and the efficacies of iron and phosphorus

Figure III.5: Relationship between the mean values of the discolouration diameters and the mobilization efficacies. A and B: bacterial isolates, C and D: fungal isolates, A and C: test on CAS medium, B and D: test on TCP medium. The linear regression take into account the experimental data related to only the isolates that were tested in the experiments where the behaviour of the reference strains was stable along time. The four linear regressions were significant: A,  $r^2 = 0.98$  and  $P = 0.0001$ ; B,  $r^2 = 0.95$  and  $P = 0.0001$ ; C,  $r^2 = 0.67$  and  $P = 0.0001$ ; D,  $r^2 = 0.35$  and  $P = 0.0001$ .



mobilization on the CAS and the TCP media did not significantly vary in time according to a one-factor (date of experiment) ANOVA ( $P=0.6454$  for the diameters of the discolouration areas on the CAS medium,  $P=0.5698$  for the diameters of the discolouration areas on the TCP medium,  $P=0.0876$  for the efficacies on the CAS medium and  $P=0.2453$  for the efficacies on the TCP medium). In consequence, whatever the date of the experiment, the mean values of the discolouration diameters and the mobilization efficacies for all the bacterial isolates that grew on the CAS and TCP media were compared in the same one-factor (isolate origin compartment) ANOVA.

In the case of the reference fungal isolate PML2(10), the mean values of the diameters of the discolouration areas and the efficacy of iron and phosphorus mobilization on the CAS and TCP media significantly varied along time according to a one-factor (date of experiment) ANOVA ( $P=0.0013$  for the diameters of the discolouration areas on the CAS medium,  $P=0.0007$  for the diameters of the discolouration areas on the TCP medium,  $P=0.0005$  for the efficacies on the CAS medium and  $P=0.0001$  for the efficacies on the TCP medium). The results of the experiments in which the reference strains significantly differed from standard values were discarded. In the remaining experiments, the tested isolates were compared together using a one-factor (compartment of origin of the isolates) ANOVA performed on the discolouration diameters and the mobilization efficacies.

- Choice of the best variable for characterizing the Fe and P mobilizing potentials  
The CAS and TCP discolouration efficacies were significantly correlated to the mean values of the discolouration diameters ( $P<0.001$ ) for the bacterial isolates (Figures III.5A, III.5B, III.5C and III.5D). Therefore, only the data corresponding to the mean values of the discolouration diameters were afterwards presented.

- Effect of the origin compartment of the microbial isolates on phosphorus and iron mobilization

#### *Bacterial isolates*

No matter the horizon from which they come, according to a  $\chi^2$  test ( $P<0.001$ ), the majority of bacterial isolates from the soil-mycorrhiza interface and the mycorrhizae was able to mobilize iron or phosphorus (Figures III.6A and III.6B) in the culture

Figure III.6: Distribution of the bacterial isolates according to their compartment of origin and the intensity of their discolouring effect on the CAS and/or TCP media, ie the intensity of iron and/or phosphorus mobilization. A and B: no shading, no mobilization; shading, lowest intensity; solid, highest intensity. C: no shading, no mobilization whatever the nutrient element; vertical shading, mobilization of iron only; horizontal shading, mobilization of phosphorus only; solid, mobilization of iron and phosphorus. The proportion of bacterial isolates in each of the three classes related to the intensity of iron and/or phosphorus mobilization was significantly different between the bulk soil and the two ectomycorrhizosphere compartments (soil-mycorrhiza interface and mycorrhizae) whatever the soil horizon, according to a  $\chi^2$  test ( $P < 0.001$ ).

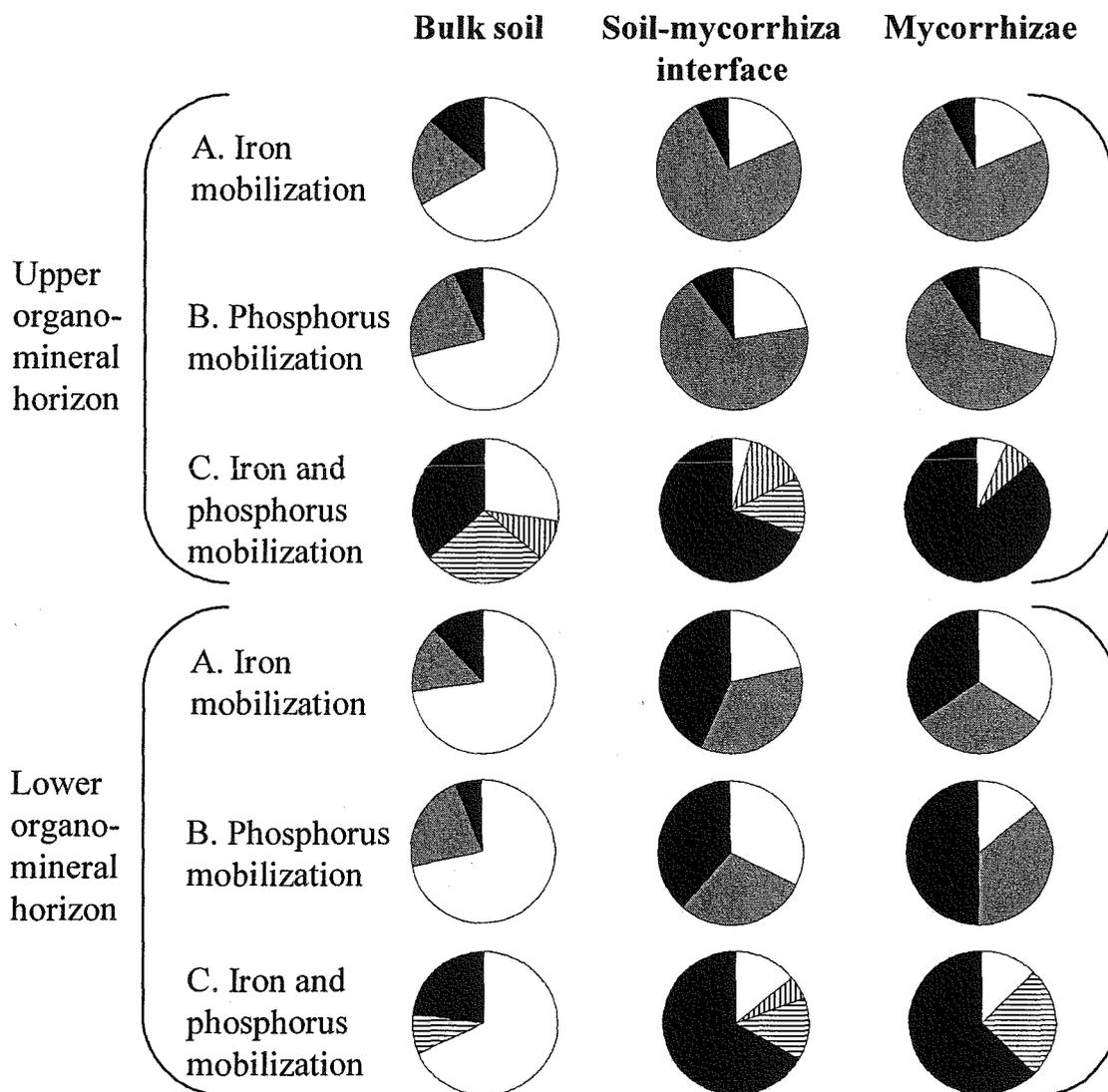
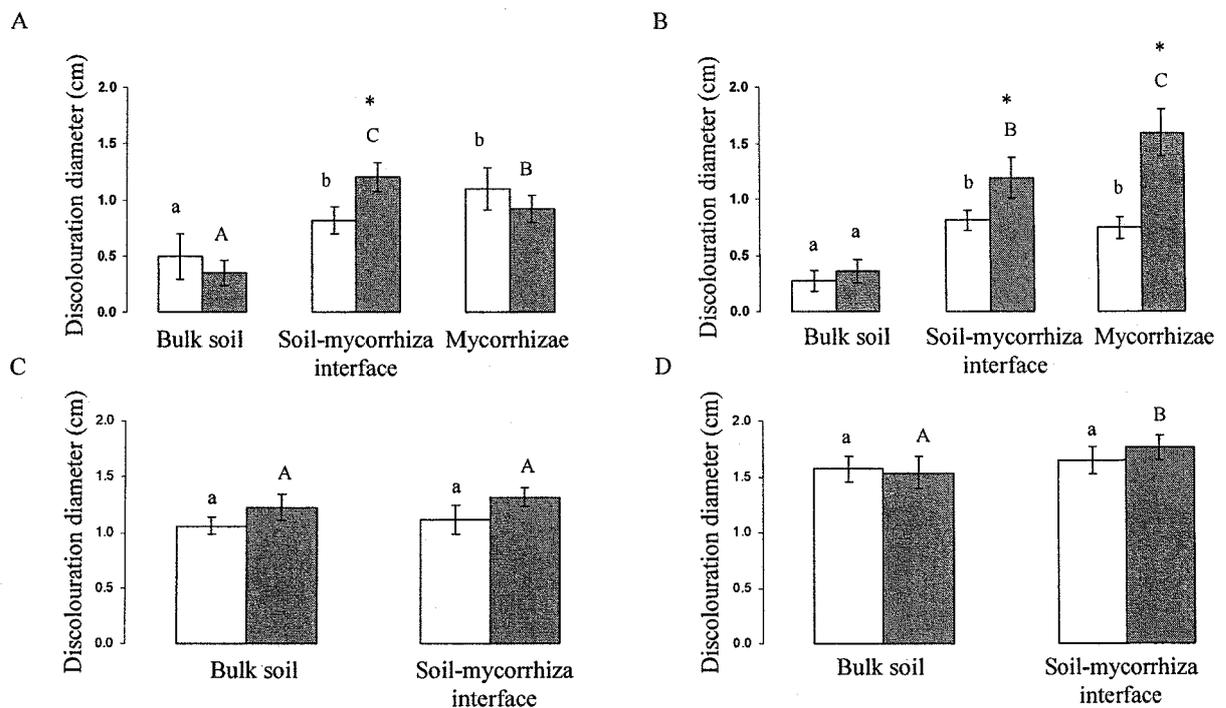


Figure III.7: Effect of the soil horizon and the compartment of origin of the bacterial and fungal isolates on the discolouration diameters on CAS medium and on TCP medium. A and B: bacterial isolates, C and D: fungal isolates, A and C: test on CAS medium, B and D: test on TCP medium. Grey: upper horizon, black: lower horizon. Bars represent standard error. For the upper horizon, values with different letters (a, b or c) are significantly different according to a one-factor (compartment of origin of the isolates) ANOVA ( $P < 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test. For the lower horizon, values with different letters (A, B or C) are significantly different according to a one-factor (compartment of origin of the isolates) ANOVA ( $P < 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test. Values with asterisks are significantly different according to a one-factor (horizon of origin of the isolates) ANOVA ( $P < 0.05$ ) for each compartment of origin of the isolates.



media, whereas the majority of isolates from the bulk soil was unable to mobilize either. This effect of the isolate origin compartment on iron and phosphorus mobilization potentials was confirmed by a one-factor (isolate origin compartment) ANOVA performed on the mean diameter values of the discolouration areas that appeared around the bacterial spots ( $P=0.001$ ). The Bonferroni-Dunn test showed that the mean diameters of the discolouration area on the CAS or TCP media differed between the bulk soil isolates, the soil-mycorrhiza interface isolates and the mycorrhiza isolates (Figures III.7A and III.7C respectively), whatever the soil horizon from which they come. Interestingly, according to a  $\chi^2$  test ( $P<0.001$ ), the majority of the bacterial isolates from the soil-mycorrhiza interface and the mycorrhizae was able to mobilize both iron and phosphorus whereas the majority of the isolates from the bulk soil was unable, no matter the sampling soil horizon (Figure III.6C).

#### *Fungal isolates*

Because the reproducibility along time of the quantitative effect of the reference isolate PML2(10) on the discolouration of the CAS and TCP media was low, only about 30 fungal isolates by horizon (the ones that were analysed in the same experiments where the effect of the isolate PML2(10) was not significantly different) were kept for statistical analyses. Because of the small number of isolates per compartment of origin, the  $\chi^2$  analyses were not performed. Nevertheless, the impact of the origin compartment of the fungal isolate on iron and phosphorus mobilization was analysed by a one-factor (isolate origin compartment) ANOVA at the threshold level of  $P=0.05$  and the Bonferroni-Dunn test. Whatever the sampling horizon, the mobilization of iron by the bulk soil isolates did not significantly differ from that of the soil-mycorrhiza interface isolates ( $P=0.3356$  and  $0.5698$  for the upper and the lower horizons respectively) (Figure III.7B). Similarly, in the 0-3 cm horizon, the mobilization of phosphorus by the bulk isolates did not significantly differ ( $P=0.4442$ ) from that of the soil-mycorrhiza interface. In contrast, in the case of the isolates from the 5-10 cm horizon, the mobilization of phosphorus by the soil-mycorrhiza interface isolates was significantly higher ( $P=0.0335$ ) than that of the bulk soil isolates (Figure III.7D).

- Effect of the origin depth of the microbial isolates

#### *Bacterial isolates*

In the case of the isolates from the bulk soil and the mycorrhizae, the mean diameters of the discolouration areas on the CAS medium did not significantly differ between the upper and the lower horizons ( $P=0.2642$  for the bulk soil isolates and  $0.3136$  for the mycorrhiza ones). In contrast, there was a significant effect ( $P=0.0142$ ) of the origin depth of the isolates in the case of the soil-mycorrhiza interface isolates (Figure III.7A). In the case of the isolates from the bulk soil, the mean diameters of the discolouration areas on the TCP medium did not significantly differ ( $P=0.7286$ ) between the upper horizon and the lower horizon. In contrast, there was a significant effect ( $P=0.0186$  and  $0.0001$ ) of the origin depth of the isolates in the case of the soil-mycorrhiza interface and the mycorrhiza isolates respectively (Figure III.7C).

#### *Fungal isolates*

Whatever the fungal isolate origin compartment, the mean diameters of the discolouration areas on the CAS and TCP media did not significantly differ between the upper horizon ( $P=0.0846$  and  $0.7602$ , respectively) and the lower horizon ( $P=0.1256$  and  $0.2445$ , respectively) (Figures III.7B and III.7D).

### **Discussion**

The direct effect of the ectomycorrhizal symbiosis on tree nutrition is now well established: *via* their extramatrical mycelium, the ectomycorrhizal fungi colonize the soil surrounding the tree short roots and release the nutrients required for tree growth, in particular by weathering the primary minerals (Landeweert *et al.*, 2001 ; Schack-Kirchner *et al.*, 2000). In contrast, very few studies have assessed a possible indirect effect of the ectomycorrhizal symbiosis on tree nutrition, *via* its selective pressure on the microbial communities that colonize the ectomycorrhizosphere. In this study, we analysed the impact of the ectomycorrhizal symbiosis on the functional diversity of the soil bacterial and fungal communities in a forest stand, in relation to the mobilization of nutrients from soil minerals and tree nutrition. We focused on phosphorus and iron, which are central nutrients for plant growth but poorly available in natural soils (Barber, 1984).

We confirmed that the CAS and TCP *in vitro* tests are well adapted to the analysis of the functional diversity among a bacterial isolate collection, as previously shown on fluorescent *Pseudomonas* by Frey-Klett *et al.* (2005). We demonstrated that the effect of a reference bacterial isolate on the discolouration of the CAS and TCP media was reproducible along time, in independent experiments. Moreover, we observed a small variability (less than 5%) of the bacterial growth and the diameter of the discolouration area between the three replicates of the same bacterial inoculum. Because the two variables “diameters of the discolouration areas” and “efficacy of iron or phosphorus mobilization” were proved to be correlated, the CAS and TCP tests constitute an inexpensive and simple method for characterizing the functional diversity of bacterial isolates. Indeed, only visual observation of the bacterial growth and measurement of the diameter of the discolouration areas are required. In contrast, the two CAS and TCP tests must still be improved if a quantitative analysis of the functional diversity among a fungal isolate collection is to be pursued, as the growth of the fungal colonies and the diameters of the discolouration areas on the two media vary too much over time in independent experiments and between the three replicates for a same isolate in a same experiment. One hypothesis would be that the vitality of the fungal plugs used as inoculum was too variable, even if always sampled at the periphery of the fungal colonies.

It is well known that ectomycorrhizal fungi contribute to the phosphorus nutrition of their host plants (Read and Perez-Moreno, 2003), *via* their impact on minerals and organic matter (Landeweert *et al.*, 2001). Other soil bacterial and fungal microorganisms also solubilize and mineralize phosphorus from inorganic and organic pools, thus influencing the availability of phosphorus to plants (Souchie *et al.*, 2006 ; Vassilev *et al.*, 1996 ; Wakelin *et al.*, 2004). Our results revealed that in the soil of a forest stand, considering all sampling compartments together, the majority of the bacterial isolates (67%) and the totality of the fungal isolates from our microbial collections were able to mobilize phosphorus from inorganic phosphate. The phosphorus-mobilization capacity of fungi and bacteria is known to be related to the production of protons and organic acids (Cunningham and Kuyack, 1992 ; Illmer and Schinner, 1995). As the same mechanisms are involved in the microbial weathering of primary minerals (Welch *et al.*, 1999 ; Wenzel *et al.*, 1994), our results suggest that the presence of phosphate-solubilising microbial isolates in the soil of our experimental

forest stand could contribute to nutrient bioavailability and therefore to tree nutrition. This hypothesis has already been partly confirmed since we were able to demonstrate the impact of three bacterial isolates from this bacterial collection, on mineral weathering and tree seedling nutrition in controlled conditions (Calvaruso *et al.*, 2006).

Due to the poor availability of iron in the soils and its essential role in many metabolic processes, certain plants and microorganisms have developed strategies for iron acquisition, *e.g.* synthesising and releasing siderophores, which are low molecular weight organic ligands with a strong affinity for iron (Hinsinger *et al.*, 2001 ; Marschner and Römheld, 1994 ; Neilands, 1995). The CAS medium we used here was originally developed by Schwyn and Neilands (1987) to detect siderophore production by bacteria. In the studied soil, our results revealed that, when considering all sampling compartments together, 62 % of the tested bacterial isolates and 96 % of the fungal ones had the ability to mobilize iron from the CAS medium. Our results are consistent with those of Baakza *et al.* (2004) who isolated ten fungal species from both marine and terrestrial environments and observed that except a marine isolate from the *Aspergillus flavus* species, all isolates were able to mobilize iron *in vitro*. Because microbial siderophores have been demonstrated to be involved in the dissolution of common silicates (Liermann *et al.*, 2000 ; Watteau and Berthelin, 1994), one could conclude from our results that many bacterial and fungal isolates, present in the forest upper and lower soil horizons we analysed, could behave as mineral weathering agents.

By comparing the intensities of iron and phosphorus mobilization by the fungal and bacterial strains isolated from ectomycorrhizae and bulk soil, we demonstrated that the oak-*S. citrinum* ectomycorrhizal symbiosis determines the functional structure of the culturable bacterial communities. These results obtained in 25 years-old stand confirm those obtained by Frey-Klett *et al.* (2005) in a nursery experiment, with nine month-old Douglas fir seedlings associated with another ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*. These authors demonstrated that the Douglas fir-*L. bicolor* ectomycorrhizosphere selected *Pseudomonas fluorescens* isolates with higher iron-mobilization efficacy and phosphorus-mobilization ability in comparison to those of the bulk soil isolates. Our results therefore suggest that the so-called "mycorrhizosphere effect" observed on the functional diversity of the bacterial communities is quite general. It depends neither on the bacterial group, nor on the age and the species of the host tree, the nature of the

fungal symbiont, the environment (nursery *vs* forest). Interestingly, the majority of the bacterial isolates which were sampled in the soil-mycorrhiza interface and the mycorrhiza compartment were able to mobilize both iron and phosphorus. These results underline the fact that the bacterial isolates in the mycorrhizosphere possess a double competency in mobilizing nutrients and raise the question as to the mechanisms involved.

We did not observe a structuring effect of the oak-*S. citrinum* ectomycorrhizal symbiosis on the iron-mobilization ability of the fungal isolates, whatever the horizon. This observation could result from the small number of isolates kept for statistical analysis, taking into account the variability of the behaviour of the reference isolate we used in our experiments. The fact that the selective pressure of the ectomycorrhizal symbiosis on the fungal and bacterial communities was mainly detected in the lower horizon raises the question as to a causal relationship between the low organic matter content of this niche and the ability of the bacteria it contains to weather minerals. Such an impact of soil properties on the diversity of bacterial communities has often been reported, in as far as the bacterial genotypic and metabolic diversity is concerned (for a review see Garbeva *et al.*, 2004). In contrast, the impact of the soil type on the functional diversity of microbial communities was so far poorly documented.

Some recent studies have demonstrated that the microbial biomass and the composition and activity of microbial communities are influenced by the soil horizons (Fierer *et al.*, 2003 ; LaMontagne *et al.*, 2003 ; Rosling *et al.*, 2003). In the same experimental forest site where we sampled our fungal and bacterial collections, Lejon *et al.* (2005) observed the decrease of microbial biomass and the modifications of the genetic composition of fungal and bacterial communities with increasing soil depth. Similarly, Rogers and Tate (2001) and Goberna *et al.* (2005) showed a significant effect of soil depth on the metabolic diversity of microbial communities, as revealed by community level physiological profile (CLPP) analyses. As previously demonstrated by Krave *et al.* (2002), this significant stratification was related to the organic matter composition of the soil layers. In the present study, we compared the functional diversity of the culturable bacterial and fungal communities in two soil horizons differing by their organic matter content. Our results reveal for the first time a vertical stratification of the functional diversity of the culturable bacterial communities in relation to phosphorus and iron mobilization potential. Whether this stratification is linked to a change in the genetic composition of the bacterial communities related to the soil depth, as

demonstrated in other studies (Fierer *et al.*, 2003 ; LaMontagne *et al.*, 2003), remains to be clarified. In the same way, the mechanisms involved in this stratification, especially the impact of the mineral composition of the soil on the selection by the ectomycorrhizal symbiosis of bacterial associates with high iron and phosphorus mobilizing efficacy will require further researches.

In conclusion, our work demonstrates that the ectomycorrhizal symbiosis has a selective pressure on the functional diversity of the bacterial and non-mycorrhizal fungal communities as it selected bacteria and fungi potentially able to mobilize iron and/or phosphorus, and to consequently weather the minerals surrounding the mycorrhizal roots. Therefore we confirm once again, but this time in a natural nutrient-poor forest ecosystem, that the ectomycorrhizal symbiosis not only has a direct positive effect on plant growth *via* the nutritional competencies of its ectomycorrhizal fungal associate but also has an indirect positive effect *via* its selective pressure on ectomycorrhizosphere bacterial and fungal communities. Further researches will be needed to determine whether this mycorrhizosphere effect leads to 'physiological complementarity' between the ectomycorrhizosphere microbial communities and the ectomycorrhizal fungi, as previously stated by Koide and Kabir (2001), when studying the interactions between ectomycorrhizal and associated saprotrophic fungi. Moreover, we showed for the first time that the functional diversity of the bacterial communities varies with soil depth in the ectomycorrhizosphere only: the bacterial isolates which possess the highest efficacies for iron and phosphorus mobilization was concentrated in the ectomycorrhizosphere niche in the lower nutrient-poor horizon. This incites us to propose a new hypothesis to explain the sustainability of forest ecosystems on nutrient-poor soils: in way of their ectomycorrhizal fungal associates, tree roots would select mycorrhizosphere bacteria highly efficient for mobilizing the poorly-available nutrients required for tree growth.

### **Acknowledgements**

We acknowledge J. Garbaye for critical review of the manuscript and K. Bateman for review of the English language. F. Guinet, M.L. Clause, B. Palin, P. Ray and B. Satrani for technical help, N. Amellal for her contribution to the sampling and isolation of the microbial collections. This work was supported by the French Research Ministry

(programme ACI Quantitative), by Andra (Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs) and the Lorraine Region.

### **3.2 Effet de la mycorrhizosphère sur la diversité génotypique et métabolique des communautés bactériennes du sol en relation avec leur capacité à altérer un minéral-test *in vitro***

Le travail qui fait l'objet de cette deuxième partie avait deux objectifs : (i) comparer la capacité de souches bactériennes isolées dans le sol global et dans l'ectomycorrhizosphère d'un arbre forestier à altérer un minéral-test, la biotite, et (ii) décrire et analyser la diversité génotypique et métabolique des souches bactériennes potentiellement impliquées dans le processus d'altération en forêt. Ce travail est le fruit d'une collaboration avec Stéphane Uroz, chercheur dans l'unité mixte de recherche INRA "Interactions Arbre - Microorganismes", qui a pris en charge la description génotypique et métabolique des souches bactériennes.

**Article : Mycorrhizosphere effect on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil.**

Uroz, S.<sup>1\*</sup>, Calvaruso, C.<sup>2</sup>, Turpault, M.P.<sup>2</sup>, Pierrat, J.C.<sup>3</sup>, Mustin, C.<sup>4</sup> and Frey-Klett, P.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INRA, UMR 1136 "Interactions Arbres-Microorganismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux.

<sup>2</sup>INRA, UR 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux,

<sup>3</sup>INRA-ENGREF, Ecologie Forestière, 54042 Nancy.

<sup>4</sup>CNRS LIMOS, UHP Nancy 1, Faculté des Sciences, Domaine Victor Grignard, B.P.239, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France.

*Soumis pour publication à Applied and Environmental Microbiology le 02 octobre 2006.*

## Résumé

Plusieurs espèces bactériennes ont déjà été décrites comme étant capables d'augmenter l'altération minérale et d'améliorer la nutrition et la croissance de la plante. Cependant, la possible relation entre le potentiel d'altération minérale, l'identité taxonomique et la capacité métabolique des souches bactériennes n'a jamais été étudiée jusqu'à présent. Ici, nous avons caractérisé une collection de 61 souches bactériennes isolées à partir de l'ectomycorhizosphère et d'ectomycorhizes de chêne - *Scleroderma citrinum* et du sol global. La capacité des souches bactériennes à altérer un minéral-test, la biotite, a été évaluée à l'aide d'un nouveau biotest en microplaques qui mesure le pH et la quantité de fer libéré en solution à partir du minéral. Nous avons révélé que les bactéries altérantes étaient significativement plus fréquentes au voisinage de *S. citrinum* que dans le sol global. De plus, l'efficacité d'altération des isolats bactériens de l'ectomycorhizosphère était significativement plus élevée que celle des isolats du sol global. Tous les isolats bactériens ont été identifiés après analyse de séquences partielles du gène *rrs*, comme appartenant aux genres *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* et *Sphingomonas*, et ont été caractérisés pour leur métabolisme du carbone par la méthode BIOLOG<sup>®</sup>. Les isolats les plus efficaces dans l'altération de la biotite appartiennent aux deux genres *Burkholderia* et *Collimonas*. Des analyses multivariées ont mené à la

définition de trois groupes métaboliques. L'un d'entre eux rassemble principalement les isolats bactériens associés à *S. citrinum*, qui présentent un haut potentiel d'altération minérale. Il se compose d'isolats consommant un nombre limité de substrats carbonés, notamment le tréhalose, un carbohydrate accumulé dans le mycélium de *S. citrinum*. Nos résultats supportent donc l'hypothèse que par l'intermédiaire de son métabolisme carboné, le champignon sélectionnerait dans le réservoir sol, des communautés bactériennes à fort potentiel d'altération. Ils posent la question de l'existence d'une complémentarité fonctionnelle entre le champignon et les bactéries associées au sein du complexe ectomycorhizien, pour l'amélioration de la nutrition de l'arbre.

**Mots-clés :** Altération minérale, *Burkholderia*, *Collimonas*, effet mycorrhizosphère, sol forestier.

### **Abstract**

To date, several bacterial species have been described as capable to promote mineral weathering and to improve plant nutrition and growth. However, the possible relationships between mineral weathering potential, taxonomic identity and metabolic ability have not been investigated so far. Here we characterized a collection of 61 bacterial strains isolated from *Scleroderma citrinum* mycorrhizae, mycorrhizosphere and adjacent bulk soil in a oak forest stand. The bacterial ability to weather biotite was assessed with a new microplate bioassay that measures the pH and the quantity of iron released from the mineral. We showed that weathering bacteria were more frequent in the vicinity of *S. citrinum* than in the bulk soil. Moreover the weathering efficacy of the mycorrhizosphere bacterial isolates was significantly higher to the one of the bulk soil isolates. All the bacterial isolates were identified by partial *rrs* gene sequence analysis, as members of the *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* genera, and characterized for their carbon metabolism by the BIOLOG<sup>®</sup> method. The most weathering efficient isolates belonged to the *Burkholderia* and *Collimonas* genera. Multivariate analysis led to the definition of three metabolic groups, one of these mainly gathered bacterial isolates associated to *S. citrinum*, which harboured high mineral weathering potential. Our results therefore support the hypothesis that by way of its carbon metabolism, the fungus select in the bulk soil reservoir a bacterial community with high weathering ability, and address the question of functional complementation

between mycorrhizal fungi and bacteria within the ectomycorrhizal complex, for the promotion of tree nutrition.

**Key-words:** *Burkholderia*, *Collimonas*, forest soil, mineral weathering, mycorrhizosphere effect.

## Introduction

Minerals constitute a reservoir of nutrients in the soils. Their physical, chemical and biological weathering play a major role in forest ecosystems with no fertilization or amendment by humans because it releases numerous nutrients required for tree growth (phosphorus, potassium, magnesium, calcium, iron). Evidences are presently accumulating which indicate that mineral weathering by soil microorganisms affects ion cycling and plant nutrition (Calvaruso *et al.*, 2006 ; Toro *et al.*, 1997; Wallander, 2000). However to date, little is known about the taxonomic and metabolic diversity of the soil microorganisms involved in this process.

The ability to solubilize poorly soluble calcium phosphates such as hydroxyapatite or to weather silicates was described for a range of bacterial genera belonging to the  $\alpha$ -proteobacteria (*Agrobacterium*, *Rhizobium*), the  $\beta$ -proteobacteria (*Achromobacter*, *Burkholderia*), the  $\gamma$ -proteobacteria (*Acidithiobacillus*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*), and the Gram positive group (*Bacillus*, *Micrococcus*) (Puente *et al.*, 2004) as well as for a range of mycorrhizal fungal genera (*Pisolithus*, *Paxillus* or *Suillus* ; Altomare *et al.*, 1999, Paris *et al.*, 1996) and non-mycorrhizal ones (*Aspergillus*, *Penicillium* ; Reddy *et al.*, 2002; Wakelin *et al.*, 2004). Phosphate-solubilizing bacteria were isolated from various environments such as eutrophic lake (Gen-Fu and Xue-Ping, 2005), mangrove tree roots (Vasquez *et al.*, 2000), cactus rhizoplane (Puente *et al.*, 2004), and tree rhizospheres (Leyval and Berthelin., 1991 ; Illmer and Schinner, 1995). However, only a limited number of studies have taken into account all together the taxonomic identity, the niche of origin and the mineral solubilization efficacy of a collection of bacterial isolates (Frey-Klett *et al.*, 2005; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

When studying the genotypic and functional diversity of fluorescent pseudomonads in a forest nursery soil, Frey *et al.* (1997) and Frey-Klett *et al.* (2005) demonstrated that the Douglas fir-*Laccaria bicolor* ectomycorrhizal symbiosis genotypically and functionally structures the fluorescent pseudomonads communities. This would result from the

biochemical impact of the symbiosis on the surrounding soil, so-called mycorrhizosphere (Rambelli, 1973; Barea *et al.*, 2002 ; Johansson *et al.*, 2004 ; de Boer *et al.*, 2005). Because the mycorrhizosphere selects strains able to solubilize inorganic phosphate and very efficient for iron mobilization, in comparison to the fluorescent pseudomonads communities from the bulk soil, Frey-Klett *et al.* (2005) suggested that the symbiosis has an indirect effect on plant nutrition via its selective pressure on bacterial communities. To confirm this hypothesis, further researches are needed, notably concerning the impact of the mycorrhizosphere on the structure of the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering, which has not been documented so far.

This is the aim of the present study. For this purpose, we selected 61 bacterial strains among 140 strains isolated from bulk soil, soil-mycorrhiza interface (mycorrhizosphere) and oak-*Scleroderma citrinum* symbiotic mantle, in a 25-year-old oak stand. We genotypically characterised them by amplifying and sequencing a portion of their 16S rDNA gene. We also determined their metabolic potential by the Biolog® method and their mineral weathering potential in a microplate assay we developed (Mustin *et al.*, in preparation). Data were then statistically analysed in order to determine if there was a relationship between the weathering ability of the bacterial isolates, their genotypic identity and/or their metabolic potential, and their compartment of origin.

## Material and methods

- Collection of bacterial strains

A collection of 140 bacterial strains was performed from oak (*Quercus petraea*)-*Scleroderma citrinum* ectomycorrhizas and bulk soil, sampled in the mineral soil horizon (5-10 cm deep) in an experimental forest site located at Breuil, in central France (Calvaruso *et al.*, 2006, Calvaruso *et al.*, submitted). The bacterial isolates were sampled in three compartments: the bulk soil (PN), the soil-mycorrhiza interface *ie* mycorrhizosphere (PML) and the symbiotic mantle (PMB). For the present study, 61 isolates were subsampled at random among the three compartments in order to be representative of the whole collection of 140 isolates: 21 PN isolates, 20 PML isolates and 20 PMB isolates. Two reference strains of *Collimonas fungivorans* named Ter6 and Ter331 (kindly provided by W. de Boer, Netherlands Institute of Ecology, Heteren), were also used during this study. All the bacterial isolates used in this study were

cryopreserved in  $-80^{\circ}\text{C}$  in 20% glycerol and then cultivated on 1/10-strength tryptic soy agar (TSA) medium ( $3\text{ g.L}^{-1}$  Tryptic Soy Broth from Difco and  $15\text{ g.L}^{-1}$  agar) and incubated at  $25^{\circ}\text{C}$ .

- Phenotypic and metabolic fingerprinting of the isolates.

Bacterial strains were examined for their colony morphology. Gram determination was performed using the aminopeptidase test from Sigma. Cell morphology and motility were observed with a BX41 Olympus microscope at x 1000 magnification and in phase interference contrast, on unstained living bacteria. The sole carbon utilization of the isolates was analysed with Biolog GN2 (Gram negative) microplates according to the manufacturer's instructions. The formazan accumulation in the bacterial cells was measured as the optical density at 590 nm by an automatic microplate reader (Bio-rad Model 550).

The quantitative data of carbon source utilization by each isolate were compared by multivariate analysis. Principal-component analysis was used to visualize the relationships between the isolates using the Splus software. All the variables being in the same unit, we analyzed the variance-covariance matrix instead of the correlation matrix, to better evidence distances between the variables. Classification of the isolates into homogeneous metabolic groups was achieved using the K-means method. Firstly, initial groups are formed and centroids are calculated as barycenters of the clusters. Secondly, the algorithm assigns each observation of the group with the closest centroid and new centroids are calculated. These steps are repeated until the centroids no longer move (McQueen, 1967).

- Mineral weathering potential of the isolates

Bacterial isolates were cultivated overnight in liquid LBm medium (Vaudequin-Dransart, *et al.*, 1995). One hundred mL of each culture were washed (v/v) three times with sterile ultra-pure water. Optical density ( $A_{600\text{nm}}$ ) of the resulting suspensions was then adjusted ca. 0.8-1. Twenty  $\mu\text{L}$  of each suspension was transferred into a well of a sterile Multiscreen microplate (MAGVN22,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  pore size, Millipore) containing 10 mg of biotite particles (size  $200\text{-}500\mu\text{M}$ ) and 180  $\mu\text{L}$  of Bushnell-Hass medium (BHm: KCl,  $20\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $150\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $80\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $90\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $65\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{KNO}_3$ ,  $100\text{ mg.L}^{-1}$  and  $\text{CaCl}_2$ ,  $20$

mg.L<sup>-1</sup>), buffered at pH 6.5 and supplemented with glucose or mannitol (2 g.L<sup>-1</sup>). The biotite was from Bancroft (Canada), a 2:1 phyllosilicate, frequently present in acid soil, which weathers relatively quickly and holds K, Mg and Fe nutrient elements. It is a pure homogeneous mineral and its composition is in g.kg<sup>-1</sup>: SiO<sub>2</sub>, 410.1 ; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 109 ; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 22.1 ; FeO, 100.5 ; MnO, 2.7 ; MgO, 189 ; Na<sub>2</sub>O, 4.1 ; K<sub>2</sub>O, 94.6 ; TiO<sub>2</sub>, 22.8 ; F, 44.2 and Zn, 0.8. Its structural formula is (Si<sub>3</sub>Al<sub>1</sub>) (Fe<sup>3+</sup><sub>0.12</sub> Fe<sup>2+</sup><sub>0.61</sub> Mg<sub>2.06</sub> Mn<sub>0.02</sub> Ti<sub>0.13</sub>) and K<sub>0.88</sub> Na<sub>0.06</sub> O<sub>10</sub> (OH<sub>0.98</sub> F<sub>1.02</sub>). Biotite and culture media were sterilized by autoclaving (20 min. at 120°C). Glucose and mannitol were added after autoclaving. Multiscreen microplates containing the 10 mg biotite particles were sterilized by UV treatment during 30 min before filling with sterile liquid media.

For each bacterial strain, 8 wells were filled with the same inoculum (4 wells for pH determination and 4 wells for iron measurement). In each experiment, 8 wells were used as a control without bacteria: they received 20 µL of BHm medium only. Two bacterial strains named PN3(3) and PML1(4) were used as negative and positive controls, respectively, in each experiment.

The Multiscreen microplates were incubated at 25°C for 48H under constant shaking (orbital, 350 rounds per minute). After incubation, the total liquid content of each well was filtered at 0.22 µM by centrifugation using MultiScreen microplates, to discard bacterial cells and biotite particules. To assess biotite weathering, filtrates were recovered in a new microplate containing 20 µL of ferrospectral® (Merck, for iron quantification) or bromocresol (1 g.L<sup>-1</sup>, Sigma, for pH determination). The pH and the amount of total iron (Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>) released from biotite in the solution were both established by measuring the optical density at 595 nm with a Bio-rad model 550 microplate reader. Calibration curves were built to determine the relationship between the optical density and the amount of protons or of iron released, respectively for the bromocresol green and the ferrospectral dyes. Average value of the four replicates for iron quantification and for pH measurements were used to determine the weathering potential of each isolate.

In order to investigate which mechanisms could explain the weathering ability of the bacterial isolates of the collection, the same microplate weathering assay was performed with serial dilutions of citric acid (10<sup>-3</sup> M, pH adjusted from 6 to 2) and hydrochloric acid (concentration adjusted to be from pH 6 to 2), in the absence of bacteria. Citric acid was used as a model of chelating molecule and hydrochloric acid as model of acidifying molecule. Experiments were performed in triplicate in the same conditions as described

above. The data obtained were used to draw two reference curves corresponding to the complexation and acidification reactions that occur during the weathering process.

- Molecular fingerprinting of the isolates.

Rrs gene amplification was performed using the universal set of primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), which allowed the amplification of almost the entire gene (Bruce *et al.*, 1992). Polymerase chain reactions were performed in a total reaction volume of 50  $\mu$ L containing 1x PCR Mastermix (Eppendorf®), 0.1  $\mu$ M primers and 1  $\mu$ L cell extract. The following temperature cycle was used: an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 56°C and 1 min 30 s extension at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were purified and concentrated using the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen). Sequencing reaction was accomplished using the multicapillary BECKMAN CEQ8000 system. The sequencing primer used was 518r (5'ATTACCGCGGATGCTGG-3') (Reiter *et al.*, 2002). The sequences were compared with those in the GenBank databases ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)), using the Blast programme (Altschul *et al.*, 1997).

- Phylogenetic analysis.

The partial 16S rRNA gene sequences from the bacterial isolates were aligned with published 16S rRNA gene sequences from  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria by use of Clustal X, version 1.8. Phylogenetic algorithms and tree design (DNA-DIST, NEIGHBOR, and SEQBOOT) were operated using the PHYLIP 3.65 package, written by J. Felsenstein (1993). Bootstrap analysis was based on 1,000 replicates.

- Statistical analysis

The effects of the compartment of origin and of the sugar source (glucose or mannitol) on the weathering ability of the bacterial isolates were determined using analysis of variance (ANOVA) at the threshold level of  $P = 0.05$ , and the Bonferroni-Dunn test. The Superanova software was used for all these analysis. Correlation between pH value and the amount of released iron was analysed using a linear regression analysis at the threshold level of  $P = 0.05$  with the Statview software.

Figure III.8: Relationship between the mean values of iron released from the biotite (up on the graph), the mean values of pH (down on the graph) and the three compartments of origin of the bacterial isolates: Bulk soil (PN), white, mycorrhizosphere (PML), grey and mycorrhiza (PMB), black. Bars correspond to standard deviation.

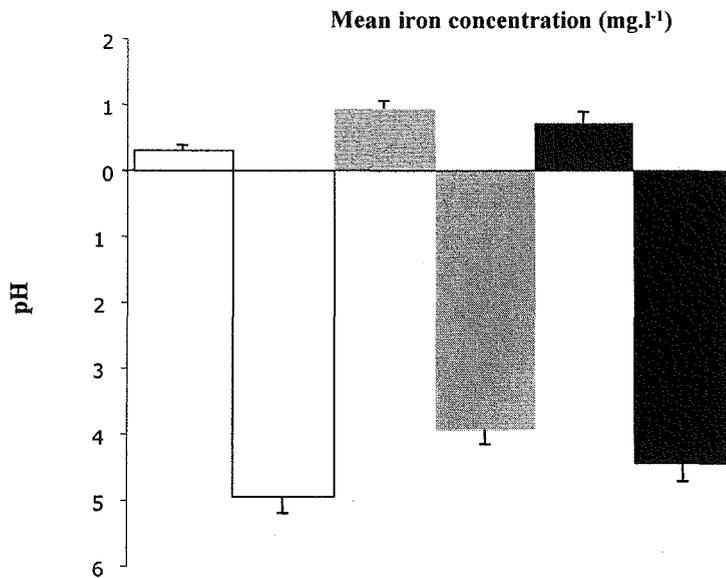
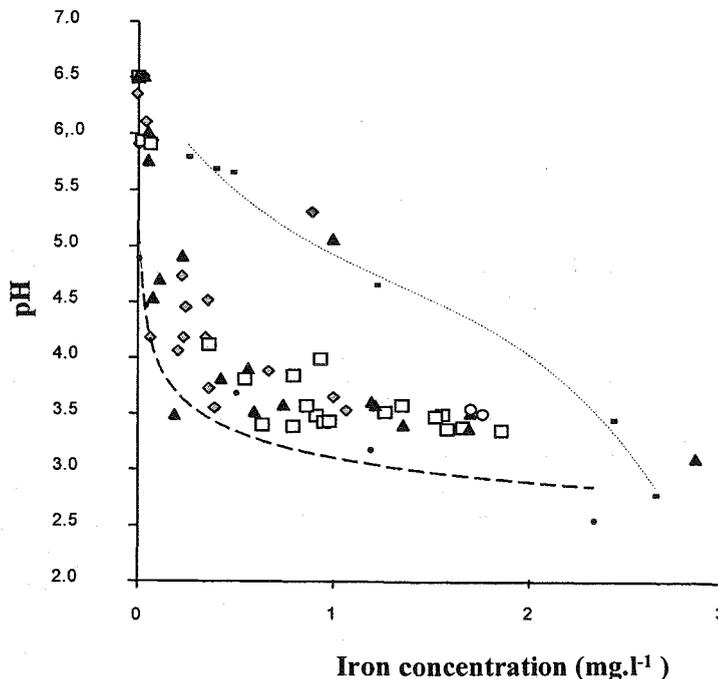


Figure III.9: Projection of the 61 bacterial isolates in function of their individual biotite weathering potential. Each plot represents a bacterial isolate from one of the three following compartments of origin: bulk soil (PN, grey rhombus), mycorrhizosphere (PML, white square) and mycorrhiza (PMB, black triangle). The two reference strains *Collimonas fungivorans* Ter6 and Ter331 are represented by white circles. Each plot is the mean value of four replicates. The weathering efficacies of PML and PMB isolates were significantly higher than the ones of PN isolates, according to a one-factor ANOVA (compartment of origin,  $P=0.0001$ ) and the Bonferroni-Dunn test, performed on the iron concentrations in the culture filtrates. The two curves correspond to the weathering effect of a complexing agent (citric acid, top curve) and a strong acid (hydrochloric acid, bottom curve). The relative distribution of the bacterial spots with respect to these two curves suggests mechanisms for the weathering effect of the bacterial isolates.



## Results

- Relationship between mineral weathering potential and origin of the bacterial isolates

A microplate assay was developed to quantify the weathering potential of bacterial isolates, by measuring the amount of iron and protons released in solution from the biotite. The weathering efficacies of PML and PMB isolates were significantly higher than the ones of PN isolates, according to a one-factor ANOVA (compartment of origin,  $P = 0.0001$ ) and the Bonferroni-Dunn test, performed on the iron concentrations in the culture filtrates (Figures III.8 and III.9). The distribution of the 61 bacterial isolates according to their zone of origin and their weathering efficacy following their belonging to three weathering efficacy classes ( $< 0.1$  ;  $< 0.8$  and  $> 0.8$  mg.L<sup>-1</sup> of iron released) highlights that the frequency of the most weathering efficient isolates was higher in the sampling compartments associated to mycorrhizosphere than in the bulk soil compartment (Figure III.10).

- Relationship between mineral weathering potential and weathering mechanisms

Most of the bacterial isolates able to release high amounts of iron from the biotite had also the ability to produce a high quantity of protons: (Figure III.9). This tendency was confirmed by a linear regression analysis between the amount of iron released from the biotite and the log value of the pH ( $Y=14.88+236.26X$ ,  $R^2=0.75$ ,  $P = 0.0001$ ). To illustrate, the majority of the isolates able to release ca. 1 mg.L<sup>-1</sup> of iron acidified the solution to pH values between 3.64 to 3.09 with the exception of the isolate PMB4(3) (pH = 5.07). Among the 61 isolates tested, PMB3(1) was the most efficient one; it released ca. 2.9 mg.L<sup>-1</sup> of iron and acidified the solution to pH 3.09. The majority of the bacterial spots, represented in figure III.9, was distributed along the reference curve of acidification.

- Relationship between taxonomy and origin of the bacterial isolates

The analysis of the nucleotide sequence of an amplified portion (ca. 400 b) of the *rrs* gene of each isolate revealed that the 61 isolates belong to the three  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria lineages only. All of the isolates analysed showed strong homology (95

Figure III.10: Distribution of the 61 bacterial isolates according to their zone of origin and their biotite weathering efficacy in three weathering classes (in mg.l-1 of iron released): < 0.1 (in white), < 0.8 (in grey) and > 0.8 (in black).

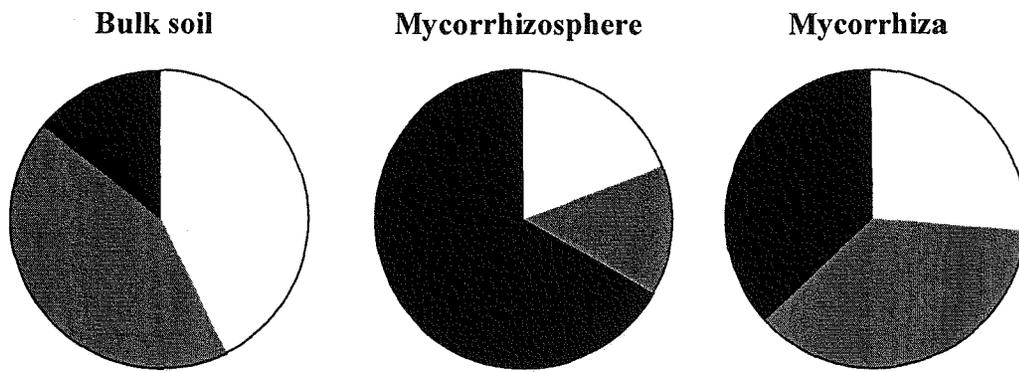
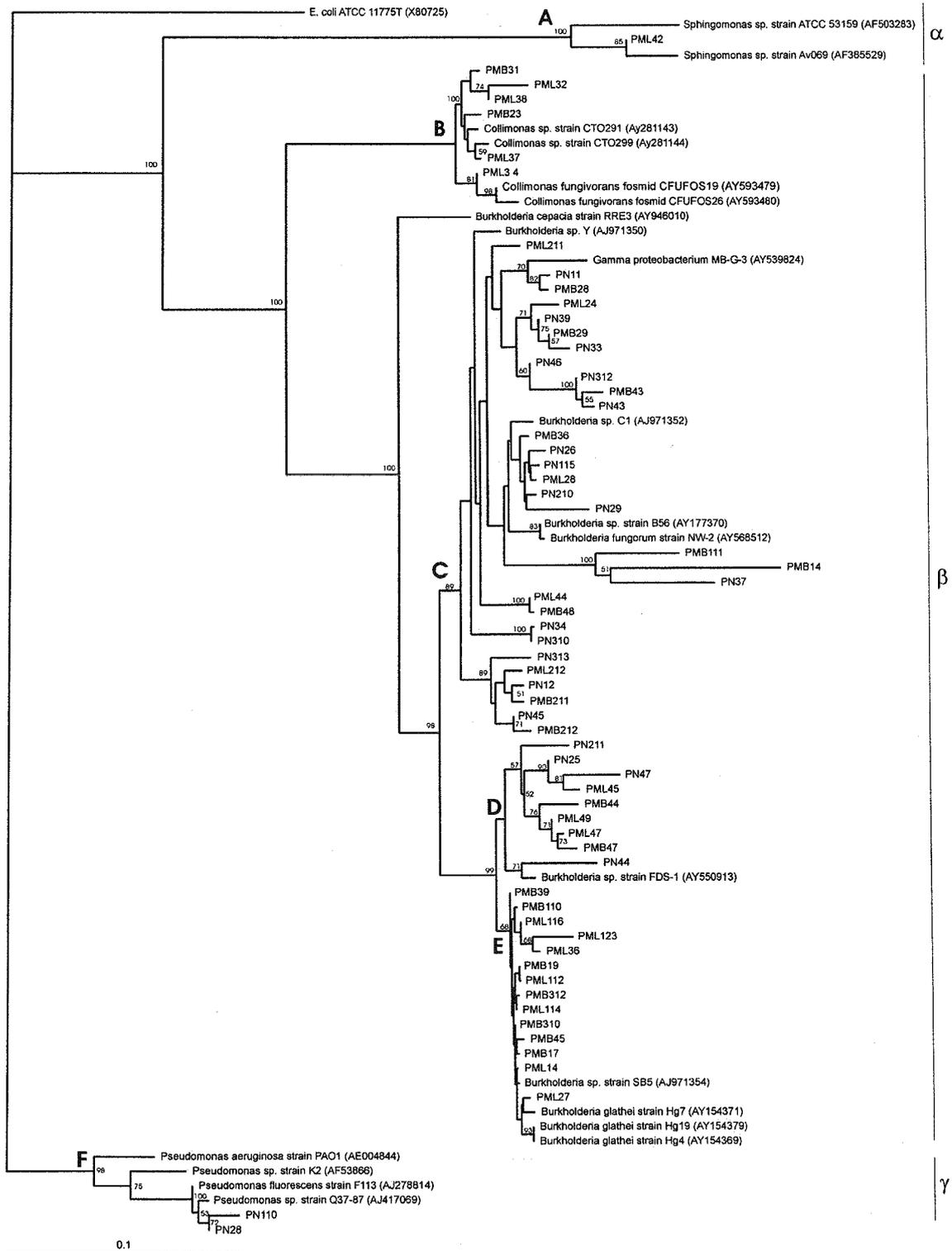


Figure III.11: Phylogenetic tree constructed with the neighbor-joining method showing the relationship between the 61 bacterial isolates of the present study and reference strains from the literature, based on PCR-sequencing of a portion of the 16S rRNA gene (pA-pH primers). A bootstrap analysis was performed with 1000 repetitions, and only values above 50 are shown. According to the bootstrap analysis, six clusters named A, B, C, D, E and F were defined. The bacterial isolates from this study are named according to their compartment of origin as follow: bulk soil (PN), mycorrhizosphere (PML) and symbiotic mantle (PMB).



to 100%) with cultivated and uncultivated environmental bacteria from the four genera *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas*.

According to the phylogenetic analysis, the bacterial isolates were clustered into six groups (Figure III.11). Eighty-four percent of the 61 bacterial isolates (cluster C, D and E) belonged to the *Burkholderia* genus. Clusters C and D gathered isolates coming from all the three sampling compartments. On the contrary, cluster E gathered only isolates coming from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle, showing 97 to 100% sequence homology with the *Burkholderia glathei* species. In the same way, cluster B gathered only isolates from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle, that belonged to the *Collimonas*. The isolates PML3(4), PML3(7), PML3(8) and PMB3(1) showed 99% sequence homology with the *rrs* gene of the *Collimonas fungivorans* species. Clusters A and F gathered only one *Sphingomonas* strain (PML4(2)) from the mycorrhizosphere and two *Pseudomonas* strains (PN1(10) and PN2(8)) from the bulk soil, respectively.

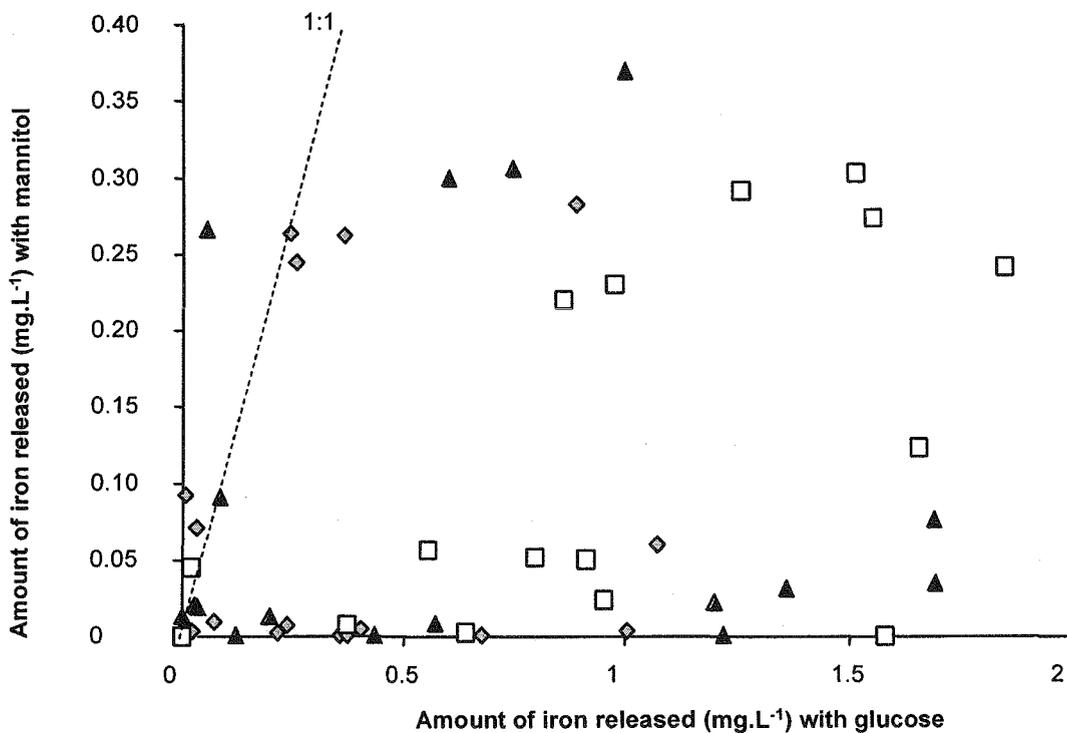
- Relationship between taxonomy, mineral weathering efficacy and origin of the bacterial isolates

Among the different bacterial genera that were identified, the *Collimonas* genus, that was isolated in association with the mycorrhizas only, gather the bacterial isolates that were significantly the most active for weathering the biotite ( $1.49 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0.3$  of iron released in average), according to a one-factor (genus identity) ANOVA ( $P = 0.0001$ ) and the Bonferroni-Dunn test. In contrast, the only *Sphingomonas* isolate harboured a low efficacy value ( $0.94 \text{ mg.L}^{-1}$  of iron released). Concerning the 51 *Burkholderia* isolates, the ones from the soil-mycorrhiza interface (PML ;  $0.83 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0.15$  of iron released) and from the symbiotic mantle (PMB ;  $0.59 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0.14$  of iron released) were significantly more efficient for biotite weathering than the PN isolates ( $0.31 \text{ mg.L}^{-1} \pm 0.08$  of iron released), according to a one-factor ANOVA ( $P = 0.0001$ ) and the Bonferroni-Dunn test.

- Impact of the carbon substrate on the weathering efficacy

The potentials of mineral weathering discussed above were measured with glucose as the sole carbon substrate in the microplate assay. As sugar utilization varies among the soil bacteria and could influence directly or indirectly their weathering ability, mannitol

Figure III.12: Influence of the carbon source on the biotite weathering potential. The weathering potential of 20 bacterial isolates from bulk soil (PN, grey rhombus), 16 isolates from mycorrhizosphere (PML, white square) and 17 isolates from symbiotic mantle (PMB, black triangle), was assayed with either mannitol or glucose as sole carbon source. Each plot is a mean value of four replicates and represents the amount of iron ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) released from the biotite. For legibility reasons standard errors were not presented and a straight line corresponding to equivalent amount of iron released (ratio 1:1) from biotite in presence of glucose or mannitol was added. Whatever the origin of the isolates, the weathering efficacies of the isolates were significantly higher in presence of glucose than in the presence of mannitol and could be classified as follow:  $\text{PML} > \text{PMB} > \text{PN}$  according to a two-factor ANOVA ( $P = 0.0001$ ) and the Bonferroni-Dunn test. Whatever the carbon source provided to the isolates, the mycorrhizosphere isolates (PML) were significantly more efficient than the bulk soil isolates (PN), according to a one-factor ANOVA ( $P = 0.0431$ ) and the Bonferroni-Dunn test.



was also tested for 20 isolates from PN, 16 from PML and 17 from PMB (Figure III.12). This sugar, metabolised by ca 94% of the tested bacterial isolates according to BIOLOG analysis, is frequently detected in fungal exudates. In the presence of mannitol as a sole carbon source, the weathering efficacy of the PN isolates was significantly lower than the ones of the PML and PMB isolates. In contrast, the weathering efficacies of the PML and PMB isolates were not significantly different, according to a one-factor ANOVA ( $P = 0.0431$ ) and the Bonferroni-Dunn test. Whatever the compartment of origin of the isolates, the weathering efficacies were significantly higher when the bacteria were incubated in the presence of glucose as a sole carbon source than in the presence of mannitol, according to a two-factor (carbon source, origin of the isolates) ANOVA ( $P = 0.0001$ ) and the Bonferroni-Dunn test, with the exception of isolate PMB2(9) which was more efficient in the presence of mannitol ( $0.265 \pm 0.018 \text{ mg.L}^{-1}$  of iron released) than in the presence of glucose ( $0.058 \pm 0.32 \text{ mg.L}^{-1}$  of iron released). Conversely, four isolates from the symbiotic mantle (PMB1(9), PMB1(11), PMB3(12) and PMB4(5)), one isolate from the mycorrhizosphere (PML1(23)) and two isolates from the bulk soil (PN2(10), PN4(7)) were able to weather the biotite in the presence of glucose only. Finally, whatever the carbon source provided to the bacteria, the weathering efficacy of the PML strains was significantly higher than the one of the PMB strains, that was also significantly higher than the one of the PN strains, according to the same two factor ANOVA ( $P = 0.0001$ ).

- Multivariate analyses of the metabolic fingerprints.

As carbon metabolism may influence mineral weathering, the 61 isolates were characterized by the BIOLOG method in order to determine if some metabolic traits can be related to the weathering efficacy of the bacterial isolates. Microplates GN2 were used as the aminopeptidase test stated that all the bacterial isolates were gram negative. The quantitative data of the carbon source utilization (95 data per isolate) were subjected to multivariate analysis, to cluster the isolates sharing the same metabolic traits and to determine the characteristic traits of each cluster. Principal-component analysis was used to visualize the relationships between bacterial isolates. As several bacterial isolates harboured high sequence homology with the *Collimonas* genus, two reference strains named Ter6 and Ter331 were added to this study. According to this analysis, the projection of the 61 isolates and of the two reference strains on the plane

Figure III.13: Projection of the 61 isolates on the plane defined by the first two principal components. The classification of the isolates into three homogeneous metabolic groups named A, B and C was achieved using the K-means method. Compartments of origin of the bacterial isolates are presented as follow: bulk soil (PN, grey rhombus), mycorrhizosphere (PML, white square) and symbiotic mantle (PMB, black triangle). The two reference *Collimonas* strains Ter6 and Ter331 are presented in grey cross.

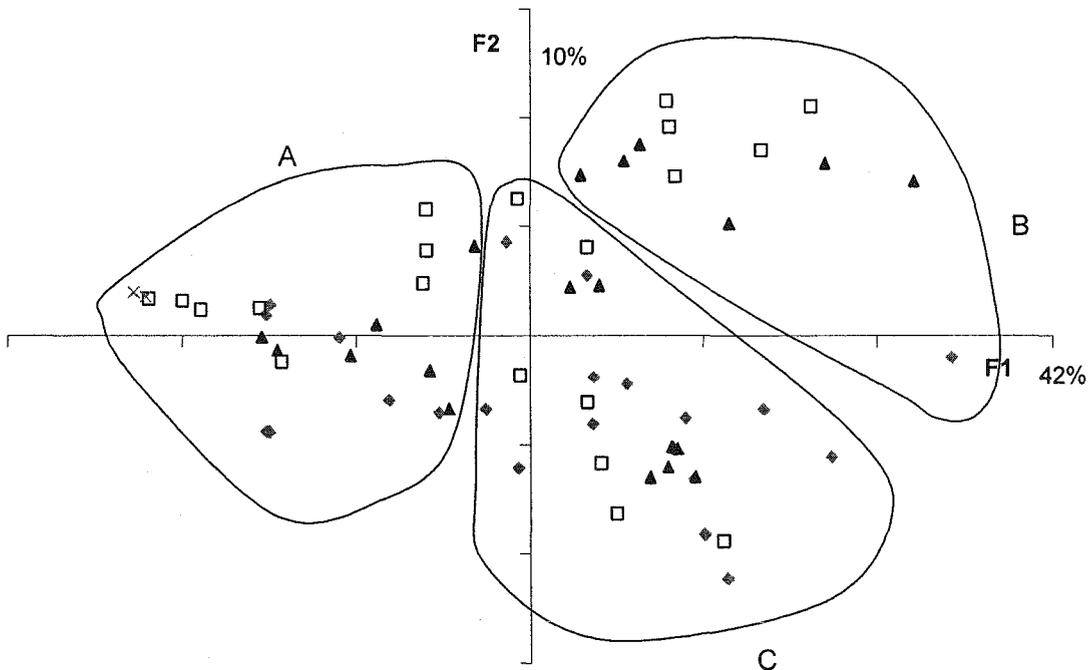
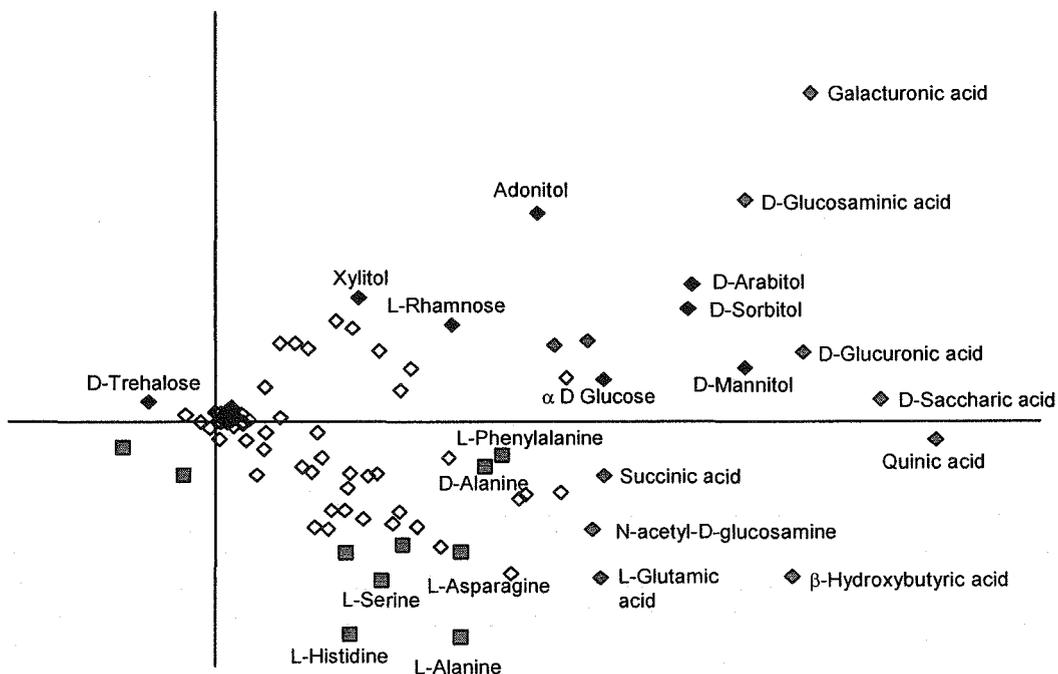


Figure III.14: Component principal analysis of the metabolic profiles of the 61 bacterial isolates. Projection of the 95 carbon substrates from the Biolog GN microplates on the plane defined by the first two principal components. For legibility reasons, only the most characteristic substrates of groups A, B and C are identified (aminoacids (grey square), sugars (black rhombus) and carboxylic acids (grey rhombus)). The positions of the other substrates are indicated by white rhombus.



defined by the first two principal components, which account for 42 and 10%, respectively, of the total variance, reveals that most of the bacterial isolates (ca. 86%) from the bulk soil (PN) gathered below the F1 axis, whereas 64% of the isolates from the mycorrhiza (PML+PMB) gathered above (Figure III.13). Using the K-means method, the data set was classified into 3 clusters named A, B and C (number fixed a priori) (Figure III.13). Isolates from the mycorrhizosphere and from the symbiotic mantle were equally distributed in the three clusters contrary to the isolates from the bulk soil that were concentrated in cluster A (ca. 33%) and C (62%) only.

The analysis of the metabolic data showed that the F1 axis was positively correlated with all the substrates except the trehalose, the L-glycyl-L-glutamic acid and the L-alanyl-glycine. This analysis allowed also to classify the most discriminating substrates for each cluster (Figure III.14). Bacterial isolates from cluster A seem to use a limited number of substrates contrary to isolates from clusters B and C. Trehalose, L-glycyl-L-glutamic acid and L-alanyl-glycine appeared as the preferentially consumed substrates of cluster A. Isolates from cluster B seemed to preferentially use carbohydrates, contrary to isolates from cluster C which seemed to prefer amino acids. The ten most characteristic substrates for cluster B, which gather isolates from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle only, were D-saccharic acid, galacturonic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, D-mannitol, D-arabitol, D-sorbitol,  $\alpha$  D-glucose, L-aspartic acid, bromosuccinic acid and for group C were quinic acid,  $\beta$ -hydroxybutyric acid, L-glutamic acid, N-acetyl-D-glucosamine, D-L-succinic acid, lactic acid, D-fructose, formic acid, L-phenylalanine, D-alanine (in decreasing order of importance).

## Discussion

Soil colonization by microorganisms depends both on their ability to have access and to metabolise the organic and inorganic nutrients present in the soil, and to interact with other microorganisms, especially root-associated ones like mycorrhizal fungi. In the rhizosphere of forest trees, ectomycorrhizal fungi, microfungi and bacteria physically interact and form multitrophic ectomycorrhizal complexes that contribute to tree nutrition (Frey-Klett *et al.*, 2005). So far, very few studies have addressed the question of the functional diversity among the different microbial components of these complexes in relation to mineral weathering, a central process for gross production and nutrient cycling. In this context, our objective was to focus on the analysis of the

diversity of the bacterial communities associated to ectomycorrhizae, in a nutrient-poor forest ecosystem. In our study, we observed that the bacterial isolates from the bulk soil were significantly less efficient for biotite weathering than the isolates from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle. Moreover, the frequency of isolates with the highest weathering efficacy was significantly higher in the sampling compartments associated to mycorrhizae, than in the bulk soil. Therefore, our results confirm once again that ectomycorrhizosphere structures the functional diversity of cultivable bacterial communities, as previously demonstrated by Frey *et al.* (1997) and Calvaruso *et al.* (submitted) using the two CAS and TCP *in vitro* tests which relate to iron and phosphorus mobilization. Because very little is known about the possible relationship between genotype, metabolism and weathering potential in soil bacterial communities, the 61 bacterial strains we isolated were also characterized by PCR-sequencing of a portion of the *rrs* gene and the BIOLOG<sup>®</sup> method.

Our 61 bacterial isolates belong to the *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* genera, the *Burkholderia* genus being the most frequent one. Strains closely related to known species of the *Burkholderia* and *Pseudomonas* genera have already been described to be the dominant cultivated bacteria associated with ectomycorrhizal fungi (Duponnois *et al.*, 1991; Poole *et al.*, 2001; Bending *et al.*, 2002). *Collimonas* bacterial strains have been previously characterized as growing at the expense of living fungi (de Boer *et al.*, 2004). To our knowledge, this is the first time that bacterial strains belonging to the *Collimonas* and *Sphingomonas* genera are described for their weathering ability. In our study, the six *Collimonas* strains we isolated were among the most efficient ones, like two other *Collimonas* strains, named Ter6 and Ter331 (de Boer *et al.*, 2004), that were assayed in this work as a reference. Interestingly, these strains were only isolated from the vicinity of the *S. citrinum* mycorrhizae and according to the BIOLOG method, they proved to use very few carbon sources only, especially trehalose which is a fungus disaccharide accumulated in *S. citrinum* mycelium (data not shown). This strongly suggests that our *Collimonas* isolates are fungus-dependant. In the *Scleroderma*-oak ectomycorrhizosphere, the *Collimonas* isolates could use trehalose exudated by the fungus or, because of their chitin-degrading ability (de Boer *et al.*, 2005) they could hydrolyse the hyphae for releasing it. De Boer *et al.* (2001) suggested that *Collimonas* strains could use their chitinolytic ability more for cohabiting with fungal hyphae than for predation. Therefore, we could here make the hypothesis of a reciprocal beneficial relationship in

which *Scleroderma* favours *Collimonas* by releasing trehalose and *Collimonas* stimulates *Scleroderma* growth by releasing inorganic nutrients from the soil minerals.

According to the phylogenetic analyse of the *rrs* gene, our 61 bacterial isolates were clustered in six groups. Among them, the *Burkholderia* isolates which represented the more frequent genus, were clustered in three groups corresponding to variable weathering efficacies. The isolates from the two first groups C and D came from all the sampling compartments and presented a mean weathering efficacy respectively of 0.17 mg.L<sup>-1</sup> and 0.39 mg.L<sup>-1</sup>. On the contrary, the isolates from group E harboured a significantly higher weathering efficacy of 1.13 mg.L<sup>-1</sup>. These isolates presented high sequence homology with the *B. glathei* species and came from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle. Interestingly, one of these strains named PML1(12) was recently described as being able to efficiently solubilize iron and inorganic phosphate *in vitro*, to significantly increase biotite weathering and pine growth (Calvaruso *et al.*, 2006). If various *Burkholderia* strains have already been described for their ability to solubilize phosphate (Lin *et al.*, 2006 ; Vassilev *et al.*, 2006), this is to our knowledge only the second report for the *B. glathei* species (Kim *et al.*, 2005).

Multivariate analysis of the metabolic fingerprints confirmed that bacterial isolates belonging to the same genera gathered together. The F2 axis allowed to distinguish the bulk soil isolates from the isolates of the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle. Interestingly, the isolates from the bulk soil were present in only two (groups A and C) of the three groups that were identified with the multivariate analysis. The third group (group B) exclusively gathered strains from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle. Such a regrouping of isolates from a mycorrhizosphere origin, according to BIOLOG data, was also observed in the mycorrhizosphere of Douglas fir-*Laccaria bicolor* in a forest nursery soil (Frey *et al.*, 1997). The BIOLOG fingerprints were used to identify carbon-substrates preferentially metabolised by each group of isolates. As already reported by Frey *et al.* (1997), bacterial isolates from bulk soil preferentially used aminoacids and carboxylic acids. Among the 61 bacterial isolates tested, the quinic acid which was preferentially used by isolates from the mycorrhizosphere and the symbiotic mantle, was the most discriminating substrate. It is an abundant plant product. Another discriminating substrate that characterized these isolates was the N-acetyl-D-glucosamine, which was also previously described as a metabolite preferentially used by bacterial isolates from the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere (Frey *et al.*, 1997). N-acetyl-D-glucosamine could either result from the release of plant

metabolites or from the chitin hydrolysis of the *S. citrinum* cell wall. Interestingly, bacterial isolates from group A, mainly from mycorrhizosphere and symbiotic mantle origin, were able to use a restricted number of carbon substrates, like trehalose, L-glycyl-L-glutamic acid and L-alanyl-glycine. A proportion of 23% of the 61 bacterial isolates were trehalose-users: only two isolates from the bulk soil and 13 isolates from the vicinity of *S. citrinum*. So, the high proportion of trehalose-users associated with *S. citrinum* suggests that this symbiont, which accumulates trehalose, could exert a trehalose-mediated selection on bacterial communities as previously shown by Frey *et al.* (1997) on fluorescent *Pseudomonas* communities. Concerning the question of the mechanisms of the selective pressure of the symbiosis on the bacterial communities, it was recently demonstrated that ectomycorrhizae can exert a direct effect on the genetic diversity of soil bacterial communities which is not mediated by their promoting effect of the host roots (Assigbetse *et al.*, 2005).

To address the question of a possible relationship between the carbon metabolism of the 61 bacterial strains and their mineral weathering efficacy, we calculated the mean weathering efficacy corresponding to each BIOLOG group. Groups A and B, which mainly contained isolates from the vicinity of the symbiosis, harboured the highest weathering efficacies. This result illustrates in a different manner the fact that ectomycorrhizosphere selects bacterial isolates with a high weathering potential. Because the weathering ability of the isolates was assessed *in vitro* in the presence of glucose as sole carbon source, one should wonder if the weathering efficacies we measured and the glucose utilization by the isolates were correlated. This was not the case (data not shown). Nevertheless, the carbon source we have used in our weathering bioassay could have influenced our results. Indeed it has been demonstrated that carbon source determines the activity of various phosphate-solubilizing bacteria (Nautiyal *et al.*, 2000). Some bacterial strains were proved to be more active for phosphate-solubilization when using xylose, and others when using lactose or mannitol.

As the aim of this study was to compare the weathering efficacy of the 61 isolates from different origins and to assess the impact of the ectomycorrhizosphere on the structure of the bacterial community, only two substrates were tested in the weathering bioassay: glucose and mannitol. These sugars were chosen because i) glucose utilization is a classical bacterial trait and ii) mannitol is a common sugar found in the fungal exudates (Martin *et al.*, 1984, 1985, 1998 ; Rangel-Castro *et al.*, 2000). Interestingly, whereas most of the isolates were able to use mannitol whatever their compartment of origin,

only one isolate of *Burkholderia*, sampled in the ectomycorrhizosphere, was significantly more efficient for biotite weathering in the presence of mannitol rather than in the presence of glucose. Variations of the phosphate-solubilizing ability were observed when ammonium or different sources of nitrates were used as nitrogen source (Nautiyal *et al.*, 2000). Here, to avoid this problem, the medium used for the weathering assay was amended with ammonium and nitrate in a ratio 1:1. Many other parameters were also proved to influence the phosphate-solubilizing ability of bacteria, like low levels of calcium, pH and temperature (Nautiyal *et al.*, 2000). Consequently, these results suggest a link between the bacterial metabolism, the soil conditions and the phosphate-solubilizing ability of the soil bacteria. But a fundamental question remains, as suggested by Bennet *et al.* (2001): "Does the enhanced weathering of mineral by microorganisms offer an advantage to that population, or is it simply a coincidental by-products of metabolism?". The authors showed that in low phosphate environment, even P-containing feldspars were weathered rapidly and thus suggested that silicate weathering is sometimes driven by the nutrient requirements of the microbial consortium.

Microorganisms are known to influence the formation or the dissolution of soil minerals by different mechanisms, playing a central role in soil fertility (Ehrlich, 1996 ; Banfield *et al.*, 1999). Two main mechanisms are suspected to be involved in mineral weathering in aerobic conditions: acidification and complexation. One hypothesis is that these mechanisms are linked to the production of geochemically reactive by-products of the bacterial metabolism. Indeed acidification is generally linked to the production of microbial organic acids and protons, and complexation to the production of microbial chelating molecules like siderophores or organic acids. In our study, the comparison of the weathering efficacies of the 61 bacterial isolates to the reference curves of acidification and complexation, suggests that both mechanisms were involved. Most of the bacterial isolates that effectively weathered the biotite harboured the ability to strongly acidify the culture media. This acidification suggested the production of organic acids from glucose metabolism. Several strains of *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Serratia* were described as being able to alter the dissolution of phosphate by producing gluconic acid (Rodriguez *et al.*, 2000 ; Krishnaraj and Goldstein, 2001; Kim *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2006; ). This acid results from glucose oxidation by the quinoprotein dehydrogenase (Babu-Khan *et al.*, 1995). Kim *et al.* (2005) demonstrated that a strain of *B. glathei*, able to produce this acid, was more active to solubilize

phosphate than a simple addition of gluconic acid. These authors suggested that the organic acid could chelate  $\text{Ca}^{2+}$  during  $\text{PO}_4^{3-}$  solubilization. However very recently, Lin *et al.* (2006) suggested that the protons associated with the gluconic acid would in fact explain the phosphate solubilisation. Interestingly Goldstein *et al.* (1999) previously demonstrated that the production of gluconic acid by a phosphate-solubilizing bacterial isolate could be induced by a root extract from a plant growing in a phosphate-limited desert environment. The weathering effect of oxalic acid and other acids was also previously described, but in studies involving fungi (Vassilev *et al.*, 1996; Gadd, 1999 ; Wallander, 2000). In our work, the identification of a bacterial strain more efficient for biotite weathering in the presence of mannitol than in the presence of glucose, and without any significant impact on medium acidification (pH value maintained ca. 5), suggested the involvement of another weathering mechanism, as chelation. Such a mechanism is suspected to be also involved in the case of two other bacterial strains PN3(12) and PMB4(3) that were able to release ca.  $0.9 \text{ mg.L}^{-1}$  of iron with an associated pH value of respectively 5.29 and 5.07. The role of bacterial chelators or siderophores in the dissolution of mineral has already been assessed (Liermann *et al.*, 2000 ; Kalinowski *et al.*, 2000b). These authors presumed that the catechol derivative produced by a strain of *Streptomyces* sp. could influence hornblende dissolution. All these observations strongly suggest that mineral weathering by microorganisms is a complex equilibrium between several mechanisms such as acidification and complexation.

Mycorrhizal fungi are well known plant growth promoters (Finlay, 2004). This characteristic results from the ability of these fungi to efficiently remove organic and inorganic nutrients from soil organic matter and minerals (Blum *et al.*, 2002 ; Landeweert *et al.*, 2001). In nature, mycorrhizal fungi live in close association with bacterial communities, forming multitrophic complexes. Here, we demonstrated that the weathering potential of the bacterial isolates from the vicinity of *Scleroderma* was higher than the one of the isolates from the surrounding bulk soil. Therefore one should suspect that some of the functional activities like mineral weathering, that were classically attributed to ectomycorrhizal fungi, could result at least partially, from the activity of the associated exo or even endo-bacterial communities (Bertaux *et al.*, 2005), that would have been selected by the ectomycorrhizal symbiosis. In this context, one should also address the question of possible functional complementation between the ectomycorrhizal fungi and the associated bacterial communities, which would improve

the weathering efficacy of the ectomycorrhizal complexes. Indeed such cooperation between microfungi and their rhizobial associates was recently described in the context of rock phosphate solubilization (Jayasinghearachchi and Seneviratne, 2006). To confirm our hypotheses, one major bottleneck to overcome in the future will be to develop tools for assessing weathering potential at the microbial community level in addition to the strain level approach we presented here.

### **Acknowledgements**

This work was made possible by grants from ACI Ecologie quantitative "Quantification de l'altération biologique des minéraux des sols" and from Région Lorraine to M.P. Turpault, P. Frey-Klett and S. Uroz. All of these are gratefully acknowledged.

The authors thank Dr. J. Garbaye for critical reviewing of the manuscript, Dr. F. Martin for helpful discussions and C. Delaruelle, B. Palin, M.L. Clause for technical assistance. We thank Dr. W. de Boer for kindly providing *Collimonas* strains.

### **3.3 Effet de différentes essences forestières sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes du sol en relation avec leur capacité à altérer un minéral-test *in vitro*.**

Afin de vérifier la stabilité dans le temps de la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes telluriques et ectomycorhizosphériques, nous avons réalisé une seconde collection de souches bactériennes dans le peuplement de chêne du site de Breuil trois années après l'isolement de la première collection. A cette occasion, nous avons décidé de réaliser deux autres collections de souches bactériennes sous des essences d'arbres connues pour avoir des nutritons azotées très distinctes sur ce site, le hêtre et l'épicéa. Cette étude devait nous permettre de comparer l'effet des essences forestières sur la structuration fonctionnelle des microorganismes dans le sol.

**Article : Forest trees select high mineral weathering bacteria to balance low nutrient availability**

Calvaruso C.<sup>1,2</sup>, Turpault M.P.<sup>1</sup>, Uroz S.<sup>2</sup>, Leclerc-Cessac E.<sup>3</sup>, Ranger J.<sup>1</sup>, Garbaye J.<sup>2</sup>, Frey-Klett P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

<sup>2</sup> INRA, UMR 1136 "Interactions Arbres-Microorganismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

<sup>3</sup> ANDRA, Direction Scientifique/Service Transferts, 92298 Châtenay-Malabry, France.

*En préparation pour letters to Nature*

### **Synthèse**

Les forêts tempérées sont principalement développées sur des sols non fertilisés et fréquemment sur des sols acides où la disponibilité en nutriments minéraux est le principal facteur limitant de croissance des arbres (Badeau *et al.*, 1999). Dans le contexte de développement durable des écosystèmes forestiers, une hypothèse proposée par Richards (1987) serait que les racines d'arbres sélectionneraient les communautés bactériennes du sol impliquées dans des processus biogéochimiques centraux, comme l'altération minérale (Barker and Banfield, 1998; Welch *et al.* 2002; Calvaruso *et al.*, 2006) et la minéralisation de la matière organique (Chen *et al.*, 2003; Petsch *et al.*, 2004), contribuant ainsi à la mobilisation des nutriments et à la croissance des arbres. Cependant, l'impact des essences d'arbres sur la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes en relation avec le processus d'altération de la phase minérale est inconnu. Dans ce travail, nous montrons dans un écosystème forestier naturel soumis à des substitutions d'essences d'arbres, que le chêne (*Quercus sessiliflora* Smith) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) n'utilisent pas la même stratégie que l'épicéa (*Picea abies* Karst.) pour acquérir les nutriments à partir des minéraux du sol. Dans un peuplement forestier âgé de 28 ans, nous avons montré que le chêne et le hêtre, dont les pH de la rhizosphère et du sol global sont très proches ( $|\Delta\text{pH}(\text{rhizosphère} - \text{sol global})| \sim 0$ ), sélectionnent autour de leurs racines mycorhizées des souches bactériennes très efficaces dans l'altération de la phase minérale *in vitro*. Cet effet structurant n'existe pas dans la rhizosphère de l'épicéa, dont le pH rhizosphérique est

non seulement significativement plus faible comparativement à celui du chêne et du hêtre, mais aussi nettement plus faible que le pH du sol global ( $|\Delta\text{pH}(\text{rhizosphère} - \text{sol global})| \sim 0.3$ ). Cette acidification plus marquée dans la rhizosphère de l'épicéa s'explique principalement par une libération massive de protons par les racines afin de compenser l'absorption d'ions  $\text{NH}_4^+$  (Turpault *et al.*, en préparation). En effet, contrairement au chêne et au hêtre, la nitrification est très faible dans les sols sous épicéa sur le site de Breuil (Zeller *et al.*, en préparation), impliquant que la source majeure d'azote disponible pour les racines d'épicéa est la forme  $\text{NH}_4^+$  (Colin Belgrand *et al.*, 2003). Parce que la production de protons est un des mécanismes majeurs responsables de l'altération minérale, nos résultats démontrent que certaines essences d'arbres ont développé des stratégies indirectes pour altérer le minéral dans des sols pauvres en nutriments, qui repose sur la sélection de communautés bactériennes possédant un fort potentiel d'altération. Dans le contexte actuel de changement climatique qui pourrait mener à un changement dans la distribution des essences d'arbres à travers l'Europe, nos résultats suggèrent que les essences d'arbres auront la capacité de s'adapter à leur nouvel environnement microbien et de sélectionner parmi les souches indigènes, celles qui amélioreront leur nutrition et par conséquent, contribueront à la durabilité des écosystèmes forestiers dans les prochaines décennies.

## Synthesis

Temperate forests are mainly developed on non fertilized and nutrient-poor soils where the mineral nutrient availability is a tree growth limiting factor (Badeau *et al.*, 1999). A hypothesis for sustainable forest development proposes that tree roots select soil bacterial communities involved in central biogeochemical processes that contribute to nutrient mobilization and tree growth (Richards, 1987), such as mineral weathering (Barker and Banfield, 1998; Welch *et al.* 2002; Calvaruso *et al.*, 2006) and organic matter mineralization (Chen *et al.*, 2003; Petsch *et al.*, 2004). However, the impact of tree species on the functional diversity of soil bacterial communities in relation to mineral weathering is unknown. Here we show in a natural forest ecosystem submitted to tree species substitution that oak (*Quercus sessiliflora* Smith) and beech (*Fagus sylvatica* L.) species do not use the same strategy than Norway spruce (*Picea abies* Karst.) species for accessing to nutrients from soil minerals. In a 28-year-old forest stand, we found that oak and beech species, which are characterized by a very little

difference between the rhizosphere and the bulk soil pH ( $|\Delta\text{pH}(\text{rhizosphere} - \text{bulk soil})| \sim 0$ ) in the 5 to 10 cm soil horizon, select around their mycorrhizal roots soil bacterial strains very efficient for mineral weathering *in vitro*. This structuring effect does not exist in the rhizosphere of Norway spruce, which is characterized by a significantly stronger acidification of the rhizosphere in comparison with the oak and the beech, and an important difference between the rhizosphere and the bulk soil pH ( $|\Delta\text{pH}(\text{rhizosphere} - \text{bulk soil})| \sim 0.3$ ) in the 5 to 10 cm soil horizon, due to a massive release of protons by the roots to balance  $\text{NH}_4^+$  absorption (Turpault *et al.*, in preparation). In fact, contrary to oak and beech, the nitrification process is very weak in the soil under Norway spruce in the site of Breuil (Zeller *et al.* in preparation), implicating that the principal available nitrogen source in the soil for the Norway spruce roots is the  $\text{NH}_4^+$  form (Colin Belgrand *et al.*, 2003). Because the production of proton is one of the main mechanisms responsible for mineral weathering, our results demonstrate that certain tree species have developed indirect strategies for mineral weathering in nutrient-poor soils, which lie on the selection of bacterial communities with high weathering potential. In today's context of global climate change which will give rise to a shift in the distribution of forest tree species across Europe, our result suggest that the migrating tree species will have the ability to adapt to their new microbial environment and to select among the indigenous soil microbial communities the ones that will improve their nutrition and therefore contribute to the durability of the temperate forest ecosystems in the next decades.

## Results and discussion

We analysed the structuration of soil culturable bacterial communities in relation with the mineral weathering process *in situ* at the Breuil-Chenue experimental forest site (Morvan, France) where we had at our disposal a 28-year-old experimental design that mimics a natural forest ecosystem submitted to tree species substitution (Ranger *et al.*, 2004). We isolated 627 bacterial strains in an organo-mineral soil horizon and under three different tree species, namely oak (*Quercus sessiliflora* Smith), beech (*Fagus sylvatica* L.) and Norway spruce (*Picea abies* Karst.). Bacterial strains were sampled in two soil compartments: the bulk soil which corresponds to the soil not influenced by tree root activity and the *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere (Calvaruso *et al.*, submitted). *Scleroderma citrinum* is a widely distributed ectomycorrhizal fungus in our

Figure III.15: Iron concentration (A) issue from biotite weathering and protons (B) generated by bacterial activity in function of their compartment of origin under oak, beech and Norway spruce. In white, bacterial strains isolated from the bulk soil and in grey, bacterial strains isolated from the mycorrhizosphere. Bars represent standard deviations. Each value is the mean value of 18 to 20 replicates. Treatments associated with the same letter are not significantly different according to a two-factor (compartment of the bacterial strains and tree species) ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test.

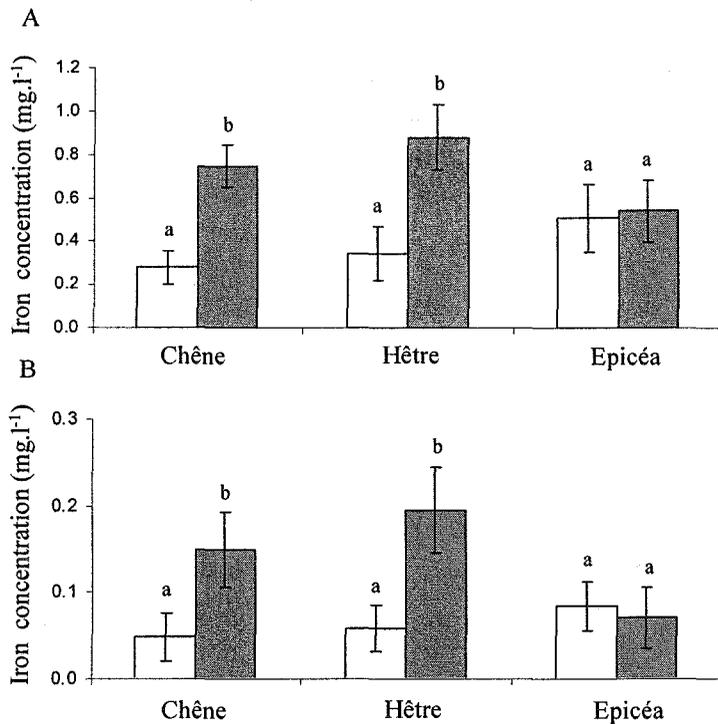
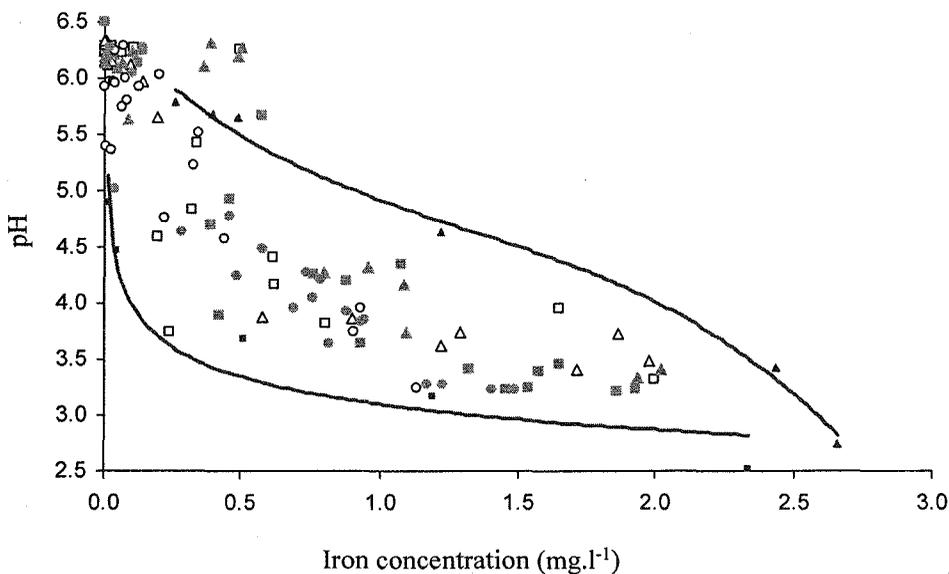


Figure III.16: Projection of the bacterial isolates in function of their individual biotite weathering potential. Each plot represents a bacterial isolate from one of the two following compartments of origin: bulk soil (PN ; white), mycorrhizosphere (PML ; grey) and the three tree species: oak (circle), beech (square) and Norway spruce (triangle). The two curves correspond to the weathering effect of a complexing agent (citric acid, top curve) and a strong acid (hydrochloric acid, bottom curve).



experimental forest site, which is not very efficient for mineral weathering *in vitro* (data not shown). By the way of an *in vitro* microplate assay that we developed for the screening of bacterial collections according to their mineral weathering potential (Uroz *et al.*, submitted), we evaluated the ability of a representative sub-sample of 166 bacterial isolates to decrease the pH, a mechanism potentially involved in the mineral weathering processes, and we quantified their mineral weathering efficacy by measuring the quantity of iron mobilized from a mineral-test, the biotite (Mustin *et al.*, submitted).

We observed that the majority of the tested isolates from the bacterial collections (> 65%) were able to decrease pH (up to 3.5 pH units) and to mobilize iron (up to 2 mg.l<sup>-1</sup>) by weathering the biotite. These results confirm in a forest environment a common knowledge: soil bacteria produce acids and complexing compounds that can weather minerals and mobilize nutrients (Ullman *et al.*, 1996 ; Kalinowski *et al.*, 2000a; Liermann *et al.*, 2000a et b), thus contributing to nutrient cycling and ecosystem functioning. So far, few studies have shown that plants, by the way of their root exudates, alter the structure and the activity of microbial communities and selectively favour those which are beneficial to them (Cook *et al.*, 1995; Dakora and Phillips, 2002). Here we observed that the bacterial strains isolated from the ectomycorrhizosphere of oak or beech-*S. citrinum* produce more acid compounds and mobilize more iron from the biotite than the strains from the bulk soil (Figures III.15 and III.16), suggesting that these ectomycorrhizal symbioses select bacterial strains potentially able to weather the minerals surrounding the roots and thus indirectly improve tree nutrition. This hypothesis has already been partly confirmed since we were able to demonstrate that a *Burkholderia glathei* isolate from the oak-*S. citrinum* ectomycorrhizosphere, sampled in our experimental forest site in 2001, significantly weathers biotite and improves pine seedling nutrition and growth in controlled conditions (Calvaruso *et al.*, 2006). The structuring effect of the *S. citrinum* ectomycorrhizosphere on bacterial communities is in accordance with the results from previous studies which compared the functional diversity of bacterial communities isolated from bulk soil and oak-*S. citrinum* ectomycorrhizosphere in the same experimental forest site and at the same season, but four years before (Calvaruso *et al.* submitted and Uroz *et al.* submitted). Therefore we demonstrate for the first time that the functional structure of the culturable soil bacterial community in relation to the mineral weathering process is stable along time. So far, the few studies that have

Figure III.17: Iron (A) and proton (B) concentrations in the solution, resulting from biotite weathering, and generated by bacterial activity in function of their compartment of origin and their sampling time: 2001 (void) and 2004 (hatched). Bars represent standard deviations. Each value is the mean of 20 to 27 replicates. For each soil compartment, treatments associated with the same letter are not significantly different according to a one-factor (tree species) ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test.

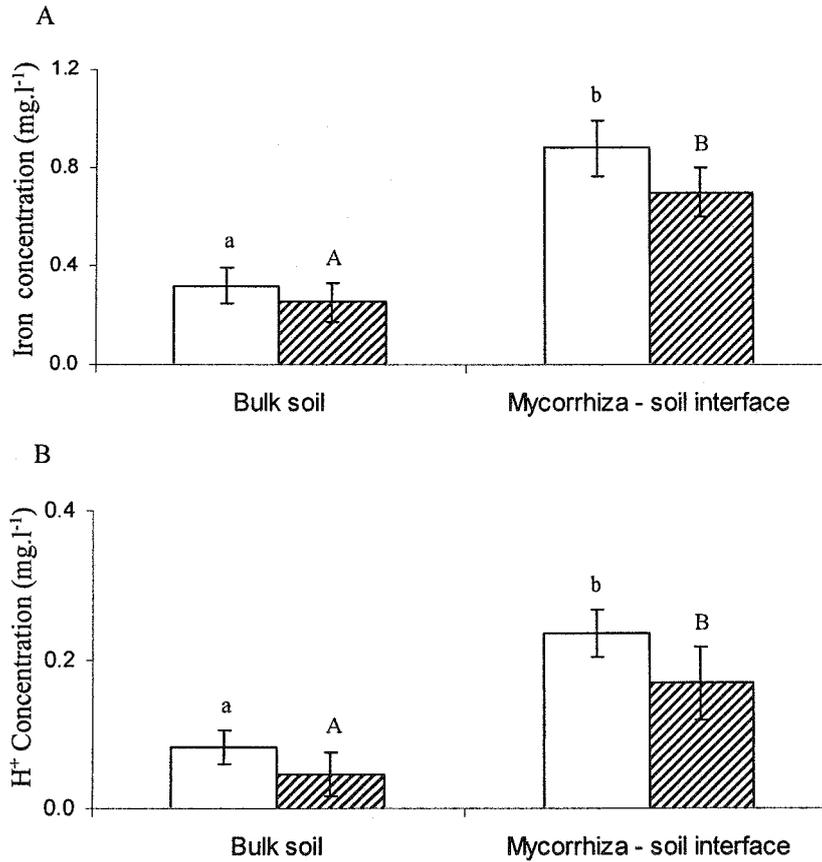


Table III.4: Bulk and rhizosphere soil pH in the 3-10 cm horizon under oak and Norway spruce in the site of Breuil. Each value is the mean of 18 to 20 replicates. In each line, values with different letters (a or b) are significantly different according to a one-factor (tree species) ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test. In each column, values with asterisks are significantly different according to a one-factor (compartment of origin of the isolates) ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test.

Compartment of origin	Tree species		
	Oak	Beech	Norway spruce
Bulk soil	4.3 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>
Rhizosphere	4.3 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.0 <sup>b*</sup>

addressed the question of the year-to-year variation of the functional diversity of bacterial communities have concluded to a high temporal variation of the soil bacterial diversity (Berardesco *et al.*, 1998; Grayston *et al.*, 2001). One should therefore wonder why these data contrast with our results (Figure III.17). To explain the temporal stability of the structuring effect of the symbiosis on the functional diversity of bacterial communities in relation to mineral weathering we propose the hypothesis that this effect is a functional requirement, which is strongly linked to the strategy that certain tree species have developed for improving their mineral nutrition. This hypothesis is supported by previous results of Frey-Klett *et al.* (2005). These authors demonstrated in a different context (9 months vs 28 years old trees, Douglas fir vs oak, *Laccaria bicolor* vs *S. citrinum*, culturable *Pseudomonas fluorescens* populations vs total culturable bacterial communities, nursery vs forest stand) that the Douglas fir-*Laccaria bicolor* ectomycorrhizal symbiosis also selects *Pseudomonas fluorescens* isolates suspected to be beneficial to the nutrition of Douglas fir seedlings due to their high phosphorus and iron mobilizing abilities. Because distinct differences among tree species in the microbial community structure have been reported (Priha *et al.*, 2001; Grayston and Prescott, 2005), we compare the functional diversity among the bacterial collections we sampled in the beech, oak and Norway spruce stands. Whatever the tree species, the abilities of the bacterial strains from the bulk soil compartment to release protons and to mobilize iron were not significantly different (Figure III.15). In contrast the quantity of protons and iron released by the bacterial strains from the oak and beech-*S. citrinum* ectomycorrhizospheres were significantly higher than the ones released by the Norway spruce ectomycorrhizosphere isolates, which were themselves not significantly different from those released by the bulk soil isolates (Figure III.15). Our result therefore demonstrate for the first time that the structuring effect of the ectomycorrhizal symbiosis on the functional diversity of bacterial communities in relation to mineral weathering depends on the tree species.

Bulk and rhizosphere soils were sampled 20 times under the three tree species to measure the pH (water). In the 5-10 cm horizon, the difference between the pH values in the rhizosphere and the pH values in the bulk soil were not significant in the oak and the beech stands ( $\Delta\text{pH} \sim 0$ ) (Table III.4). In contrast, this difference was significant in the Norway spruce stand ( $\Delta\text{pH} \sim 0.3$ ) in which the tree rhizosphere is significantly more acid than the oak and the beach rhizosphere (Table III.4). According to Turpault *et al.*

(in preparation) who did their investigations in the same experimental forest site as us, the lower pH in the Norway spruce rhizosphere would result from the presence of large amounts of ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) in the soil under this species. Indeed, when absorbing ammonium, the Norway spruce roots exudate large amounts of protons to maintain charge equilibrium (Marschner *et al.*, 1991). In the beech and oak rhizosphere in contrast, higher pH would result from the presence of important amounts of nitrate (Zeller *et al.*, in preparation). Our results therefore highlight the fact that tree species differently affects the physicochemical characteristics of the rhizosphere soil.

Because the mycorrhizal symbiosis alters the biological and physicochemical properties of the surrounding soil and thus modify the microbial equilibrium around the mycorrhizal roots, Linderman (1988) proposed the concept of “mycorrhizosphere effect” to qualify the structuring effect of the mycorrhizal symbiosis on microbial communities. Here we demonstrated for the first time that this mycorrhizosphere effect depends on the tree species. To explain the mycorrhizosphere effect they observed around Douglas fir and oak roots, Frey *et al.* (1997) and Uroz *et al.* (submitted) suggested that the two ectomycorrhizal fungi *L. bicolor* and *S. citrinum*, which both accumulate trehalose -a common fungal carbohydrate rarely detected in plants-, exert a trehalose-mediated selection on the functional diversity of bacterial communities. One should wonder why such a structuring effect which exists in the oak and beech ectomycorrhizosphere, does not exist in contrast in the Norway spruce ectomycorrhizosphere. We hypothesize that, because of its nitrogen nutrition based on  $\text{NH}_4^+$  uptake, Norway spruce releases large amounts of protons in its rhizosphere which is sufficient to mobilize nutrients from soil minerals and sustain tree nutrition. This hypothesis is supported by the results obtained of Augusto *et al.* (2000) and Calvaruso *et al.* (in preparation) in the same site of Breuil, who showed that due to a reduced pH, the dissolution of a feldspar and the clay fraction, respectively, is significantly higher under Norway spruce than under oak. The availability of the nutrients from soil minerals is expected to be lower in the oak and beech stands than in the spruce one because of the soil pH. In this context, our result demonstrates that oak and beech trees use another strategy than Norway spruce trees to balance this low nutrient availability. They direct the structure of the functional bacterial communities and select bacterial strains with high mineral weathering potential. Interestingly, it was previously shown *in situ* in a beech forest that the weathering of soil minerals is significantly higher in the

rhizosphere than in the bulk soil in the poor-nutrient soil only and not in the fertilized one (Turpault *et al.*, submitted). One should thus ask if the structuring effect of the beech ectomycorrhizosphere on the functional diversity of the bacterial communities still exists in fertilized soils where the functional contribution of the bacterial communities is no more a requirement.

## Conclusion

Our work illustrates the hypothesis that tree influences on soil processes are mediated through their effects on soil microorganisms, and that conversely, soil microbial communities are influenced by tree roots (Grayston and Prescott, 2005). However it highlights the fact that this relationships strongly depends on the tree species as far as mineral weathering is concerned. In the current context of tree species migration due to global climate change, the fact that tree species are able to modify the physicochemical and biological properties of their surrounding soil in function of their nutritional needs incite us to be quite confident concerning the sustainability of temperate forest ecosystems in the next decades.

## Acknowledgements

The authors thank C. Delaruelle, B. Palin, M.L. Clause and G. Nourrisson for technical assistance.

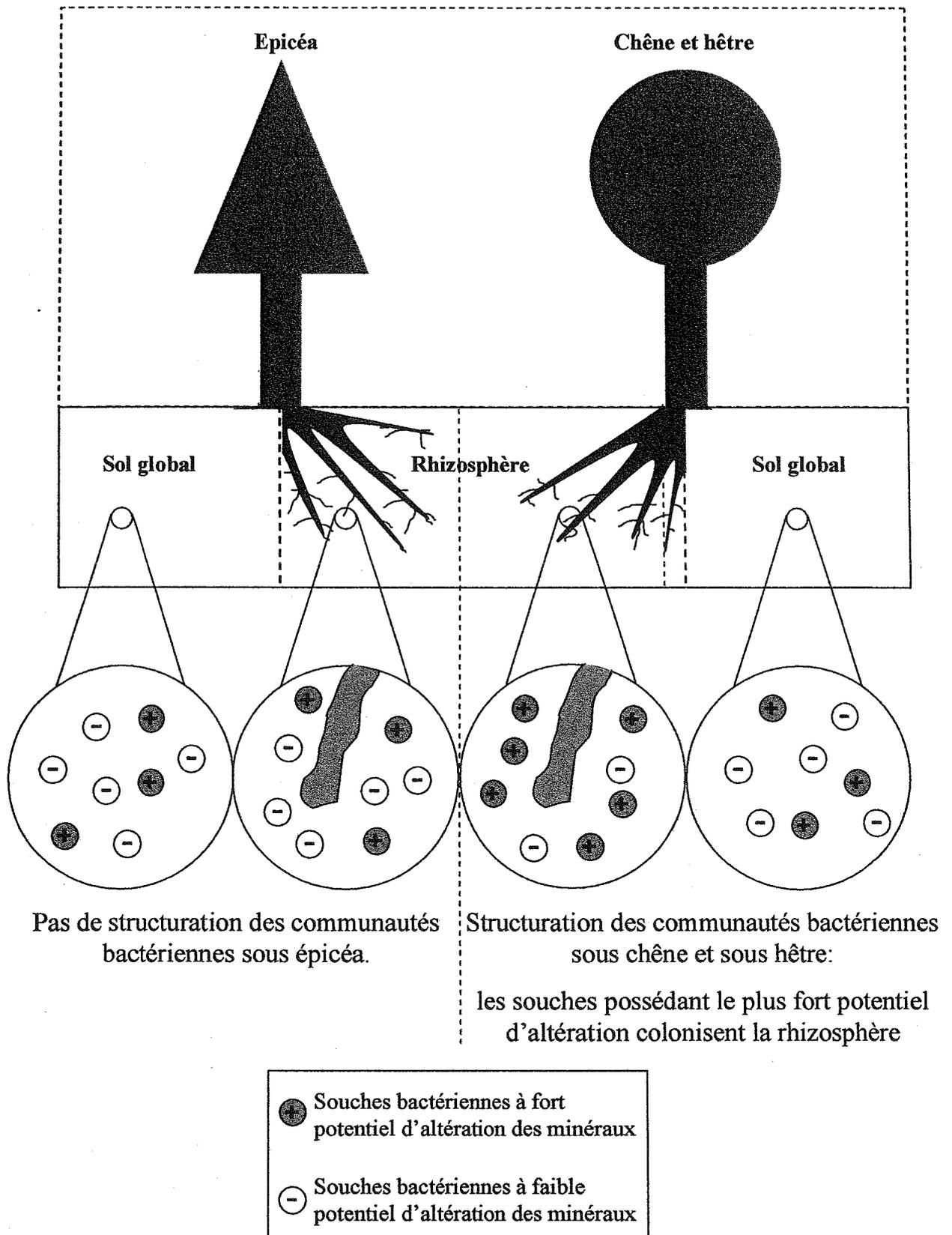
This work was supported by the Andra (agence nationale de gestion des déchets radioactifs), the French Research Ministry (ACI quantitative ecology project) and the region "Lorraine".

## 4. SYNTHÈSE ET DISCUSSION

---

Méthodologiquement, les tests *in vitro* en boîtes de Petri et en microplaques se sont avérés très performants pour la caractérisation de souches bactériennes cultivables en relation avec la mobilisation d'éléments minéraux. Ces tests sont fiables, reproductibles dans le temps et permettent une bonne discrimination des souches bactériennes. En

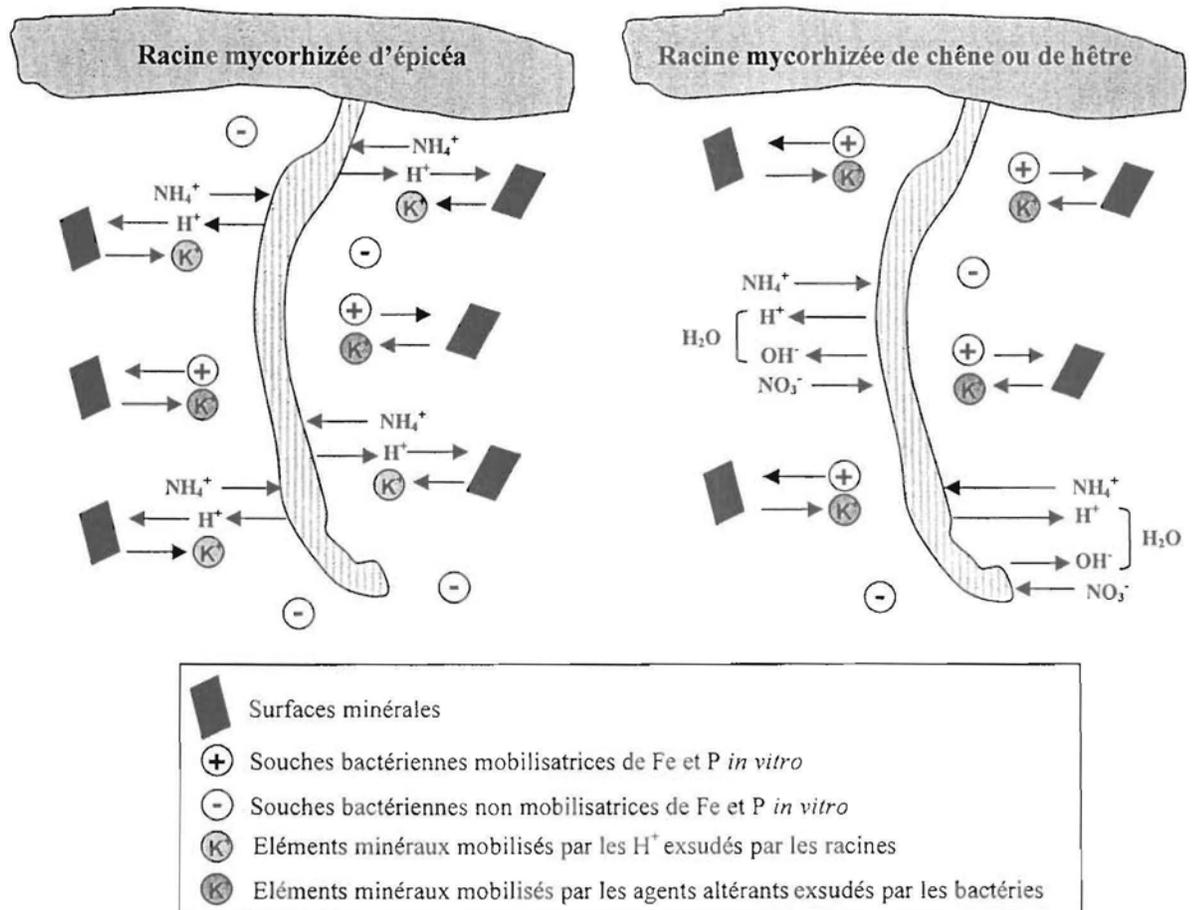
Figure III.18: Schéma de synthèse représentant la structuration des communautés bactériennes isolées du sol du site de forestier de Breuil sous les différentes essences d'arbres testées.



revanche, ces tests sont peu adaptés à la caractérisation des communautés fongiques : les données de croissance et de mobilisation d'éléments par un même isolat fongique sont très variables au cours du temps, probablement du fait d'une grande variabilité de vitalité des implants. L'utilisation d'inoculum liquide contenant une concentration de spores calibrée pourrait être une alternative intéressante. Cependant, elle ne permettra de caractériser que les espèces de champignons sporulantes. Contrairement aux tests en boîtes de Petri qui n'offrent qu'une appréciation indirecte du potentiel d'altération des isolats, basée sur la mesure du potentiel de mobilisation du fer et du phosphore à partir de milieux synthétiques, le test en microplaques permet d'apprécier l'effet direct des isolats sur l'altération d'un minéral-test *via* la quantité de fer mobilisée. De plus, ce test nous permet d'aborder la question des mécanismes mis en œuvre *via* l'étude de la relation entre la quantité de fer en solution et le pH de la solution. Toutefois, ces tests, nécessitant l'isolement de communautés bactériennes et fongiques à partir d'un sol forestier ne permettent de tester que les souches microbiennes cultivables qui ne constituent qu'une faible proportion des communautés réellement présentes dans les sols forestiers et qui n'est, par conséquent peut-être pas représentative de l'ensemble des communautés (Torsvik *et al.*, 1998 ; Anderson et Cairney, 2004). C'est pourquoi, des tests globaux en microplaques sont en cours de mise au point par Stéphane Uroz (INRA-Nancy, UMR 1136). Ils permettraient de tester la capacité d'altération d'un minéral-test par l'ensemble des communautés microbiennes présentes dans un compartiment du sol. Un des verrous techniques réside dans la préparation, à partir d'un échantillon de sol, d'un inoculum microbien non pollué chimiquement par des particules minérales ou des composés organiques.

Grâce à ces tests, nous avons clairement démontré, une structuration fonctionnelle des communautés bactériennes cultivables du sol en relation avec la fonction altération de la phase minérale : les isolats présentant le plus fort potentiel d'altération des minéraux colonisent l'ectomycorhizosphère de *Scleroderma citrinum* sous chêne et sous hêtre (Figure III.18). Ces souches bactériennes pourraient améliorer la nutrition des plantes et ainsi agir comme des bactéries promotrices de la croissance des arbres forestiers en améliorant la disponibilité des nutriments dans le sol. En revanche, aucune structuration des communautés bactériennes n'a pu être mise en évidence sous épicéa (Figure III.18), démontrant un effet de l'essence forestière sur la structuration des communautés bactériennes dans le sol. Les analyses physico-chimiques des sols déjà présentées dans le second chapitre, apportent un élément de réponse pouvant expliquer ces différences

Figure III.19: Schéma de synthèse représentant les différences de comportement des racines ectomycorhizées d'arbres forestiers dans la mobilisation des éléments par altération de la phase minérale.



entre essences. En effet, l'épicéa acidifie plus le sol rhizosphérique ( $\Delta\text{pH}$  (pH sol global – pH rhizosphère  $\sim 0.3$ ) que ne le font les essences feuillues ( $\Delta\text{pH}$  (pH sol global – pH rhizosphère)  $\sim 0$ ) dans cet horizon de sol (5-10 cm). Cette acidification plus marquée dans la rhizosphère de l'épicéa est corrélée à une forte production de protons par ses racines afin de compenser (équilibre de charges) l'absorption massive d'azote sous forme d'ions  $\text{NH}_4^+$  (cf. article intitulé "Forest trees select high mineral weathering bacteria to balance low nutrient availability"). Cette différence de structuration des communautés bactériennes observée entre deux essences feuillues (chêne et hêtre) et l'épicéa pourrait être tout simplement due aux conditions physico-chimiques différentes régnant dans le sol sous ces essences. En effet, les microorganismes du sol sont très sensibles à ces conditions et notamment au pH (Marschner *et al.*, 2004 ; Pommerening-Röser et Koops, 2005). Une autre hypothèse serait que ce sont les racines d'arbres elles-mêmes qui contrôleraient la structuration des communautés bactériennes dans les sols forestiers (Brant *et al.*, 2006), favorisant par ce biais la sélection et la croissance de souches bactériennes qui leur sont favorables, en étant notamment capables de compenser une faible biodisponibilité en éléments minéraux dans le sol. Ainsi, les racines de chêne et de hêtre et leurs champignons symbiotiques associés, produisant moins d'agents altérants acides que celles d'épicéa, sélectionneraient, par l'intermédiaire de leurs exsudats, des communautés bactériennes aptes à mobiliser les éléments minéraux.

Si nos hypothèses sont exactes, nous pouvons proposer deux mécanismes de mobilisation des nutriments minéraux très différents en fonction de l'essence (Figure III.19):

- pour l'épicéa : une exsudation massive de protons, en réponse à une absorption majoritaire d'azote sous forme d'ions  $\text{NH}_4^+$ , qui altèrent le minéral et mobilisent ainsi une importante quantité de nutriments. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus sur le site forestier de Breuil et présentés dans le chapitre précédent. Ils confirment également les résultats des travaux de Berger *et al.* (2006) qui ont montré que la forte mobilisation de calcium et de cations basiques par les racines d'épicéa est principalement due à une acidification résultant du fonctionnement de cette essence.
- pour le chêne et le hêtre : une exsudation de composés sélectionnant certaines souches bactériennes à fort potentiel d'altération.

Les biotests que nous avons mis au point *in vitro* en boîtes de Petri et en microplaques, même s'ils sont simples et rapides, ne permettent de caractériser uniquement le potentiel

d'altération de souches bactériennes et fongiques purifiées. L'efficacité réelle de ces souches *in situ* en présence de racines d'arbres et d'une microflore indigène reste encore à vérifier. C'est pourquoi, afin de prendre en considération les interactions rhizosphériques et pouvoir mesurer l'effet respectif de chacun des partenaires biologiques dans le processus d'altération des minéraux, nous avons mis en place des expérimentations plus complexes, en colonnes. Les résultats que nous avons obtenus font l'objet du chapitre suivant.

**CHAPITRE IV:**

**QUANTIFICATION DE LA PART RESPECTIVE**

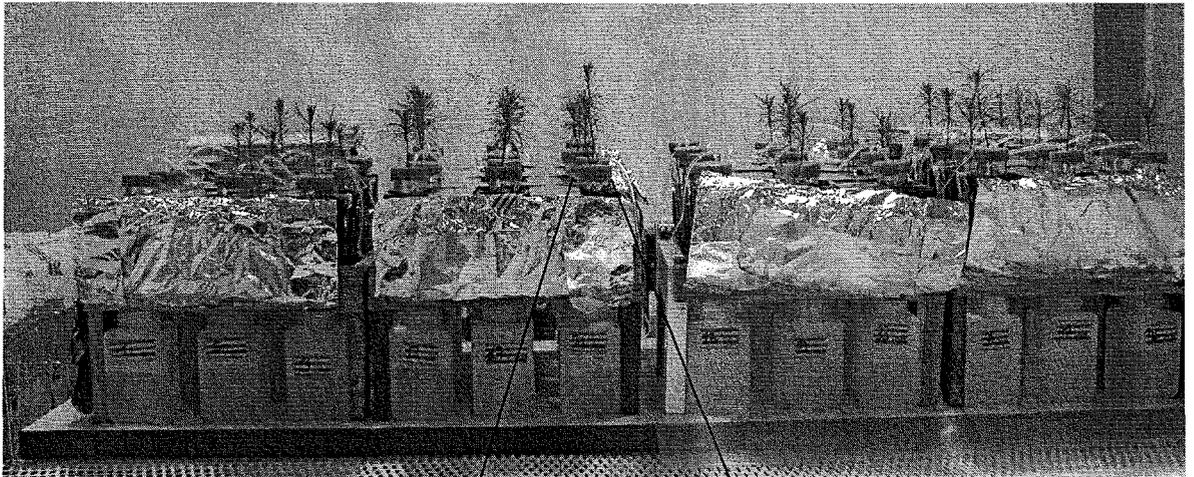
**DES DIFFERENTS PARTENAIRES BIOLOGIQUES**

**DE LA RHIZOSPHERE DANS LE PROCESSUS**

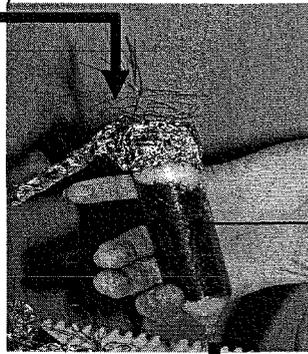
**D'ALTERATION DES MINERAUX :**

**EXPERIENCES EN COLONNES**

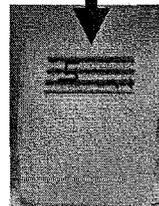
Figure IV.1: Photo du dispositif expérimental en colonnes.



**Solution nutritive**



**Mélange quartz - biotit**



**Solution drainée**

## 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

---

De nombreux travaux ont montré que les systèmes racinaires d'une part et les microorganismes du sol d'autre part, étaient capables d'altérer les minéraux silicatés (Leyval et Berthelin, 1991 ; Hinsinger *et al.*, 1992 ; Paris *et al.*, 1995 ; Welch *et al.*, 1999). Cette altération peut résulter d'un fractionnement physique lié à la croissance des racines, mais elle est surtout associée à l'exsudation de métabolites aux propriétés altérantes par les racines et les microorganismes (Robert et Berthelin, 1986 ; Drever, 1994 ; Hinsinger and Gilkes, 1997 ; Jones, 1998 ; Ström, 1997). Si les mécanismes impliqués ont été déjà beaucoup étudiés, on connaît bien moins la part respective de chacun des partenaires biologiques de la rhizosphère dans les processus d'altération des minéraux et de mobilisation des éléments dans les sols car il est très difficile de découpler les effets inhérents à chacun d'entre eux. De plus, dans les écosystèmes naturels, les flux d'énergie et de matière entrants et sortants sont très variables au cours du temps et sont de ce fait difficiles à estimer (Kolka *et al.*, 1996). Par ailleurs, malgré le rôle essentiel de la rhizosphère dans l'altération, jusqu'à présent très peu de travaux ont eu pour but de caractériser l'impact de facteurs environnementaux sur le processus d'altération des minéraux par les arbres (Berner et Berner, 2006).

C'est pourquoi, ce chapitre a pour objectifs de quantifier la part respective des différents partenaires biologiques de la rhizosphère (racines, bactéries, champignons saprophyte et ectomycorhizien) dans le processus d'altération de la phase minérale et de mesurer l'impact de composés toxiques (uranium et cadmium) sur la croissance, l'activité biologique et le processus d'altération des minéraux.

## 2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL EN COLONNES

---

Après une première étape de caractérisation du potentiel d'altération de souches bactériennes et fongiques du sol *via* des tests simples et rapides *in vitro* (cf. chapitre III), nous avons mis en place trois expérimentations plus complexes, en colonnes (Figure IV.1).

Tableau IV.1 : Paramètres des différentes expériences d'interactions réalisées à l'aide du dispositif expérimental en colonnes.

Paramètres de l'expérience	Expérience 1*	Expérience 2	Expérience 3
<b>Durée</b>	21 jours	76 jours: expérience "solution nutritive de base" 102 jours: expérience "solution nutritive enrichie en éléments"	56 jours
<b>Conditions de culture</b>	18°C - 25°C, humidité: 60 - 70%, 17 heures de jour, éclairage fort:20000 Lux	18°C - 25°C, humidité: 60 - 70%, 17 heures de jour, éclairage fort:20000 Lux	18°C - 25°C, humidité: 60 - 70%, 17 heures de jour, éclairage fort:20000 Lux
<b>Plante</b>		Semis de pin	Semis de pin
<b>Bactéries</b>	<i>Burkholderia glathei</i> PML1(12) <i>Burkholderia glathei</i> PMB4(3)		<i>Pseudomonas fluorescens</i> BBc6R8
<b>Champignon ectomycorhizien</b>			<i>Laccaria bicolor</i> S238N
<b>Champignons</b>	PML2(10) SN2(3)		
<b>Minéral</b>	Biotite	Biotite	Biotite
<b>Solution nutritive</b>	De base Enrichie en glucose	De base Enrichie en nutriments	De base Enrichie en uranium Enrichie en cadmium

\* Expérience 1 = "Interactions microorganismes - minéral - solution"

Expérience 2 = "Interactions arbre forestier - bactéries - minéral - solution"

Expérience 3 = "Interactions arbre forestier - champignon ectomycorhizien - bactéries - minéral - solution"

- **Le matériel expérimental**

Le tableau IV.1 résume les différentes expériences d'interactions mises en place dans les mêmes conditions de culture en chambre de croissance, et utilisant le même matériel végétal et minéral ainsi que la même solution nutritive. Ce matériel a été choisi sur deux critères : (i) être présents dans les écosystèmes forestiers et (ii) être adaptés à ce type d'expérimentation en colonnes.

- Le pin sylvestre, *Pinus sylvestris* (provenance : forêt de Haguenau) a l'avantage d'avoir une croissance relativement rapide, ce qui convient à des expériences de courte durée comme les nôtres. Les semis de pins ont été cultivés pendant six semaines en serre dans un substrat non stérile tourbe – vermiculite (1:1) dans les conditions suivantes : 60% d'humidité, des températures de 15°C la nuit et 22°C le jour, une période d'éclairage de 16h. Les racines des semis ont ensuite été minutieusement nettoyées au pinceau dans quatre baignoires successives d'eau ultra-pure stérile afin de retirer toutes les particules de sol. Après avoir éliminé l'excès d'eau à l'aide d'un papier absorbant, les semis ont été pesés individuellement et repiqués dans les colonnes à raison d'un semis par colonne.

- La biotite de Bancroft (Canada) est un phyllosilicate 2:1 qui s'altère relativement rapidement et porte des éléments nutritifs (K, Mg, Fe) indispensables à la plante, ainsi que du césium. De plus, ce minéral est un mica fréquent dans les sols acides comme les sols forestiers. Il s'agit d'un minéral pur (sauf calcite), homogène et de composition 41.01 % de SiO<sub>2</sub>, 10.9 % de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 13.26 % de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.27 % de MnO, 18.9 % de MgO, 0.41 % de Na<sub>2</sub>O, 9.46 % de K<sub>2</sub>O, 2.28 % de TiO<sub>2</sub>, 4.42 % de F, 1650 ppm de Li, 824 ppm de Zn et 56 ppm de Cs. Sa formule structurale est : (Si<sub>3</sub>Al<sub>1</sub>) (Fe<sup>3+</sup><sub>0.12</sub> Fe<sup>2+</sup><sub>0.61</sub> Mg<sub>2.06</sub> Mn<sub>0.02</sub> Ti<sub>0.13</sub>) K<sub>0.88</sub> Na<sub>0.06</sub> O<sub>10</sub> (OH<sub>0.98</sub>, F<sub>1.02</sub>). Après retrait des cristaux de calcite, effeuillage et élimination des bordures, les cristaux de biotite sont broyés, soumis à un traitement aux ultrasons pour retirer les particules fines puis tamisés afin de ne conserver que les particules de diamètre compris entre 0.5 et 1 mm. Ils sont stérilisés par autoclavage (20 min. à 120°C). Des cristaux purs de quartz sont concassés, traités aux ultrasons afin d'obtenir deux fractions de granulométrie 0.5 à 1 mm et 1 à 2 mm (Augusto *et al.*, 2001) puis stérilisés par autoclavage (20 min. à 120°C). Il a été vérifié que l'autoclavage ne modifie pas la vitesse de dissolution de la biotite et du quartz. Les quantités respectives de minéraux introduits dans les colonnes sont : 2.8 g de biotite (0.5- 1 mm), 10 g de quartz (0.5-1 mm) et 35 g de quartz (1-2 mm).

- La composition de la solution nutritive de base est établie de telle sorte qu'elle n'apporte aux végétaux que les éléments indispensables à la croissance de la plante mais absents de la composition de la biotite, et à des concentrations de l'ordre de celles observées dans le sol du site atelier de Breuil, soit 1.5 mg.l<sup>-1</sup> de sodium , 2 mg.l<sup>-1</sup> de phosphore (1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O), 2.3 mg.l<sup>-1</sup> de calcium, 1.9 mg.l<sup>-1</sup> de soufre (1 g CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O), 11.2 mg.l<sup>-1</sup> de N (3.2 g NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>) et 1.5 ml de solution de micro-éléments contenant du molybdène (Mo) et cuivre (CuSO<sub>4</sub>, 4H<sub>2</sub>O) Le pH de cette solution nutritive est de 5.6.

En revanche, le matériel microbiologique varie suivant les expérimentations mais la préparation des inocula bactériens et fongiques est similaire quelle que soit l'expérimentation. Elle est décrite en annexe 7.

- **Le calcul du bilan d'altération**

Ce dispositif, grâce au contrôle des flux d'éléments entrants et sortants de la colonne, permet de faire un bilan de l'altération du minéral-test. Ainsi, le bilan d'altération (B.A.) d'un élément minéral au sein de la colonne peut être représenté par la formule générale suivante :

$$\text{B.A.} = (S_f - S_i) + (P_f - P_i) + R \quad (2)$$

Avec :

$S_f$  est la quantité d'un élément dans la solution récoltée après percolation dans la colonne :  $S_f$  correspond à la concentration de la solution drainée multipliée par le volume de cette solution,

$S_i$  est la quantité d'un élément dans la solution nutritive initiale,

$P_f$  est la quantité d'un élément dans le plant de pin en fin d'expérimentation,

$P_i$  est la quantité d'un élément dans le semis de pin en début d'expérimentation. Elle est estimée à l'aide de semis de pin témoins sacrifiés en début d'expérience,

$(P_f - P_i)$  correspond donc à l'immobilisation  $I$  d'un élément par le plant au cours de l'expérience,

$R$  est la précipitation d'un élément dans la colonne.

Figure IV.2: Calcul du bilan d'altération pour des éléments comme le potassium et le magnésium.

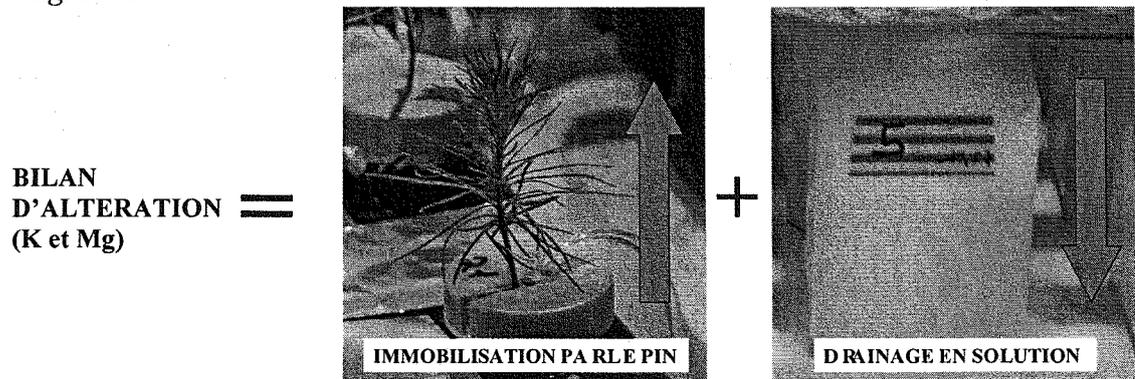


Tableau IV.2 : Résumé des analyses effectuées lors des différentes expériences d'interactions réalisées à l'aide du dispositif expérimental en colonnes.

Analyses	Expérience 1*	Expérience 2	Expérience 3
<b>Volume de solution percolée</b>	OUI	OUI (expérience "solution nutritive de base")	OUI
<b>pH de la solution</b>	OUI	OUI (expérience "solution nutritive de base")	OUI
<b>Concentration d'éléments dans la solution percolée</b>	OUI	OUI (expérience "solution nutritive de base")	OUI
<b>Quantité d'éléments dans les plants initiaux et finaux</b>		OUI	OUI
<b>Pesée des plants en début et en fin d'expérience</b>		OUI	OUI
<b>Quantification microbienne</b>	OUI	OUI	OUI
<b>Quantification des mycorhizes</b>			OUI
<b>Observations au DRX</b>		OUI	
<b>Observations au MEB</b>	OUI	OUI	OUI

\* Expérience 1 = "Interactions microorganismes - minéral - solution"

Expérience 2 = "Interactions arbre forestier - bactéries - minéral - solution"

Expérience 3 = "Interactions arbre forestier - champignon ectomycorhizien - bactéries - minéral - solution".

Par exemple, pour le potassium qui est un élément absent de la solution nutritive et qui ne reprécipite pas dans la colonne (confirmation par des analyses chimiques de la surface de particules de biotite et de quartz en fin d'expérience) :

$$\text{B.A.} = \text{S}_f + \text{I} \text{ (Figure IV.2)} \quad (3)$$

- **Les analyses**

Le calcul du bilan d'altération d'un minéral implique donc un nombre conséquent d'analyses sur la plante, sur la solution et également sur la phase minérale. Le tableau IV.2 résume les différents types d'analyses effectuées lors de chacune des expériences en colonnes. Ces analyses sont détaillées ci-dessous :

#### *Les percolats*

- mesure du volume et du pH (pHmètre à électrodes SENTRON type Argus) lors de chaque prélèvement pour les quatre répétitions.
- dosage des éléments minéraux chaque semaine pour toutes les répétitions par spectrométrie d'émission à plasma ICP-AES (JY180 ULTRACE). Pour le césium (expérience d'interaction plante – microorganismes – minéral – solution), une mesure globale en fin d'expérience a été effectuée par ICP-MS au CEA de Saclay pour les quatre répétitions.

#### *Les plants*

Afin de calculer l'augmentation de biomasse et la quantité d'éléments minéraux immobilisée par les plants de pin au cours de l'expérience, il est nécessaire de connaître la masse des parties racinaires et aériennes des plants et la quantité d'éléments minéraux dans les plants au moment de la plantation dans les colonnes. Ces analyses étant destructives, nous avons cultivé des plants de pin dans les mêmes conditions qui ont été sacrifiés au lancement de l'expérimentation.

- pesée des parties aériennes et racinaires des plants en début (plants sacrifiés) et en fin d'expérience pour les quatre répétitions,
- après une minéralisation à l'acide perchlorique des plants de pin, (protocole détaillé dans la partie "matériel et méthodes" de l'article intitulé "Root-associated bacteria

contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis"), nous avons dosé les éléments minéraux dans les parties racinaires et aériennes des plants en début (plants sacrifiés) et en fin d'expérience pour les quatre répétitions par spectrométrie d'émission à plasma ICP-AES (JY180 ULTRACE). Pour le césium (expérience d'interaction plante – microorganismes – minéral – solution), cette mesure a été effectuée par ICP-MS au CEA de Saclay.

#### *Les microorganismes*

- quantification des densités bactériennes totales cultivables dans les colonnes en fin d'expérimentation pour les quatre répétitions. Un gramme de substrat quartz – biotite a été prélevé dans chaque colonne après homogénéisation du substrat. Après une minute d'agitation en présence de 2 ml d'eau ultra-pure stérile, 20 µl du surnageant ont été prélevés et des dilutions au centième et au dix millième ont été préparées en série. Les suspensions bactériennes ont ensuite été étalées sur des boîtes de Petri contenant du milieu TSA 10% à l'aide d'un enseigneur Spiral (Interscience). Après 3 jours d'incubation à 25°C, les comptages bactériens ont été réalisés et les densités bactériennes ont été estimées à l'aide d'un abaque.

- quantification du nombre de racines courtes mycorhizées en début (plants sacrifiés) et en fin d'expérience pour les quatre répétitions après observations des systèmes racinaires sous une loupe binoculaire (Leica MZ 6) selon la méthode décrite par Frey-Klett *et al.* (1997).

#### *Le minéral*

- analyse cristallographique à l'aide d'un diffractomètre de rayons X Siemens D5000 sur des préparations orientées de biotites témoins (non soumises à l'expérimentation) et de biotites prélevées en fin d'expérimentation,

- observations au microscope électronique à balayage Hitachi S2500 (connecté à un système de microanalyses ThermoNoran) des surfaces de minéraux témoins (non soumis à l'expérimentation) et de minéraux prélevés en fin d'expérimentation.

Figure IV.3: Compartiment d'origine des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) et des souches fongiques SN2(3) et PML2(10).

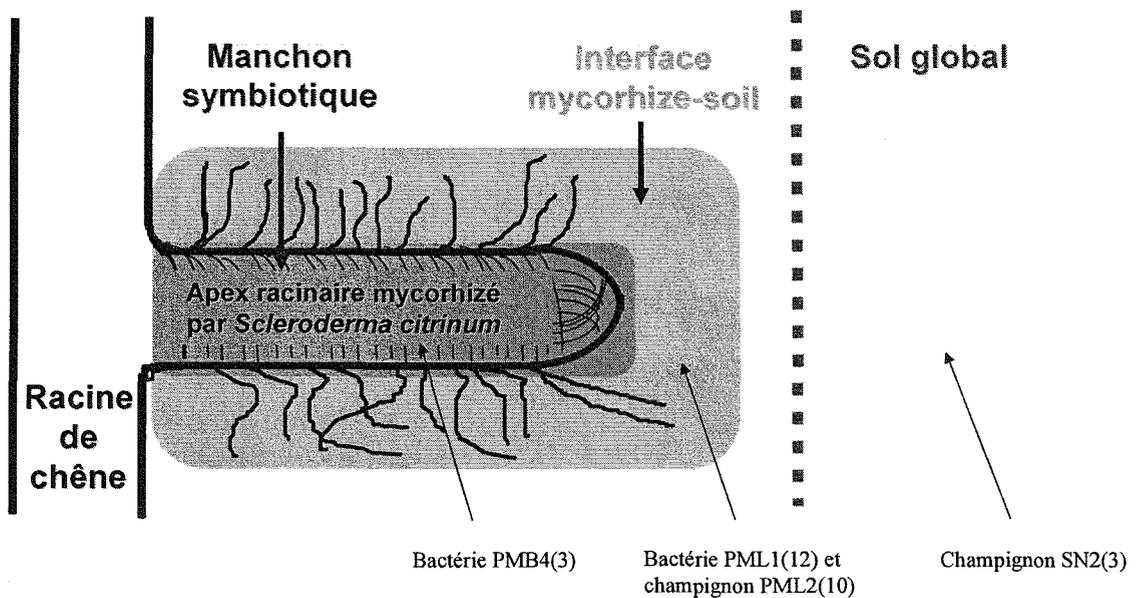
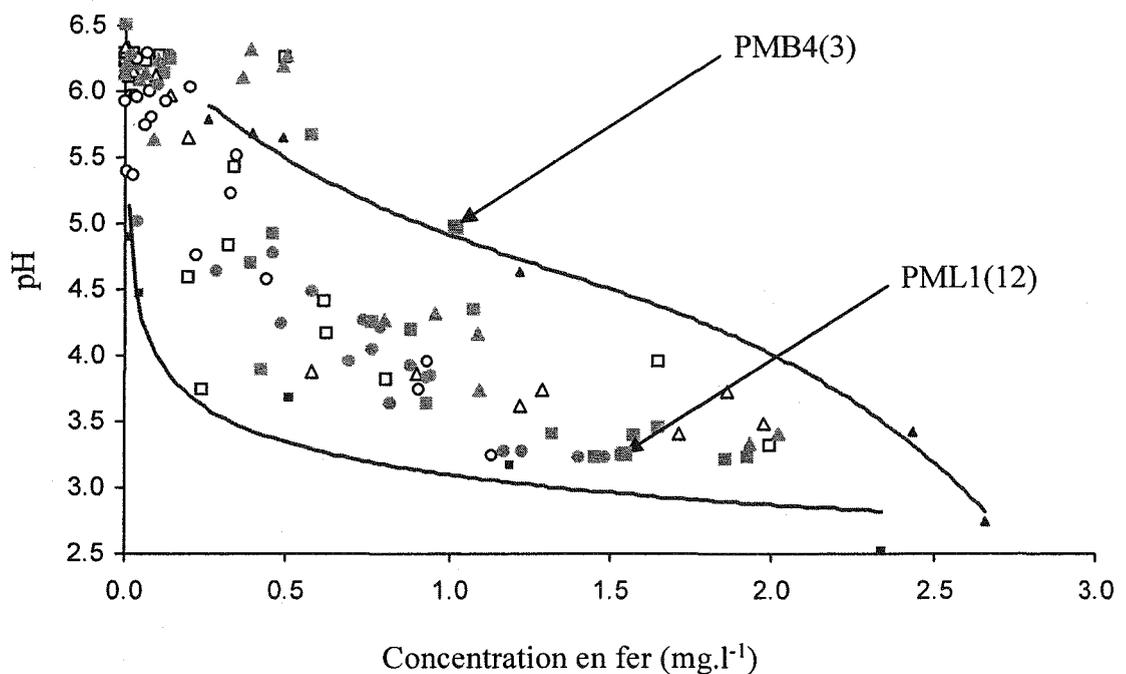


Figure IV.4: Localisation des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) (cf. chapitre III) sur un diagramme fer issu de l'altération de la biotite / pH de la solution, réalisé à partir des résultats obtenus lors du test en microplaques de l'ensemble des souches bactériennes de la collection réalisée sous le peuplement de chêne en 2001. Chaque point est la moyenne de quatre répétitions. La courbe supérieure correspond à l'effet altérant d'un acide complexant (acide citrique) et la courbe inférieure correspond à l'effet altérant d'un acide chlorhydrique).



### 3. RESULTATS

---

#### 3.1 Quantification du processus d'altération au cours de l'interaction biotite - microorganismes – solution

Notre première étude visait à quantifier l'altération d'un minéral-test, la biotite, engendrée par deux souches bactériennes et deux souches fongiques rhizosphériques en présence et en l'absence de glucose.

##### Matériel et méthodes

Ne sont décrits ci-dessous que les spécificités du matériel inhérent à cette expérience qui divergent du protocole général présenté dans la partie "dispositif expérimental en colonnes".

- Matériel microbiologique

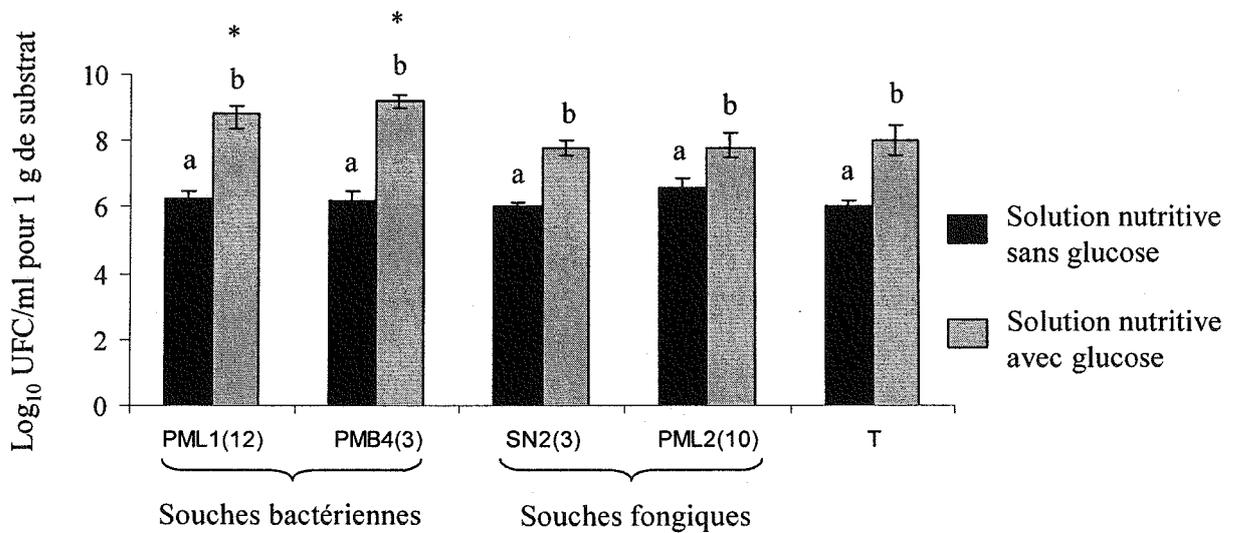
Les souches bactériennes *Burkholderia glathei* PML1(12) et PMB4(3) ont été isolées dans l'horizon organo-minéral 5-10 cm, respectivement au niveau de l'interface "racines de chêne mycorhizées par *Scleroderma citrinum* – sol" et dans le manchon symbiotique des mycorhizes de *S. citrinum* (Figure IV.3). Ces souches ont été choisies pour leurs fortes capacités à mobiliser le fer et le phosphore *in vitro*. Les tests en microplaques ont par ailleurs révélé que la souche PML1(12) semble plutôt altérer la biotite par acidification alors que la souche PMB4(3) agirait plutôt par un mécanisme de complexation (Figure IV.4).

Les souches fongiques SN2(3) et PML2(10) isolées respectivement dans le sol global de l'horizon organo-minéral 0-5 cm sous chêne et au niveau de l'interface "racines de chêne mycorhizées par *S. citrinum* – sol" de l'horizon organo-minéral 5-10 cm (Figure IV.3). Ces souches ont également été choisies pour leurs fortes capacités à mobiliser le fer et le phosphore *in vitro*.

Tableau IV.3: Les différents traitements de l'expérience "interactions microorganismes - minéral - solution". Les chiffres correspondent au nombre de répétitions.

Souches microbiennes	Solution nutritive	
	Avec glucose	Sans glucose
Bactérie PML1(12)	4	4
Bactérie PMB4(3)	4	4
Champignon SN2(3)	4	4
Champignon PML2(10)	4	4

Figure IV.5: Densités de bactéries cultivables mesurées après 21 jours d'expérimentation dans le substrat des colonnes. Chaque histogramme correspond à la moyenne de 4 répétitions. Les barres représentent les écarts-types. Pour chaque traitement microbien, les valeurs associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (type de solution nutritive) et le test Bonferroni-Dunn. Pour chaque type de solution nutritive, les histogrammes avec un astérisque sont significativement différents selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement microbien) et le test Bonferroni-Dunn.



- Solution nutritive

La solution nutritive de base à laquelle est ajoutée, pour la moitié des traitements, une source de carbone, en l'occurrence du glucose à une concentration de  $1 \text{ g.l}^{-1}$ , pour compenser l'absence d'exsudat racinaire.

- Traitements

Le tableau IV.3 présente les différents traitements mis en place dans cette expérience.

## Résultats

Les densités bactériennes sont significativement plus importantes dans les colonnes alimentées en solution nutritive avec glucose comparativement à celles des colonnes alimentées en solution nutritive sans glucose et ce, quel que soit le traitement considéré (Figure IV.5). Les densités bactériennes sont significativement plus fortes dans les traitements ayant subi l'inoculation avec les souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) mais uniquement lorsque la solution contient du glucose (Figure IV.5).

Quel que soit le paramètre observé (pH, quantités de magnésium et de potassium dans la solution), les résultats obtenus sur les colonnes témoins non inoculées, alimentées avec une solution nutritive contenant du glucose ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec les colonnes alimentées avec la même solution nutritive mais dépourvue de glucose (Tableau IV.4).

Les valeurs de pH des traitements non inoculés alimentés en solution nutritive pourvue ou non en glucose ne sont pas significativement différentes et sont stables dans le temps. A l'inverse, les valeurs de pH des traitements inoculés par les souches bactériennes ou les souches fongiques, montrent une acidification en présence de glucose qui est plus ou moins marquée et plus ou moins rapide suivant le traitement (Figure IV.6). Ainsi, la souche bactérienne PMB4(3) acidifie rapidement la solution pour atteindre des valeurs minimales de pH de 3.8 après 7 jours d'expérimentation, la souche bactérienne PML1(12) acidifie, quant à elle, plus fortement le milieu avec des valeurs de pH de l'ordre de 3.2 mais après seulement 14 jours d'expérimentation. Les souches fongiques acidifient moins la solution avec des valeurs de pH de 4.6 pour PML2(10) et 5.5 pour SN2(3) après 21 jours d'expérimentation.

Tableau IV.4: Quantités de magnésium et de potassium dans la solution drainée et pH de la solution drainée dans les traitements témoins non inoculés, après 21 jours d'expérimentation. Chaque valeur correspond à la moyenne de quatre répétitions. Pour les différentes variables mesurées (quantité de magnésium en solution ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ), quantité de potassium en solution ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) et pH de la solution), les moyennes associées à des lettres identiques ( $\alpha$ , A ou  $\alpha$ ) ne sont pas significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement solution nutritive), et le test de Bonferroni-Dunn.

Solution nutritive	Quantité de magnésium en solution ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Quantité de potassium en solution ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	pH de la solution
Sans glucose	754 <sup>a</sup>	378 <sup>A</sup>	7.1 <sup>a</sup>
Avec glucose	774 <sup>a</sup>	446 <sup>A</sup>	7.0 <sup>a</sup>

Figure IV.6: Evolution du pH de la solution drainée au cours du temps pour les différents traitements bactériens et fongiques alimentés en solution nutritive avec glucose et sans glucose. Chaque point est la moyenne de quatre répétitions.

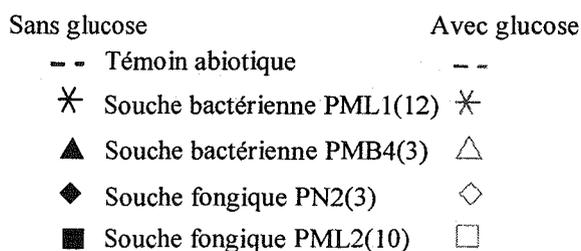
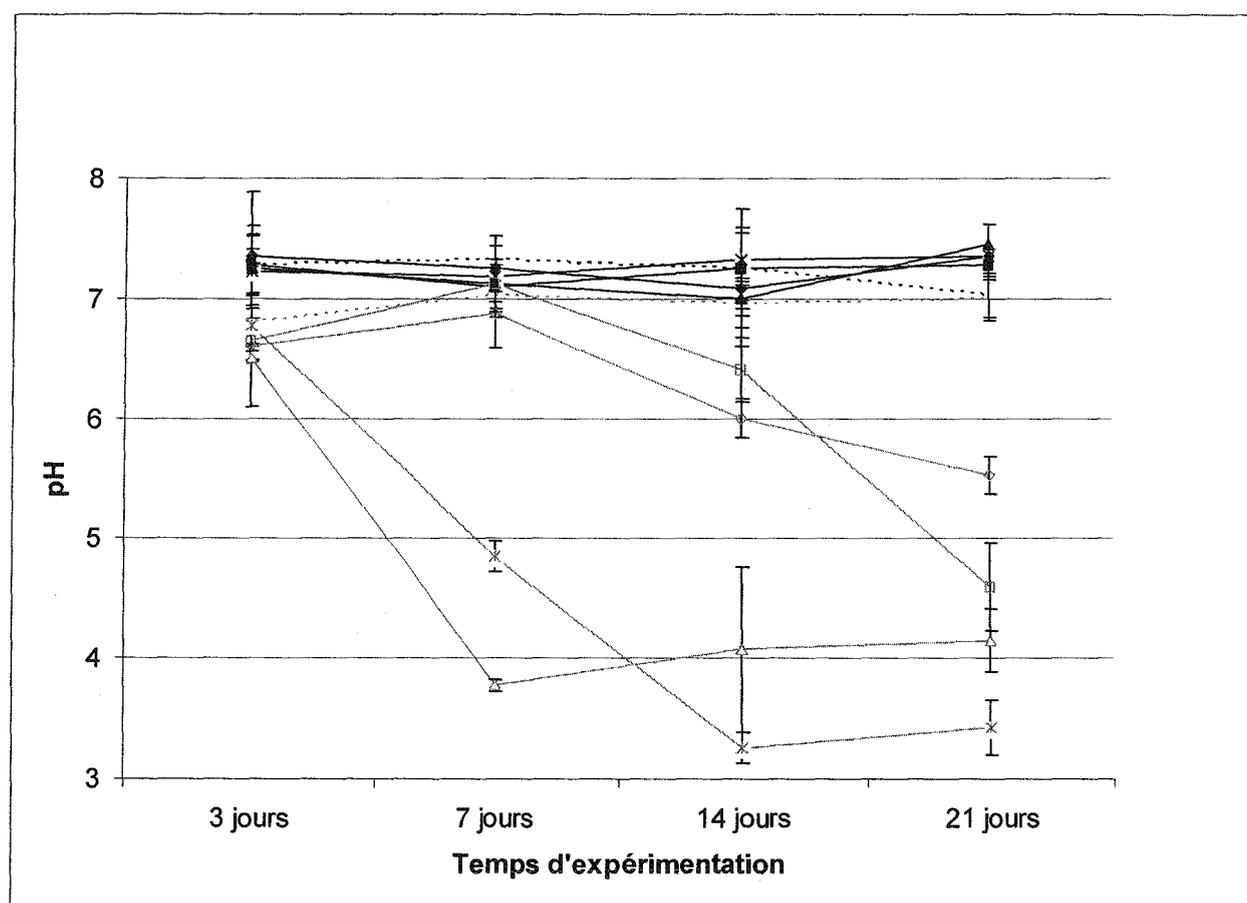
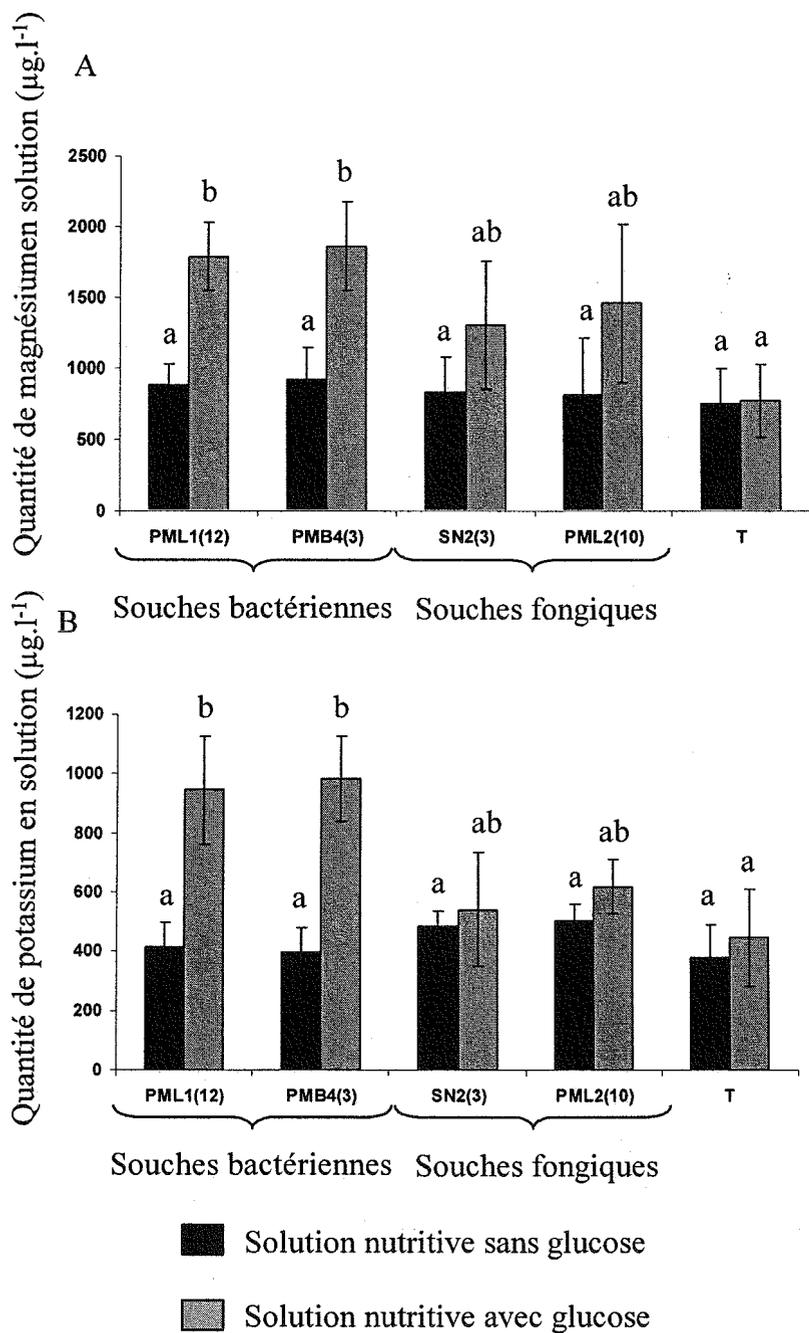


Figure IV.7: Quantités totales de magnésium (A) et de potassium (B) libérées en solution au cours des 21 jours d'expérimentation. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les barres représentent les écarts-types. Pour chaque type de solutions nutritives, les valeurs associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement microbien) et le test Bonferroni-Dunn.



Les bilans d'altération réalisés après trois semaines d'expérimentation montrent qu'en absence de glucose dans la solution nutritive, il n'y a aucune différence entre les différents traitements inoculés et le traitement non inoculé concernant les quantités de magnésium et de potassium en solution (Figures IV.7A et IV.7B). En revanche, lorsque la solution nutritive est pourvue en glucose, les quantités de magnésium libérées en solution sont significativement plus importantes en présence des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) (1.8 et 1.9 mg, respectivement) et à un degré moindre, en présence des champignons (1.3 et 1.5 mg, respectivement) comparativement au traitement non inoculé (0.8 mg) (Figure IV.7A). De même, lorsque la solution nutritive est pourvue en glucose, les quantités de potassium libérées en solution sont significativement plus importantes en présence des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) (0.9 et 1.0 mg, respectivement) comparativement au traitement non inoculé (0.4 mg), ce qui n'est pas le cas des traitements inoculés avec les souches fongiques (0.5 et 0.6 mg, respectivement) (Figure IV.7B).

### **Interprétation et discussion des résultats**

Quelle que soit la variable observée (pH, quantités de magnésium et de potassium dans la solution), le traitement non inoculé alimenté en solution nutritive sans glucose n'est pas différent du traitement non inoculé alimenté en solution nutritive avec glucose. Ce qui implique que le glucose, en lui-même, (i) n'interagit pas directement avec la phase minérale et (ii) n'a pas stimulé la croissance d'une microflore contaminante ayant des propriétés altérantes dans les colonnes de l'ensemble du dispositif. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de comparer les différents traitements inoculés, avec et sans glucose.

L'acidification de la solution que nous avons uniquement observée en présence de glucose et de microorganismes inoculés suggère la production d'acides organiques résultant du métabolisme microbien du glucose. Plusieurs souches microbiennes et plus particulièrement des bactéries telles que *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Serratia* ont été décrites comme étant capables d'accélérer la dissolution de phosphates par la production d'acide gluconique (Rodriguez *et al.*, 2000 ; Krishnaraj & Goldstein, 2001 ; Kim *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2006). Cet acide résulte de l'oxydation du glucose par la quinoprotéine déhydrogénase (Babu-Khan *et al.*, 1995). Welch et Ullman (1999) ont suggéré que la production d'acide gluconique par les microorganismes catalyserait la

dissolution d'un feldspath. Plus récemment, Kim *et al.* (2005) ont même démontré que la production de cet acide par une souche de *B. glathei* était plus efficace pour solubiliser le phosphate qu'une simple addition d'acide gluconique. Lin *et al.* (2006) ont fait l'hypothèse que les protons associés à l'acide gluconique seraient à l'origine de la solubilisation des phosphates. En produisant une grande quantité de protons, les microorganismes vont dissoudre le phyllosilicate et mobiliser le magnésium et le potassium (Robert et Berthelin, 1986). Dans le cas des souches que nous avons étudiées, à savoir les souches bactériennes *B. glathei* PML1(12) et PMB4(3) et les souches fongiques SN2(3) et PML2(10), la production de protons issus de la dégradation du glucose lors du métabolisme microbien pourrait être le mécanisme majeur de l'altération de la biotite mais cela reste à confirmer. D'autant plus que les mesures de densités bactériennes mettent en évidence un effet stimulant du glucose sur la croissance bactérienne dans les colonnes inoculées avec les souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3). Ceci suggère que le glucose pourrait également agir comme source d'énergie pour les microorganismes, stimulant ainsi leur activité et la production d'autres métabolites ayant des propriétés altérantes comme les acides organiques ou les enzymes (Robert et Berthelin, 1986). Le comportement des souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) et des souches fongiques SN2(3) et PML2(10) sur le milieu CAS (cf chapitre III) suggère que ces souches seraient également capables de synthétiser des sidérophores. En effet, le milieu CAS que nous avons utilisé, a été, à l'origine, mis au point dans le but de caractériser l'aptitude de microorganismes à produire des sidérophores (Alexander et Zuberer, 1990).

Nos résultats permettent par ailleurs de hiérarchiser l'efficacité des microorganismes à altérer de la biotite dans nos conditions expérimentales en colonnes. En effet, les souches bactériennes *B. glathei* PML1(12) et PMB4(3) augmentent la dissolution de 20 à 50% par rapport aux souches fongiques SN2(3) et PML2(10). Ceci résulterait (i) de la plus grande capacité des souches bactériennes à dégrader le glucose et à produire des composés acides comme l'indiquent les pH de la solution entre 3 et 4 pour les souches bactériennes alors qu'ils sont proches de 5 pour les champignons et (ii) de l'utilisation préférentielle de cette source de carbone par les bactéries qui engendre donc une augmentation considérable de la biomasse et de l'activité bactérienne dans les colonnes ainsi que la production d'une plus grande quantité de composés altérants comparativement aux champignons.

Pour finir, il est intéressant de noter que les valeurs de pH de la solution obtenues pour les deux souches bactériennes *B. glathei* PML1(12) et PMB4(3) sont comparables dans notre expérimentation en colonnes alors que les tests *in vitro* en microplaques indiquaient des comportements différents : la souche PML1(12) dissolvait la biotite principalement par un mécanisme d'acidification, avec un pH de la solution proche de 3, alors que la souche PMB4(3) semblait plutôt agir par un mécanisme de complexation, avec un pH de la solution voisin de 5. Ces observations mettent en évidence l'importante influence des conditions du milieu (aération, pH et composition de la solution nutritive,..) sur l'activité altérante des microorganismes, notamment en ce qui concerne les mécanismes mis en œuvre pour altérer la phase minérale et mobiliser les éléments.

### **3.2 Quantification du processus d'altération au cours de l'interaction biotite - arbre forestier -bactéries – solution**

Après avoir testé l'effet des microorganismes seuls sur l'altération de la biotite, nous avons mis en place de nouveaux dispositifs en colonnes faisant interagir la plante avec quelques souches bactériennes rhizosphériques potentiellement altérantes. Cette étude devait permettre de (i) quantifier l'altération d'un minéral-test engendrée par différents acteurs biologiques (plante, bactéries), seuls ou en association, et de (ii) mesurer l'effet de l'inoculation de souches bactériennes rhizosphériques, seules ou en association, sur la croissance de la plante

**Article : Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis.**

Calvaruso C.<sup>1,2</sup>, Turpault M.P.<sup>1</sup>, Frey-Klett Pascale<sup>2\*</sup>

UR INRA 1138 "Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

UMR INRA-UHP 1136 "Interactions Arbres-Microorganismes", Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

Publié dans *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2 : 1258-1266

### Résumé

La source principale de nutriments dans les écosystèmes forestiers provient de l'altération des minéraux du sol qui résulte de la circulation des eaux et de l'activité des plantes et des microorganismes. Les objectifs principaux de ce travail étaient de quantifier l'effet respectif des plantes et des bactéries associées aux racines dans l'altération des minéraux et leurs conséquences sur la croissance et la nutrition des semis d'arbres. C'est pourquoi, nous avons mis en place deux expériences en colonnes contenant un substrat quartz - biotite. Les colonnes étaient plantées ou non avec un semis de pins, et inoculées ou non avec trois souches bactériennes ectomycorhizosphériques. Ceci avait pour but de quantifier l'altération de la biotite et la croissance des plants de pin et de déterminer comment les bactéries augmentent la croissance des plants de pin.

Nous avons montré que les racines de pin augmentent l'altération de la biotite par un facteur 1.3 pour le magnésium et 1.7 pour le potassium. Nous avons démontré également que l'inoculation de la souche bactérienne *Burkholderia glathei* PML1(12) augmente significativement l'altération de la biotite par un facteur 1.4 pour le magnésium et 1.5 pour le potassium en comparaison avec les plants de pin non inoculés. De plus, nous avons observé un effet positif significatif de *B. glathei* PMB1(7) et PML1(12) sur la croissance des pins et sur la morphologie du système racinaire (nombre de racines latérales et de poils absorbants). Nous avons démontré que PML1(12) augmente la croissance des pins quand les plants sont alimentés avec une solution nutritive qui ne contient pas les nutriments présents dans la biotite. En revanche, aucune augmentation de croissance des pins liée à l'inoculation de PML1(12)

n'a été observée quand les plants étaient alimentés avec une solution nutritive contenant tous les nutriments nécessaires à la croissance des pins. Par conséquent, nous suggérons que l'effet promoteur de croissance de *B. glathei* PML1(12) résulterait principalement d'une amélioration de la nutrition de la plante *via* une augmentation de l'altération du minéral.

### **Abstract**

The principal nutrient source for the forest trees derives from the weathering of the soil minerals which results from water circulation and from plant and microbial activity. The main objectives of this work were to quantify the respective effects of plant and root-associated bacteria on mineral weathering and their consequences on tree seedlings growth and nutrition. That is why we carried out two column experiments with a quartz-biotite substrate. The columns were planted with or without pine seedlings, and inoculated or not with three ectomycorrhizosphere bacterial strains in order to quantify biotite weathering and pine growth, and to determine how bacteria improve pine growth. We showed that the pine roots significantly increased biotite weathering by a factor 1.3 for magnesium and 1.7 for potassium. We also demonstrated that the inoculation of *Burkholderia glathei* PML1(12) significantly increased biotite weathering by a factor of 1.4 for magnesium and 1.5 for potassium in comparison with the pine alone. In addition, we observed a significant positive effect of *B. glathei* PMB1(7) and PML1(12) on pine growth and on root morphology (number of lateral roots and root hairs). We demonstrated that PML1(12) improved pine growth when the seedlings were supplied with a nutrient solution which did not contain the nutrients present in the biotite. No improvement of pine growth was observed when the seedlings were supplied with all the nutrients necessary for pine growth. We therefore propose that the growth promoting effect of *B. glathei* PML1(12) mainly resulted from the improved plant nutrition *via* increased mineral weathering.

### **Introduction**

In ecosystems with low inputs and without any fertilisation or soil amendment by man, the nutrients available to plants come from atmospheric inputs and weathering of soil minerals. This is mainly the case with forest ecosystems which, in addition, are

frequently located on poor and acidic soils (Badeau *et al.*, 1999). Plants developing on acidic soils are subjected to two major constraints: i) high concentrations of ions like  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{H}^+$  which inhibit root growth and ii) low mineral nutrient availability as a result of low reserves and impaired uptake due to high  $\text{H}^+$  concentrations (Marschner, 1991).

In temperate and boreal forest ecosystems, the vast majority of trees lives in close association with symbiotic fungi, the ectomycorrhizal fungi, which connect tree roots to the soil environment *via* a broad network of hyphae. These fungi contribute to plant nutrition by carrying far away from the roots and from very small pores, the water and the nutrients they released by weathering the primary minerals (Landeweert *et al.*, 2001 ; Van Breemen *et al.*, 2000). In addition, the ectomycorrhizal symbiosis modifies root exudation qualitatively and quantitatively by changing the metabolic functions of the roots (Leyval and Berthelin, 1993, Rambelli 1973 ; Rygiewicz and Andersen, 1994). It creates a special environment called mycorrhizosphere, where the bacterial equilibrium is different from that of the bulk soil (soil without any influence of roots) (Linderman, 1988). These modifications of the bacterial equilibrium in the mycorrhizosphere are likely to contribute to plant nutrition (Frey-Klett *et al.*, 2005). However, the mechanisms involved still remain to be clarified, especially the role of mycorrhizosphere bacteria on the weathering of soil primary minerals.

It is already known that the physico-chemical changes in the rhizospheric soil, induced by roots and their associated microflora, influence the weathering processes and the nutrients uptake by plants (Hinsinger, 1998, Jones and Darrah, 1994, Jones *et al.* 2003, Landeweert *et al.*, 2001, Marschner *et al.*, 1986). However, the respective quantitative contributions of plant and rhizosphere micro-organisms on mineral weathering processes and their consequences on plant nutrition still remain to be determined, especially in the case of nutrient-poor forest ecosystems. This study presents the first part of a project which purpose is to quantify the contribution of the different microbial components of mycorrhizosphere to the mineral weathering processes and the tree nutrition. It is focused on the bacterial component, which contribution to mineral weathering in forest soil has been completely neglected so far.

To determine the respective contribution of tree roots and mycorrhizosphere bacteria to mineral weathering, we carried out a column experiment in a growth chamber, associating pine seedlings with different combinations of three strains of *Burkholderia glathei*. The inputs and outputs of potassium and magnesium in solution, as well as the

immobilisation of these elements by pine seedlings, were measured in order to compare the weathering budget in the different treatments. Because the bacterial strain *B. glathei* PML1(12) simultaneously promoted mineral weathering and plant growth, we carried out a complementary experiment in a greenhouse in order to confirm these effects and to test if both effects were linked. For that purpose, we compared the effect of this bacterial strain on the growth of pine seedlings supplied either with a deficient or a complete nutrient solution.

## Material and methods

- Bacterial strains

### *Origin*

A collection of 140 bacterial strains were isolated from oak (*Quercus petraea*)-*Scleroderma citrinum* ectomycorrhizas and bulk soil, sampled in the mineral soil horizon in an experimental forest site located at Breuil, in central France. The ecosystem is oligotrophic and very sensitive to nutrient deficiency and acidification. The soil is an alocrisol with acid mull type humus developed in aeolian silt, over a granite parent material containing two micas (Dejou, 1967). The bacterial isolates were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  in Nutrient Broth glycerol medium (8 g.l<sup>-1</sup> Nutrient Broth from Difco, 850 ml of demineralised water and 150 ml of glycerol).

### *Selection of three bacterial strains*

Among our collection of 140 bacterial strains, the three strains PMB1(7), PML1(4) and PML1(12), which were isolated from oak-*S. citrinum* ectomycorrhizas, were chosen because they showed the highest potential for mineral weathering in three different biotests (Table IV.5). The first two biotests (CAS and TCP Petri dish tests), which measure the bacterial efficacy for phosphorus and iron mobilisation, were performed according to Frey-Klett *et al.* (2005). The third biotest, which allows to quantify the bacterial impact on biotite weathering, consisted in incubating each bacterial suspension (20 microliters,  $A_{600\text{nm}} = 0.9$ ) with 160 microliters of nutrient solution: 1.5 mg.l<sup>-1</sup> of sodium, 2 mg.l<sup>-1</sup> of phosphorus (10 mg.l<sup>-1</sup> of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 2.3 mg.l<sup>-1</sup> of calcium, 1.9 mg.l<sup>-1</sup> of sulphur (10 mg.l<sup>-1</sup> of  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 11.2 mg.l<sup>-1</sup> of nitrogen (32 mg.l<sup>-1</sup> of  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ) and 20 microliters of glucose (20 g.l<sup>-1</sup> of glucose), and 10 mg of biotite (200

Tableau IV.5: Capacity of the three bacterial strains selected for the column experiments to mobilise iron and phosphorus in three in vitro tests.

<sup>x</sup> efficacy of iron mobilisation = diameter of the discoloration zone on the CAS medium corresponding to the zone of iron solubilisation / bacterial concentration (CFU/ml).

<sup>y</sup> efficacy of phosphorus mobilisation = diameter of the discoloration zone on the TCP medium corresponding to the zone of phosphorus solubilisation / bacterial concentration (CFU/ml).

<sup>z</sup> a reference strain which presents low efficacy to mobilise nutrients in the different biotests.

<sup>t</sup> effect of the non-inoculated complete solution (same composition than the deficient nutrient solution used for the column experiments plus 2 g.l<sup>-1</sup> of glucose) on the mobilisation of potassium and iron in the biotest with mineral.

For each variable (efficacy of Fe and P mobilisation, solution pH, [Fe] and [K] released after biotite weathering), treatments associated with the same letter are not significantly different according to a one-factor (bacterial treatment) ANOVA (P=0.05), and the Bonferroni-Dunn test.

Strains	Petri dish tests		Biotest with mineral		
	Efficacy of Fe mobilisation <sup>x</sup>	Efficacy of P mobilisation <sup>y</sup>	Solution pH	[Fe] released after biotite weathering	[K] released after biotite weathering
PMB1(7)	0.23 <sup>c</sup>	0.70 <sup>c</sup>	2.93 <sup>c</sup>	2.26 <sup>c</sup>	2.59 <sup>c</sup>
PML1(4)	0.15 <sup>b</sup>	0.44 <sup>bc</sup>	2.68 <sup>d</sup>	3.32 <sup>d</sup>	3.37 <sup>d</sup>
PML1(12)	0.27 <sup>c</sup>	0.26 <sup>b</sup>	3.05 <sup>c</sup>	2.29 <sup>c</sup>	2.55 <sup>c</sup>
PN4(4) <sup>z</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	4.05 <sup>b</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.90 <sup>b</sup>
Nutrient solution <sup>t</sup>			5.15 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	1.44 <sup>a</sup>

Tableau IV.6: Molecular identification of the three bacterial strains.

<sup>a</sup> top match as determined by the BLAST method. The BLAST programme was described by Altschul et al. (1997).

Isolate	<i>rrs</i> sequence length	Top match [GenBank accession n°] <sup>a</sup>	Nucleotide identity
PMB1(7)	453	<i>Burckholderia glathei</i> AY154378	98%
PML1(4)	764	<i>Burckholderia glathei</i> AY154374	99%
PML1(12)	677	<i>Burckholderia glathei</i> AY154378	98%

to 500 micrometers) during 65 hours, in shaken cultures (350 rounds per minute). In each of these three biotests, the strain PN4(4), which was isolated from bulk soil, was used as a control because it presents a very low efficacy for P and Fe mobilisation, and biotite weathering. The results presented in the Table IV.5 underline the great diversity of behaviours obtained in the different biotests for the four bacterial strains.

#### *Molecular identification*

Partial sequencing of the 16S ribosomal DNA genes of the bacterial isolates was carried out as described by Bertaux *et al.* (2003). After purification, the 16S ribosomal DNA gene products were sequenced with the eubacterial primer 27F (Weisburg *et al.*, 1991). The sequences were compared with those in the GenBank databases ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)), using the Blast programme (Altschul *et al.*, 1997) (Table IV.6).

#### *Preparation of the bacterial inocula*

Bacteria were grown on 10% TSA medium (3 g.l<sup>-1</sup> Tryptic Soy Broth from Difco and 15 g.l<sup>-1</sup> agar) at 25°C for 36h. Bacteria were suspended in sterile ultra-pure water, washed twice. The inoculum concentrations were then adjusted to 4.10<sup>7</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> according to a A<sub>600nm</sub> standard curve calibrated by plate enumeration.

- Plant material

Non mycorrhizal scots pine seedlings (*Pinus sylvestris*; provenance: Haguenu forest, France) were grown in a non-sterile peat-vermiculite substrate in a greenhouse: 60% humidity, a night temperature of 15°C and a day temperature of 22°C, and a 16 hour period of daylight, two watering of two minutes by day. After six weeks, the seedling roots were washed very carefully with a brush in sterile ultra-pure water, four times successively, to remove remaining peat and vermiculite particles. The excess of water was then removed using absorbent paper, and the seedlings were weighed individually in the case of the growth chamber experiment.

- Mineral material

The mineral chosen was a biotite from Bancroft (Canada), a 2:1 phyllosilicate, frequently present in acid soils, which weathers relatively quickly and holds K, Mg and Fe nutrient elements (which are indispensable for plants). It is a pure homogeneous mineral and its composition is: 41.01% SiO<sub>2</sub>, 10.9% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2.21% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10.05% FeO, 0.27% MnO, 18.9% MgO, 0.41% Na<sub>2</sub>O, 9.46% K<sub>2</sub>O, 2.28% TiO<sub>2</sub>, 4.42% F and 824 ppm Zn. Its structural formula is (Si<sub>3</sub>Al<sub>1</sub>) (Fe<sup>3+</sup><sub>0.12</sub> Fe<sup>2+</sup><sub>0.61</sub> Mg<sub>2.06</sub> Mn<sub>0.02</sub> Ti<sub>0.13</sub>) and K<sub>0.88</sub> Na<sub>0.06</sub> O<sub>10</sub> (OH<sub>0.98</sub> F<sub>1.02</sub>).

The biotite crystals were ground, washed with distilled water and treated ultrasonically (two minutes, three times at 100 volts), to remove the fine particles that electrostatically adhere to the particles with the size required, and then sieved to obtain the size fraction between 0.5 and 1 mm. Pure quartz crystals were prepared the same way and sieved to obtain two size fractions of 0.5 to 1 mm and 1 to 2 mm (Augusto *et al.*, 2001). Biotite and quartz preparations were then sterilized by autoclaving (20 min. at 120°C). A previous experiment showed that the dissolution kinetics of both minerals was not modified by autoclaving.

- Nutrient solutions

*Growth chamber experiment*

Only a deficient nutrient solution was used. The composition of this deficient nutrient solution was adjusted in order that it only contained elements that were essential for pine growth but were absent from the biotite composition, and in concentrations equivalent to those found in the soils at the experimental forest site at Breuil: 1.5 mg.l<sup>-1</sup> of sodium, 2 mg.l<sup>-1</sup> of phosphorus (10 mg.l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O), 2.3 mg.l<sup>-1</sup> of calcium, 1.9 mg.l<sup>-1</sup> of sulphur (10 mg.l<sup>-1</sup> of CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O), 11.2 mg.l<sup>-1</sup> of nitrogen (32 mg.l<sup>-1</sup> of NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>) and trace-element: 0.3 mg.l<sup>-1</sup> of molybden (0.3 mg.l<sup>-1</sup> of Mo) and 0.2 mg.l<sup>-1</sup> of copper (0.6 mg.l<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O).

*Greenhouse experiment*

Two nutrient solutions were used. The composition of the deficient nutrient solution was the same than the one used in the growth chamber experiment. In contrast, the composition of the complete solution was the same that the deficient nutrient one but

enriched by potassium, magnesium, iron, manganese and zinc in concentrations equivalent to those found in the soils at the experimental forest site at Breuil: 4.2 mg.l<sup>-1</sup> of potassium (8 mg.l<sup>-1</sup> of KCl), 1 mg.l<sup>-1</sup> of magnesium (5 mg.l<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>), and trace-element 0.5 mg.l<sup>-1</sup> of iron (2.5 mg.l<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O), 0.2 mg.l<sup>-1</sup> of manganese (0.6 mg.l<sup>-1</sup> of MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O), and 0.2 mg.l<sup>-1</sup> of zinc (1 mg.l<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O).

The pH of the two nutrient solutions was about 6. Given the quantity of nutrient solutions required for the pine seedlings during the time of the experiments, the solutions were concentrated 100 times, sterilised (20 min. at 120°C) and stored at 4°C in 50 ml sterile tubes to limit all the risk of contamination, and protected from the light. Each week, the nutrient solutions were replaced by new ones, prepared by mixing the concentrated nutrient solutions with sterile ultra-pure water (20 min. at 120°C).

- Experimental devices and culture conditions

#### *The columns*

They were made from sterile inert polypropylene Falcon tubes, 15 cm high and 4 cm in diameter, with a hole drilled at the bottom. They contained a layer of pre-treated (by percolation with HCl solution at pH 1 for 1 night and with sterile ultra-pure water for 1 day) and sterilized (autoclaved 20 min. at 120°C) glass wool (8 mm thick), on which a mixture of 2.8 g of biotite (0.5 to 1 mm diameter), 10 g of quartz (0.5 to 1 mm) and 35 g of quartz (1 to 2 mm), were placed. A preliminary experiment with fluorescein solution showed that this mixture allows a good flow in the whole column. The columns were filled individually under a laminary flow hood. In each column, one pine seedling was planted, except for those of the control treatment without plant (**WP**) which simulates geochemical processes. Then 1.8 ml of bacterial inoculum with a concentration of 4.10<sup>7</sup> CFU/ml was added to each column, except for the two control treatments: Non-inoculated plant (**P**) and without plant (**WP**) (see below), which received 1.8 ml of sterile ultra-pure water only.

#### *Growth chamber experimental device*

The deficient nutrient solution was stored in a 20 l sterile inert container, which was protected from the light by aluminium foil. Two peristaltic pumps were calibrated to supply the columns with the nutrient solution at a rate of 1 ml per hour, *via* tygon

tubing. The nutrient solution percolating through the columns was collected individually in 100 ml polyethylene tubes placed below each column. The experiment included 9 treatments (with 4 replicates): 1 control without biological material (WP), 1 control with non-inoculated plant (P) and 7 treatments with a plant and one bacterial strain (PMB1(7), PML1(4) or PML1(12)) or associations of strains (PMB1(7)+PMLI(4), PMB1(7)+PML1(12), PML1(4)+PML1(12), and PMB1(7)+PML1(4)+PML1(12)). The columns were placed in a growth chamber with 60% humidity, a night temperature of 18°C and a day temperature of 25°C, and a 17 hour period of daylight.

#### *Greenhouse experimental device*

Fifteen ml of sterile nutrient solutions were injected manually three times per week (Monday, Wednesday and Friday) in each column with sterile syringes. The experiment included 4 treatments (with 10 replicates): two control treatments with non-inoculated plants, supplied by either a deficient nutrient solution or a complete solution, and two inoculated plant treatments with the bacterial strain PML1(12), supplied by either a complete solution or a deficient nutrient solution. The columns were placed in a greenhouse with 60% humidity, a night temperature of 18°C and a day temperature of 25°C, and a 17 hour period of daylight.

- Sampling

#### *Growth chamber experiment*

Forty pine seedlings pre-grown under the same conditions as those used in the column experiment were sampled at the beginning of the experiment (before the bacterial inoculation) to quantify the initial dry weight biomass and mineral content of the seedlings. For the chemical analyses, the solutions from the four replicates of each treatment were collected throughout the experiment. Four weathering budgets for the drainage solution were thus obtained for each treatment. After 76 days, all the pine seedlings were sampled to observe root morphology and to quantify their final biomass and mineral content. Four weathering budgets for the plant immobilisation were thus obtained for each treatment.

### *Greenhouse experiment*

One hundred and two days after bacterial inoculation, all the pine seedlings were sampled for analyses: shoot length, fresh and dry weight of the root and aerial part, length, diameter and volume of the roots.

- Analyses

### *Growth chamber experiment*

The volumes of all the drainage solutions were measured each week. The potassium and magnesium contents of all solutions sampled were measured by ICP emission spectrometer (Plasma torch JY180 ULTRACE). A kinetics follow-up of the potassium and magnesium released from the biotite into the drainage solution was made for the treatment without plant in order to check that the experiment was in a stationary regime (data not shown).

After having washed the pine seedlings, 0.25 g of oven-dried (65°C) aerial or root parts were ground, pre-treated with 5 ml of 30% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) during one night. Then, 5 ml of perchloric acid (HClO<sub>4</sub>) were introduced and the solutions were placed on a warming plate during one night (40°C). These two strong oxidants digest all the organic matter to let and leave behind only the mineral elements. Then the solutions were measured by ICP emission spectrometer.

To observe the weathering surfaces of the biotite, 8 particles adhering to the seedling roots after manual shaking were sampled for each treatment (two particles per replicate). The particles were air dried and glued to a glass slide with varnish. Then, the slides were coated with carbon. Images of the biotite surface and a semi-quantitative analysis of the constitutive elements of the sample were made simultaneously using a Hitachi S2500 SEM connected to a Thermoarcan microanalysis system.

To observe the root morphology and the root-mineral interface, 8 root pieces (two per replicate) were sampled for each treatment. A low vacuum (high pressure) Leo 1450VP SEM, coupled to an Oxford microanalysis system was used. It differs from classical scanning electron microscope by using a controlled pressure function, thus the sample can be observed in a primary vacuum known as a Low Vacuum. The Low Vacuum mode means that one can work without a preliminary coating and thus without altering the sample. In this way root architecture and absorbent hairs in contact with the mineral

surface could be observed. To semi-quantitatively estimate the number of lateral roots and the number of root hairs, we used a binocular microscope Leica MZ 6.

### *Greenhouse experiment*

The shoot length (from the leaf insertion basis to the terminal bud) was measured for each pine seedling at the end of the experiment. At sampling, the roots were washed very carefully in sterile ultra-pure water three times successively to remove the remaining mineral particles. The excess of water was removed using absorbent paper and the fresh weight of the seedlings was determined. Then each root system was photocopied, taking into account the necessity to reduce root overlapping. To measure the different parameters relative to root architecture, the WinRhizo software was used. It allows to quantify root length and total root surface area. Then, the plants were dried at 65°C during five days in order to determine the dry weight of the root and aerial parts.

- Total weathering budget

In each column of the growth chamber experiment, the total weathering budget **W** was calculated as follows:  $W = (D-N) + I$  for the potassium and the magnesium, two elements which were not re-precipitated and not exchanged in the columns as confirmed by MEB observations.

**D** was the quantity of the element in the drainage solution,

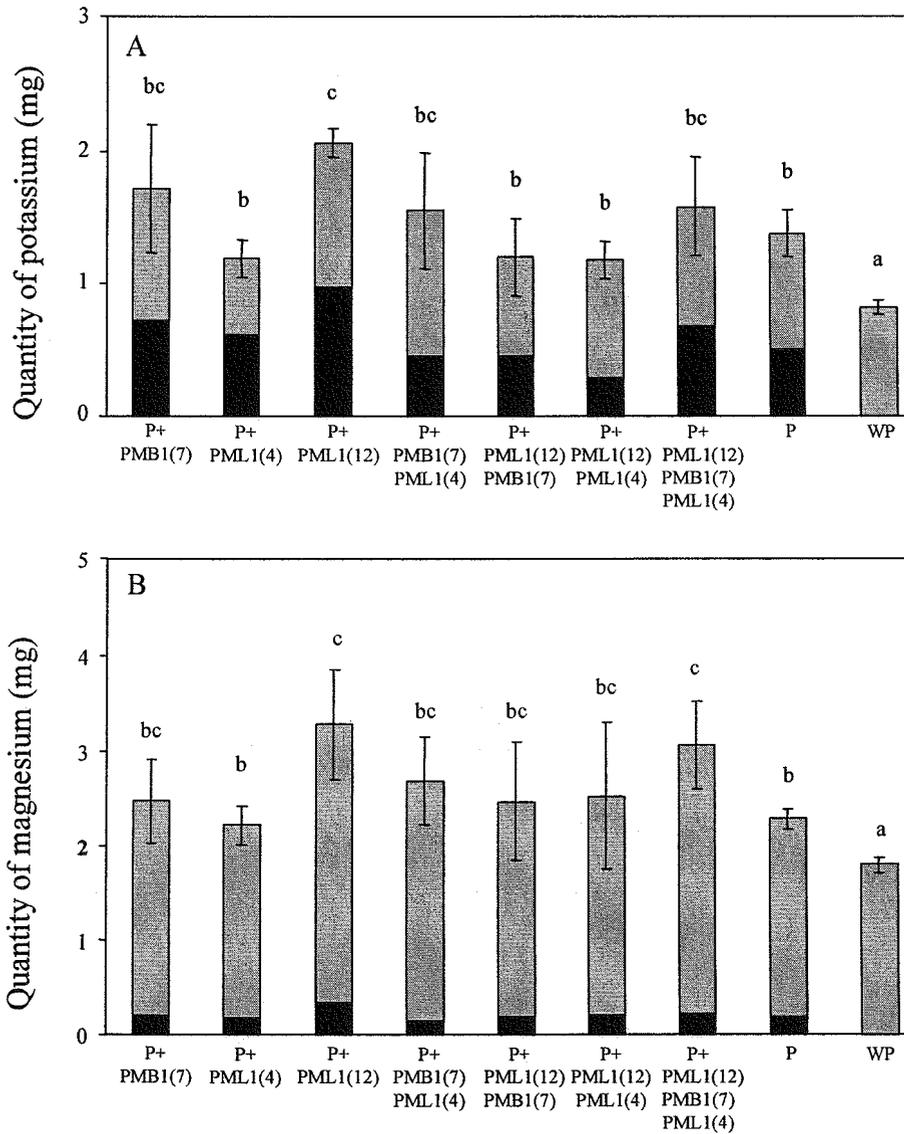
**N** was the quantity of the element in the nutrient solution (= 0 for potassium and magnesium),

**I** was the quantity of the element immobilised by the pine seedling during the experiment and  $I = I_f - I_i$ , where **I<sub>i</sub>** and **I<sub>f</sub>** were the quantities of the element in the pine seedling at the beginning and at the end of the experiment, respectively.

- Statistical analyses of the results

The effect of the plant and the bacterial inoculations on the weathering budgets, on the growth of the pine seedlings and their root architecture were determined using analyses of variance (ANOVA) at the threshold level of  $P = 0.05$ , and the Bonferroni-Dunn test. The Superanova software was used for all these analyses.

Figure IV.8: Mass-balance of potassium (A) and magnesium (B) released into leaching solution (grey) and taken up by plants (black). Each plot is a mean value of four replicates. Bars represent standard deviation referring to the values of the weathering budget. For each variable (sum of potassium or magnesium quantities released into leachates and taken up by plants), treatments associated with the same letter are not significantly different according to a one-factor (plant and bacterial treatment) ANOVA ( $P = 0.05$ ), and the Bonferroni-Dunn test.



## Results

- Weathering budget

The total amounts of potassium and magnesium mobilised from biotite with non-inoculated plants or with plants inoculated by the different bacterial strains were significantly higher than those in the treatment without plant (WP) (Figure IV.8). They were also significantly higher in the treatment inoculated with strain PML1(12), relatively to the non-inoculated plant treatment (P). In this case, not only the amounts of magnesium leached into the solution but also the one taken up by the plant were significantly higher in the treatment inoculated with the strain PML1(12) in comparison to the non-inoculated plant treatment, according to a one-factor ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test (comparison to control) (data not shown). In the same way, the amounts of potassium taken up by the plant were significantly higher in the treatment inoculated with the strain PML1(12) in comparison to the non-inoculated plant treatment, according to a one-factor ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test (comparison to control) (data not shown). In contrast, when the strain PML1(12) was co-inoculated with the strains PMB1(7) or PML1(4), the quantities of potassium and magnesium mobilised from the biotite were no more significantly higher than that of the treatment with plant alone (Figure IV.8). In the special case of the triple inoculation of strains PMB1(7) + PML1(4) + PML1(12), only the amount of magnesium leached into the solution was significantly higher than the one in the treatment with the non-inoculated plant, according to a one-factor ANOVA ( $P = 0.05$ ) and the Bonferroni-Dunn test (comparison to control) (data not shown).

- Analysis of the biotite weathering processes

The SEM observations clearly showed that the surface of the biotite particles from the PML1(12)-inoculated plant treatment was more weathered than the one in the treatment without plant (Figure IV.9) Bacterial cell accumulations were preferentially observed in carbon rich areas (probably root exudates). Some carbon precipitates associated with sulphur and phosphorus as well as iron precipitates were also visible (white areas). Conversely, potassium, magnesium or aluminium precipitates were not observed. The observations showed also that the majority of the biotite particles sampled along the roots was not transformed into vermiculite. This result was confirmed by plotting the total quantity of potassium released from biotite (the quantity of potassium in solution +

Figure IV.9: SEM photography of biotite surfaces without plant and bacteria (A) and with plant inoculated with the bacterial strain PML1(12) (B and C). The white and black areas presented with a black arrow correspond respectively to iron precipitates and carbon deposits. Part (C) corresponds to an enlargement of the square region in part (B). The dotted arrow present bacteria on the biotite surface.

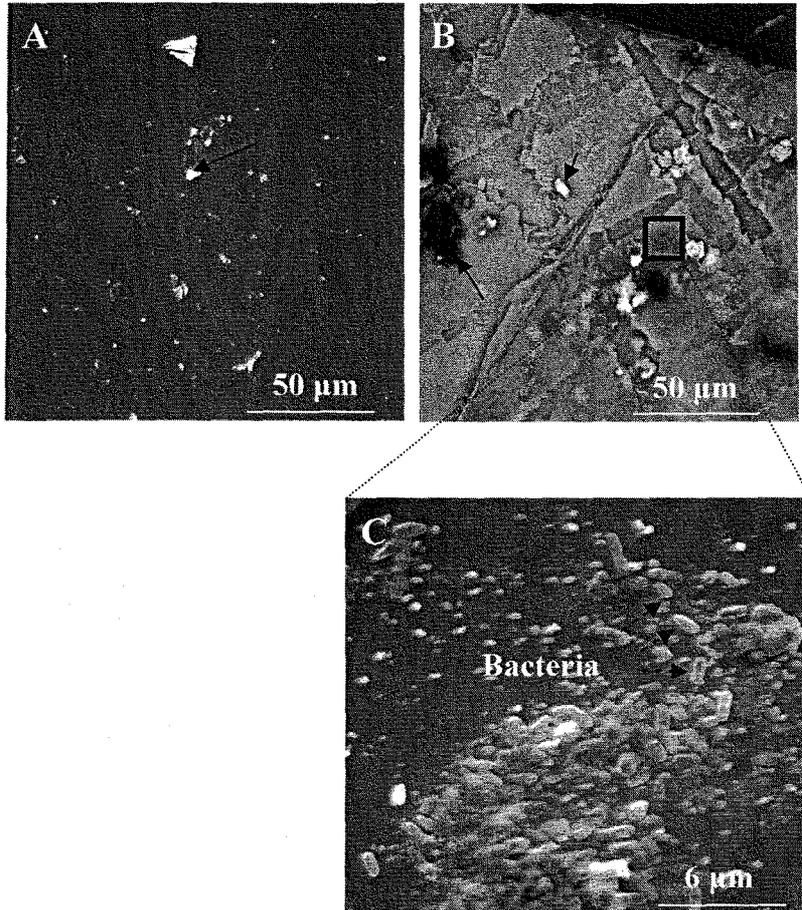


Figure IV.10: Relation between the magnesium and the potassium quantities leached into the solution and taken up by plants, i.e. mobilised in the biotite. The black linear regression curve ( $y = 1.29x + 59.10$  and  $R^2 = 0.321$ ) was obtained with the experimental data set. This regression is significant at  $P < 0.001$ . The dotted curve represents the Mg/K stoichiometry in the Bancroft biotite which refers to a congruent dissolution process. The area under the dotted curve corresponds to the transformation domain of the biotite into vermiculite.

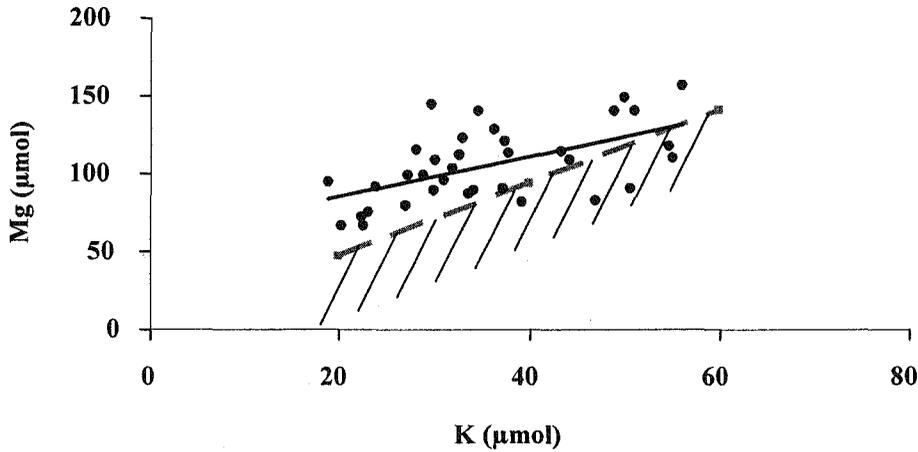
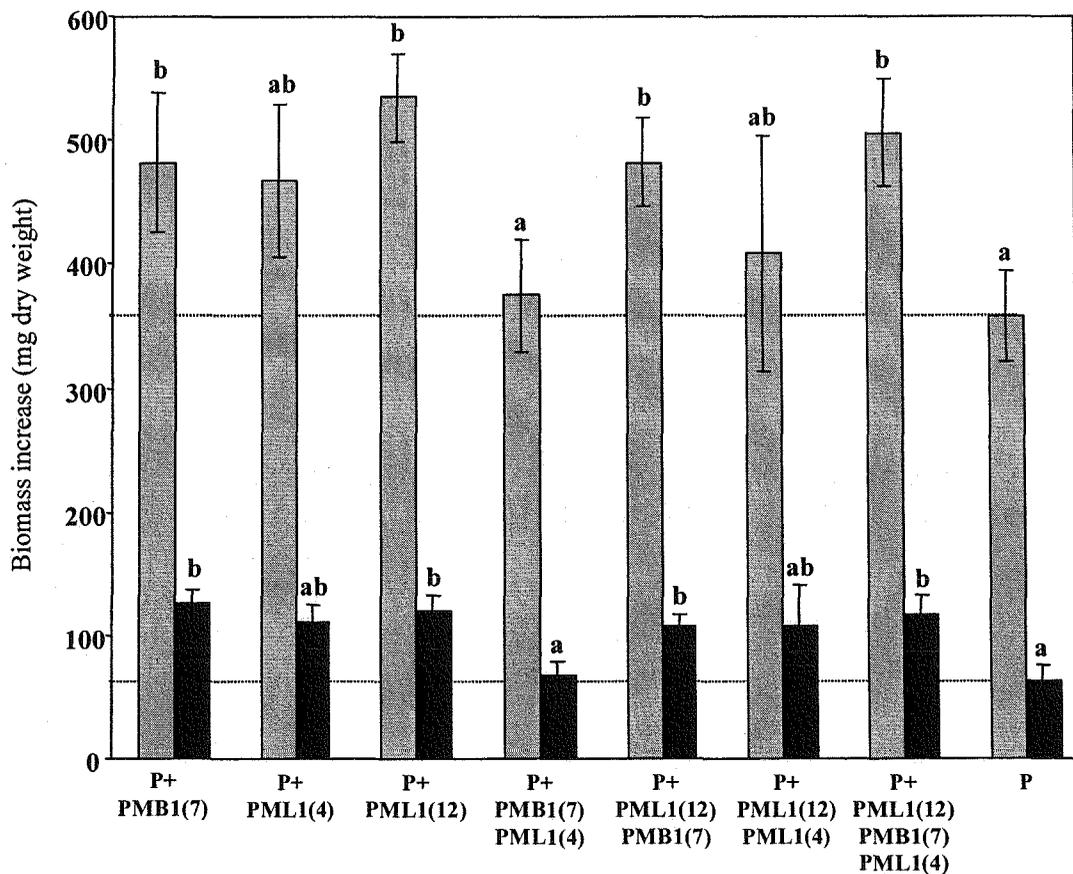


Figure IV.11: Increase of the root (black) and total plant (grey) biomass during the 76 days of the growth chamber experiment in the different treatments. Each plot is a mean value of four replicates. Bars represent standard deviation. For each variable (total plant growth or root growth), treatments associated with the same letter are not significantly different according to a one-factor (bacterial treatment) ANOVA ( $P = 0.05$ ), and the Bonferroni-Dunn test.



the quantity of potassium mobilised by the seedlings) against the total quantity of magnesium released (Figure IV.10): potassium and magnesium were released in a nearly stoichiometric way; there was no preferential release of interlayer potassium responsible for the transformation of biotite into vermiculite.

- Growth of the pine seedlings

#### *Growth chamber experiment*

The pine seedlings inoculated with the following bacterial strains, PMB1(7), PML1(12), PMB1(7) + PML1(12), and PMB1(7) + PML1(4) + PML1(12), produced significantly more total and root biomass than the non-inoculated plants (Figure IV.11). These data were in accordance with Low Vacuum SEM and binocular microscopy observations, which showed a higher number of lateral roots and a higher density of root hairs on PML1(12)-inoculated roots in comparison with non-inoculated plants (Figure IV.12 and Table IV.7) .

In contrast to the significant positive effect of some of the bacterial associations, the co-inoculation of the strain PML1(4) with PMB1(7) significantly reduced the promoting effect of strain PMB1(7) on the growth of the pine seedlings.

#### *Greenhouse experiment*

When the pine seedlings were supplied by a complete nutrient solution, the inoculation of bacterial strain PML1(12) had no effect on plant growth, according to the five measured parameters: total seedling biomass, shoot length, root biomass, total length and total surface area of the roots (Figure IV.13). In contrast, as observed in the growth chamber experiment, the bacterial strain PML1(12) significantly promoted the growth of the pine seedlings which were supplied by the deficient nutrient solution: the inoculated plants had a significantly higher seedling biomass (Figure IV.13A), shoot-length (Figure IV.13B), root biomass (Figure IV.13C), total length of the roots (Figure IV.13D) and total surface area of the roots (Figure IV.13E) than the non-inoculated seedlings.

Figure IV.12: Low vacuum SEM photography of a non-inoculated root (A) and a root inoculated with the bacterial strain PML1(12), which presents many root hairs (B).

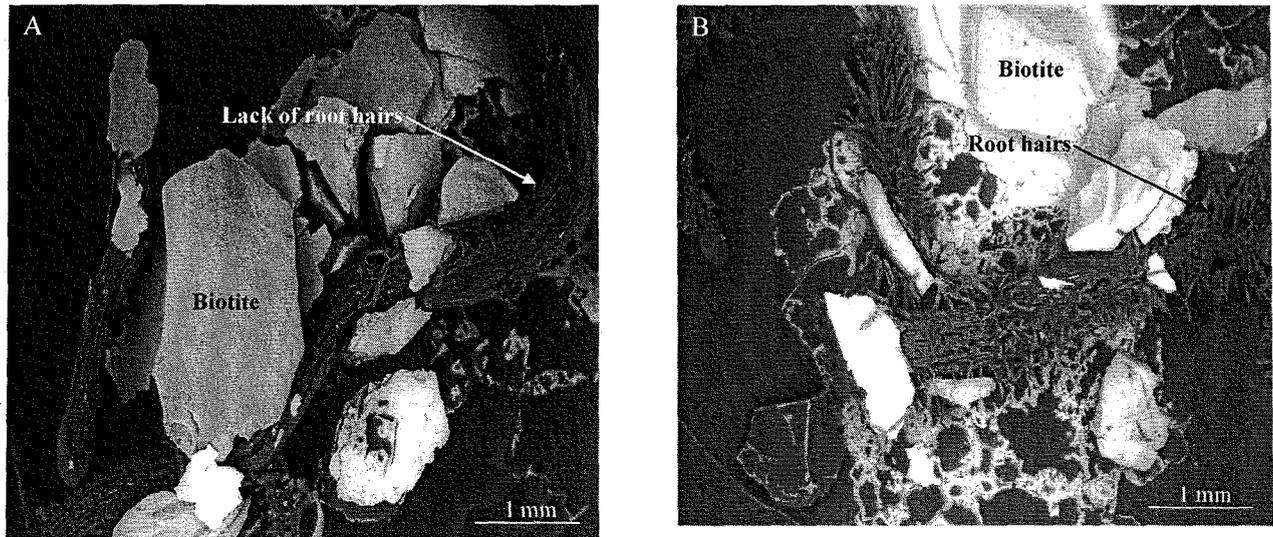


Tableau IV.7: Semi-quantitative estimation of the number of lateral roots and the number of root hairs in the different treatments according to binocular microscopy observations.

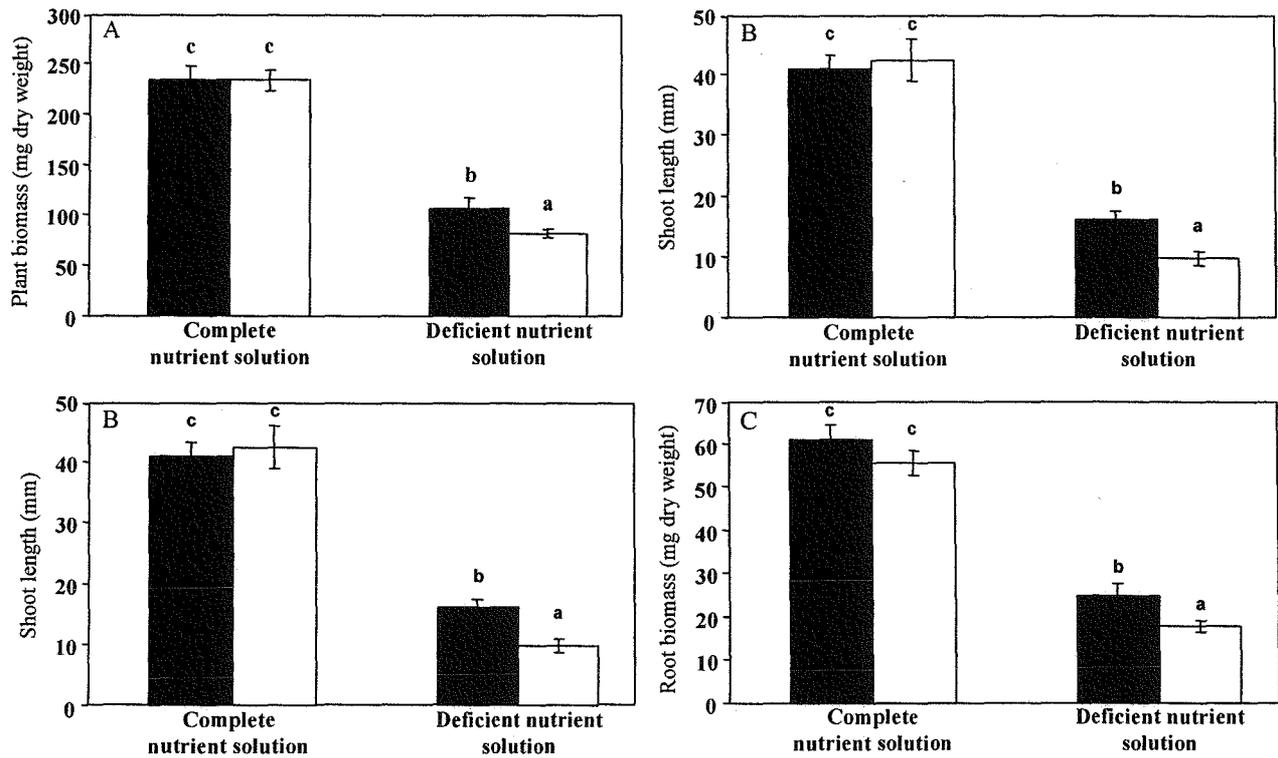
a name of the bacterial strain inoculated.

b treatment without bacterial inoculation.

c semi-quantitative estimation of the number of the lateral roots and the number of the root hairs, with four levels (+/-, +, ++, +++).

Treatment	Number of lateral roots	Number of root hairs
P+PMB1(7) <sup>a</sup>	+++ <sup>c</sup>	++ <sup>c</sup>
P+PML1(4)	++	+
P+PML1(12)	+++	+++
P+PMB1(7) PML1(4)	++	++
P+PMB1(7) PML1(12)	++	++
P+PML1(4) PML1(12)	++	++
P+PMB1(7) PML1(4) PML1(12)	+++	++
P <sup>b</sup>	++	+/-

Figure IV.13: Growth of the plants during the 102 days of the greenhouse experiment in the different treatments. A = total seedling biomass, B = shoot length measured above cotyledons, C = root biomass, D = total of the root length, E = total of the root surface area. Black plots correspond to plants inoculated with the bacterial strain PML1(12), white ones correspond to non-inoculated plants. Each plot is a mean value of ten replicates. Bars represent standard deviation. For each variable, treatments associated with the same letter are not significantly different according to a one-factor (bacterial treatment) ANOVA ( $P = 0.05$ ), and the Bonferroni-Dunn test.



## Discussion

In this work, we quantified potassium and magnesium immobilised by pine seedlings or drained out from the columns, and the biomass increase of the pine seedlings, in order i) to quantify the respective contribution of roots and root-associated bacteria to the weathering of biotite and ii) to assess the effect of the weathering process on seedling growth. To carry out this work, we chose to perform column experiments that only contain a mineral substrate (quartz and biotite) for plant growth and no organic matter, in order to mimic the conditions that exist in the natural forest soil horizons B and C, in which the weathering of minerals is the sole source of potassium and magnesium. To be in accordance with this experimental strategy, all the bacterial strains we used for this work were isolated from *S. citrinum*-oak ectomycorrhizas sampled in a forest soil mineral horizon.

- Effect of pine roots and bacteria on biotite weathering

### *Root effect*

All the results obtained by the different approaches (weathering budget and SEM observations) converge: the pine roots significantly increased biotite weathering by a factor 1.5 in comparison to the treatment without plant. Our results are in accordance to those of Bormann *et al.* (1998) who demonstrated in an experimental forest that red pine (*Pinus resinosa*) plants improved by 2.4 and 1.8 factors the quantities of calcium and magnesium released by weathering the primary minerals in a forest soil, respectively. In the same way, our results are in accordance to those of Bakker *et al.* (2004) who measured plagioclase weathering in a laboratory experiment at pH 3-4 and 25°C, and showed that the release of Si, Mg, Ca and Al was increased by a 1.8 factor in the presence of Douglas fir and Scots pine under these acidic conditions.

This effect of plant roots on mineral weathering may result from physical and/or biochemical processes. Indeed, plant roots induce the formation of macropores (Gibbs and Reid, 1988), which play a major role in the preferential flow phenomenon and thus the weathering process (Beven and Germann, 1982). Moreover, plant roots fragment soil minerals and thus increase the number of reactive surfaces (Berthelin, 1985 ; Mottershead *et al.*, 2003). In addition, through the nutrient uptake, the plants modify the nutrient concentrations in the rhizosphere and generate zones of depletion or

accumulation of nutrients (Barber, 1995). Plant roots also modify the redox potential and the pH in the rhizosphere (Marschner *et al.*, 1986 ; Marschner, 1995 ; Muofhe, 1997 ; Nye, 1981 ; Römheld, 1987). For example, the difference between the pH in the rhizosphere soil and in the bulk soil can be up to two pH units (Marschner and Römheld, 1983 ; Riley and Barber, 1971). This acidification of the rhizospheric soil results from the production of CO<sub>2</sub> during respiration, from the release of organic compounds in the root exudates (Drever, 1994 ; Hinsinger and Gilkes, 1997 ; Jones, 1998 ; Ström, 1997), and from the balance of ion charges within the roots which depends on the excretion of one H<sup>+</sup> ion for every cation absorbed (Haynes, 1990). These modifications of physico-chemical conditions in the rhizosphere make the cations from the minerals more accessible to the plant (Dakora and Phillips, 2002 ; Grayston *et al.*, 1996 ; Ochs *et al.*, 1993). Besides, this phenomenon could also be regulated by nutrient deficiencies because plants that grow in potassium or phosphorus deficient conditions are able to modify the composition and quantity of root exudates, thus improving the mobilisation of these elements (Krafczyk *et al.*, 1984 ; Lipton *et al.*, 1987).

#### *Bacterial effect*

The molecular identification of the three bacterial strains we chose for this study revealed that they all belong to the *B. glathei* species, which occurrence in the soil has already been mentioned. The column experiments showed that the weathering rate of biotite varied with the different bacterial strains. These results contrast from the ones of the *in vitro* tests which demonstrated that all the three bacterial strains used had previously shown great capacities to mobilise iron, potassium and phosphorus. Our results thus underline the importance of taking into account biotic and abiotic environment, like the composition of root exudates (Marschner *et al.*, 2001), the presence of ectomycorrhizal fungi and the soil properties (pH, aeration and physico-chemical characteristics), when characterizing the weathering effect of a given bacterial strain because these parameters may influence the expression of the weathering ability of the bacteria. Moreover, our results also suggest that the weathering ability of the bacteria, which involves the production of protons, organic acids, siderophores and organic ligands (Grayston *et al.*, 1996 ; Paul and Clark, 1989 ; Rogers and Bennett, 2004 ; Welch *et al.*, 1999) depends on the bacterial strain. Finally, the fact that multiple strain inoculation can be less efficient in mineral weathering than strains inoculated

alone, suggests for the first time the importance of microbial interactions in the mineral weathering process.

#### *Plant-bacterial interaction on mineral weathering*

Our results clearly demonstrate a significant positive interaction between pine roots and the bacterial strain *B. glathei* PML1(12) on mineral weathering. They are consistent with the ones of Leyval and Berthelin (1989) on a beech-*Agrobacterium radiobacter* model and the ones of Puente *et al.* (2004) on cactus inoculated or not with different rhizoplane bacteria. In our study, the positive interaction between pine roots and *B. glathei* PML1(12) could simply result from an additive effect of the weathering abilities of the two partners. Another possibility is that the weathering increase is due to a synergistic effect, which could result from three hypothetical processes: (i) the fragmentation of the mineral caused by root activity increases the direct positive effect of the bacteria on mineral weathering by increasing the reactive surfaces (Barker and Banfield, 1998); (ii) the root exudates indirectly provides substrates required for the production of weathering metabolites by the bacteria (Grayston *et al.*, 1996) or (iii) the production of growth phytohormones by the bacteria, in addition to weathering agents, stimulates root development, modify root physiology (Gamalero *et al.*, 2002 ; Patten and Glick, 1996) and root exudation which improves mineral weathering and nutrient uptake (Gahoonia *et al.*, 1997).

#### *Biological processes involved in biotite weathering*

The biotite can undergo two types of weathering mechanisms (i) dissolution by the destruction of the mineral structure (congruent way) or transformation into vermiculite (incongruent way) by the release of interlayer potassium (Robert *et al.*, 1979). Our weathering budgets as well as SEM observations and analyses showed that, whatever the bacterial treatments, potassium and magnesium were released in a nearly stoichiometric way: the interlayer potassium was not released faster than the magnesium from the biotite structure. Consequently, biotite had mainly been dissolved by a congruent phenomenon in our experiment. Our results contrast with those from many other studies which showed evidences of incongruent dissolution of biotite under the influence of plant root activity (Hinsinger *et al.*, 1992) and/or under the influence of rhizospheric micro-organisms (Leyval and Berthelin, 1991 ; Paris *et al.*, 1995). This

discrepancy could result from different experiment durations. In our experiment, the exudation and the uptake by the roots could only play an important role in the weathering process during the last 30 days of the experiment, when root development was large enough to colonise the whole column. This obviously contrasts with the experiments conducted by Hinsinger *et al.* (1992), who put the mineral directly in contact with an already established root mat which readily produced large quantities of weathering substances and was therefore able to take up abundant quantities of potassium. In the same way, Leyval (1990) observed a partial vermiculitisation of another phyllosilicate (phlogopite) in the rhizosphere of pine seedlings inoculated with *Agrobacterium* sp., after one year of experimentation only.

- Effect of bacteria on the growth of pine seedlings

According to the results of the growth chamber experiment, the two mycorrhizosphere bacterial strains PMB1(7) and PML1(12) behave as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (28). The beneficial effect of these strains could result from two non-exclusive effects: (i) an indirect effect of the bacteria on plant nutrition, *via* an increased bacterial mobilisation of nutrients from the mineral, and/or (ii) a direct effect of the bacteria on plant roots by means of phytohormones, like indoleacetic acid (IAA), cytokinins and ethylene, which stimulate the formation of lateral roots and absorbent root hairs (Patten and Glick, 1996). Indeed, an increase in the number of lateral roots was observed in the treatments inoculated with the strains PMB1(7), PML1(12) as well as with the association PMB1(7) + PML1(4) + PML1(12). Moreover, for the roots inoculated with the strain PML1(12), a large number of absorbing root hairs were also observed.

The greenhouse experiment demonstrated that the beneficial effect of the bacterial strain PML1(12) on plant growth, only occurred under conditions of nutrient deficiency. Therefore, notwithstanding a possible direct effect of the bacteria on plant growth *via* phytohormones, the bacteria mainly acted by an indirect way, *via* mineral weathering which increased the amount of nutrients available for the plant. Indeed, if the bacteria had only promoted plant growth by a direct way, we would have observed a significant increase of the growth of the plants in the nutrient-rich conditions too. Our results are in accordance with those of Toro *et al.* (1997) who demonstrated the beneficial effect of two phosphate-solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp. and *Bacillus subtilis*) on the

growth of onion (*Allium cepa* L.) mycorrhized with *Glomus intraradices* via the release of P from rock phosphate. They are also in accordance with those of Leyval and Berthelin (1989) who performed *Pinus sylvestris* cultures in lysimetric conditions where the culture substrate contained sand, phlogopite and rock phosphate. These authors showed that *Agrobacterium radiobacter*, known to solubilize insoluble phosphates, significantly enhanced beech growth and P, Mg, Al, K and Fe concentrations in roots and stems. However, the addition of soluble potassium to compensate the potassium deficiency observed after one year of experiment prevented the authors from measuring the potassium issued from the weathering of phlogopite and consequently from establishing a total weathering budget for potassium.

### **Conclusion**

We confirmed the significant impact of plant roots on mineral weathering and demonstrated that a bacterial isolate, *B. glathei* PML1(12), significantly improved plant nutrition and promoted plant growth, mainly because of its effect on mineral weathering. We also showed that interactions between different bacterial strains significantly modify the mineral weathering budgets. This is the first step in understanding the mechanisms of sustainability in forest ecosystems on nutrient-poor soils: by their joined contribution to mineral weathering, root and mycorrhizosphere bacteria are efficient enough for mobilising the nutrients required to maintain tree growth. Further researches are now needed to quantify the respective contribution of the ectomycorrhizal fungi and the associated bacteria in the mineral weathering process, in relation to tree mineral nutrition.

### **Acknowledgements**

We acknowledge J. Garbaye for critical review of the manuscript, J. Ranger and F. Lapeyrie for helpful advices, G. Nourrisson, C. Hossann, P. Bonnaud, S. Bienaimé, D. and L. Gelhaye for technical analyses, J. L. Churin, P. Vion, B. Palin, F. Guinet, B. Simon, A. Normand, M. Cuny, D. Le Thiec, A. Kohler, A. Nys, S. Uroz, J. Jaffrain and N. Angeli for technical help.

This work was supported by the French Research Ministry (ACI quantitative ecology project) and by the Lorraine Region.

### 3.3 Quantification du processus d'altération au cours de l'interaction biotite - arbre forestier -microorganismes – solution

Nous avons complexifié notre plan d'expérience en intégrant le champignon ectomycorhizien dans notre dispositif en colonnes. Cette partie de notre travail visait (i) à quantifier l'altération d'un minéral-test engendrée par différents acteurs biologiques (plante, bactérie, champignon ectomycorhizien), seuls ou en association, et (ii) à quantifier l'effet de l'inoculation d'une souche bactérienne, de l'inoculation d'un champignon ectomycorhizien et de la double inoculation bactérie - champignon ectomycorhizien, sur la croissance de la plante. En complément, l'effet de deux composés toxiques, comme l'uranium et le cadmium sur le niveau de fonctionnement symbiotique et de la fonction altération, a été testé. Dans une perspective d'évaluation de la dynamique du césium dans les écosystèmes forestiers, problématique prise en charge par l'Andra dans le cadre de ses études de sûreté, une étude préliminaire de faisabilité du dosage de césium dans les solutions et la biomasse végétale a été entreprise à l'aide de notre dispositif en colonnes.

#### Matériel et méthodes

Ne sont décrits ci-dessous que les spécificités du matériel inhérent à cette expérience qui divergent du protocole général présenté dans la partie "dispositif expérimental en colonnes".

- Matériel microbiologique :

Cette expérience devait initialement associer le pin sylvestre, le champignon ectomycorhizien *Scleroderma citrinum*, souche isolée sur le site de Breuil, et la souche bactérienne *B. glathei* PML1(12) isolée dans l'ectomycorhizosphère du couple *S. citrinum* - chêne. Cependant plusieurs tentatives de mycorhization du pin sylvestre par *S. citrinum* n'ont pas abouti. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N car ce champignon, dont la mycorhization contrôlée est maîtrisée dans le laboratoire INRA "Interaction Arbres-Microorganismes", est capable de former des mycorhizes avec le pin sylvestre. La souche bactérienne *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8, auxiliaire de la mycorhization du Douglas par le champignon *L. bicolor* S238N, isolée par Frey-Klett *et al.* (1997), a été choisie pour ses

Tableau IV.8 : Les différents traitements de l'expérience "interactions arbre forestier - microorganismes - minéral - solution". Les chiffres correspondent au nombre de répétitions

Traitements biologiques	Traitements chimiques		
	Solution nutritive de base	Solution nutritive de base + uranium	Solution nutritive de base + cadmiu
Sans pin	4		
Pin non inoculé	4		
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	4		
Pin + <i>L. bicolor</i> S238N	4		
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	4	4	4

Tableau IV.9 : Taux de mycorhization des racines courtes de plants de pin en début et après 56 jours d'expérimentation.

Traitements biologiques	Pourcentage de racines courtes de plants de pin mycorhizés par <i>L. bicolor</i> S238N	
	En début d'expérience	En fin d'expérience
Pin non inoculé	0	0
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	0	0
Pin + <i>L. bicolor</i> S238N	65*	28
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	65*	23 <sup>1</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	65*	23 <sup>2</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	65*	21 <sup>3</sup>

\* Taux de mycorhization initial moyen de 12 plants de pin cultivés dans les mêmes conditions et sacrifiés en début d'expérimentation.

<sup>1</sup> Traitement solution nutritive.

<sup>2</sup> Traitement solution nutritive + uranium.

<sup>3</sup> Traitement solution nutritive + cadmium.

interactions positives avec ce champignon. De plus, cette souche présente l'avantage d'être marquée (résistance à 100 mg.l<sup>-1</sup> de rifampicine) et elle a également montré de bonnes potentialités à mobiliser le fer et le phosphore lors des tests *in vitro*.

- Solutions nutritives :

Pour certains traitements, 59.5 mg.l<sup>-1</sup> d'uranium sous forme d'uranyl-acétate complexé ou 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de cadmium sous forme de chlorure de cadmium ont été ajoutés à la solution nutritive de base.

- Traitements

Le tableau IV.8 présente les différents traitements mis en place dans cette expérience.

## Résultats

- Effet des partenaires biologiques de la rhizosphère :

Le taux de mycorhization des racines courtes des plants de pin par le champignon *L. bicolor* S238N avoisinait les 65% en début d'expérience pour atteindre des valeurs inférieures à 30% en fin d'expérience et ce quel que soit le traitement biologique. Ainsi, l'inoculation de la souche *P. fluorescens* BBc6R8 n'a eu aucun effet sur le taux de mycorhization. (Tableau IV.9).

L'augmentation de biomasse des plants de pins inoculés avec la souche fongique *L. bicolor* S238N seule et celle des plants ayant subi la double inoculation, souche fongique *L. bicolor* S238N - souche bactérienne *P. fluorescens* BBc6R8, sont significativement plus importantes que celle des plants non inoculés (Figure IV.14). En revanche, l'inoculation avec la souche bactérienne *P. fluorescens* BBc6R8 seule, n'a pas d'effet promoteur de croissance sur les plants de pin (Figure IV.14). L'effet bénéfique de l'inoculation fongique et de la double inoculation s'observe uniquement sur la croissance des parties aériennes des plants de pin (Tableau IV.10).

Les quantités totales de potassium libérées par altération de la biotite sont significativement plus importantes en présence de la plante, en présence de la plante mycorhizée par *L. bicolor* S238N, et en présence de la plante mycorhizée par *L. bicolor* S238N et inoculée par *P. fluorescens* BBc6R8 par rapport au traitement non inoculé (Figure IV.15). En revanche, le traitement inoculé par *P. fluorescens* BBc6R8 n'est pas

Figure IV.14: Augmentation de la biomasse sèche des plants de pin durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement biologique) et le test de Bonferroni-Dunn

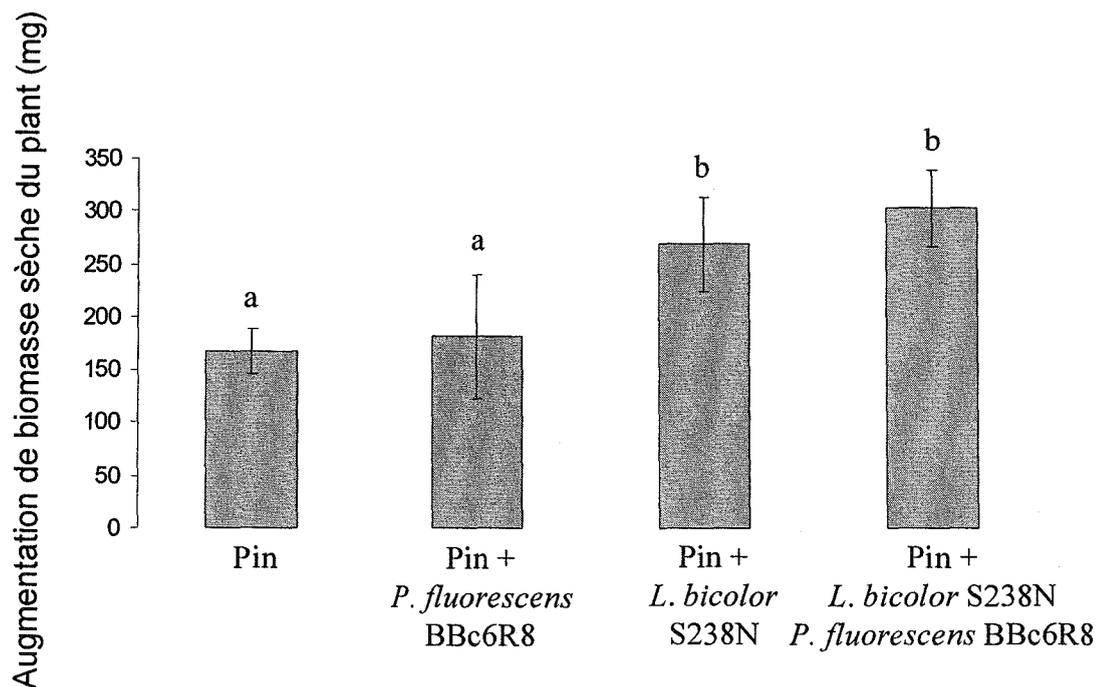


Tableau IV.10: Augmentation de biomasse sèche des parties aériennes et racinaires des plants de pin (mg) durant les 56 jours de l'expérimentation. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions. Dans chaque colonne, les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement biologique), et le test de Bonferroni-Dunn.

Traitements biologiques	Augmentation de biomasse sèche (mg)	
	Partie aérienne	Partie racinaire
Pin non inoculé	128 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	145 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>
Pin + <i>L. bicolor</i> S238N	222 <sup>b</sup>	47 <sup>a</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	257 <sup>b</sup>	47 <sup>a</sup>

Figure IV.15: Quantité de potassium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement biologique) et le test de Bonferroni-Dunn.

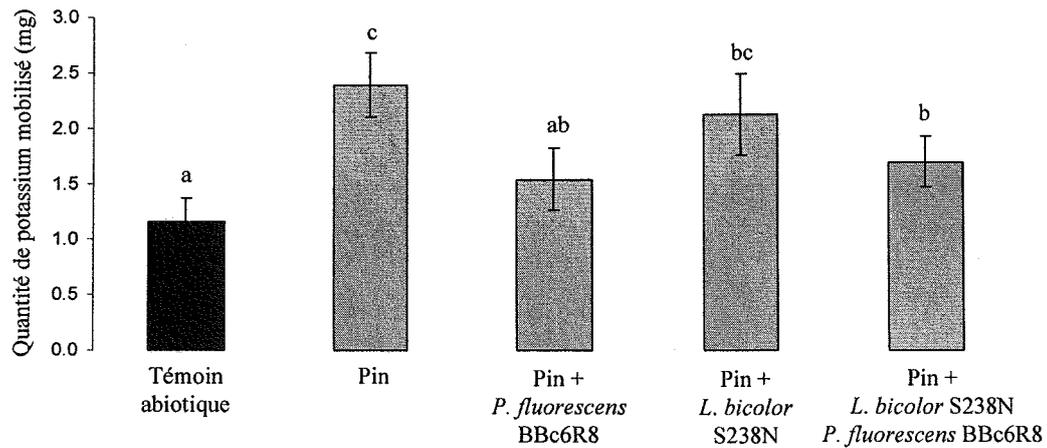
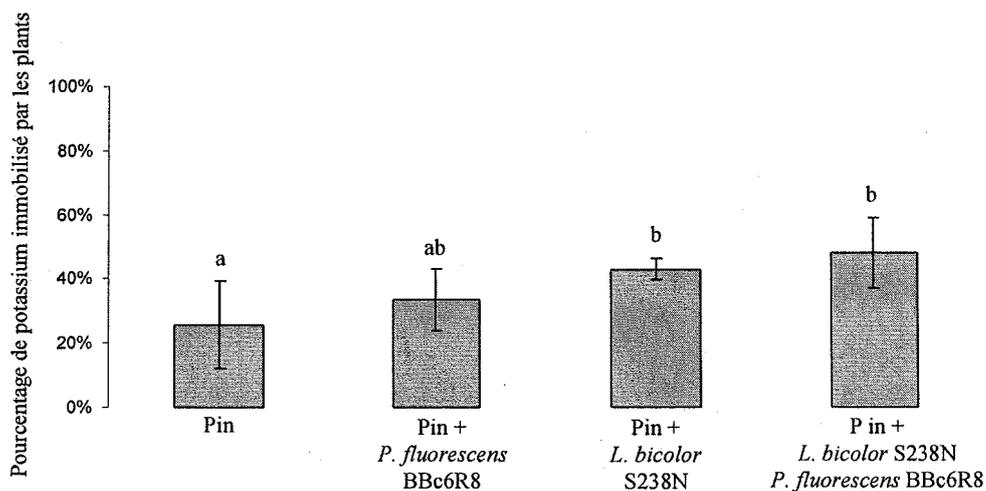


Figure IV.16: Pourcentage de potassium immobilisé par les plants de pin (= quantité de potassium immobilisée par le plant de pin / (quantité de potassium drainée en solution + quantité de potassium immobilisée par le plant de pin)) durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement biologique) et le test de Bonferroni-Dunn.



significativement différent du traitement témoin non inoculé (Figure IV.15). Si l'on compare les traitements biologiques, l'altération de la biotite est significativement plus élevée en présence de la plante seule comparativement aux traitements "plante inoculée par *P. fluorescens* BBc6R8" et "plante inoculée par le couple *L. bicolor* S238N - *P. fluorescens* BBc6R8" (Figure IV.15). Le pourcentage de potassium prélevé par la plante est significativement plus important lorsque le plant de pin a subi l'inoculation par *L. bicolor* ou la double inoculation (*L. bicolor* et *P. fluorescens*) comparativement au plant de pin non inoculé (Figure IV.16).

- Effet de l'uranium et du cadmium

Seuls les plants mycorhizés par *L. bicolor* S238N et inoculés par la souche bactérienne *P. fluorescens* ont subi ces traitements chimiques.

Nous n'avons observé aucun effet de l'uranium ou du cadmium sur le taux de mycorhization des racines courtes de plants de pin par le champignon *L. bicolor* S238N (Tableau IV.9). En revanche, la croissance des plants de pin était significativement plus faible pour le traitement chimique avec uranium comparativement au traitement témoin (solution nutritive sans uranium ni cadmium) (Figure IV.17). L'effet inhibiteur de l'apport d'uranium s'observait uniquement sur la croissance des parties aériennes des plants de pin (Tableau IV.11). En ce qui concerne le traitement cadmium, nous n'observons pas d'effet inhibiteur sur la croissance des plants de pin (Figure IV.17). La densité de la microflore bactérienne cultivable totale est significativement plus faible pour le traitement chimique avec uranium comparativement au traitement témoin (Figure IV.18). En revanche, nous n'observons pas d'effet inhibiteur du cadmium sur cette densité bactérienne (Figure IV.18).

Les quantités totales de potassium mobilisées (drainées en solution + prélevées par la plante) par altération de la biotite sont significativement plus faibles dans le cas du traitement chimique avec uranium comparativement au traitement témoin (Figure IV.19). De même, le pourcentage de potassium immobilisé dans les plants est significativement plus faible dans le traitement ayant reçu une solution nutritive avec uranium comparativement au traitement témoin (Figure IV.20). Nous n'observons aucun effet significatif du cadmium sur la mobilisation du potassium et son immobilisation dans les plants (Figure IV.19).

Figure IV.17: Augmentation de la biomasse sèche des plants de pin durant l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement chimique) et le test de Bonferroni-Dunn.

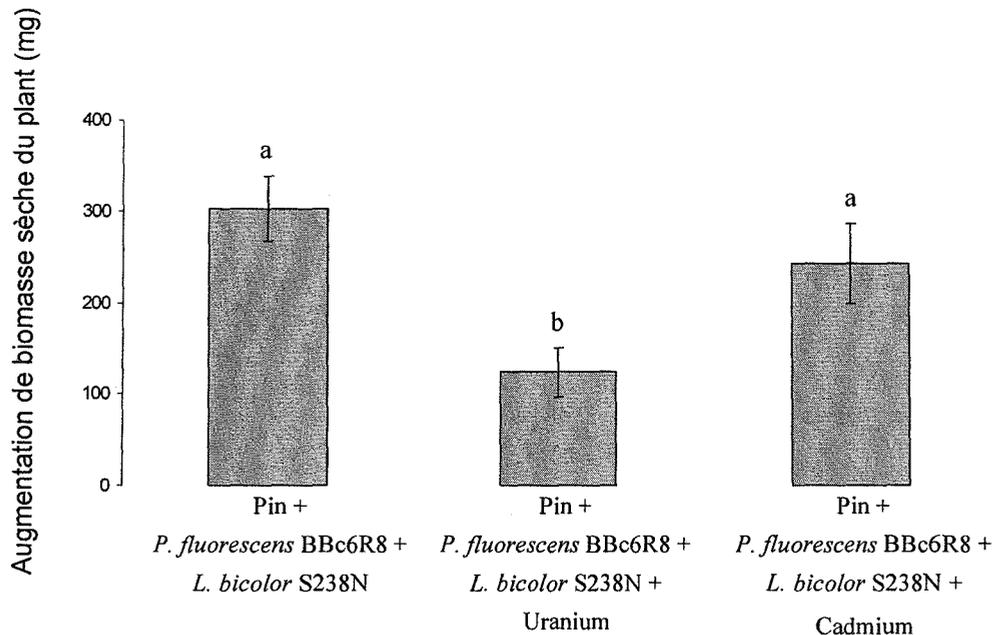


Tableau IV.11: Augmentation de biomasse sèche des parties aériennes et racinaires des plants de pin (mg) durant les 56 jours de l'expérimentation. Les valeurs représentent la moyenne de quatre répétitions. Les valeurs associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement chimique), et le test de Bonferroni-Dunn.

Traitements	Augmentation de biomasse sèche (mg)	
	Partie aérienne	Partie racinaire
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	257 <sup>a</sup>	47 <sup>a</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N + uranium	83 <sup>b</sup>	41 <sup>a</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N + cadmium	198 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup>

Figure IV.18: Logarithme des densités de la microflore bactérienne cultivable totale après 56 jours d'expérimentation. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement chimique) et le test de Bonferroni-Dunn

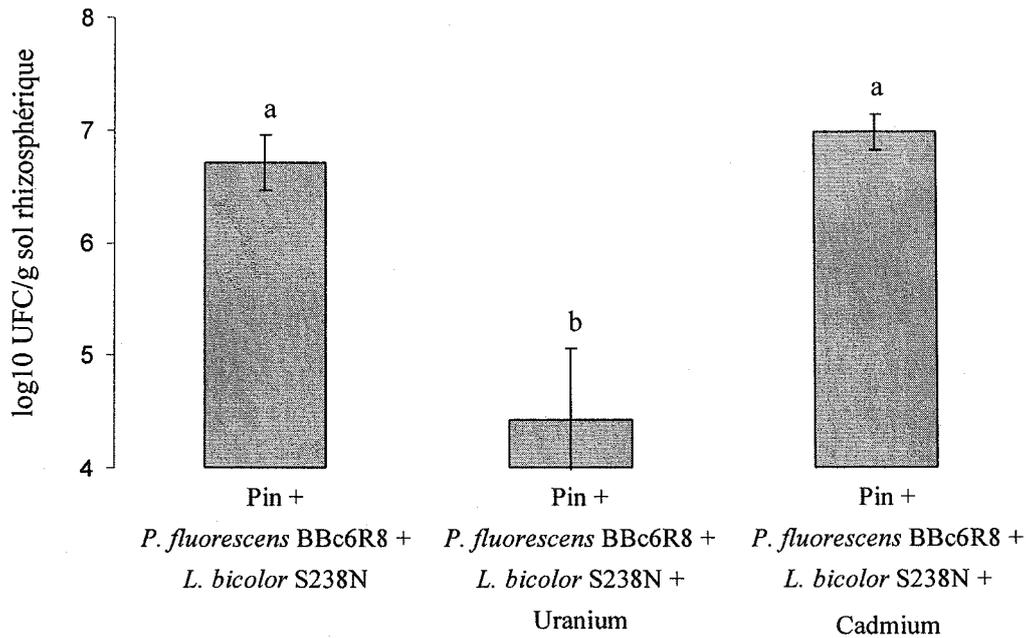


Figure IV.19: Quantité de potassium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement chimique) et le test de Bonferroni-Dunn.

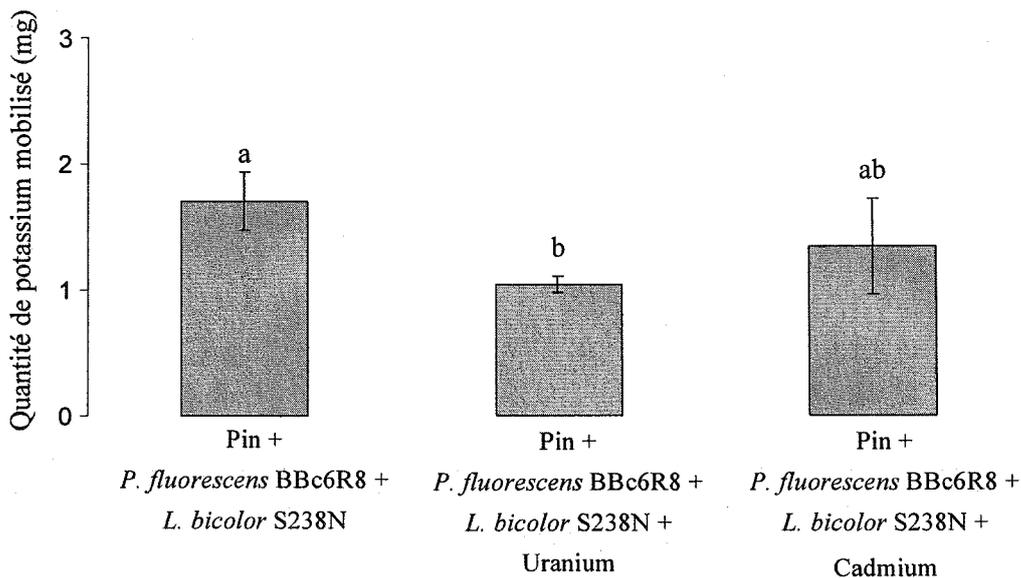


Figure IV.20 : Pourcentage de potassium immobilisé dans les plants de pin (= quantité de potassium immobilisée par le plant de pin / (quantité de potassium drainée en solution + quantité de potassium immobilisée par le plant de pin)) au cours des 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA (P = 0.05) à un facteur (traitement chimique) et le test de Bonferroni-Dunn

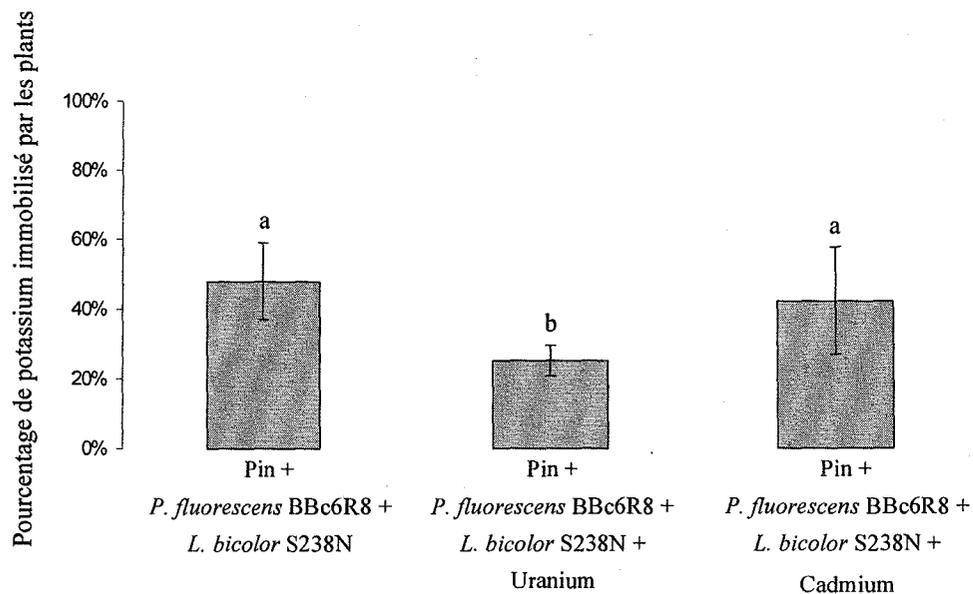


Figure IV.21: Quantité de césium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant l'expérience en colonnes durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement biologique) et le test de Bonferroni-Dunn.

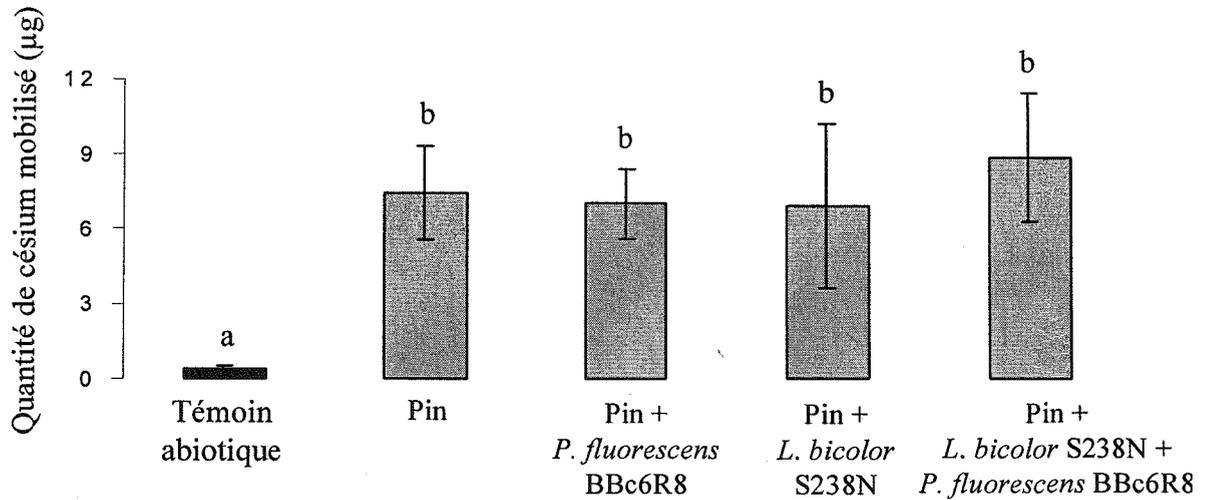


Tableau IV.12: Pourcentage de césium immobilisé par les plants de pin (= quantité de césium immobilisée par le plant de pin / (quantité de césium drainée en solution + quantité de potassium immobilisée par le plant de pin)) durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque valeur est la moyenne de quatre répétitions. Pour les plants alimentés avec la solution nutritive de base, les traitements associés à des lettres identiques (a) ne sont pas significativement différents selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement biologique) et le test de Bonferroni-Dunn. Pour les plants ayant subi la double inoculation et alimentés en solution nutritive enrichie en uranium ou en cadmium, les moyennes associées à des lettres différentes (A ou B) sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement chimique) et le test de Bonferroni-Dunn.

Traitements chimiques	Traitements chimiques	% de césium immobilisé par les pins
Pin non inoculé	aucun	84 <sup>a</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8	aucun	86 <sup>a</sup>
Pin + <i>L. bicolor</i> S238N	aucun	84 <sup>a</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	aucun	91 <sup>aA</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	uranium	69 <sup>B</sup>
Pin + <i>P. fluorescens</i> BBc6R8 + <i>L. bicolor</i> S238N	cadmium	87 <sup>A</sup>

- Essai d'un bilan d'altération sur le césium

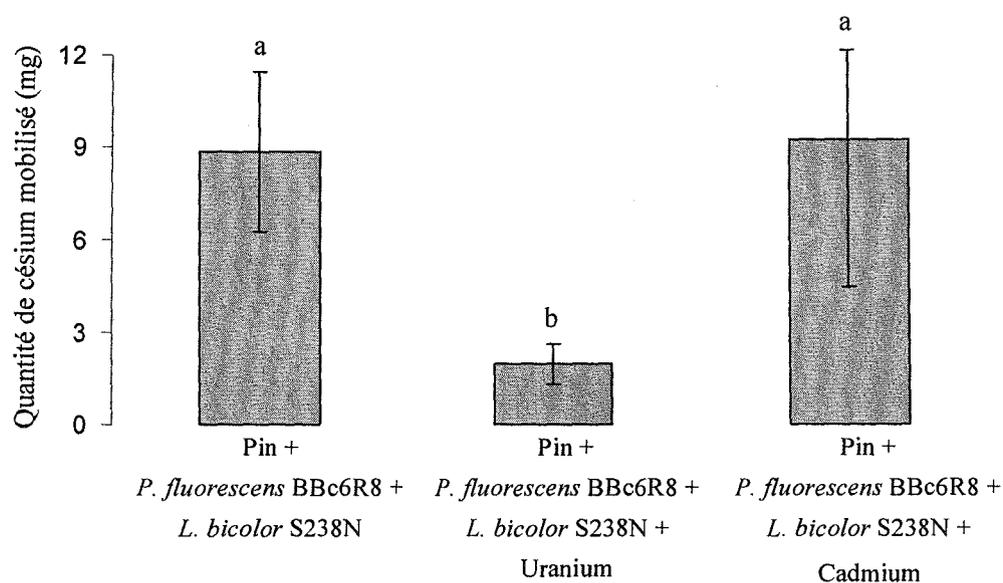
Notre travail montre qu'il est possible de réaliser un dosage du césium en solution et dans les parties racinaires et aériennes de la plante. Nous avons mis en évidence un effet significatif de la plante non inoculée et de la plante associée avec les différents partenaires biologiques de la rhizosphère sur la mobilisation du césium issu de l'altération de la biotite (Figure IV.21), la très grande majorité du césium en solution étant prélevée par les plants quels que soient les traitements considérés (Tableau IV.12). Le bilan d'altération réalisé sur le césium confirme l'effet inhibiteur de l'uranium sur l'altération de la biotite (Figure IV.22) et sur la quantité de césium prélevée par l'association symbiotique (Tableau IV.12).

### **Interprétation et discussion des résultats**

Cette expérimentation en colonnes avait pour but de faire interagir les différents partenaires biologiques de la rhizosphère d'un arbre forestier avec la phase minérale et la solution du sol. En ce sens, elle simulait un écosystème forestier simplifié, nous permettant de déterminer la contribution de chacun des partenaires biologiques dans l'altération minérale et d'envisager les interactions qui peuvent régner entre les différentes composantes du système.

Nous avons observé une augmentation significative de la croissance des plants de pin en présence du champignon *L. bicolor* S238N, associé ou non à la souche bactérienne *P. fluorescens* malgré le faible pourcentage de mycorhization des semis de pin par *L. bicolor* S238N en fin d'expérience. Il est à noter que la souche *P. fluorescens* BBc6R8 n'a pas stimulé la mycorhization des semis par *L. bicolor* S238N dans cette expérience. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette souche a été inoculée sur des semis déjà mycorhizés et non pas au moment de l'inoculation du champignon ectomycorhizien comme cela est pratiqué couramment dans les expériences visant à quantifier l'effet auxiliaire de cette bactérie (Frey-Klett *et al.*, 1997). En effet, Brulé *et al.* (2001) ont suggéré que l'effet auxiliaire de cette souche bactérienne résulterait principalement d'une stimulation par la bactérie de la survie et de la croissance du champignon en condition présymbiotique. Dans notre dispositif en colonnes, les conditions expérimentales n'auraient donc pas été propices au potentiel auxiliaire de la souche *P. fluorescens* BBc6R8. Les champignons ectomycorhiziens sont connus pour améliorer la croissance des arbres grâce à de nombreux mécanismes tels que la protection contre les

Figure IV.22: Quantité de césium (drainée en solution et immobilisée par le plant de pin) mobilisée par altération de la biotite durant les 56 jours de l'expérience en colonnes. Les barres représentent les écart-types. Chaque histogramme est la moyenne de quatre répétitions. Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes selon une ANOVA ( $P = 0.05$ ) à un facteur (traitement chimique) et le test de Bonferroni-Dunn



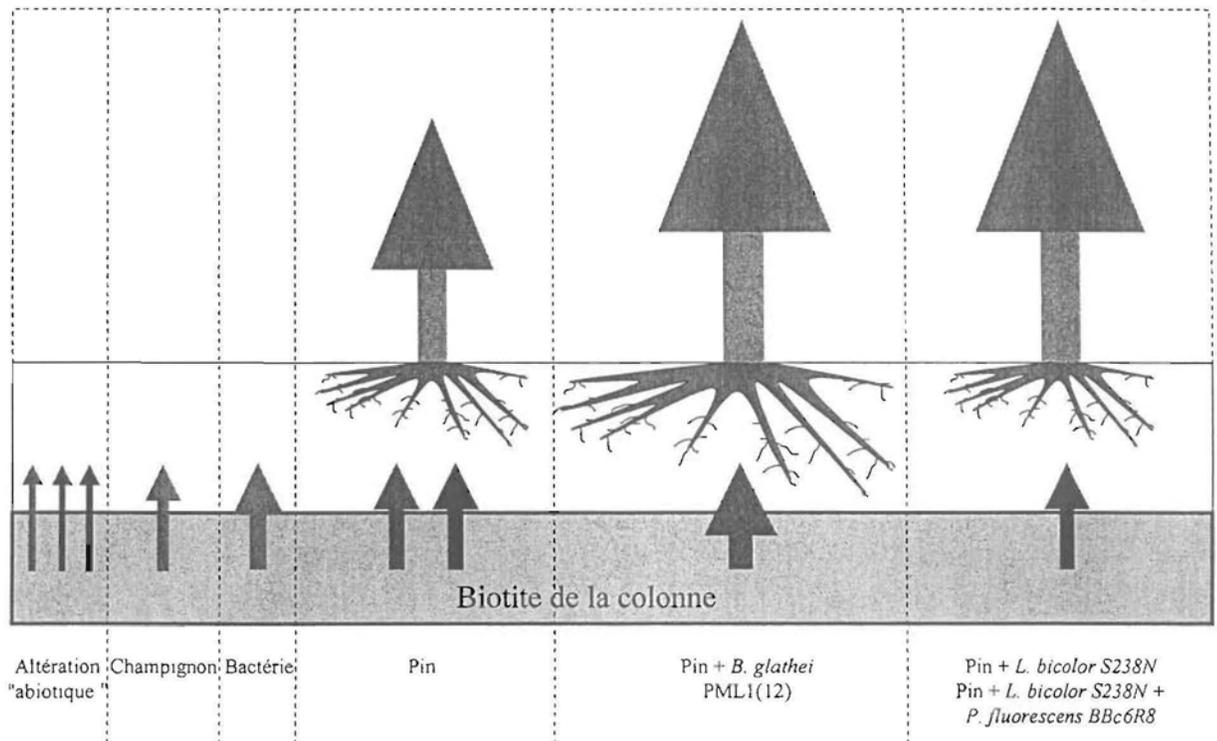
pathogènes, la production d'hormones de croissance ou bien en favorisant l'acquisition de nutriments *via* une mobilisation accrue de la réserve minérale du sol et/ou un prélèvement supérieur par les racines (Jongmans *et al.*, 1997 ; Van Breemen *et al.*, 2000 ; Landeweert *et al.*, 2001 ; Van schöll *et al.*, 2005). Ce dernier mécanisme semble être à l'origine de l'effet promoteur de croissance des plants de pin observé dans notre expérience. En effet, nos résultats montrent que les quantités de potassium mobilisées par les plants de pin mycorhizés sont inférieures à celles mobilisées par les plants non mycorhizés alors que les pourcentages de potassium prélevés par les plants mycorhizés sont très nettement supérieurs à ceux prélevés par les plants non mycorhizés. Ce n'est donc pas la production de composés altérants par les racines mycorhizées mais bien l'augmentation des quantités de potassium accessibles aux racines de pin qui serait le mécanisme majeur de la promotion de croissance des plants mycorhizés observés dans notre expérience. Ces résultats s'opposent à ceux de Glowa *et al.* (2003) et Wallander *et al.* (2005) qui ont montré que des champignons ectomycorhiziens appartenant à d'autres espèces telles que *Piloderma* pouvaient fournir plus de potassium disponible à la plante hôte en accélérant l'extraction du potassium des feuilletts interfoliaires de la biotite. Cependant, Blum *et al.* (2002) ont démontré que dans un sol pauvre en calcium, les champignons ectomycorhiziens associés aux racines d'épicéa fournissaient 95% du calcium accumulé dans le feuillage des arbres grâce à leur capacité à absorber directement les ions minéraux issus de l'altération de l'apatite avant que les ions calcium n'entrent dans le complexe d'échange du sol. Il semblerait donc que les champignons ectomycorhiziens puissent contribuer à la nutrition minérale de la plante par des mécanismes différents. Ces mécanismes sont-ils dépendants de la souche, de l'espèce ou du genre de champignons ectomycorhiziens ? Pour le moment, la question reste ouverte car à notre connaissance, aucune étude n'a encore été menée dans ce sens. L'inoculation de la souche bactérienne *P. fluorescens* sélectionnée pour sa capacité à mobiliser le phosphore et le fer *in vitro* et présentant un bon potentiel d'altération de la biotite dans le test en microplaques, n'a pas eu d'effet stimulant sur la croissance des plants de pin mycorhizés ou non, ni sur l'altération de la biotite. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer ces résultats réside dans le fait que la souche BBc6R8 qui a apparemment totalement disparu des colonnes où elle avait été inoculée (résultats non présentés), n'a peut-être pas trouvé dans nos conditions expérimentales la niche dont elle avait besoin pour exprimer son potentiel d'altération. Il a été suggéré que cette souche serait, non pas rhizosphérique, mais hyposphérique. Sa survie dépendrait en

effet de la présence du champignon *L. bicolor* S238N (Brulé, 2001). En conséquence, le faible taux de mycorhization des semis au cours de notre expérience permet peut-être d'expliquer la disparition apparente de la souche BBc6R8 dans les colonnes durant l'expérimentation. Il est important de noter que nous ne pouvons pas affirmer que la souche a réellement disparu dans la mesure où nous n'avons pas recherché la présence éventuelle de cellules bactériennes viables non cultivables. De plus, il aurait été pertinent de suivre l'évolution de la souche BBc6R8 au cours du temps de manière à apprécier la vitesse de décroissance de cette population dans nos conditions expérimentales. Malheureusement, une telle expérience qui impose obligatoirement des prélèvements destructifs n'a pu être réalisée, du fait du nombre limité de colonnes que nous pouvions alimenter en solution nutritive avec les pompes péristaltiques à notre disposition.

Malgré tout, dans notre expérience, un effet positif du pin, de l'association symbiotique pin - champignon ectomycorhizien *L. bicolor* et de l'association symbiotique pin - champignon ectomycorhizien *L. bicolor* – souche bactérienne *P. fluorescens* BBc6R8 sur l'altération de la biotite a pu être observé. La production d'agents altérants ( $H^+$ , acide carbonique, acides organiques,...) par la plante et les microorganismes ainsi que le prélèvement et la fixation de cations de la solution sur les parois racinaires et fongiques et les membranes bactériennes, induisant un déséquilibre solution - minéral, pourraient expliquer cette stimulation du processus d'altération de la phase minérale.

La seconde partie de notre travail a consisté à évaluer la toxicité de l'uranium et du cadmium ajoutés dans la solution nutritive sur l'activité de la relation tripartite pin - champignon ectomycorhizien *L. bicolor* - souche bactérienne *P. fluorescens*, et le processus d'altération des minéraux. Notre résultat majeur est l'effet inhibiteur très marqué de l'uranium sur la croissance des plants de pin, les densités bactériennes et fongiques et l'activité biologique des plantes et des microorganismes associés, se traduisant par une nette diminution de l'altération de la biotite et un prélèvement de potassium par la symbiose ectomycorhizienne inférieur au traitement témoin. A l'inverse, le cadmium n'a pas eu d'effet dépressif. Ceci pourrait être dû à la faible concentration en cadmium utilisée dans cette expérience ( $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) qui s'avérait ainsi inférieure au seuil de toxicité de cet élément sur la symbiose ectomycorhizienne. Weissenhorn *et al.* (1993) ont montré que la dose de cadmium nécessaire pour provoquer la mortalité de 50% de la population d'un champignon endomycorhizien *Glomus mossae* était de  $0.8 \text{ mg.l}^{-1}$ . Une autre hypothèse non exclusive serait que le

Figure IV.23 : Schéma de synthèse résumant tous les effets observés dans les expérimentations en colonnes. La largeur des flèches représente le niveau d'altération de la biotite, plus la largeur de la flèche est importante, plus l'altération a été forte. La même symbolique a été utilisée pour caractériser la croissance des parties racinaires et des parties aériennes des plants de pin. Seuls les niveaux d'altération de la biotite associées à une même expérimentation (flèches de même couleur) sont comparables. En orange : l'expérience d'interactions minéral - microorganismes. En vert : l'expérience d'interactions minéral - pin - bactéries. En bleu, l'expérience d'interactions pin - champignon ectomycorhizien - bactéries.



champignon ectomycorhizien *L. bicolor* S238N pourrait protéger la plante hôte vis-à-vis de faibles doses en cadmium. Il a en effet déjà été montré que de nombreux champignons ectomycorhiziens augmentent la tolérance aux métaux lourds de leurs hôtes (Wilkins, 1991) en piégeant les métaux dans le mucilage à la surface de leurs hyphes, dans leurs parois ou dans leurs vacuoles (Kottke, 1992).

Enfin, en ce qui concerne notre tentative de bilan d'altération sur le césium, nous avons pu constater que le césium drainé en solution et le césium immobilisé par la biomasse végétale sont à des concentrations mesurables. Les résultats obtenus avec le césium confirment l'effet positif de la plante sur l'altération de la biotite et l'effet inhibiteur de l'uranium sur le prélèvement. De plus, nous avons montré dans les traitements sans uranium, que la majeure partie du césium mobilisé (entre 84 et 91%) est prélevée par la plante alors que seulement 26 à 48% du potassium mobilisé est quant à lui prélevé, supportant ainsi l'hypothèse de Broadley et Wiley (1997) selon laquelle le césium pourrait être prélevé et transféré dans la plante à la place du potassium. Des études complémentaires sont certes nécessaires pour valider les résultats obtenus en faisant notamment varier les paramètres expérimentaux tels que l'âge des plants qui influe considérablement sur le prélèvement, et la structure des minéraux argileux qui contrôle fortement la libération du césium en solution (Smolders, 2001). Dans le cadre des études de sûreté de l'Andra, ces résultats pourraient se révéler très utiles.

#### 4. SYNTHÈSE ET DISCUSSION

---

La figure IV.23 résume tous les résultats obtenus dans ces expérimentations en colonnes.

Nos expérimentations en colonnes ont permis de quantifier la part respective de l'altération de la biotite, engendrée par la solution seule, par les plantes et diverses souches bactériennes et fongiques, seules ou en association. Les résultats obtenus ont démontré que les souches bactériennes *B. glathei* PML1(12) et PMB4(3) et, à un degré moindre, les souches fongiques SN2(3) et PML2(10), isolées dans l'ectomycorhizosphère du couple chêne - *Scleroderma citrinum* sur le site forestier de Breuil, augmentent l'altération de la biotite par des facteurs compris entre 1.7 et 2.4 (magnésium mobilisé) comparativement au traitement abiotique mais uniquement en

présence de glucose. Ce dernier, qui n'a pas agi directement sur la phase minérale, pourrait avoir indirectement accéléré l'altération de la biotite de deux manières distinctes dans notre expérimentation :

(i) la dégradation du glucose par les communautés microbiennes de la colonne pourrait générer la production de métabolites acides capables d'attaquer la surface minérale. Des pH de 3.2 et 3.8 ont été atteints respectivement en présence des souches bactériennes *B. glathei* PML1(12) et PMB4(3) alors que le pH du traitement abiotique était resté proche de la neutralité tout au long de l'expérience. Il est important de préciser que dans ce type d'expérimentation en colonnes utilisant un minéral-test, la quantité de protons réellement produite par les microorganismes est considérablement sous-estimée car l'altération de la biotite est un processus consommateur de protons : la biotite joue un rôle de tampon de l'acidité. D'ailleurs toutes les expérimentations en microplaques et en colonnes, même celles utilisant un acide fort comme l'acide chlorhydrique concentré, ont montré l'existence d'un seuil du pH avoisinant des valeurs de 3 qui est probablement lié à cet effet tampon de la biotite. De même, des pH considérablement plus acides peuvent exister au niveau de certains microsites (Liermann *et al.*, 2000).

(ii) le glucose a certainement stimulé non seulement la croissance mais aussi l'activité des communautés microbiennes comme en atteste le suivi des densités bactériennes dans les différents traitements après 21 jours d'expérimentation : la microflore bactérienne cultivable a été multipliée par des facteurs 100 pour les traitements non inoculés et les traitements inoculés avec les souches fongiques SN2(3) et PML2(10), à 1000 pour les traitements inoculés avec les souches bactériennes (PML1(12) et PMB4(3), en présence de glucose. Dans de telles conditions, l'activité microbienne accrue a pu générer un certain nombre de métabolites aux propriétés altérantes tels que les sidérophores (Schmitt *et al.*, 2003). En considérant nos données actuelles, il ne nous est pas possible de trancher entre ces deux hypothèses. En effet, nous ne disposons d'aucune mesure des densités de souches bactériennes PML1(12) et PMB4(3) et des souches fongiques SN2(3) et PML2(10) dans les colonnes en fin d'expérimentation. De plus, nous ne connaissons pas la composition en acides organiques de la solution drainée. Des expérimentations ultérieures seront nécessaires pour acquérir ces nouvelles données.

Les résultats obtenus dans nos différentes expériences mettent tous en évidence un effet positif de la plante sur l'altération de la phase minérale comparativement au traitement sans plante ni microorganismes. Ces résultats confirment les résultats d'un grand

nombre d'études (Hinsinger et Gilkes, 1997 ; Hinsinger *et al.*, 2001) mais pour la première fois, ils permettent également une quantification précise de l'effet de la plante sur l'altération de la biotite. L'effet positif des plants de pin sur l'altération varie entre +30% et +100%. Aucune transformation de la biotite n'a pu être mise en évidence dans nos expériences. Nous avons observé une destruction de la structure de la phase minérale par une simple dissolution congruente. Cette observation contraste avec bon nombre de données de la littérature mettant en évidence des transformations des minéraux au contact des racines (Hinsinger *et al.*, 1992). Ces divergences peuvent s'expliquer principalement par la courte durée de nos expériences. Leyval *et al.* (1990) a observé, dans la rhizosphère de plants de pin, une transformation partielle en vermiculite d'un autre phyllosilicate, la phlogopite, mais après un an d'expérimentation. De plus, la plupart des expérimentations présentées dans la littérature plaçait le minéral dans un environnement racinaire très dense produisant d'importantes quantités d'agents altérants et prélevant abondamment et plus spécifiquement certains éléments comme le potassium. Dans notre expérience, du fait d'une densité racinaire moyenne dans les colonnes et étant donné le déplacement de la racine lié à sa croissance, une particule de biotite sera soumise à l'activité altérante de la racine et plus particulièrement de l'apex, durant une courte période de temps, probablement insuffisante pour transformer la biotite.

Un effet additionnel de la souche bactérienne *B. glathei* PML1(12) sur l'altération de la biotite (+40% par rapport au traitement plante seule) et sur la croissance des plants de pin (+50% par rapport au traitement plante seule) a été observé. Ce dernier effet est également observé pour la souche bactérienne *B. glathei* PMB1(7). Des études complémentaires ont montré que l'effet promoteur de croissance exercé par la souche *B. glathei* PML1(12) sur les plants de pin était principalement lié à sa capacité à mobiliser des nutriments tels que le potassium et le magnésium par altération de la biotite. Nos travaux confirment ainsi les observations faites par Jackson et Voigt (1971) pour le calcium, Boyle et Voigt (1973) pour le potassium, Kloepper *et al.* (1980) pour le fer, Leyval et Berthelin (1989) pour le magnésium, à savoir une amélioration de la nutrition des plantes lors de l'inoculation de certaines souches bactériennes rhizosphériques. Une co-inoculation de la souche PML1(12) avec la souche *B. glathei* PML1(4) inhibe ce potentiel d'altération et de stimulation de la croissance de la plante. Des phénomènes de compétition entre souches peuvent être invoqués (Curl et Truelove, 1986 ; Davet, 1996). Bent *et al.* (2001) suggèrent que la présence d'autres souches bactériennes peut inhiber

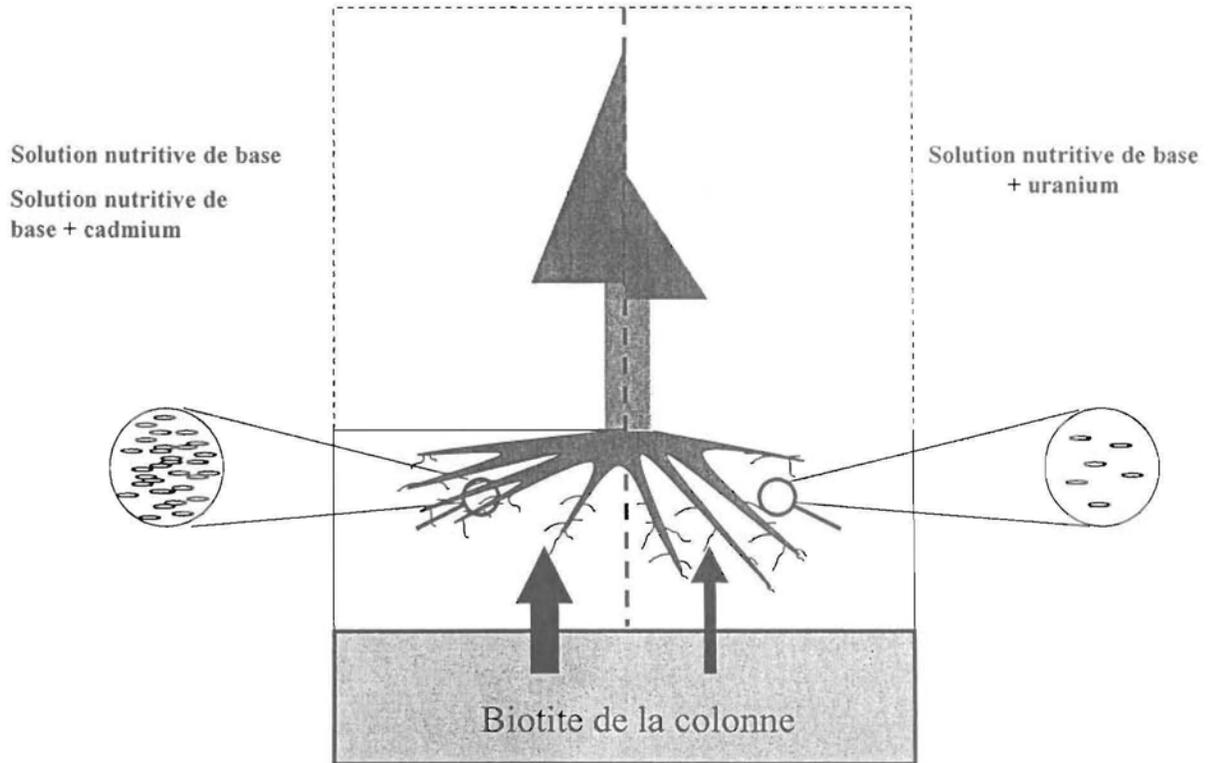
la capacité d'une rhizobactérie à promouvoir la croissance de la plante soit en réduisant le contact entre la souche promotrice de croissance et les racines de la plante (colonisation racinaire) soit en interférant avec les mécanismes impliqués dans l'effet promoteur de croissance. Dans notre cas, il se pourrait que la souche co-inoculée, perturbe l'activité de *B. glathei* PML1(4) et par conséquent inhibe sa capacité à produire des composés altérants.

Nous avons montré que l'inoculation des plants de pin avec le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N n'augmente pas l'altération de la biotite mais favorise le prélèvement des nutriments par les plants, contribuant ainsi à leur croissance. Il est à présent clairement établi que l'amélioration du prélèvement liée aux champignons ectomycorhiziens résulte principalement du développement d'un important réseau de fins filaments mycéliens colonisant le sol, permettant ainsi à la plante d'accéder à une plus grande quantité d'éléments en solution et de prospector une plus grande surface minérale (Lamhamedi et Fortin, 1991 ; Tinker *et al.*, 1992). Si certaines souches de champignons ectomycorhiziens ont été décrites comme de réels agents d'altération (Paris *et al.*, 1995), il est possible que d'autres souches et/ou d'autres espèces de champignons mycorhiziens jouent uniquement un rôle dans le prélèvement et le transfert des nutriments depuis le sol jusqu'aux cellules racinaires. Tel serait le cas de la souche *L. bicolor* S238N.

Nous n'avons mis en évidence aucun effet positif de la souche bactérienne *P. fluorescens* BBc6R8 sur l'altération de la biotite et la croissance des plants du fait probablement de la disparition de cette souche bactérienne dans les colonnes après inoculation. Il pourrait être pertinent à l'avenir de mettre en place une nouvelle expérience associant le champignon *L. bicolor* S238N avec une souche bactérienne non seulement potentiellement altérante mais aussi adaptée à nos conditions expérimentales de manière à apprécier la mise en place éventuelle de relations de type complémentarité fonctionnelle entre le champignon et les bactéries : les bactéries altèreraient le minéral présent dans les colonnes alors que le champignon lui, prélèverait en retour, les nutriments ainsi libérés.

Nos expériences en colonnes ont également permis de quantifier le césium, aussi bien dans la solution drainée que dans la biomasse végétale. Nous avons montré que, dans nos conditions expérimentales, le césium mobilisé lors de l'altération de la biotite est prélevé en moyenne à plus de 85% par la plante alors que le potassium l'est à moins de 40%. De même, ces expériences ont révélé un effet inhibiteur de l'uranium sur l'activité

Figure IV.24 : Schéma de synthèse résumant les effets observés dans l'expérience en colonnes lors de l'ajout de composés toxiques comme l'uranium et le cadmium dans la solution nutritive. La largeur des flèches représente le niveau d'altération de la biotite, plus la largeur de la flèche est importante, plus l'altération a été forte. La même symbolique a été utilisée pour caractériser la croissance des parties racinaires et des parties aériennes des plants de pin, ainsi que la densité bactérienne dans le sol rhizosphérique (cercle).



biologique et la croissance des plantes (Figure IV.24). Tous ces résultats seront discutés dans une partie consacrée à la problématique Andra présentée dans le chapitre qui suit.

## **DISCUSSION GENERALE**

## DISCUSSION GENERALE

---

Notre travail visait à quantifier l'altération des phases minérales au sein de la rhizosphère d'arbres forestiers et à déterminer la part de chacun des partenaires biologiques de ce compartiment du sol dans ce processus et dans la dynamique de certains éléments minéraux nutritifs ou non. La rhizosphère est un environnement complexe, hétérogène, dynamique et interactif, qui dépasse la simple notion d'interface entre le sol et les plantes. Elle est le lieu d'interactions fortes entre le monde végétal, le monde microbien et le monde minéral. En conséquence, pour comprendre le fonctionnement de la rhizosphère, il est nécessaire non seulement d'intégrer les paramètres régissant le fonctionnement de la plante dans son ensemble, des microorganismes, de la phase minérale, de la solution et des gaz, mais également de considérer les nombreuses interactions et rétroactions existant entre toutes ces composantes du sol. C'est pourquoi l'intérêt majeur de mon travail et son originalité résident dans l'association de plusieurs approches méthodologiques complémentaires permettant d'apprécier l'importance de ces différentes interactions au sein de la rhizosphère d'arbres forestiers à différentes échelles de complexité. D'une part, j'ai mené des études et des expérimentations en forêt prenant en compte la multiplicité des fonctions et des partenaires dans la rhizosphère, la diversité des associations plante - microorganismes, ainsi que la complexité des interactions entre processus physiques, chimiques et biologiques qui se déroulent dans la rhizosphère. D'autre part, j'ai mis au point et utilisé des biotests *in vitro* (boîtes de Petri et microplaques) permettant de caractériser rapidement le potentiel d'altération des communautés microbiennes cultivables des sols forestiers. Enfin, j'ai élaboré des dispositifs de culture simplifiés de type colonnes permettant de découpler les effets de la plante, des bactéries et des champignons, et également de limiter et de contrôler les paramètres du milieu (plante, microorganismes, milieu et solution nutritifs, minéral, conditions de température, luminosité, humidité). Mon travail a permis d'apporter un certain nombre de résultats déjà discutés dans les précédents chapitres et dont je présente la synthèse ci-après, qui constituera la base de la discussion générale.

## 1. SYNTHÈSE DES RESULTATS

---

Les différentes études et expérimentations mises en œuvre durant cette thèse ont permis de mettre en évidence :

➤ **En forêt :**

- un impact de la rhizosphère d'arbres forestiers sur la dynamique du potassium dans un sol du site de Bure : le potassium s'accumule dans la rhizosphère des arbres,
- un effet stimulant de la rhizosphère d'arbres forestiers sur les processus d'altération, dissolution et transformation, des minéraux dans un sol du site de Breuil. Des estimations suggèrent que le flux d'altération des minéraux au sein de la rhizosphère contribuerait à près de la moitié du flux total d'altération dans l'horizon de surface (0-3 cm) de ce sol forestier, alors que ce compartiment représente moins de 10% du volume de sol,
- un comportement différent des essences forestières vis-à-vis du processus d'altération des minéraux : l'épicéa altère principalement par acidification de la rhizosphère alors que le chêne n'acidifie pas la rhizosphère,
- un effet stimulant de la rhizosphère d'arbres forestiers sur le niveau d'altération des minéraux qui est fonction de la biodisponibilité en nutriments des sols : dans les sols fertilisés du site de Fougères, l'effet stimulant de la rhizosphère n'est pas observé.

➤ **In vitro :**

- une bonne adaptation des biotests à la caractérisation de l'activité des souches bactériennes, mais des améliorations sont nécessaires pour caractériser les souches fongiques,
- une structuration fonctionnelle des communautés bactériennes dans les sols forestiers : les souches bactériennes à fort potentiel d'altération de la biotite colonisent principalement la mycorrhizosphère du chêne et du hêtre,
- un effet de l'essence sur la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes dans les sols forestiers : cette structuration n'est pas observée sous

épicéa qui, contrairement au chêne et au hêtre, exsude une grande quantité de composés acides,

- une relation entre le potentiel d'altération des isolats bactériens, leur genre et leur métabolisme : les isolats bactériens les plus efficaces dans l'altération des minéraux appartiennent aux genres *Burkholderia* et *Collimonas* et métabolisent le tréhalose.

#### ➤ En laboratoire

- un effet stimulant des souches bactériennes rhizosphériques *B. glathei* PML1(12) et *B. glathei* PMB4(3) et à un degré moindre des souches fongiques SN2(3) et PML2(10) sur l'altération de la biotite,
- un effet stimulant des plants de pin non inoculés sur l'altération des minéraux : les quantifications révèlent des augmentations du niveau d'altération comprises entre 30 et 100%,
- un effet promoteur de croissance (+ 50%) de la souche bactérienne rhizosphérique *B. glathei* PML1(12) sur les plants de pin, lié à une augmentation de l'altération de la biotite (+ 40%),
- un effet promoteur de croissance (+ 70%) du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N sur les plants de pin lié à une augmentation du prélèvement de nutriments (+ 50%) sans stimulation du niveau d'altération de la biotite,
- une immobilisation très forte par les plants de pin du césium (85%) issu de l'altération de la biotite,
- un effet inhibiteur de l'uranium à une concentration de 59.5 mg.l<sup>-1</sup>, sur l'altération de la biotite (- 70%), la croissance des plantes (- 60%) et les densités bactériennes (- 99%).
- un effet de la disponibilité en nutriments sur l'activité altérante de la souche bactérienne rhizosphérique *B. glathei* PML1(12) : cette souche, associée à un plant de pin, ne stimule l'altération de la biotite qu'en présence d'une solution nutritive pauvre en nutriments.

## 2. ROLE MAJEUR DE LA RHIZOSPHERE D'ARBRES FORESTIERS DANS LE PROCESSUS D'ALTERATION DES MINERAUX DU SOL

---

Les tests *in vitro* ont clairement démontré la capacité d'une grande partie des bactéries et des champignons isolés dans la rhizosphère de différentes essences d'arbres à altérer un minéral-test. Toutes les expériences que nous avons réalisées en conditions contrôlées ayant pour but de simuler un écosystème forestier très simplifié, ont démontré l'effet stimulant, à des intensités différentes, du plant de pin, de plusieurs souches bactériennes et fongiques rhizosphériques, ainsi que des associations plant de pin - bactéries rhizosphériques sur l'altération de la phase minérale. Enfin, les expérimentations et les études réalisées en forêt ont clairement mis en évidence l'impact de la rhizosphère de plusieurs essences d'arbres sur l'altération des minéraux dans les sols forestiers et son implication dans l'évolution pédogénétique.

Considérés individuellement, les résultats obtenus dans ces différentes études et expérimentations n'auraient pas permis d'émettre une conclusion formelle, mais la convergence des observations effectuées à trois échelles et à trois niveaux de complexité différents amène à une conclusion unique: **l'activité biologique au sein de la rhizosphère représente un moteur de l'altération des minéraux et par conséquent de la mobilisation des éléments minéraux dans les sols.**

Ces résultats remettent notablement en cause le mode de calcul du flux d'altération des minéraux dans les écosystèmes forestiers proposé par l'ensemble des modèles géochimiques comme par exemple le modèle PROFILE (Sverdrup et Warfvinge, 1995) qui ne prend en considération que le sol global. En effet, ce modèle détermine le flux d'altération des minéraux dans un sol en fonction de ses propriétés minéralogiques, physico-chimiques et hydrologiques et de la composition des solutions à l'échelle de l'horizon entier, qui sont très différentes de celles de la rhizosphère principalement du fait de l'activité des racines et des microorganismes associés. Ceci implique une sous-estimation importante de ce flux total d'altération, facteur pourtant déterminant dans la nutrition des arbres et dans la durabilité de l'écosystème. Mais comment calculer plus précisément ce flux d'altération des minéraux dans les sols forestiers compte-tenu de la complexité et de la variabilité spatio-temporelle du sous-système rhizosphère ?

### 3. LES ARBRES INTERAGISSENT AVEC LEUR ENVIRONNEMENT : UNE QUESTION DE SURVIE

---

Au contraire des animaux qui peuvent se déplacer sur de grandes distances à la recherche de nourriture, les plantes n'ont accès qu'aux nutriments minéraux présents dans l'environnement proche de leurs racines. De plus, comme nous l'avons déjà précisé dans notre préambule, ces nutriments minéraux constitués principalement par la phase minérale des sols sont d'une part peu abondants dans la plupart des écosystèmes forestiers tempérés et d'autre part non directement assimilables par les racines dans leur grande majorité, puisque seuls les éléments sous forme soluble le sont. En conséquence, les arbres vont devoir modifier leur environnement afin d'optimiser l'exploitation des ressources nutritives. Ceci est possible car leur développement racinaire est remarquablement sensible aux variations d'approvisionnement et de distribution des nutriments minéraux dans le sol. Ainsi, dans le but d'acquérir les nutriments nécessaires à leur croissance, les arbres sont notamment capables de modifier la structure et l'architecture de leur système racinaire (Robinson, 1994 ; Schöttelndreier et Falkengren-Grerup, 1999 ; Forde et Lorenzo, 2001 ; Hodge, 2004), de modifier la composition et la quantité des exsudats racinaires (Lynch, 1990 Neumann et Römheld, 1999 ; Neumann et Martinoia, 2002 ; Rengel et Marschner, 2005) et également de s'associer avec des microorganismes, notamment des champignons ectomycorhiziens qui comme nous l'avons décrit dans notre introduction, sont capables de contribuer de manière efficace au processus d'altération. Nos résultats suggèrent que **ces associations entre les racines et les microorganismes du sol** résultent d'une **sélection des souches microbiennes à fort potentiel d'altération et par conséquent, favorables à la nutrition de la plante**. Mais quel est le moteur de cette structuration des communautés dans les sols ?

#### 4. LA SYMBIOSE ECTOMYCORHIZIENNE COMME MOTEUR DE LA STRUCTURATION DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES DANS LES SOLS FORESTIERS

---

Nous avons proposé l'hypothèse que la **symbiose ectomycorhizienne exercerait une pression de sélection sur les communautés bactériennes environnantes en faveur des souches possédant un fort potentiel d'altération des minéraux**. Cette hypothèse implique l'envoi de signaux par la symbiose ectomycorhizienne aux communautés microbiennes environnantes. Les résultats des tests *in vitro* ont clairement montré que les isolats possédant un fort potentiel d'altération sont majoritairement associés à *S. citrinum* et consomment notamment du tréhalose, un carbohydrate accumulé dans le mycélium de *S. citrinum*. Ce sucre synthétisé par de nombreux champignons mais très rarement produit par les plantes, a déjà été décrit comme moteur de l'effet mycorhizosphérique de la symbiose Douglas - *L. bicolor* sur les communautés de *Pseudomonas* en pépinière forestière (Frey *et al.*, 1997). C'est pourquoi, nous proposons l'hypothèse que le **couple racines d'arbre - champignon ectomycorhizien produirait des sucres spécifiques qui agiraient sur les communautés microbiennes environnantes en sélectionnant des souches à fortes capacités de mobilisation des éléments**. De Boer *et al.* (2006) contestent l'idée d'une sélection exercée par les exsudats racinaires car ils considèrent que la nature plutôt générale des exsudats racinaires ne peut pas être à l'origine de réponses microbiennes hautement spécifiques. Cependant, un grand nombre d'auteurs (Barbour *et al.*, 1991 ; Grierson *et al.*, 1992 ; Zheng *et al.*, 1996 ; De Weert *et al.*, 2002 et Walker *et al.*, 2003) estime que les acides organiques et les amino-acides exsudés par les racines dans la rhizosphère sont dotés de propriétés chimiotactiques pour les microorganismes. Ceci suggère qu'en modifiant la composition des exsudats racinaires, la symbiose ectomycorhizienne pourrait influencer sur les microorganismes colonisant la rhizosphère. Reste à comprendre comment le chimiotactisme de certains microorganismes vis-à-vis de ces exsudats particuliers peut-être corrélé à une activité métabolique très ciblée, comme l'altération des minéraux du sol ? Nous avons montré que dans le sol du peuplement d'épicéa, la structure des communautés bactériennes potentiellement altérantes n'est pas affectée par la présence de mycorhizes de *S. citrinum*. Si notre hypothèse d'effet sélectif de certains sucres et/ou exsudats fongiques, tel le tréhalose, sur la diversité fonctionnelle des communautés

bactériennes est exacte, alors nous devons nous interroger sur les raisons de l'absence de structuration fonctionnelle des communautés bactériennes sous épicéa. La production des exsudats de champignons ectomycorhiziens serait-elle dépendante de l'essence hôte ? La question reste ouverte pour le moment car à notre connaissance aucun travail n'a encore jamais été réalisé en ce sens. Néanmoins, Dell *et al.* (1989) avaient pu montrer dans le cas d'une enzyme impliquée dans l'assimilation de l'ammonium, la glutamate déhydrogénase à NADP, que l'activité de cette enzyme chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma crustuliniforme* était différemment exprimée selon que le champignon était en symbiose avec l'épicéa ou le hêtre. Ce travail abonde dans le sens de notre hypothèse car il suggère que le métabolisme fongique varierait selon l'hôte végétal. Mais le métabolisme de la symbiose ectomycorhizienne n'est vraisemblablement pas le seul facteur à prendre en compte pour expliquer la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes. Des facteurs physico-chimiques tels que la biodisponibilité en nutriments pourraient jouer un rôle également.

## 5. LA DISPONIBILITE EN ELEMENTS MINERAUX CONTROLERAIT L'ACTIVITE RHIZOSPHERIQUE DANS LES ECOSYSTEMES FORESTIERS

---

Les différentes études que nous avons réalisées, ont montré que le processus d'altération de la phase minérale variait considérablement en fonction du traitement considéré. Ainsi, nous avons montré que : (i) l'altération des minéraux-tests en forêt développée sur sol acide est stimulée dans la rhizosphère d'arbres uniquement en l'absence de fertilisation, (ii) la sélection des communautés bactériennes rhizosphériques à fortes capacités à altérer la biotite *in vitro* n'est effective que pour les essences (chêne et hêtre) produisant moins de composés acides altérants, (iii) l'effet positif de la souche bactérienne PML1(12) sur l'altération de la biotite n'est observée que dans les conditions de pauvreté en nutriments de la solution. L'ensemble de ces résultats suggère que **l'activité rhizosphérique agissant sur le processus d'altération des minéraux serait contrôlée par la disponibilité en nutriments dans le sol.** Ainsi, **des coopérations positives entre les différents partenaires biologiques de la rhizosphère deviendraient actives dans des conditions de stress nutritionnel.**

## 6. LA COMPLEMENTARITE FONCTIONNELLE ARBRE – MICROORGANISMES : UNE STRATEGIE NUTRITIONNELLE POUR LES ARBRES FORESTIERS

---

Les phénomènes de sélection des communautés bactériennes à fort potentiel d'altération ont été observés dans l'ectomycorhizosphère du champignon *Scleroderma citrinum*. Or ce champignon ectomycorhizien a démontré de faibles capacités à altérer des minéraux-test dans des expérimentations *in vitro*. C'est pourquoi, nous proposons l'hypothèse d'une complémentarité fonctionnelle entre ce champignon, peu altérant, et les souches bactériennes sélectionnées. En d'autres termes, en conditions de carences nutritives, la symbiose sélectionnerait des souches bactériennes à fort pouvoir d'altération pour compenser le faible pouvoir altérant du champignon. Par exemple, Frey-Klett *et al.*, 2005 a mis en évidence que le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*, caractérisé par un faible potentiel d'altération des minéraux dans une de nos expérimentations d'interactions en colonnes (chapitre IV), a un effet structurant sur la diversité fonctionnelle des souches bactériennes : les souches à fort potentiel d'altération se localisant principalement dans l'ectomycorhizosphère.

Cette complémentarité fonctionnelle entre différents partenaires de la rhizosphère en condition de stress, a déjà été observée plusieurs fois, notamment par l'équipe scientifique de Barea et Azcon (Barea *et al.*, 2005) qui ont mis en évidence l'effet bénéfique d'une association entre un champignon endomycorhizien (*Glomus*) et différentes espèces bactériennes du sol (*Bacillus*, *Brevibacillus*) sur la santé et la croissance de plantes soumises à des carences en phosphore (Vassilev *et al.*, 1996 ; Toro *et al.*, 1997 ; Medina *et al.*, 2003) et à des toxicités en cadmium et en zinc (Vivas *et al.*, 2003 ; Medina *et al.*, 2005 ; Vivas *et al.*, 2005 et Vivas *et al.*, 2006). D'autres effets synergiques d'association bactéries – champignons ont été mis en évidence par Jayasinghearachchi et Seneviratne (2006) qui ont montré que la co-inoculation de bactéries du sol et de champignons (*Penicillium*) augmentait l'altération d'une roche phosphatée.

## 7. PLASTICITE ET DURABILITE DE L'ECOSYSTEME FORESTIER : LA BIODIVERSITE MICROBIENNE COMME FACTEUR-CLE

---

L'hypothèse de l'existence de phénomènes de complémentarité fonctionnelle entre les différentes composantes biologiques de la rhizosphère, qui s'activeraient afin d'améliorer la nutrition de l'arbre en conditions de stress nutritionnel requérant le maintien d'une importante biodiversité dans l'écosystème, est nécessaire pour la durabilité tant du système sol - arbre que de l'écosystème forestier dans son ensemble (Holdgate, 1996 ; Van der Putten *et al.*, 2004). En effet, plus la diversité microbienne dans un environnement est forte, plus le réservoir de fonctions potentiellement activables suivant les conditions du milieu est vaste. Une étude récente (De Ridder-Duine *et al.*, 2005) a suggéré que la composition des communautés microbiennes de la rhizosphère est limitée par les populations microbiennes disponibles dans le pool général de microorganismes du sol global. En d'autres termes, les communautés microbiennes rhizosphériques seraient issues des communautés du sol global ayant répondu aux stimuli envoyés par la symbiose ectomycorhizienne et ayant supporté les conditions régnant au sein de la rhizosphère (rhizocompétence). Or, dans les sols forestiers, la diversité microbienne est très forte (Hackl *et al.*, 2004), nettement supérieure à celle observée dans les sols agricoles ou fertilisés, ce qui laisse à penser que *via* les communautés microbiennes qu'ils abritent, **les écosystèmes forestiers seraient dotés d'une grande plasticité vis-à-vis des contraintes environnementales et notamment nutritionnelles.**

## 8. APPORTS DE CES ETUDES DANS LE CONTEXTE D'UN STOCKAGE A LONG TERME DE DECHETS RADIOACTIFS DANS DES SOLS FORESTIERS

---

Les études mises en oeuvre dans cette thèse ont apporté des résultats d'intérêt pour la qualification des sites de stockage profond dans le cadre de la considération de l'écosystème forestier. En effet, en ce qui concerne les études réalisées en forêt, nous avons observé une mobilisation et une accumulation de potassium dans la rhizosphère des arbres. Du fait de ses propriétés physico-chimiques voisines de celles du potassium, le césium pourrait donc avoir tendance, lui aussi, à s'accumuler dans la rhizosphère des

arbres forestiers. Cependant, une simple analogie de comportement physico-chimique entre le césium et le potassium ne permet pas d'apporter une réponse définitive concernant la dynamique du césium dans les sols forestiers. Notamment, l'expérimentation d'interactions arbre forestier – microorganismes – minéral – solution en colonnes, qui a permis de quantifier le césium, aussi bien dans la solution drainée que dans la biomasse végétale, met clairement en évidence que, dans nos conditions expérimentales, le césium mobilisé lors de l'altération de la biotite est prélevé en moyenne à 88% par la plante alors que le potassium ne l'est qu'à 37%. Ce qui suggère un prélèvement préférentiel du césium par la plante. Ce phénomène de prélèvement préférentiel d'éléments – traces a également été observé lors d'une expérimentation en colonnes faisant interagir une plante hyperaccumulatrice *L. emarginata*, des microorganismes résistants au nickel et un minéral-test riche en nickel, le chrysotile (présentée en annexe 9). Cette plante, qui a accéléré la dissolution du chrysotile, a prélevé plus de 90% du nickel mobilisé lors de l'altération du chrysotile soit près de 2% du nickel contenu dans le minéral.

Ces résultats améliorent les connaissances en ce qui concerne l'une des problématiques de recherche de l'Andra, à savoir la dynamique (mobilisation, prélèvement et accumulation) du césium dans les sols forestiers. A l'avenir, il apparaît indispensable de continuer l'analyse de la dynamique du césium dans l'écosystème forestier, en mesurant l'ensemble des flux intervenant dans le cycle biogéochimique de cet élément en forêt. Ce suivi nécessite une forte instrumentation de l'écosystème : des sites-ateliers comme ceux de Fougères et de Breuil sont tout à faits adaptés à ce type d'étude.

Les expériences en colonnes ont également permis de tester l'effet de composés toxiques sur l'activité biologique et la croissance des plantes. Les résultats sont sans équivoque, dans ce type d'environnement et à une telle concentration, l'uranium est nocif pour les plants de pin et pour les microorganismes : une inhibition non seulement de la croissance des organismes, mais également de leur activité est observée. Ces résultats suggèrent que, bien qu'il soit généralement considéré comme en équilibre en regard des perturbations qui caractérisent son environnement comme par exemple la présence d'agents pathogènes, l'écosystème forestier pourrait être très vulnérable aux perturbations induites par des agents qui lui sont étrangers. Toutefois, ces expérimentations sont très réductionnistes car la microflore présente, inoculée ou non, y est très simplifiée. On peut ainsi se demander si dans un sol forestier naturel, un arbre

mature ne pourrait pas mettre en œuvre un certain nombre de stratégies telles que l'association avec des communautés bactériennes ou fongiques détoxifiantes qui limiteraient l'impact de l'uranium. On sait déjà que de nombreux champignons ectomycorhiziens protègent leur hôte en limitant la toxicité en métaux lourds (Wilkins, 1991).

## 9. PERSPECTIVES

---

Au vu des résultats concernant la structuration fonctionnelle des communautés bactériennes dans les sols forestiers en relation avec l'altération des minéraux, de nombreuses hypothèses écologiques et mécanistes peuvent être émises mais elles restent encore à valider.

Dans un premier temps, il est indispensable de vérifier, à l'aide des tests *in vitro* en microplaques, l'existence d'une structuration des communautés microbiennes associées à d'autres symbioses ectomycorhiziennes, sur d'autres sites forestiers développés sur des sols possédant des niveaux de fertilité différents. Ces analyses sont obligatoires si l'on veut valider le caractère générique des conclusions proposées dans cette thèse.

Par la suite, il serait nécessaire de mettre en œuvre des expériences permettant de valider les hypothèses que nous avons formulées quant à la capacité de la symbiose ectomycorhizienne à modifier ses exsudats en conditions de carences nutritives et la sélection exercée par ces exsudats sur les communautés bactériennes à fort pouvoir d'altération. Pour cela, il serait nécessaire de mettre en place des dispositifs en forêt de type microbougies permettant de prélever les exsudats racinaires d'arbres forestiers développés sur des sols possédant des niveaux de fertilité différents. En parallèle, une caractérisation du potentiel d'altération des communautés microbiennes prélevées dans la rhizosphère et le sol global sur ces différents sites serait entreprise.

Par ailleurs, nos expérimentations en laboratoire étaient basées sur l'étude de souches bactériennes cultivables et, même si cette phase est un prérequis indispensable quand on étudie une fonction dont on ne connaît pas les déterminants génétiques, elle ne constitue qu'une étape. Ceci est d'autant plus vrai que les avancées technologiques nous permettent, de nos jours, d'avoir accès à des outils extrêmement performants dans le domaine de la microbiologie environnementale. A l'avenir, l'étude du rôle de

l'ensemble des communautés microbiennes rhizosphériques dans l'altération des minéraux nécessitera des approches polyphasiques impliquant notamment la construction de banques génomiques et métagénomiques (Lombard *et al.*, 2006) qui serviront à lier la fonction d'altération aux gènes et aux microorganismes impliqués (Lemanceau *et al.*, 2006). Une fois les microorganismes et les déterminants génétiques identifiés, des études de diversité fonctionnelle, des études d'expression et de localisation *in situ* des principaux gènes impliqués, devront être engagées afin de mieux comprendre les processus d'altération qui régissent la biodisponibilité (fertilité) et la toxicité des éléments dans les sols.

A l'heure actuelle, deux banques de mutants d'insertion ont été réalisées sur les souches modèles *Burkholderia glathei* PML1(4) et PML1(12). Le criblage de ces banques sur milieu gélosé TCP est en cours. Plusieurs mutants d'intérêt de la souche PML1(4) ont d'ores et déjà été obtenus et la caractérisation des gènes interrompus est en cours. L'identification de la fonction déterminée par ces gènes devrait permettre de mieux comprendre les processus d'altération bactériens. Parallèlement, une étude globale sur une niche jusque-là non étudiée : la minéralosphère (zone d'influence des minéraux) est en cours. Cette approche basée sur le métagénome des communautés microbiennes associées aux minéraux devrait permettre d'identifier (i) quels sont les microorganismes présents à la surface des minéraux et (ii) si la nature du minéral influe sur la diversité microbienne. Ce travail est un préambule à la recherche en masse de déterminants génétiques impliqués dans la fonction d'altération. L'ensemble des données accumulées par ces travaux devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'altération et de développer des marqueurs pour étudier ce processus *in situ*.

En ce qui concerne les études et expérimentation visant à quantifier le niveau d'altération des minéraux en forêt, il paraît tout d'abord nécessaire de déterminer la contribution de la rhizosphère aux flux d'éléments issus de l'altération des minéraux dans des écosystèmes forestiers variés (climat, sol, essence). Ceci afin de donner un caractère plus générique à cette étude. Le croisement des approches, observation et expérimentation en forêt, semble une bonne voie. Cependant, ces méthodes doivent être affinées afin de mieux évaluer cette contribution.

Si nos hypothèses se confirment, les modèles utilisés actuellement pour évaluer le flux d'altération des minéraux dans les sols forestiers seraient obsolètes ou tout du moins très approximatifs. Cela impliquerait la mise au point de modèles plus performants mais

singulièrement plus complexes, intégrant la plante et les microorganismes du sol. Ainsi, on pourrait imaginer faire intervenir dans les calculs du flux d'altération, l'essence d'arbres, les microorganismes associés et les interactions entre plantes et microorganismes. Ces différents paramètres biologiques seraient affectés d'un coefficient relatif à leur potentiel d'altération dans certaines conditions du milieu et obtenus grâce à des tests *in vitro*.

De nombreuses applications de ces recherches sont attendues pour les écosystèmes forestiers notamment dans quatre domaines : la nutrition des arbres développés sur sols pauvres, la gestion de la mobilité d'éléments toxiques ou radioactifs, la gestion des sols forestiers liée à l'introduction de nouvelles essences d'arbres, et l'évaluation biologique de la fertilité des sols.

### **Nutrition en sol pauvre**

L'inoculation de souches bactériennes à fort potentiel d'altération dans des sols très pauvres en nutriments pourrait être un moyen d'améliorer la nutrition des plantes. Nos résultats suggèrent même qu'il pourrait être bénéfique de réaliser des co-inoculations champignons ectomycorhiziens – bactéries rhizosphériques avec, par exemple une souche bactérienne possédant un fort potentiel d'altération et une espèce de champignon mycorhizien optimisant le prélèvement de nutriments en solution. Il est évident que ces méthodes biologiques de fertilisation des sols pourraient être plus durables et économiquement avantageuses comparés à des fertilisations chimiques. Néanmoins, il se pose le problème de la viabilité des associations champignon – bactéries réalisées, et de la sélection de souches performantes, adaptées à l'environnement dans lequel elles seront inoculées. En effet, l'expression de fonctions par un microorganisme peut être affectée par l'essence végétale et les propriétés biologiques et physico-chimiques du sol dans lequel elles sont introduites (Goddart *et al.*, 2001 ; Tan *et al.*, 2004). Dans le contexte forestier, cette application pourrait toutefois s'avérer coûteuse.

### **Gestion de la mobilité d'éléments anthropiques**

Dans le même ordre d'idée, il serait envisageable de planter, sur des sols pollués, des espèces végétales hyperaccumulatrices et/ou de gérer la densité des arbres afin de limiter le drainage de certains éléments. De plus si l'objectif est de mobiliser les

éléments présents dans les minéraux et de les stocker dans les végétaux, ces plantes pourraient être inoculées avec des souches bactériennes possédant de forts potentiels d'altération des minéraux. Les souches stimuleraient ainsi la mise en solution des polluants qui seraient par la suite prélevés abondamment par la plante. Toutefois, il est primordial de s'assurer qu'il n'existe pas de découplage dans le temps ou dans l'espace de l'activité mobilisatrice des microorganismes et de l'activité de prélèvement des racines. D'une manière plus générale, les connaissances acquises sur le fonctionnement des essences (ORE Breuil-Chenue) sont un bon point de départ pour choisir des essences les plus adaptées, cependant la connaissance du cycle de ces éléments dans les écosystèmes forestiers apporterait un complément indispensable.

### **Gestion durable des sols par l'introduction de nouvelles essences**

Cette étude ainsi que tous les travaux entrepris sur l'effet de la substitution d'essences dans le site ORE de la forêt de Breuil-Chenue permettent de mieux comprendre l'impact de l'introduction de nouvelles essences sur un sol, notamment les effets sur les cycles du carbone et de l'azote et les interactions avec les cycles des autres nutriments et les communautés biologiques (thèses de Jérôme Jaffrain et de Louis Mareschal ; contrats de recherche Biodiversité, ORE, ACI, MICROGER,...). Il apparaît que le fonctionnement de l'écosystème est sous forte dépendance de l'essence. Par exemple, pour acquérir les nutriments, les essences semblent adopter des stratégies très diverses (production d'acides organiques *via* la racine ou la litière, de protons localement dans la rhizosphère ou massivement *via* le cycle de l'azote, sélection de communautés microbiennes,...). Les bilans de dissolution minérale, de perte par drainage, d'immobilisation dans la biomasse,... pour les différents éléments sont propres à chaque essence. En fonction, de la fertilité « géochimique » des sols et des contraintes environnementales, il devrait être possible de recommander une essence et des aménagements sylvicoles.

### **Microorganismes comme indicateur de fertilité des sols**

Une autre application envisageable serait l'utilisation des microorganismes, notamment les bactéries, comme indicateur « biologique » de la fertilité des sols. Cette application nécessite toutefois la connaissance des gènes impliqués dans l'altération et l'existence d'une corrélation entre le géotype et la fonction. Les travaux visant à répondre à ces

questions sont en cours de réalisation dans notre laboratoire et devrait nous donner des indications dans les mois à venir.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- AFES 1995 Référentiel pédologique. INRA [Institut national de la Recherche agronomique], Paris. 332 p.
- Ahmad J S and Baker R 1987 Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77, 182-189.
- Alexander D B and Zuberer D A, 1990 Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12, 39-45.
- Altomare C, Norvell W A, Bjorkman T and Harman G E 1999 Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. environ. microbiol.* 65, 2926-2933.
- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman D 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids res.* 25, 3389-3402.
- Amellal N, Burtin G, Bartoli F and Heulin T 1998 Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Appl. environ. microbiol.* 64, 3740-3747.
- Amrhein C and Suarez D L 1988 The use of a surface complexation model to describe the kinetics of ligand-promoted dissolution of anorthite. *Geochim. cosmochim. Acta* 52, 2785-2793.
- Amrhein C and Suarez D L 1992 Some factors affecting the dissolution kinetics of anorthite at 25°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52, 2785-2793.
- Andersen C P and Rygielwicz P T 1999 Understanding plant-soil relationships using controlled environment facilities. *Adv. Space Res.* 24, 309-318.
- Anderson J P E and Domsch K H 1978 A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221.
- Angers D A and Caron J 1998 Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry* 42, 55-72.
- April R and Keller D 1990 Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States. *Biogeochemistry* 9, 1-18.
- Arocena J M and Glowka K R 2000 Mineral weathering in ectomycorrhizosphere of subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) as revealed by soil solution composition. *For. Ecol. Manage.* 133, 61-70.
- Assigbetse K, Gueye M, Thioulouse J and Duponnois R 2005 Soil bacterial diversity responses to root colonization by an ectomycorrhizal fungus are not root-growth-dependent. *Microb. Ecol.* 50, 350-359.
- Augusto L, Turpault M P and Ranger J 2000 Impact of forest tree species on feldspar weathering rates. *Geoderma* 96, 215-237.
- Augusto L, Ranger J, Turpault M P and Bonnaud P 2001 Experimental in situ transformation of vermiculites to study the weathering impact of tree species on the soil. *Eur. J. Soil Sci.* 52, 81-92.

- Baakza A, Vala A K, Dave B P and Dube H C 2004 A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311, 1-9.
- Babu-Khan, S, Yeo T C, Martin W L, Duron M R, Rogers R D and Goldstein A H 1995 Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 972-978.
- Badeau V, Dambrine E and Walter C 1999 Propriétés des sols forestiers français : résultats du premier inventaire systématique. *Etud. Gest. Sols* 6, 165-180.
- Bain D C, Mellor A, Wilson M J and Duthie D M L 1994 Chemical and mineralogical weathering rates and processes in an upland granitic till catchment in Scotland. *Water air soil pollut.* 73, 11-27.
- Bais H P, Park S W, Weir T L, Callaway R M and Vivanco J M 2004 How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9, 26-32.
- Baker A J M, McGrath S P, Sidoli C M D and Reeves R D 1994 The possibility of in-situ heavy-metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour. Conserv. Recycl.* 11, 41-49.
- Baker K and Cook R J 1974 Biological control of plant pathogens. In *Biological control of plant pathogens*. pp 433pp. W.H. Freeman and Company., San Francisco USA.
- Bakken A K, Gautneb H, Sveistrup T and Myhr K 2000 Crushed rocks and mine tailings applied as K fertilizers on grassland. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 56, 53-57.
- Bakker M R, George E, Turpault M P, Zhang J L and Zeller B 2004 Impact of Douglas-fir and Scots pine seedlings on plagioclase weathering under acidic conditions. *Plant Soil* 266, 247-259.
- Banfield J F, Barker W W, Welsch S A and Taunton A 1999 Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3404-3411.
- Bano N and Musarrat J 2003 Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr. Microbiol.* 46, 324-328.
- Barber S A 1984 *Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach*. John Wiley & Sons Inc., New York USA. 398 p.
- Barber S A 1995 *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. John Wiley and Sons, New York USA. XI + 414 pp p.
- Barea J M, Azcon R and Azcon-Aguilar C 2002 Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 343-351.
- Barea J M, Azcon R and Azcon-Aguilar C 2004 Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. In *Plant Surface Microbiology*. pp 351-371. Springer-Verlag Berlin, Berlin.
- Barea J M, Azcon R and Azcon-Aguilar C 2005a Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. pp 195-212. Springer-Verlag Berlin, Berlin.

- Barea J M, Pozo, M J, Azcon R and Azcon-Aguilar C 2005b Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1761-1778.
- Barker W W, Welch S A and Banfield J F 1997 Biogeochemical weathering of silicate minerals. In *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*. pp 391-428. Mineralogical Soc America, Washington.
- Barker W W and Banfield J F 1998 Zones of chemical and physical interaction at interfaces between microbial communities and minerals: A model. *Geomicrobiol. j.* 15, 223-244.
- Baziramakenga R, Simard R R and Leroux G D 1995 Determination of Organic-Acids in Soil Extracts by Ion Chromatography. *Soil biol. biochem.* 27, 349-356.
- Begg C B M, Kirk G J D, Mackenzie A F and Neue H U 1994 Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. *New Phytol.* 128, 469-477.
- Bending G D, Poole E J, Whipps J M and Read D J 2002 Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 219-227.
- Bennett P C, Siegel D I, Hill B M and Glaser P H 1991 Fate of silicate minerals in a peat bog. *Geology* 19, 328-331.
- Bennett P C, Rogers J R, Choi W J and Hiebert F K 2001 Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiol. j.* 18, 3-19(17).
- Berge A C B, Adaska J M and Sicho W M 2004 Use of antibiotic susceptibility patterns and pulsed-field gel electrophoresis to compare historic and contemporary isolates of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Newport. *Appl. environ. microbiol.* 70, 318-323.
- Berger T W, Swoboda S, Prohaska T and Glatzel G 2006 The role of calcium uptake from deep soils for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*). *For. Ecol. Manage.* 229, 234-246.
- Berner R A and Cochran M F 1998 Plant-induced weathering of Hawaiian basalts. *J. sediment. res., Sect. A Sediment. pet. proc.* 68, 723-726.
- Bertaux J, Schmid M, Prevost-Boure N C, Churin J L, Hartmann A, Garbaye J and Frey-Mett P 2003 In situ identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Appl. environ. microbiol.* 69, 4243-4248.
- Bertaux J, Schmid M, Hutzler P, Hartmann A, Garbaye J and Frey-Klett P 2005 Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Environ. microbiol.* 7, 1786-1795.
- Berthelin J and Leyval C 1982 Ability of symbiotic and non-symbiotic rhizospheric microflora of maize (*Zea mays*) to weather micas and to promote plant growth and plant nutrition. *Plant Soil* 68, 369-377.
- Berthelin J 1983 Microbial weathering processes. In *Microbial geochemistry*, Ed W E Krumbein. pp 223-262. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK.
- Berthelin J 1985 Microbial weathering processes in natural environments. In *Physical and chemical weathering in geochemical cycles*, Eds A Lerman and M Meybeck. pp 33-60. Kluwer, Dordrecht, Boston, London.

- Berthelin J, Leyval C and Toutain F 1994 Biologie des sols : Rôle des organismes dans l'altération et l'humification. In *Pédologie, Volume 2. Constituants et propriétés du sol*, Eds M Bonneau and B Souchier. pp 143-237. Masson, Paris.
- Beven K and Germann P 1982 Macropores and water flow in soils. *Water resour. res.* 18, 1311-1325.
- Bevivino A, Peggion V, Chiarini L, Tabacchioni S, Cantale C and Dalmastrì C 2005 Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. *Res. Microbiol.* 156, 974-983.
- Bienfait H F, Bino R J, Blik A M v d, Duivenvoorden J F and Fontaine J M 1983 Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 59, 196-202.
- Blum J D, Klaue A, Nezat C A, Driscoll C T, Johnson C E, Siccama T G, Eagar C, Fahey T J and Likens G E 2002 Mycorrhizal weathering of apatite as an important calcium source in base-poor forest ecosystems. *Nature* 417, 729-731.
- Bormann B T, Wang D, Bormann F H, Benoit G, April R and Snyder M C 1998 Rapid, plant-induced weathering in an aggrading experimental ecosystem. *Biogeochemistry* 43, 129-155.
- Bormann F H and Likens G E 1979 Pattern and process in a forested ecosystem. In *Pattern and process in a forested ecosystem*. pp XI + 253 pp. Springer-Verlag., New York USA.
- Bowen G D and Rovira A D 1976 Microbial colonization of plant roots. In *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 14., Ed K F Baker. pp 121-144. Annual Reviews, Inc, Palo Alto, Calif., U.S.A.
- Bowen G D and Rovira A D 1999 The rhizosphere and its management to improve plant growth. In *Advances in Agronomy*, Vol 66. pp 1-102. Academic press Inc, San Diego.
- Boyle J R and Voigt G K 1973 Biological weathering of silicate materials. Implications for tree nutrition and soil genesis. *Plant Soil* 38, 191-201.
- Brant J B, Myrold D D and Sulzman E W 2006 Root controls on soil microbial community structure in forest soils. *Oecologia* 148, 650-659.
- Brantley S and Hill P S M 2000 Lekking in *Gryllotalpa major*, the prairie mole cricket: a test of the "hotshot hypothesis." *Am. Zool.* 40, 953-954.
- Brantley S L 1992 Kinetics of dissolution and precipitation experimental and field results, *Proc. 7th Internat. Symp. on Water-Rock Interaction held at Park City Utah USA 13-18 July 1992*. Balkema, Rotterdam (The Netherlands). 3-6 p.
- Brantley S L, Liermann L, Bau M and Wu S 2001 Uptake of trace metals and rare earth elements from hornblende by a soil bacterium. *Geomicrobiol. j.* 18, 37-61.
- Brantley S L, Liermann L and Bullen T D 2001 Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids. *Geology* 29, 535-538.
- Broadley M R and Willey N J 1997 Differences in root uptake of radiocaesium by 30 plant taxa. *Environ. Pollut.* 97, 11-15.
- Brown J C and Ambler J E 1973 "Reductants" released by roots of Fe-deficient soybeans. *Agron. j.* 65, 311-314.

- Bruce K D, Hiorns W D, Hobman J L, Osborn A M, Strike P and Ritchie D A 1992 Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3413-3416.
- Brulé C, Frey-Klett P, Pierrat J C, Gérard F, Lemoine M C, Rousselet J L, Sommer J, Garbaye J 2001 Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and effect of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1683-1694.
- Brunner I 2001 Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 4, 13-27.
- Buée M, Courty PE, Le Tacon F, Garbaye J 2006 Ecosystèmes forestiers: diversité et fonction des champignons. *Biofutur* 268, 42-45.
- Buée M, INRA Nancy, France, communication personnelle.
- Busacca A J and Singer M J 1989 Pedogenesis of a chronosequence in the Sacramento Valley, California, USA., II. Elemental chemistry of silt fractions. *Geoderma* 44, 43-75.
- Callot G, Chamayou H, Maertens C, Salsac L and Drouineau G 1982 Mieux comprendre les interactions sol-racine : incidence sur la nutrition minérale. INRA [Institut National de la Recherche Agronomique], Paris. 325 p.
- Calvaruso C, Turpault M P and Frey-Klett P 2006 Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: A budgeting analysis. *Appl. environ. microbiol.* 72, 1258-1266.
- 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.
- Chen G, Zhu H L and Zhang Y 2003 Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res. Microbiol.* 154, 393-398.
- Cheng W, Coleman D C, Carroll C R, Hoffman C A. 1993 *In situ* measurement of root respiration and soluble C concentration in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1189-1196.
- Chou L and Wollast R 1985 Steady-state kinetics and dissolution mechanisms of albite. *Am. J. Sci.* 285, 963-993.
- Clegg S, Gobran G R and Guan X 1997 Rhizosphere chemistry in an ammonium sulfate and water manipulated Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] forest. *Can. J. Soil Sci.*, 77, 515-523.
- Clegg S, G R Gobran G R, 1997 Rhizospheric P and K in forest soil manipulated with ammonium sulfate and water. *Canadian Journal of Soil Science* 77, 525-533.
- Cochran M F and Berner R A 1992 The quantitative role of plants in weathering. In *Water-rock interaction Volume 1: low temperature environments. Proceedings of the 7th International Symposium, WRI-7 Park City, Utah 13-18 July 1992.*, Eds Y K Kharaka and A S Maest. pp 473-476. A.A. Balkema, Rotterdam Netherlands.
- Colin-Belgrand M, Dambrine E, Bienaime S, Nys C and Turpault M P 2003 Influence of tree roots on nitrogen mineralization. *Scand. J. Forest Res.* 18, 260-268.
- Cook R J, Thomashow L, Weller M D, Fujimoto D, Mazzola M, Banger G, Kim D S 1995 Molecular mechanism of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc Natl Acad Sci* 92, 4197-4201.

- Courchesne F and Gobran G R 1997 Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 1245-1249.
- Courchesne F, Laberge, J F and Dufresne A 1998 Influence of soil organic matter on sulphate retention in two podzols in Quebec, Canada. *Can. J. Soil Sci.* 79, 103-109.
- Cunningham J E and Kuiack C 1992 Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1451-1458.
- Curl E A and Truelove B 1986 *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin.
- Czarnes S, Hatlett P D, Bengough A G and Young I M 2000 Root and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport. *Eur. J. Soil Sc.* 51, 435-443.
- Dakora D F, Phillips D A 2002 Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245, 35-47
- Dambrine E, Pollier B, Bonneau M and Ignatova N 1998 Use artificial trees to assess dry deposition in spruce stands. *Atm. Environ.* 32, 1817-1824.
- Danell E, Alstrom S, and Ternstrom A 1993 *Pseudomonas fluorescens* in association with fruit bodies of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycol. Res.* 1148-1152.
- Darrah P R, 1993 The rhizosphere and plant nutrition: A quantitative approach. *Plant Soil* 155/156, 1-20.
- Davet P 1996 *Vie microbienne du sol et production végétale*. Ed. INRA, Paris.
- De Boer W, Klein Gunnewiek, P J, Kowalchuk G A and Van Veen J A 2001 Growth of chitinolytic dune soil beta-subclass Proteobacteria in response to invading fungal hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3358-3362.
- De Boer W, Leveau J H, Kowalchuk G A, Klein Gunnewiek P J, Abeln E C, Figge M J, Sjollem K, Janse J D and van Veen J A 2004 *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 857-64.
- De Boer W, Kowalchuk G A and van Veen J A 2004 "Root-food" and the rhizosphere microbial community composition. *New Phytol.* 170, 3-6.
- De Boer W, Folman L B, Summerbell R C. and Boddy L 2005 Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 795-811.
- Dejou J 1967 L'altération du granite à deux micas de la Pierre-qui-Vire. *Annales agronomiques.* 18, 145-201.
- Dell B, Botton, B, Martin F and Le Tacon F 1989 Glutamate dehydrogenases in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.* 111, 683-692.
- Denef K, Six J, Merckx R and Paustian K 2002 Short-term effects of biological and physical forces on aggregate formation in soils with different clay mineralogy. *Plant Soil* 246, 185-200.
- De Ridder-Duine A S, Kowalchuk G A, Klein Gunnewiek P J A, Smant W, Van Veen J A and De Boer W 2005 Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol. Biochem.* 37, 349-357.

- Di Battista C, Selosse MA, Bouchard D, Stenström E, Le Tacon F 1996 Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S238. Mycol. Res. 100, 1315-1324.
- Digat B 1994 The plant growth-promoting bacteria : an example with the *Pseudomonas*. C.R. Acad. Agric. Fr. 80, 113-122.
- Dommergues Y and Mangenot F 1970 Ecologie microbienne du sol. Ed. Masson, Paris.
- Doussan C, Pagès L, Pierret A 2003 Soil exploration and resource acquisition by plant roots: an architectural and modelling point of view. 23, 419-431.
- Drever J I 1994 The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. Geochim. cosmochim. Acta 58, 2325-2332.
- Drever J I and Vance G F 1994 Role of soil organic acids in mineral weathering. In role of soil organic acids in geological processes. pp138-161. SPRINGER, New York.
- Drever J I and Stillings L L 1997 The role of organic acids in mineral weathering. Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp. 120, 167-181.
- Duponnois R and Garbaye J 1991 Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions. Ann. Sci. Forest. 48, 239-251.
- Ebelmen J J 1845 Sur les produits de la décomposition de la famille des silicates. Ann. Des Mines 7, 3-66.
- Ebbs S D, Lasat M M, Brady D J, Cornish J, Gordon R and Kochian L V 1997 Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. J. Environ. Qual. 26, 1424-1430.
- Egamberdiyeva D, and Höfflich G 2003 Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. J. Arid Environ. 56, 293-301.
- Ehrlich H G 1996 How microbes influence mineral growth and dissolution. Chem. Geol. 132, 5-9.
- Elliot J C 1994 Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Chapter 2, 63.110 p. Elsevier, Amsterdam.
- Espiau P and Peyronel A 1976 L'acidité d'échange des sols, méthode de détermination de l'aluminium échangeable et des protons échangeables. Science du Sol. 3, 161-175.
- Ezzaim A, Turpault M P and Ranger J 1997 Nutrient distribution in an acid brown soil developed from a volcanic tuff bedrock (Beaujolais, France). Consequences for the long-term fertility. Annales Des Sciences Forestieres 54, 371-387.
- Felsenstein J 1993 PHYLIP: phylogeny inference package (version 3.65). University of Washington, Seattle.
- Fichter J 1997 Minéralogie quantitative et flux d'éléments minéraux libéré par altération des minéraux des sols dans deux écosystèmes sur granite (bassin versant du Strengbach, Vosges). pp 273. Henri Poincaré- Nancy I. U.F.R., Nancy.
- Fierer N, Schimel J P and Holden P 2003 Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biol. Biochem. 35, 167-176.

- Fierer N and Jackson R B 2006 The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 103, 626-631.
- Findenegg G R and Nelemans J A (1993) The effect of phytase on the availability of P from *myoinositol* hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil* 154, 189-196.
- Finlay R D 2004 Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*. 18, 91-96.
- Fischer W R, Flessa H, Schaller G 1989 pH values and redox potentials in microsites of the rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152, 191-195.
- Forde B and Lorenzo H 2001 The nutritional control of root development. *Plant and Soil* 232, 51-68.
- Frankenberger W T jr, and Poth M 1987 Biosynthesis of indole-3 acetic by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2908-2913.
- Frey-Klett P, Pierrat J C and Garbaye J 1997 Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas fir. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 139-144.
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O et Heulin T 1997 Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1852-1860.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse M L, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti M G, Pierrat J C and Garbaye J 2005 Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol.* 165, 317-328.
- Gadd G M 1999 Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv. in Microbial Physiol.* 41, 47-92.
- Gahoonia T S, Care D and Nielsen. N E 1997. Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant Soil* 191:181-188.
- Gahoonia T S and Nielsen N E 2004 Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. *Plant Soil* 260, 47-57.
- Gamalero E, Martinotti M G, Trotta A, Lemanceau P, and Berta G. 2002 Morphological modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New Phytol.* 155, 293-300.
- Garbaye J and Bowen G D 1987 Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Can. J. Forest. Res.* 17, 941-943.
- Garbaye J and Bowen G D 1989 Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytol.* 112, 383-388.
- Garbaye J 1994 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128, 197-210.
- Garbeva P, Van Veen J A and Van Elsas J D 2004 Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for suppressiveness. *Ann. Rev. Phytopathol.* 42, 243-270.

- Garcia de Salamone I E, Hynes R K and Nelson L M 2001 Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47, 404-411.
- Gen-Fu W and Xue-Ping Z 2005 Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. *Water Res.* 39, 4623-4632.
- Gibbs R J and Reid J B 1988 A conceptual model of changes in soil structure under different cropping systems. *Adv. Soil Sci.* 8,123-149.
- Glatzel G 1991 Internal proton generation in forest ecosystems as influenced by influenced by historic land-use and moder forestry. *Fertil. Res.* 27, 1-8.
- Glowa K R, Arocena J M, and Massicotte H B 2003 Extraction of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma* *Geomicrobiol J.* 20, 99-111.
- Goberna M, Insam H, Klammer S, Pascual J A and Sanchez J 2005 Microbial community structure at different depths in disturbed and undisturbed semiarid mediterranean forest soils. *Microb. Ecol.* 50, 315-326.
- Gobran G R and Clegg S 1998 Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeochemistry* 42, 107-120.
- Gobran G R Clegg S and Courchesne F 1998. Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeochemistry* 42, 107-120.
- Gobran G R, Clegg S and Courchesne F 1999 The rhizosphere and trace elements acquisition in soils. In: Selim H.M., Iskander A. (eds), *Fate and transport of heavy metals in the vadose zone.* CRC Press LLC.
- Gobran G R, Turpault M P and Courchesne F 2005. Contribution of rhizospheric processes to mineral weathering in forest soils. *In: P.M. Huang. and G.R. Gobran (Editors), Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere.* Elsevier, pp 3-28.
- Goldstein A H, Braverman K and Osorio N 1999 Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 295-300.
- Gottlein A, Heim A and Matzner E 1999 Mobilization of aluminium in the rhizosphere soil solution of growing tree roots in an acidic soil. *Plant Soil* 211, 41-49.
- Grayston S J, Vaughan D and Jones D 1996 Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5, 29-56.
- Grayston S J and Campbell C D 1996 Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiol.* 16, 1031-1038.
- Grayston S J, Griffith G S, Mawdsley J L, Campbell C D and Bardgett R D 2001 Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil biol. biochem.* 33, 533-551.
- Grayston S J and Prescott C E 2005 Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. *Soil biol. biochem.* 37, 1157-1167.
- Green P 1966 Mineralogical and weathering study of a red-brown earth formed on granodiorite. *Austr. J. Soils Res.* 4, 181-187.

- Gregory P J 2006 Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *Eur. J. Soil Sci.* 57, 2-12.
- Grundmann L G and Gourbière F 1999 A micro-sampling approach to improve the inventory of bacterial diversity in soil. *Appl. Soil Ecol.* 13, 123-126.
- Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, Bodrossy L and Sessitsch A 2004 Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5057-5065.
- Harley A D and Gilkes R J 2000 Factors influencing the release of plant nutrient elements from silicate rock powders: a geochemical overview. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 56, 11-36.
- Haynes R J 1990 Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil* 126.
- Heim A, Luster J, Brunner I, Frey B and Frossard E 2000 Effects of aluminium treatment on Norway spruce roots: Aluminium binding forms, element distribution, and release of organic substances. *Plant and Soil* 216, 103-116.
- Heinonsalo J, Jorgensen KS, Haahtela K and Sen R 2000 Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 46, 451-464.
- Hiltner L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundüngung und Brache. *Arbeiten der Deutsche Landwirtschaftliche Gesellschaft* 98: 59-78.
- Hinsinger P, Jaillard B and Dufey J E 1992 Rapid weathering of a trioctahedral mica by roots of Ryegrass. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 977-982.
- Hinsinger P, Elsass F, Jaillard B, Robert M 1993 Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. *J. Soil Sci.* 44, 535-545.
- Hinsinger P and Gilkes R J 1997 Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in an acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma* 75, 231-249.
- Hinsinger P 1998 How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. In *Advances in Agronomy*, Vol 64. pp 225-265. Academic press Inc, San Diego.
- Hinsinger P, Barros O N F, Benedetti M F, Noack Y and Callot G 2001 Plant-induced weathering of a basaltic rock: Experimental evidence. *Geochim. cosmochim. Acta* 65, 137-152.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C X and Jaillard B 2003 Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 248, 43-59.
- Hinsinger P, Gobran G R, Gregory P J and Wenzel W W 2005 Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168, 293-303.
- Hodge 2004 The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol.* 162, 9-24.

- Hoffland E 1992 Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. *Plant Soil* 140, 279-289.
- Holdgate M 1996 The ecological significance of biological diversity. *Ambio* 25, 409-416.
- Huang P M and Keller W D 1970 Dissolution of rock-forming silicate minerals in organic acids: simulated first-stage weathering of mineral surfaces. *Am. Mineral.* 55, 2076-2094.
- Hughes J M, Cameron M and Crowley K D 1989 Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. *American Mineralogist*, 74, 870-876.
- Illmer P and Schinner F 1995 Solubilization of inorganic calcium phosphates: solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.
- Jackson T A and Voigt G K 1971 Biochemical weathering of calcium-bearing minerals by rhizosphere micro-organisms, and its influence on calcium accumulation in trees. *Plant Soil* 35, 655-658.
- Jaillard B 1980 Fonctionnement hydrique d'un sol carbonaté. Incidence sur la chlorose ferrique. Thèse de 3e cycle en Sciences biologiques fondamentales et appliquées. Spécialité Agronomie, option Pédologie de l'Université de Montpellier II. pp 135, [s.l.].
- Jaillard B and Hinsinger P 1993 Alimentation minérale des végétaux dans le sol. *Encyclopédie des techniques Agricoles* 87 (6-93), fasc.1210, 1-13.
- Jayasinghearachchi H S and Seneviratne G 2006 "Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobial biofilms." *Soil Biol. Biochem.* 38, 405- 408.
- Johansson J F, Paul L R and Finlay R D 2004 Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 1-13.
- Jones D L and Darrah P R 1994 Role of root derived organic-acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil* 166, 247-257.
- Jones D L 1998 Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Jones D L, Dennis P G, Owen A G and van Hees P A W 2003 Organic acid behavior in soils - misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil* 248, 31-41.
- Jones D L, Hodge A and Kuzyakov Y 2004 Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* 163, 459-480.
- Jongmans A G, Van Breemen N, Lundstrom U, Van Hees P A W, Finlay R D, Srinivasan M, Unestam T, Giesle R, Melkerud P A and Olsson M 1997 Rock-eating fungi. *Nature* 389, 682-683.
- Kalinowski B E, Liermann L J, Givens S and Brantley S L 2000a Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chem. Geol.* 169, 357-370.
- Kalinowski B E, Liermann L J, Brantley S L, Barnes A and Pantano C G 2000b X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 64, 1331-1343.
- Kalinowski B E, Oskarsson A, Albinsson Y, Arlinger J, Odegaard-Jensen A, Andlid T and Pedersen K 2004 Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad. *Geoderma* 122, 177-194.

- Kelly J M and P A Mays 1989 Root zone physical and chemical characteristics in southeastern spruce-fir stands. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53,1248-1255.
- Kelly E, Chawick, O A and Hilinski T E 1998 The effect of plants on mineral weathering. *Biogeochemistry* 42, 21-53.
- Kim Y H, Bae B and Choung Y K 2005. Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate-solubilizing microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 23-29.
- Kloepper J W, Leong J, Teintze M and Schroth M N 1980 Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting bacteria. *Nature* 885-886.
- Koide R T and Kabir Z 2001 Nutrient economy of red pine is affected by interactions between *Pisolithus tinctorius* and other forest-floor microbes. *New Phytol.* 150, 179-188.
- Kottke I 1992 Ectomycorrhizas – organs for uptake and filtering of cations. In "Mycorrhizas in ecosystems (D J Read, D H Lewis, A H Fitter and I J Alexander, Eds), pp316-322 CAB International, Wallingford, UK."
- Krafczyk I, Trolldenier G and Beringer H 1984 Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere micro-organisms. *Soil Biol. Biochem.* 16, 315-322.
- Krave A S, Lin B, Braster M, Laverman A M, Van Straalen N M, Roling W F M and Van Verseveld H W 2002 Stratification and seasonal stability of diverse bacterial communities in a *Pinus merkusii* (pine) forest soil in central Java, Indonesia. *Environ. Microbiol.* 4, 361-373.
- Krishnaraj P U and Goldstein A H 2001 Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli* in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 215-220.
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo W L, Mendes R, Geraldi I O, Pizzirani-Kleiner A A and Azevedo J L 2004 Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6, 1244-1251.
- Kuziakov Y 2002 Factors affecting rhizosphere priming effect. *Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 382-396.
- LaMontagne M G, Schimel J P and Holden P A 2003 Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Microb. Ecol.* 46, 216-227.
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay R D, Kuyper T M and Van Breemen N 2001 Linking plants to rock: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* 16, 248-253.
- Latour X, Delorme S, Mirleau P and Lemanceau P 2003 Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* 23, 397-405.
- Lebret M 2002 Les humus forestiers en hêtraies de plaine : analyse des facteurs de l'évolution au cours d'une chronoséquence. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, mention biologie de l'Université de Rennes 1. : 292 p.

- Lecointe S, Nys C, Walter C, Forgeard F, Huet S, Recena P, Follain S 2006 Estimation of carbon stocks in a beech forest (Fougères Forest – W. France): extrapolation from the plots to the whole forest. *Ann. For. Sci.*, 63, 1 : 139–148.
- Le Goaster S, Dambrine E, and Ranger J 1991 Croissance et nutrition minérale d'un peuplement d'épicéa sur sol pauvre. I-Evolution de la biomasse et dynamique d'incorporation d'éléments minéraux. *Acta Oecologia* 12, 157-167.
- Lejon D P H, Chaussod R, Ranger J and Ranjard L 2005 Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microb. Ecol.* 50, 614-625.
- Lemanceau P 1992 Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*. 12, 413-437.
- Lemanceau P and Heulin T, 1998 La rhizosphère. *In* Stengel P « Sol. interface fragile », INRA, collection.
- Lemanceau P, Le Roux X, Martin F 2006 Vers une approche intégrée de l'écologie microbienne du sol. *In* Biofutur "Ecologie microbienne des sols" pp. 22 et 23.
- Lesturgez G, Poss R, Hartmann C, Bourdon E, Noble A and Ratana-Anupap S 2004 Roots of *Stylosanthes hamata* create macropores in the compact layer of a sandy soil. *Plant Soil* 260, 101-109.
- Le Tacon F, Oswald H 1977 Influence de la fertilisation minérale sur la fructification du hêtre (*Fagus sylvatica*), *Ann. Sci.For.* 34, 89-109.
- Leyval C and Berthelin J 1982 Separate or simultaneous effects of endomycorrhizal fungi and non-symbiotic microflora on nutrition and growth of maize. *Colloques de l'INRA*.
- Leyval C and Berthelin J 1989 Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant Soil* 117,103-110.
- Leyval C 1990 Lysimeters in a greenhouse as an help to study the interactions between microorganisms, minerals, and forest tree roots, p. 335-346. *In* A. F. Harrison *et al.* (ed.), *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Field methods, applications and interpretations*. Elsevier Appl. Sci., London, England.
- Leyval C and Berthelin J 1991 Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of pine. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55, 1009-1016.
- Leyval C and Berthelin J 1993 Rhizodeposition and Net Release of Soluble Organic-Compounds by Pine and Beech Seedlings Inoculated with Rhizobacteria and Ectomycorrhizal Fungi. *Biol. fertil. soils* 15, 259-267.
- Liermann L J, Kalinowski B E, Zhou X Y and Susan L 2000a Microenvironnements of pH in biofilms grown on dissolving silicate surface. *Chem. Geol.* 171, 1-16.
- Liermann L J, Kalinowski B E, Brantley S L and Ferry J G 2000b Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochim. cosmochim. Acta* 64, 587-602.
- Lin T F, Huang H I, Shen F T and Young C C 2006 The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresour. Technol.* 97, 957-960.
- Linderman R G 1988 Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78, 366-371.

- Linderman RG. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. In: Pflieger FL, Linderman RG, eds. *Mycorrhizae and plant health*. APS press, 1-25.
- Lipton D, Blanchar R W and Blevins D G 1987 Citrate, malate and succinate in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.* 85, 315-317.
- Lombard N, Bailly J, Marmeisse R and Simonet P 2006 La métagénomique des communautés microbienne. In *Biofutur "Ecologie microbienne des sols"* pp. 24-27.
- Loper J E and Henkels M D 1999 Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5357-5363.
- Lynch J M 1990. *The Rhizosphere*. Chichester, UK: Wiley.
- Madé B 1991 Modélisation thermodynamique et cinétique des réactions géochimiques dans les interactions eau – roche. pp 308. Institut de géologie - Strasbourg. U.F.R. Sciences de la Vie et de la Terre, Nancy.
- Maillant S 2003 Extension de la caractérisation pédologique des environs du site Meuse/Haute-Marne. Note technique, Ed ANDRA. pp 66. ANDRA [Agence Nationale pour la gestion des Dechets Radioactifs], Châtenay-Malabry ?
- Marilley L, Vogt G, Blanc M, Aragno M 1998 Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as mediated by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Soil* 198, 219-224.
- Marschner H, Römheld V and Ossenberg-Neuhaus H 1982 Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 407-416.
- Marschner H and Römheld V 1983 *In-vivo* measurement of root induced pH changes at the soil root interface effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzenphysiol.* 111, 241-252.
- Marschner H, Römheld V and Kissel M 1986 Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9, 695-714.
- Marschner H and Römheld V 1987 Different strategies in higher plants for acquisition of iron. *International Botanical Congress Abstracts* 17, 36.
- Marschner H, Römheld V, Kissel M 1987 Localization of phytosidérophores release and iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant.* 71, 157-162.
- Marschner H, Haussling M and George E 1991 Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. *Trees* 5, 14-21.
- Marschner H 1995 Mineral nutrition of higher plants. In *Mineral nutrition of higher plants*. pp XV + 889 pp. Academic Press, London UK.
- Marschner P, Yang C H, Lieberei R and Crowley D E 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1437-1445.
- Marschner P and Baumann K 2003 Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. *Plant Soil* 251, 279-289.

- Marschner P, Crowley D E, Yang C H Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261, 199-208.
- Marschner P, Grierson P F and Rengel Z 2005 Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Appl. Soil Ecol.* 28, 191-201.
- Martin F, Canet D and Marchal J P 1984 *In vivo* abundance <sup>13</sup>C NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. *Physiol. Vég.* 22, 733-743.
- Martin F, Canet D and Marchal J P 1985 <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance study of mannitol cycle and trehalose synthesis during glucose utilization by the ectomycorrhizal *Cenococcum graniforme*. *Plant Physiol.* 77, 499-502.
- Martin F, Boiffin V and Pfeffer P E 1998 Carbohydrate and amino acid metabolism in the *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza during glucose utilization. *Plant Physiol.* 118, 627-635.
- Mavingui P G, Laguerre O, Berge and Heulin T 1992 Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1894-1903.
- Mc Cully M E 1999 Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizosphers. *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 695-718.
- McQueen J, 1967 Some methods for classification and analysis of multivariate observations. 5th Berkeley Symposium on mathematics, Statistics and Probability. 1, 281-298.
- Medina A, Probanza A, Gutierrez Manero F J and Azcon R 2003 Interactions of arbuscular – mycorrhizal fungi and *bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Appl. Soil Ecol.* 22, 15-28.
- Medina A, Vassilev N, Barea J M and Azcon R 2005 Application of *Aspergillus niger* – treated agrowaste residue and *Glomus mosseae* for improving growth and nutrition of trifolium repens in a Cd-contaminated soil. *J. Biotechnol.* 116, 369-378.
- Mehra O P and Jackson M L 1960 Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clay Minerals.* 7, 317-327.
- Mengel K and Kirkby E A 1987 Principles of plant nutrition, 4<sup>th</sup> ed. Intl. Potash Institute, Bern, Switzerland.
- Morgan J A W, Bending G D and White P J 2005 Biological costs and benefits to plant - microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1729-1739.
- Mortland M M, Lawton K and Uehara G 1956 Alteration of biotite to vermiculite by plant growth. *Soil Sci.*, 82, 477-481.
- Mottershead D N, Bailly B, Collier P and Inkpen. R J 2003 Identification and quantification of weathering by plant roots. *Build. Environ.* 38:1235-1241.
- Muofhe M L 1997 N<sub>2</sub> fixation and rhizosphere ecology of *Aspalathus linearis* ssp. *linearis* (Rooibos tea). Ph.D. thesis. University of Cape Town, South Africa.
- Mustin C, Dziurla M A, Toniazzo V, Bousserhine N and Berthelin J 2004 Contact between bacteria and minerals as a main factor controlling the dissolution kinetics and

mineral evolution in weathering processes of sulfides and oxides. 1st General Assembly of European Geosciences Union at Nice, France, 25 - 30 April 2004 [Poster 0154 in SSS4 Weathering, soil formation and soil management]. Geophysical Research Abstracts 6, EGU04-A-07880.

- Nautiyal C S, Bhadauria S, Kumar P, Lal H, Mondal R and Verma D 2000 Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiol. Lett. 182, 291-296.
- Neal J L, Bollen J R, and Bollen W B 1964 Rhizosphere microflora associated with mycorrhizae of Douglas fir. Can. J Microbiol. 10: 259-265.
- Neilands J B 1995 Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J Biol. Chem. 270, 26723-26726.
- Neumann G and Romheld V 1999 Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant Soil 211, 121-130.
- Neumann G and Martinoia E 2002 Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments, Trends Plant Sci. 7, 162–167.
- Nguyen C 2003 Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23, 375-396.
- Nordborg F and Olsson S 1999 Changes in soil mineralogy and exchangeable cation pools in stands of Norway spruce planted on former pasture land. Plant soil 207, 219-229.
- Nunan N, Kejian W, Young I M, Crawford J W and Ritz K 2003 Spatial distribution of bacterial communities and their relationship with the micro-architecture of soil. FEMS Microb. Ecol. 4,,: 203-215.
- Nye P H 1981 Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. Plant Soil 61, 7-26.
- Ochs M. I, Brunner W, Stumm and B. Cosovic. 1993. Effects of root exudates and humic substances on weathering kinetics. Water, Air Soil 68:213-229.
- Oelkers E H, Schott J and Devidal J L The effect of ammonium, pH and chemical affinity on the rates of aluminosilicate dissolution reactions. Geochim. Et Cosmochim. Acta 58, 2011-2024.
- Olsson P A, Chalot M, Bååth E, Finlay R D and Söderström B 1996 Ectomycorrhizal mycelia reduce bacterial activity in sandy soil. FEMS Microb. Ecol. 21, 77-86.
- Paces T 1983 Rate constant dissolution derived from measurement of mass balances in hydrological catchments. Geochim. Cosmochim. Acta 47, 1855-1863.
- Pandey P, Kang S C, Gupta C P and Maheshwari D K 2005 Rhizosphere competent *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). Curr. Microbiol. 51, 303-309.
- Paris F, Bonnaud P, Ranger J and Lapeyrie F 1995 In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi .1. Effect of K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> deficiency on phyllosilicate evolution. Plant Soil 177, 191-201.
- Paris F, Botton B and Lapeyrie F 1996 *In vitro* weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi .2. Effect of K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> deficiency and N sources on accumulation of oxalate and H<sup>+</sup>. Plant and Soil. 179, 141-150.

- Park C Y, Fenter P, Zhang Z, Cheng L W, Sturchio N C 2004 Structure of fluorapatite (100)-water interface by high-resolution X-ray reflectivity. *American Mineralogist* 89, 1647-1654.
- Patten C L, and Glick B R 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- Paul E A and Clark F E 1989 *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego.
- Poole E J, Bending G D, Whipps J M and Read D J 2001 Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytol.* 151, 553-766.
- Olsson P A, Chalot M, Bååth E, Finlay R D, Söderström B 1996 Ectomycorrhizal mycelia reduce bacterial activity in sandy soil. *FEMS Microb. Ecol.* 21, 77-86.
- Petsch S T, Edwards K J and Eglinton T I 2005 Microbial transformations of organic matter in black shales and implications for global biogeochemical cycles. *Paleoecol. Paleogeogr. Paleoclimatol.* 219, 157-170.
- Pommerening-Roser A and Koops H P 2005 Environmental pH as an important factor for the distribution of urease positive ammonia-oxidizing bacteria. *Microbiol. Res.* 160, 27-35.
- Priha O, Grayston S J, Pennanen T and Smolander A 1999 Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 187-199.
- Puente M E, Bashan Y, Li C Y and Lebsky V K 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol. (Stuttg).* 6, 629-642.
- Rambelli A 1973 The rhizosphere of mycorrhizae. *In* Marks GC and Kozlowski TT (ed.) *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*, Academic press, New York, pp 299-343
- Rangel-Castro I, Danell E, Borowicz J and Martin F 2000 *Cantharellus cibarius*: carbon and amino acid metabolism in relation to its fruit body-inhabiting fluorescent *Pseudomonas*. *Mushroom Sci.* 15, 87-93.
- Ranger J and Turpault M P 1999 Input-output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *For. Ecol. Manage.* 122, 139-154.
- Ranjard L, Lejon D P H, Mougél C, Schehrer L, Merdinoglu D and Chaussod R 2003 Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. microbiol.* 5, 1111-1120.
- Read D B, Gregory P J and Bell A E 1999 Physical properties of axenic maize root mucilage. *Plant Soil* 211, 87-91.
- Read D J, Perez-Moreno J 2003 Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? *New phytol.* 157, 475-492.
- Reddy M S, Kumar S, Babitaa K and Reddy M S 2002 Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* 84, 187-189.

- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H and Sessitsch A 2002 Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2261-2268.
- Richards B N 1987 The microbiology of terrestrial ecosystems. Wiley. New York, pp 399.
- Robert M, Razzaghe M K, Vicente M A, and Veneau G. 1979 Rôle du facteur biochimique dans l'altération des minéraux silicatés. Bull. Ass. fr. Etud. Sol, Sci. Sol 1:153-174.
- Robert M and Berthelin J 1986 Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. In Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin USA.
- Robinson D 1994 The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. New phytol. 127, 635-674.
- Robinson D (2001) Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants in patchy soil. Plant Soil 232, 41-50.
- Rodriguez H, Gonzalez T and Selman G 2001 Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. J. Biotechnol. 84, 155-161.
- Rogers B F, Tate R L 2001 Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. Soil Biol. Biochem. 33, 1389-1401.
- Rogers J R and Bennett P C 2004 Mineral stimulation of subsurface micro-organisms: release of limiting nutrients from silicates. Chem. Geol. 203, 91-108.
- Römheld V and Marschner H 1983 Mechanism of iron uptake by peanut *Arachis-Hypogaea* cultivar a-124b plants 1. Reduction chelate splitting and release of phenolics iron III. Plant physiol. 71, 949-954.
- Römheld V and Marschner H 1986 Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant physiol. 80, 175-180.
- Römheld V 1991 The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. Plant Soil 130, 127-134.
- Rosello-Mora R, Amman R 2001 The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 25, 39-67.
- Rosling A, Landeweert R, Lindahl B D, Larsson K H, Kuyper T W, Taylor A F S, Finlay R F 2003 Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol profile. New Phytol. 159, 775-783.
- Rouatt J W, Peterson E A, Katznelson H and Henderson V E 1963 Microorganisms in the root zone in relation to temperature. Can. J. Microbiol. 9, 227-236.
- Rovira A D 1965 Interaction between plant roots and soil microorganisms. Ann. Rev. Microb. 19, 241-266.
- Rufyikiri G, Nootens D, Dufey J E, Delvaux B 2004 Mobilization of aluminium and magnesium by roots of banana (*Musa* spp.) from kaolinite and smectite clay minerals. Appl. Geochem. 19, 633-643.
- Rupp L A and Mudge K W 1985 Ethephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of Mugo pine. Physiol. Plant. 64, 316-322.

- Rygiewicz P T and Andersen C P 1994 Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated below ground. *Arch. environ. contam. toxicol.* 369, 58-60.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 1989 *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, pp 1626.
- Sasaki K, Tsunekawa M, Ohtsuka T and Konno H 1998 The role of sulfur-oxidizing bacteria *Thiobacillus thiooxidans* in pyrite weathering. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 133, 269-278.
- Schack-Kirchner H, Wilpert K V, Hildebrand E E 2000 The spatial distribution of soil hyphae in structured spruce-forest soils. *Plant Soil* 224, 195-205.
- Schmidt W 2003 Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci.* 8, 188-193.
- Schöttelndreier M and Falkengren-Grerup U 1999 Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity. *Plant Soil* 209, 297-309.
- Schultze M and Kondorosi A 1998 Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32, 33-57.
- Schwartzman D W and Volk T 1989 Biotic enhancement of weathering and the habitability of Earth. *Nature* 340, 457-460.
- Schwyn B and Neilands J B 1987 Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 46-56.
- Seddoh F K 1973 *Altération des roches cristallines du Morvan (granite, granophyres, rhyolites). Etude minéralogique, géochimique et micro-morphologique*. Thèse. Université de Dijon, France, 377p.
- Séguin V, Courcesne, F, Gagnon C, Martin R R, Naftel S J and Skinnr W 2005 Mineral weathering of forested soil. *In: P.M. Huang. and G.R. Gobran (Editors), Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere*. Elsevier, pp 29-55.
- Sharma P and Swarup A 1995 Microbial oxidation of pyrites in relation to its efficiency in alkali soil reclamation. In *Environmental impact of soil component interactions: Volume 1: natural and anthropogenic organics*. Proceedings of a workshop entitled 'Impact of interactions of inorganic, organic and microbiological soil components on environmental quality, Edmonton, Canada, 11-15 August, 1992. CRC Press Inc., Boca Raton USA.
- Smith S E and Barker S J 2002 Plant phosphate transporter genes help harness the nutritional benefits of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends Plant. Sci.* 7, 189-190.
- Smith S A and Read D 1997 *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd Edition). London, UK: Academic Press.
- Souchie E L, Saggin-Junior O J, Silva E M R, Campello E F C, Azcon R and Barea J M 2006 Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ Brazil. *An acad bras cienc* 78, 183-193.
- Spaink H P, Kondorosi A and Hooykaas P J J 1998 *The rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. 24, 461-485. Kluwer Academic Publish. Dordrecht/Boston/London.

- Spyridakis D C, Chester G and Wildes S A 1967 Kaolinisation of biotite as a result of coniferous and deciduous seedling. *Soil Sc. Soc. Am.* 31, 203-210.
- Ström L 1997 Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants. *Oikos* 80, 459-466.
- Ström L, Godbold D L and Jones D L 2001 Procedure for determining the biodegradation of radiolabeled substrates in a calcareous soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 347-351.
- Sverdrup H and Warfinge P 1993 Calculating field weathering rates using a mechanistic geochemical model PROFILE. *Appl. Biochem.* 8, 273-283.
- Swoboda-Colberg N G and Drever J I 1992 Mineral dissolution rates: A comparison of laboratory and field studies. In: *Water-Rock Interaction*, Y. K. Kharaka and A. S. Maest (Eds.) Balkema, Rotterdam. 115-118.
- Tarafdar J C and Jungk A 1987 Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biol. Fert. Soils* 3, 333-344.
- Shamoot S, Mc Donald L, Bartholomew W V 1968 Rhizodeposition of organic debris in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 32, 817-820.
- Tadano T, Sakai H 1991 Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37, 129-140.
- Tamura T 1958 Identification of clay minerals from acid soils. *J. Soil Sci.* 9: 141-147
- Tice K R, Graham R C and Wood H B 1996 Transformations of 2:1 phyllosilicates in 41-year-old soils under oak and pine. *Geoderma* 70, 49-62.
- Thirioux L 1990 Mécanismes et cinétique de dissolution de matériaux phosphatés et amorphes en milieux acides chlorhydrique et citrique. Thèse de l'Université d'Orléans. 227p.
- Toro M, Azcon R and Barea J 1997 Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability ((sup32)P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4408-4412.
- Torsvik V, Daae F L, Sandaa R A, Ovreas L 1998 Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotech.* 64, 53-62.
- Trolldenier G 1987 Rhizosphere organisms - Potassium interactions with emphasis on methodology. In *Methodology in Soil-K Research. Proceedings of the 20th Colloquium of the International Potash Institute (I.P.I.), Baden bei Wien, Austria.* Ed. I.P.I. pp. 283-297. I.P.I., Bern.
- Turpault M P and Trotignon L 1994 The dissolution of biotite monocrystals in dilute HNO<sub>3</sub> at 24°C : evidence of an anisotropic corrosion process of micas in acidic solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 58, 2761-2775.
- Turpault M P, Uterano C, Boudot J P and Ranger J 2005 Influence of mature Douglas fir roots on the solid soil phase of the rhizosphere and its solution chemistry. *Plant Soil* 275, 327-336.
- Ullman W J, Kirchman D L, Welch S A and Vandevivere P 1995 Experimental-Evidence for Microbially Mediated Silicate Mineral Dissolution in Nature. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 209, 52-GE0C.

- Ullman W J, Kirchman D L, Welch S A and Vandevivere P 1996 Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chem. Geol.* 132, 11-17.
- Van Breemen N, Finlay R F, Lundström U, Jongmans A G, Giesler R and Olsson M 2000 Mycorrhizal weathering: A true case of mineral plant nutrition. *Biogeochemistry* 49, 53-67.
- Van der Putten W H, De Ruiter P C, Bezemer T M, Harvey J A, Wassen M, Wolters V 2004 Trophic interactions in a changing world. *Basic Appl. Ecol.* 5, 487-494.
- Van Hees P A W, Godbold D L, Jentschke G and Jones D L 2003 Impact of ectomycorrhizas on the concentration and biodegradation of simple organic acids in a forest soil. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 697-706.
- Van Scholl L, Keltjens W G, Hoffland E 2005 Effect of ectomycorrhizal colonization on the uptake of Ca, Mg and Al by *Pinus sylvestris* under aluminium toxicity. *Forest ecology and management.* 215, 352-360.
- Vansuyt G, Souche G, Straczek A, Briat J F, Jaillard B. 2003. Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants: effect of phosphorus and iron nutrition. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 27-33.
- Van Vliet-Lanoë B, Pellerin J, Helluin M 1995 Morphogenèse-Pédogenèse: Les héritages du dernier cycle glaciaire en forêt de Fougères (Ille-et-Vilaine, France). *Z. Geomorph. N. F.* 39, 4, 489-510.
- Vassilev N, Franco I, Vassileva M and Azcon R 1996 Improved plant growth with rock phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste. *Bioresource technol.* 55, 237-241.
- Vassilev N, Vassileva M and Nikolaeva I 2006 Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 137-144.
- Vaudequin-Dransart V, Petit A, Poncet C, Ponsonnet C, Nesme X, Jones J B, Bouzar H, Chilton W S and Dessaux Y 1995 Novel Ti plasmids in *Agrobacterium* strains isolated from fig tree and chrysanthemum tumors and their opinelike molecules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 311-321.
- Vazquez P, Holguin G, Puente M E, Lopez-Cortes A and Bashan Y 2000 Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils* 30, 460-468.
- Velbel M. A. (1993) Constancy of silicate-mineral weathering-rate ratios between natural and experimental weathering: implications for hydrologic control of differences in absolute rates. *Chemical Geology*; 105, 89-99.
- Vivas A, Vörös A, Biro B, Barea J M, Ruiz-Lozano J M and Azcon R 2003 Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. improving plant tolerance to Cd contamination. *Appl. Soil Ecol.* 24, 177-186.
- Vivas A, Barea J M and Azcon R 2005 Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environ. Pollut.* 134, 257-266.

- Vivas A, Biro B, Ruiz-Lozano J M, Barea J M and Azcon R 2006 Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* 62, 1523-1533.
- Wakelin S A, Warren R A, Harvey P R and Ryder M H 2004 Phosphate solubilization by *Penicillium spp.* closely associated with wheat roots. *Biol Fert Soils* 40, 36-43.
- Walker T S, Bais H P, Grotewold E and Vivanco J M 2003 Rot exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132, 44-51.
- Wallander H. and Wickman T 1999 Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 9,25-32.
- Wallander H 2000 Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil.* 218, 249-256.
- Watteau F and Berthelin J 1994 Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *Eur. J. Soil Biol.* 30, 1-9.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A and Lane D J 1991 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Weiss J V, Emerson D and Megonigal J P 2004 Geochemical control of microbial Fe(III) reduction potential in wetlands: comparison of the rhizosphere to non-rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 89-100.
- Weissenhorn I, Leyval C and Berthelin J 1993 Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant Soil* 157, 247-256.
- Welch S A and Ullman W J 1996 Feldspar dissolution in acidic and organic solutions: Compositional and pH dependence of dissolution rate. *Geochim. cosmochim. Acta* 60, 2939-2948.
- Welch S A, Barker W W and Banfield J F 1999 Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution. *Geochim. cosmochim. Acta* 63, 1405-1419.
- Welch S A and Ullman W J 1999 The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 degrees and 35 degrees C. *Geochim. cosmochim. Acta* 63, 3247-3259.
- Wenzel C L, Ashford A E and Summerell B A 1994 Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteid roots of seedlings of waratah (*Telopea speciosissima* (Sm.) R.Br.). *New Phytol.* 128, 487-496.
- White A F 1995 Chemical weathering rates of silicate minerals in soils. *In* Chemical Weathering Rates of Silicate Minerals (eds. A. F. White and S. L. Brantley), pp. 407-461. *Reviews in Mineralogy* 31. Mineralogical Society of America.
- White A F and Brantley S L 2003 The effect of time on the weathering of silicate minerals: why do weathering rates differ in the laboratory and field?
- Wilkins D A 1991 The influence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agric. Ecosyst. Environ.* 35, 245-260.
- Xie Z, Walther J V 1994 Dissolution stoichiometry and adsorption of alkali and alkaline earth elements to the acid-reacted wollastonite surface at 25°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 2587-2598.

- Young E J, Myers A T, Munson E L and Cowklin N M 1969 Mineralogy and geochemistry of fluorapatite from Cerro de Mercado, Durango, Mexico. U.S. Geological Survey Professional Paper, 650-D, D84-D93, U.S. Geological Survey, Washington.
- Youssef R A and Chino M 1987 Studies on the behaviour of nutrients in the rhizosphere: 1. establishment of a new rhizobox system to study nutrient status in the rhizosphere. J. Plant Nutr. 10, 1185-1195.
- Yuan L, Huang J G, Li X L and Christie P 2004 Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedling roots. Plant Soil 262, 351-361.
- Zhang F, Romheld V and Marschner H 1991 Release of zinc mobilizing root exudates in different plant species as affected by zinc nutritional status. J. Plant Nutr. 14, 675-686.
- Zheng D, Alm E W, Stahl D A, Raskin L 1996 Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4504-4513.
- Zheng S J, Ma J F, Matsumoto H 1998 High aluminium resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. Plant Physiol. 117, 745-751.
- Zimmer W, Aparicio C and Elmerich C 1991 Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*: identification and sequencing of a trpGDC cluster. Mol. Gen. Genet. 229, 41-51.

## ANNEXES



# Altération microbienne des minéraux

*Au croisement de plusieurs disciplines, la géomicrobiologie est une science jeune, mais essentielle pour l'environnement tant sur le plan de la recherche fondamentale, que sur un plan économique et social. Elle devrait constituer à l'avenir un outil solide en matière de gestion des sols et de qualité de l'eau.*

Stéphane Uroz\*, Christophe Calvaruso\*\*, Marie-Pierre Turpault\*\*, Pascale Frey-Klett\*

L'étude des interactions entre les micro-organismes et les minéraux, ou géomicrobiologie, est une science récente, issue du dialogue entre les chercheurs de différents domaines, tels la microbiologie, l'écologie, la géologie, la géochimie, la minéralogie et l'hydrobiologie. Cette discipline résulte de la découverte récente de micro-organismes capables non seulement de coloniser les environnements les plus extrêmes, jusqu'à considérés comme inaccessibles, mais aussi d'agir sur les cycles des éléments notamment en altérant les minéraux à la surface de la Terre. L'altération microbienne des minéraux joue un rôle essentiel dans l'environnement car elle participe à la libération des éléments nutritifs clés contenus dans ces minéraux, tels que le calcium, le magnésium, le potassium, le phosphore et le fer, indispensables à la vie de ces micro-organismes, mais aussi à celle des plantes et des animaux. C'est pourquoi comprendre les interactions micro-organismes/minéral, tout comme les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération biologique des minéraux, s'avère essentiel, aussi bien d'un point de vue fondamental, que pour la gestion économique et sociale de notre environnement. En effet, les connaissances acquises en géomicrobiologie devraient permettre de relever des challenges tels que la gestion durable de la fertilité des sols, la réhabilitation des sols industriels et urbains, le stockage des gaz, des déchets miniers et radioactifs dans les sols, ainsi que la gestion de la qualité de l'eau. L'accès à la séquence génomique de certains des micro-organismes impliqués dans les cycles des éléments minéraux (nutriments ou éléments toxiques) constitue un outil de choix pour cette recherche des mécanismes de l'altération microbienne des minéraux.

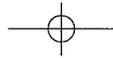
## Pourquoi s'intéresser à l'altération des minéraux ?

Les roches, notamment magmatiques et métamorphiques, ont été formées dans des conditions de hautes températures et de hautes pressions. Leur exposition aux conditions de surface, à l'eau de pluie, aux variations thermiques ainsi qu'à l'oxygène induit des réactions d'altération qui conduisent à la dissolution et à la cristallisation de nouveaux minéraux. Cette altération joue un rôle fondamental, car elle est à l'origine de la disponibilité des éléments minéraux bénéfiques ou toxiques pour les organismes vivants dans les milieux aquatiques ou terrestres. De plus, depuis des temps géologiques reculés, les minéraux de la Terre subissent un fractionnement important, d'origine géochimique et biologique, conduisant notamment à la formation des sédiments et des sols tels que nous les connaissons aujourd'hui. L'altération minérale et son impact considérable sur l'Homme et son environnement, n'est plus à démontrer, car elle influe sur l'évolution de nos paysages, la fertilité des sols ou encore sur la qualité de l'eau. Ce phénomène est aussi susceptible d'affecter notre intégrité physique ainsi que notre patrimoine architectural et artistique. En effet, les micro-organismes qui colonisent la surface de nos dents \*\* sont capables d'altérer la structure de l'émail causant des dégâts parfois importants. Par ailleurs, les statues, les monuments et façades des bâtiments en pierre par exemple, sont eux aussi soumis à une forte altération d'origine microbienne (figure 1). Cependant, l'altération biologique des minéraux ne cause pas que des désagréments : elle a

\* Inra, Unité Mixte de Recherche « Interactions Arbres/Micro-organismes », 54280 Champenoux ; uroz@nancy.inra.fr  
 \*\* Inra, Unité de Recherche « Biogéochimie des Éco-systèmes Forestiers », 54280 Champenoux

\*\* Nos dents ainsi que nos os sont des minéraux d'origine biologique, composés d'hydroxyapatite.





## Dossier *Écologie microbienne des sols*

aussi des applications industrielles. Certains micro-organismes sont notamment utilisés pour extraire des métaux ou des éléments toxiques présents dans des minerais pauvres ou des déchets miniers, comme dans le cas de la neutralisation des sulfures issus de la mine désaffectée de Matsuo au Japon. Ce processus est appelé bio-lixiviation. En conséquence, comprendre les mécanismes de l'altération nous permettra de mieux comprendre et gérer notre environnement, de trouver des moyens pour protéger notre patrimoine.

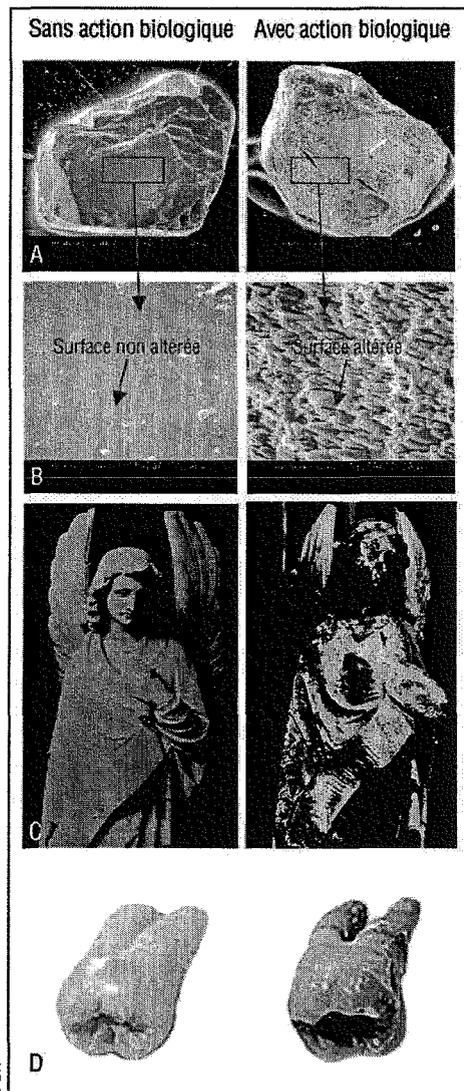
### Des organismes et des environnements variés

Une grande diversité d'organismes est capable de coloniser et d'altérer des surfaces minérales de nature variée et dans différents environnements, allant de la cavité buccale à la surface des roches et au sol.

La cavité buccale est un exemple méconnu d'écosystème dans lequel l'altération minérale a son importance. Elle peut être considérée comme un environnement extrême du fait de la forte acidité qui la caractérise. Les dents constituent un support stable sur lequel les bactéries vont pouvoir se fixer et se multiplier. Elles sont susceptibles d'y former des biofilms, véritables matrices complexes formées de polysaccharides dans lesquels cohabitent diverses bactéries et champignons. Ces bactéries utilisent les sucres que nous consommons et produisent en retour des acides tels que l'acide lactique. Leur action conduit d'une part à la formation de la plaque dentaire (micro-environnement favorable à la survie des micro-organismes) et d'autre part à une décalcification localisée de la dent : la carie (figure 1). Les souches bactériennes fréquemment impliquées dans ce processus appartiennent aux genres *Streptococcus* et *Lactobacillus* (1).

Les lichens sont aussi capables de coloniser et d'altérer pendant des décennies la même surface minérale d'un rocher ou d'un monument. Ils sont classiquement décrits comme une symbiose entre un champignon et une algue photosynthétique. Le fonctionnement de cette symbiose implique des échanges de matières favorables aux deux partenaires. Les sucres produits par l'algue durant la photosynthèse alimentent le champignon en carbone. En retour, parallèlement aux processus d'altération physique comme la succession de phases de gel-dégel ou l'action répétée des gouttes de pluie, les hyphes du champignon, qui explorent l'environnement proche du lichen et pénètrent dans les fissures des roches, produisent des molécules organiques comme l'acide oxalique et libèrent ainsi les éléments minéraux nécessaires à la croissance du lichen. Les observations au microscope électronique à transmission montrent une interaction fine de contact du lichen avec la surface minérale, *via* une sorte de ciment naturel contenant des polysaccharides, des argiles et des oxydes de différents éléments chimiques en phase d'être assimilés. Dans les zones inaccessibles, car de porosité trop faible, le lichen est également capable de mobiliser les éléments minéraux à distance *via* l'action d'acides organiques excrétés (2).

Le sol, et tout particulièrement l'environnement proche de la racine des plantes, appelé rhizosphère ou mycorrhizosphère\*, sont tous deux conditionnés par l'altération microbienne des minéraux. Tandis que certains micro-organismes telluriques vivent dans la solution du sol, d'autres colonisent la surface des minéraux (figure 2), dont ils peuvent affecter la structure. Par ailleurs, grâce aux sucres, acides organiques et acides aminés qu'elle produit au niveau de ses racines, la plante sélectionne et maintient une communauté microbienne rhizosphérique mixte, fongique et bactérienne, très active qui se multiplie, explore le sol environnant et mobilise des éléments nutritifs tels que le fer, le calcium, le potassium et le phosphore, à partir des minéraux du sol. Il apparaît qu'un minéral s'altère visiblement plus lorsqu'il est situé dans une rhizosphère que lorsqu'il est localisé dans un sol dépourvu de racines (figure 1). Cette altération ne peut néanmoins être imputée uniquement aux micro-

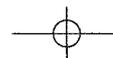


**Figure 1** Altération des minéraux : action des micro-organismes

Ces différents supports minéraux ont subi (partie droite) ou non (partie gauche) l'action du biologique. **A** et **B**) Observation au microscope électronique à balayage de cristaux d'apatite ayant séjourné ou non, quatre années dans la rhizosphère de hêtres de 80 ans (© Turpault, Inra). **C**) Statue détériorée ou non par l'action du biologique (d'après *International Biodeterioration & Biodegradation* 46 Th. Warscheida, J. Braamsb, *Biodeterioration of stone: a review* (2000) 343-368, © Elsevier) ; et **D**) dent saine ou cariée (© M.B. Ecole-plus.com).

(1) Loesche WJ (1986) *Microbiol Rev* 50(4) 353-80  
(2) Banfield JF *et al.* (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7) 3404-11

\*2 Selon que la racine est ou non associée à un champignon symbiotique mycorrhizien.



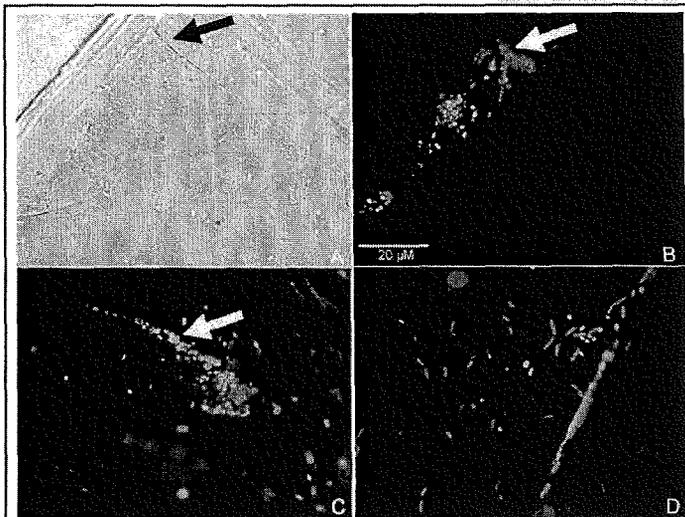
organismes qui colonisent cette niche. En effet, la plante joue aussi un rôle prépondérant dans l'altération biologique des minéraux dans la rhizosphère : la production de métabolites tels que les acides organiques ou les protons au niveau des racines, agit directement sur la cinétique d'altération des minéraux. Mais l'impact des bactéries n'est cependant pas négligeable. Il a été récemment montré que l'inoculation d'une souche bactérienne sélectionnée permet de multiplier par un facteur 1,4 à 1,5 l'altération d'un minéral de référence, la biotite, en comparaison avec l'effet d'une plante non inoculée (3).

### Une clé de la durabilité de nos écosystèmes forestiers ?

Comment expliquer que nos forêts poussent ? Question qui peut paraître étonnante en apparence, mais à laquelle la réponse n'est pas si simple. En effet, parmi les environnements terrestres, l'écosystème forestier est l'un de ceux qui ne subit généralement pas de fertilisation de la part de l'Homme, contrairement, par exemple, aux terres agricoles. D'où viennent les nutriments nécessaires à la croissance durable des écosystèmes forestiers ? Mis à part les apports liés aux pluies et aux retombées atmosphériques ainsi que le recyclage de la matière organique *via* la chute des feuilles et les racines mortes, les minéraux des sols constituent le seul réservoir en nutriments disponibles pour le fonctionnement de ces écosystèmes (figure 3). Mais comment s'opère cette altération minérale ? Il est important de rappeler ici que les forêts sont principalement situées sur des sols pauvres et souvent acides (4). Cette acidité a pour conséquence majeure pour les plantes de générer dans le sol de fortes concentrations en ions tels que les ions  $Al^{3+}$  et  $H^+$  qui inhibent la croissance racinaire. Dans les écosystèmes forestiers, les arbres se sont associés à des micro-organismes rhizosphériques (bactéries et champignons symbiotiques) avec lesquels ils coopèrent pour libérer les nutriments nécessaires à leur croissance (5, 6). Par exemple, il a été récemment montré que dans la rhizosphère de plants de chênes de 30 ans, et plus particulièrement au niveau des mycorhizes d'un champignon symbiotique ubiquiste dans nos forêts, *Scleroderma citrinum*, les proportions de bactéries capables de mobiliser le fer ou le phosphore à partir de réserves inorganiques, ainsi qu'à altérer un minéral de référence, la biotite, étaient significativement plus importantes au niveau de la mycorhize que dans le sol nu.

### Que sait-on de l'impact des micro-organismes ?

Les micro-organismes, et tout particulièrement les bactéries, sont remarquables dans leur diversité, qu'elle soit phylogénétique ou métabolique, et pour leur faculté à s'adapter et à coloniser les environnements les plus extrêmes que ne tolèrent pas les champignons. Comme décrit précédemment, les bactéries et les champignons sont capables de former des structures en biofilm que ce soit sur la surface des minéraux du sol, sur nos dents, sur des statues ou pierres de construction. Cette association permet aux micro-organismes de créer des micro-environnements plus favorables à leur survie, dans lesquels ils sont protégés contre les agressions extérieures.



**Figure 2** Colonisation microbienne de la surface des minéraux

Particules de biotite (phyllosilicate,  $K(Fe,Mg)_3AlSi_3O_{10}(F,OH)_2$ ) observées au microscope à transmission en lumière polarisée (A) et en épifluorescence (B). Les bactéries (de l'ordre de  $\mu m$ ) apparaissent comme de petits bâtonnets colorés en rouge ou en vert. Cette coloration est due à l'utilisation d'un colorant (LIVE DEAD®) qui se fixe sur les acides nucléiques, colorant ainsi les cellules bactériennes. Les bactéries intactes sont colorées en vert, tandis que celles qui présentent une membrane endommagée apparaissent en rouge. Les bactéries colonisent souvent les arrêtes (symbolisée par une flèche blanche) des particules de biotite (C). Une diversité morphologique des bactéries présentes sur cette particule minérale est observée (D).

© UROZ, INRA

Dans ces environnements particuliers, les bactéries prélèvent les nutriments et l'énergie nécessaires à leur croissance à partir de la matrice minérale, *via* notamment de nombreuses réactions d'oxydation (perte d'électron) et de réduction (gain d'électron) ou par la production de molécules chélatrices (molécules présentant la capacité de fixer les ions).

Contrairement aux eucaryotes supérieurs qui misent sur l'oxygène pour leur respiration, de nombreuses bactéries excellent dans l'utilisation d'autres accepteurs d'électrons terminaux pour subvenir aux besoins énergétiques de leur métabolisme. Ces bactéries se rencontrent souvent dans des environnements particuliers dépourvus d'oxygène, dans l'eau, dans les sols engorgés ou sur la face inférieure des biofilms qu'elles créent à la surface de minéraux ou dans les canalisations. Parmi ces bactéries, des souches appartenant aux espèces *Gallionella ferruginea*, *Geobacter sulfurreducens*, *Leptothrix sp.*, *Shewanella oneidensis* ou *Thiobacillus ferrooxidans*, ont été caractérisées pour leur capacité à oxyder ou à réduire des éléments chimiques simples comme le fer, le chrome, le manganèse, le mercure, l'arsenic, le sélénium ou l'uranium. On parle de corrosion ou de biocorrosion pour qualifier l'impact des bactéries sur ces composés métalloïdes simples. Les réactions chimiques impliquées sont relativement bien connues et associent réactions géochimiques et dégradation de la matière organique. Dans le cas de minéraux plus complexes contenant ces éléments chimiques, comme les silicates par exemple, les réactions chimiques induites par les bactéries conduisent à des modifications de structure des minéraux par dissolution ou transformation. D'un point de vue chimique, ces processus requièrent des couples rédox (couple d'éléments chimiques comprenant un oxydant et un réducteur) ayant des potentiels assez élevés pour produire la quantité d'énergie nécessaire au bon fonctionnement et à l'intégrité des cellules bactériennes impliquées. Notons que le fonctionnement de nos cellules est basé sur le même processus fondamental : capter de l'éner-

(3) Calvaruso C *et al.* (2006) *Appl Environ Microbiol* 72(2) 1258-66

(4) Badeau V *et al.* (1999) *Étude et Gestion des Sols* 6(3) 165-80

(5) Paris F *et al.* (1995) *Plant and Soil* 177, 191-201

(6) Frey-Klett P *et al.* (2005) *New Phytol* 165(1) 317-28



## Dossier Ecologie microbienne des sols

gie en couplant des donneurs d'électrons à des accepteurs d'électrons. Chez les bactéries, le flux électrochimique résultant de ce couplage produit de l'énergie utilisée par exemple pour le transport d'éléments en solution, la rotation des flagelles et la synthèse de composés chimiques riches en énergie connus, comme l'adénosine triphosphate (ATP).

Par ailleurs, dans les environnements aérobies ou micro-aérobies, il a été montré que les micro-organismes, qu'il s'agisse cette fois-ci de bactéries ou de champignons, produisent des molécules (des protons, des acides organiques et/ou des sidérophores) qui peuvent participer à l'altération des minéraux selon deux grands procédés : la complexation des éléments et l'acidification du milieu. C'est le cas notamment du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*, capable par exemple d'altérer un minéral de référence, la phlogopite, par une complexation des ions aluminium associée à une dissolution acide du réseau cristallin. Cette altération se traduit lors de l'observation aux rayons X par une augmentation de l'espace entre les feuillettes de la phlogopite (5). Le même type d'observation a aussi été réalisé pour un autre champignon ectomycorhizien, *Laccaria laccata*, (7, 8) ainsi qu'avec des bactéries appartenant au genre *Acidithiobacillus*, *Agrobacterium* ou *Bacillus*. À l'inverse, il a été observé que des micro-organismes pouvaient perturber la dissolution d'un minéral. Des études récentes ont en effet mis en évidence *in vitro* que les souches de *Shewanella oneidensis* ou de *Ramlibacter tataouinensis* inhibaient respectivement la dissolution de la calcite et du pyroxène, mais les mécanismes demeurent pour le moment méconnus (9, 10).

Parmi les acides les plus souvent cités comme étant impliqués dans les processus d'altération des minéraux silicatés, on trouve l'acide oxalique et l'acide acétique, mais aussi d'autres acides comme les acides formique, propionique, lactique, pyruvique, citrique, succinique ou sulfurique. Ces molécules sont capables d'acidifier le milieu, de casser les liaisons oxygène et de complexer les ions en solution. Cette dernière capacité est aussi décrite pour les sidérophores. Ces molécules très affines du fer sont excrétées par les micro-organismes en condition de carence en fer : elles complexent et transportent le fer jusque dans la cellule. Par ailleurs, l'enveloppe exopolysaccharidique des bactéries, du fait de sa charge électrique, est aussi capable de complexer des ions et pourrait ainsi contribuer au processus d'altération (11). L'action des acides organiques et des molécules complexantes sur l'altération des minéraux est donc double : ces molécules peuvent se fixer sur les surfaces minérales et littéralement en arracher des éléments, et elles peuvent complexer les éléments en solution, accélérant ainsi indirectement le taux de dissolution des minéraux. À l'heure actuelle, les molécules produites par les micro-organismes et impliquées dans l'altération sont loin d'être toutes identifiées.

### La génomique et les géosciences : un atout précieux

L'identification de plusieurs souches bactériennes aux propriétés altérantes a permis de faire de grandes avancées dans la compréhension des processus microbiens impliqués dans l'altération des minéraux, par la mise en évidence du rôle non seulement des réactions

d'oxydo-réduction, mais aussi de certaines molécules acides, des sidérophores ou des exopolysaccharides de l'enveloppe bactérienne.

Cependant la génétique de ces souches bactériennes est encore peu développée en comparaison à d'autres. Ceci s'explique par le fait que, si l'on considère les bactéries capables d'oxyder le fer ( $Fe^{2+}$ ) par exemple, la plupart n'ont été découvertes et caractérisées que dans les dix dernières années. L'accession récente au génome de bactéries telles que *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Geobacter sulfurreducens* ou encore *Shewanella oneidensis*, permet aujourd'hui de mieux comprendre le potentiel métabolique de ces souches, et ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation de leurs propriétés par l'Homme, en particulier pour l'extraction de minerais rares ou la gestion durable de l'environnement. En effet, les séquençages menés par *The Institute for Genomic Research* \*3 ont révélé des tailles de génome relativement réduites, comprises entre 2,9 Mpb pour *A. ferrooxidans* et 4,9 Mpb pour *S. oneidensis*, et ont permis de générer un véritable catalogue de gènes candidats susceptibles de coder pour des métabolismes propres à ces bactéries, par exemple la capacité à oxyder le fer. L'examen rapide du génome d'une souche de *G. sulfurreducens* a mis en évidence des capacités métaboliques jamais encore décrites : cette souche possède de nombreux systèmes senseurs permettant d'apprécier la tension en oxygène, l'état redox ou encore les niveaux d'énergie (12). Plus précisément, les génomes de *G. sulfurreducens* et *D. vulgaris* présentent de nombreuses séquences d'enzymes du type hydrogénase (enzyme catalysant la réduction des protons en hydrogène gazeux) et des protéines du type cytochrome c (protéines impliquées dans le transport des électrons).

Ainsi l'ensemble de ces données de génomique vient compléter les informations déjà acquises par des techniques de génétiques plus conventionnelles mais complémentaires \*4, notamment sur la souche d'*A. ferrooxidans*. Ces approches plus conventionnelles ont par exemple permis de proposer récemment un autre rôle pour certains métabolites secondaires produits par des bactéries du genre *Pseudomonas* : substances humiques, quinones, phenazines et riboflavine. La mutation du gène *phzB* \*5 rend par exemple la souche bactérienne PCL1391 de *Pseudomonas chlororaphis* incapable de dissoudre des oxydes de fer et de manganèse (13). Dans des conditions particulières d'oxygénation du milieu ces différentes molécules pourraient jouer un rôle dans la réduction d'éléments tels que le fer ou le manganèse et donc contribuer au processus d'altération des minéraux contenant des éléments sensibles à l'oxydo-réduction (14).

En conditions aérobies en revanche, très peu de gènes impliqués dans le processus d'altération des minéraux sont connus. Seuls des gènes participant à la synthèse de l'acide gluconique ont été identifiés dans des souches de *Pseudomonas*, d'*Erwinia* ou de *Rhanella*. La mutation de ces gènes conduit à une absence de production d'acide par la bactérie et s'accompagne clairement d'une incapacité à solubiliser des cristaux de phosphate de calcium (15). Cependant la même démonstration n'a pas été réalisée avec des minéraux complexes tels que les silicates. De la même manière, les gènes impliqués dans la synthèse des sidérophores semblent être de bons candidats, mais l'effet d'aucun de ces gènes n'a été testé sur des minéraux jusqu'à présent.

\*3 TIGR :

www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html

\*4 Constructions de banques d'ADN génomique, clonage et criblage pour une fonction précise.

\*5 *phzB* : gène impliqué dans la synthèse de la phenazine-1-carboxamide

(7) Leyval C, Berthelin J (1991). *Soil Sci Soc Am J* 55, 4, 1099-16

(8) Styriakova I. et al. (2004) *Can J Microbiol* 50(3) 213-9

(9) Luttge A, Conrad PG (2004). *Appl Environ Microbiol* 70(3) 1627-32

(10) Benzerara K et al. (2004) *Geomicrobiol J* 21, 341-9

(11) Banfield JF, Neilson KH (1997). *Reviews in Mineralogy* 35

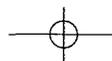
(12) Methé BA et al. (2003) *Science* 302(5652) 1967-9

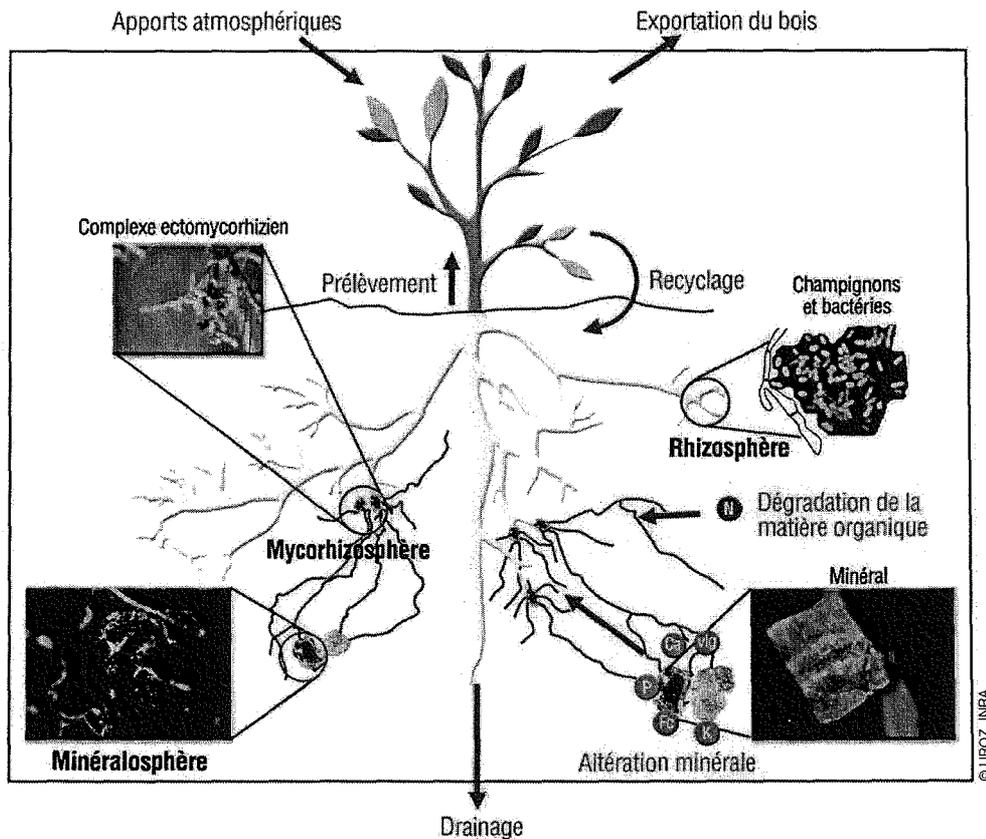
(13) Hernandez ME et al. (2004). *Appl Environ Microbiol* 70(2) 921-8

(14) Stams AJ et al. EM (2006) *Environ Microbiol Mar* 8(3)

371-82

(15) Babu-Khan S et al. (1995) *Appl Environ Microbiol* (1995) Mar 61(3) 972-8





**Figure 3** Implication des micro-organismes dans le cycle des nutriments et la croissance des arbres en forêt

Ce cycle s'organise autour de cinq grandes composantes : prélèvements, recyclage, apports atmosphériques, exportation du bois et drainage. Deux d'entre elles (prélèvements et recyclage) sont fortement influencées par les micro-organismes du sol, qui colonisent différentes niches. On parle de minéralosphère pour qualifier l'environnement proche d'une particule minérale, de même de mycorhizosphère et de rhizosphère pour le volume de sol soumis à l'influence des racines mycorhizées ou non. Une racine est mycorhizée lorsqu'elle est associée à un champignon symbiotique du sol appelé champignon mycorhizien. Les arbres des forêts boréales et tempérées sont principalement associés à des champignons symbiotiques appelés ectomycorhiziens, du fait de la structure des organes symbiotiques qu'ils forment sur les racines courtes de leur hôte. Le complexe ectomycorhizien qui en résulte comprend non seulement des tissus racinaires et des cellules de champignon symbiotique, mais aussi des bactéries et des champignons non symbiotiques qui cohabitent dans cette niche. L'enjeu actuel est de déterminer la contribution des différentes composantes de cette microflore aux processus de dégradation de la matière organique et d'altération minérale.

Beaucoup d'efforts et d'investissement en termes de recherche sont donc encore nécessaires à l'avenir pour compléter l'identification des déterminants moléculaires microbiens des processus d'altération des minéraux et répondre à un certain nombre de questions d'importance évolutive et écologique, notamment : la séquence des gènes impliqués dans l'altération est-elle conservée ? Les mécanismes gouvernés par ces gènes sont-ils génériques ? Quels sont les facteurs environnementaux régulant l'expression de ces gènes ?

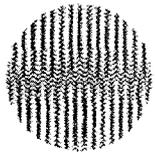
### La géomicrobiologie des sols : une discipline émergente à développer

Nous vivons actuellement les prémices d'une nouvelle discipline, la géomicrobiologie des sols. À l'avenir les études de l'écologie et de la génétique des micro-organismes impliqués dans l'altération des minéraux du sol devront se développer et se multiplier si l'on veut tirer pleinement parti des applications que cette nouvelle discipline pourra générer aussi bien dans le domaine industriel que dans celui de la protection de l'environnement. Dans l'état actuel de nos connaissances, de nombreuses hypothèses écologiques et mécanistes peuvent être émises

mais restent à vérifier. L'une d'entre elles pourrait être que les minéraux du sol constituent une niche écologique particulière, la minéralosphère, qui sélectionne les micro-organismes les plus aptes à altérer ces minéraux. La vérification de cette hypothèse nécessitera de s'intéresser aux souches microbiennes cultivables et à leurs potentialités, mais aussi de caractériser l'ensemble de la communauté microbienne présente sur les minéraux dans les sols, aussi bien du point de vue taxonomique que du point de vue fonctionnel. Le passage par l'étude des micro-organismes cultivables est un prérequis, certes restrictif car l'on estime que seuls 1 % des micro-organismes telluriques sont cultivables, mais indispensables quand on étudie une fonction dont on ne connaît pas les déterminants génétiques. L'étude de ce nouveau compartiment nécessitera des approches polyphasiques impliquant notamment la construction de banques génomiques et métagénomiques \*\* qui serviront à lier la fonction d'altération aux gènes et aux micro-organismes impliqués \*. Une fois les micro-organismes et les déterminants génétiques identifiés, des études de diversité fonctionnelle, des études d'expression et de localisation *in situ* des principaux gènes impliqués, devront être engagées afin de mieux comprendre les processus d'altération qui régissent la fertilité et la toxicité des sols. ●

\*\* voir article de N. Lombard et al., dans ce dossier.

\* voir article de P. Lemanceau et al., dans ce dossier.



**INRA**

**Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers**

**Effet de l'essence forestière sur le fonctionnement  
biogéochimique et biologique d'un écosystème forestier.**



**Présentation du site expérimental de  
la forêt de Breuil-Chenu, Morvan**



**Responsable scientifique : Jacques RANGER**  
**Responsable technique : Dominique GELHAYE**  
INRA Centre de Nancy  
Unité Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers  
54280 Champenoux  
tel : 03 83 39 40 68  
fax 03 83 39 40 69  
[ranger@nancy.inra.fr](mailto:ranger@nancy.inra.fr)  
[dgelhaye@nancy.inra.fr](mailto:dgelhaye@nancy.inra.fr)

avril 2006

## I- Avant propos

L'introduction massive de résineux plus productifs, et à développement plus rapide que la forêt native, soutenue financièrement par le Fonds Forestier National (FFN) et destinée à résorber le déficit de la filière bois après la seconde guerre mondiale, a conduit à une transformation importante des paysages, en particulier en basse et moyenne montagne. Le boisement des terres libérées par l'agriculture, associé à une sylviculture prônant des peuplements équiennes, mono-spécifiques et denses se traduit par une modification notable du paysage et parfois par un caractère inhospitalier de ces espaces boisés, qui sont relativement impénétrables dans leur phase initiale de développement.

Les observations ponctuelles trop vite généralisées sur l'évolution des sols, de la diversité biologique ou de la qualité des eaux de surface, ont conduit à des polémiques importantes sur l'opportunité des boisements résineux, traduisant en fait une prise de conscience écologique de notre Société dès les années 70.

Des études détaillées du rôle des boisements résineux sur les sols, les écosystèmes et les eaux de surface, ont alors été entreprises en France sous l'égide de la DGRST (Bonneau et al., 1977), puis du CNRS (PIREN) (Bonneau et al., 1982, 1983, 1984).

La méthode employée était naturellement celle qui pouvait donner rapidement des informations : la méthode dite des 'couples' de peuplement fut utilisée pour comparer les sols sous des peuplements existants, pour lesquels il avait été vérifié que seul le type de peuplement différait. Elle fut utilisée pour étudier l'évolution des sols (Nys, 1981, 1988), pour étudier le fonctionnement comparé des écosystèmes feuillus et résineux par approche analytique (Ranger J. et al., 1983, Ranger D. et al., 1983, Nys et al., 1983, Nys, 1988), pour étudier le fonctionnement comparé des écosystèmes feuillus et résineux par approche expérimentale *in situ* utilisant l'évolution de sondes minérales, les minéraux tests (Ranger et al., 1985, 1986, 1990 ; Augusto, 1999 ; Augusto et al., 2000, 2001, 2002).

Les limites de la méthode des couples, qui ne permet souvent pas de contrôler strictement tous les facteurs de variation, a conduit à la création d'un dispositif spécifique ou des plantations de diverses essences feuillues et résineuses ont été substituées à la forêt native. C'est l'origine du dispositif de Breuil installé en 1976 par la Station de Recherche sur les Sols et la Fertilisation, sous la Direction de Maurice Bonneau (Bonneau et al., 1977), et utilisé dans les projets actuels 25 ans après sa mise en place.

## II- Objectifs généraux du site atelier

Les recherches menées sur le site atelier de Breuil appartenant au réseau des sites Observatoires de Recherche sur l'Environnement (ORE F-OreT, coordonné par le GIP Ecofor) se situent sur le moyen et sur le long terme.

L'objectif général est d'étudier l'effet de la substitution d'essence sur le fonctionnement biogéochimique et biologique des écosystèmes. Les observations viseront à mettre en évidence les changements au niveau des sols (phase solide, solutions, phase minérale et phase organique). Les mécanismes sous-jacents seront identifiés, et les causes, physiques (pédoclimat induit), chimiques ou biochimiques (modifications de la qualité et de la quantité des matières organiques produites), biologiques (prélèvement de la végétation, diversité et fonctionnalité des populations microbiennes et fongiques associées) seront analysées à l'échelle du sol entier et de sites fonctionnels particuliers (humus, horizons organo-minéraux, rhizosphère), et à celle de l'écosystème.

Ces données permettront d'améliorer les connaissances théoriques sur les substitutions d'essences, et permettront d'étayer les recommandations pour les aménagements des écosystèmes forestiers. La substitution d'essence est en effet très fréquente dans les aménagements forestiers, et il est par conséquent important d'en identifier au plus juste les effets (Augusto et al., 2001).

Les mots-clés de ce projet sont les suivants ; écologie fonctionnelle, écologie quantitative, biogéochimie, biologie, cycles biogéochimiques, processus du fonctionnement des sols, approche systémique, modélisation

## III- Matériels et Méthodes

### III-1 Le site expérimental

- La situation géographique : le site expérimental est situé dans les parcelles 7 et 8 de la forêt domaniale de Breuil-Chenu (Nièvre-Morvan) (**figure 1**). Il constitue une série

Recherche dans l'aménagement du massif. L'altitude est de 650 m et la situation morphologique locale du terrain est un plateau légèrement incliné vers le Sud.

- Le climat général : la pluviométrie moyenne annuelle trentenaire à Château-Chinon est de 1280 mm (dominante hivernale, et minimums relatifs en avril et juillet), la température moyenne annuelle de 9°C (5,4°C de moyenne des minimas mensuels, et 12,5°C de moyenne des maximas mensuels) et l'ETP de 640 mm.
- La géologie : le substrat géologique est constitué par le granite leucocrate à gros grains et deux micas de la Pierre-qui-Vire, dont les compositions minéralogique et chimique sont les suivantes (Seddoh, 1973) : 23,5 % de quartz, 44 % de feldspath K, 28,5 % de plagioclase, 1,6 % de biotite chloritisée et 1,6 % de muscovite, conduisant à des teneurs de 0,5 % de MgO, 0,6 % de CaO, et 4,4 % de K<sub>2</sub>O. Ce granite est recouvert par une couche variable mais peu épaisse de limon éolien ; l'ensemble ayant subi une cryoturbation de surface variable mais généralisée au cours du quaternaire (Aurousseau, 1976).
- Les sols : Il s'agit de sols acides (pH compris entre 4 et 4,5) et désaturés (taux de saturation compris entre 5 et 15 % en fonction des horizons) de type Alocrisols. La texture du sol est sablo-limoneuse (60 % de sables et moins de 20 % d'argiles), plus argileuse dans l'arène en profondeur. Les blocs de granité altéré sont répartis de manière erratique sur le plateau, avec une augmentation de fréquence en rupture de pente. L'humus de la forêt native est dégradé (dysmoder épais) et une crypto-podzolisation apparaît en surface, morphologiquement marquée par un horizon brun chocolat discontinu. L'enracinement est profond.
- les peuplements : la forêt native, un taillis-sous-futaie vieilli à réserves de hêtre (dominant) (*Fagus sylvatica* L) et de chêne (*Quercus sessiliflora* Smith) et taillis de diverses essences (*Quercus sessiliflora* Smith, *Betula verrucosa* Ehrh., *Corylus avelana* L.) a été coupée à blanc et remplacée par des plantations de diverses essences feuillues et résineuses : le chêne (*Quercus sessiliflora* Smith), le Hêtre (*Fagus sylvatica* L.), l'épicéa commun (*Picea abies* Karst.), le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Franco), le sapin de Nordmann (*Abies nordmanniana* Spach.), le pin laricio de Corse (*Pinus nigra* Arn. ssp *laricio* Poiret var *corsicana*).

- le dispositif expérimental : il s'agit d'un dispositif en deux 'faux' blocs comprenant chacun les traitements suivants :
  - une parcelle représentant la forêt initiale qui n'est pas un témoin expérimental puisqu'elle n'a pas subi la préparation par andainage (bloc I) ou brûlage (bloc II) des rémanents d'exploitation.
  - les 5 parcelles plantées en hêtre, chêne, épicéa, Douglas, sapin et pin.
  - 4 parcelles d'épicéa commun, de Douglas de pin Laricio et de sapin de Nordmann, fertilisées et amendées dès la plantation pour tester a priori l'effet de la remédiation à l'acidification du sol lié à l'introduction des essences résineuses.

Le dispositif a été installé en 1976 dans le cadre d'un contrat DGRST « Modification de la fertilité des sols sous boisements artificiels de résineux purs » coordonné par Maurice Bonneau, Directeur de la Station de Recherches sur les Sols et la Fertilisation de l'INRA de Champenoux. : Maurice Bonneau (Directeur de Recherches), Claude Nys (Assistant de Recherche cartographie – sols), Michel Adrian (TR terrain), Dominique Gelhaye (Adjoint terrain), Jitka Lhomme (analyste chimiste).

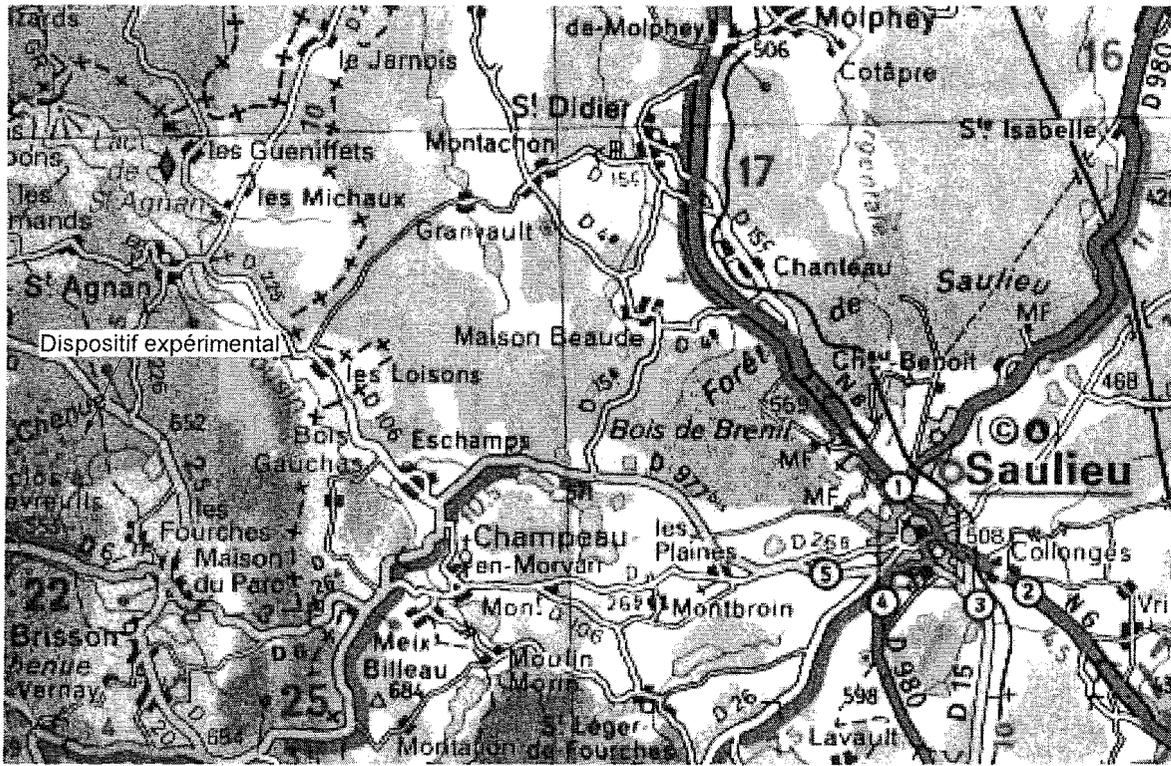
Chaque parcelle fait environ 10 ares. Les apports d'amendements et fertilisation sont les suivants : en 1979 (37 g de  $P_2O_5$ , 15 g de  $K_2O$ , 3,4 g de N appliqués par plant sous forme de superphosphate triple à 45 %, sulfate de potasse et ammonitrate) et en 1983 épandage en plein de 160 kg de  $P_2O_5$  et 1120 kg de CaO sous forme de Récalcit compacté (calcaire broyé phosphaté). La densité de plantation pour les peuplements feuillus est de 15000 plants/ha et de 1600 plants/ha pour les peuplements résineux.

Le plan de l'expérience est présenté à la **figure 2**.

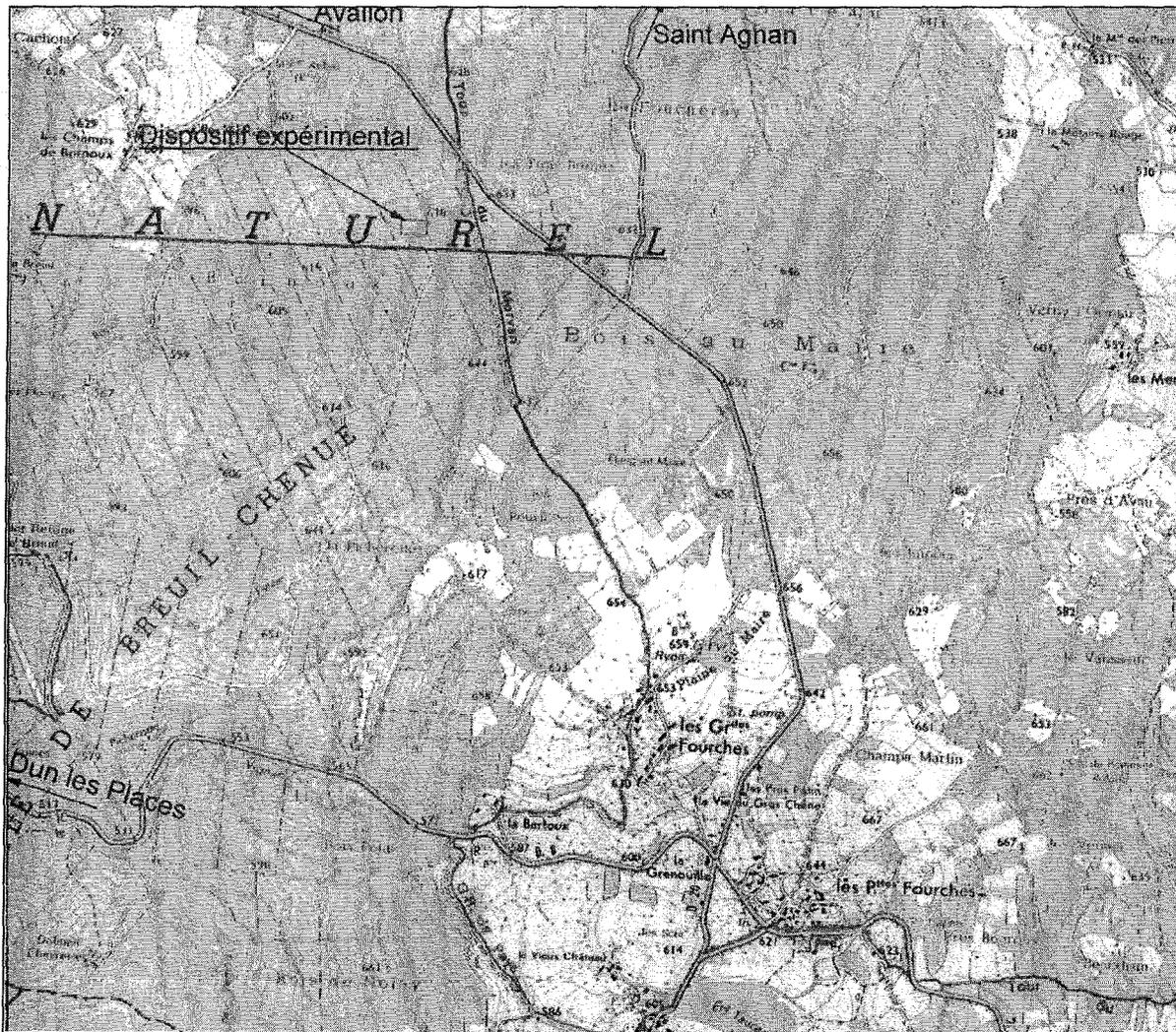
### III-2 – Le climat local et le pédoclimat

Une station météorologique a été mise en place en 2005. Elle est positionnée sur une tour de 12m où sont mesurés les paramètres suivants : température de l'air, intensité lumineuse globale, vitesse du vent, humidité relative de l'air, pluviométrie. Ces données permettent de calculer l'ETP locale sur un pas de temps semi-horaire. De plus, la pluie fait l'objet d'un prélèvement journalier grâce à un partiteur automatique ; les échantillons seront analysés pour quantifier les dépôts humides.

Le microclimat du peuplement et le pédoclimat sont observés depuis 2001 dans deux couples de peuplements feuillus et résineux : hêtre-Douglas et chêne-épicéa. La température et l'humidité relative de l'air sont mesurées à 1,30 m au pas de temps horaire. La température du sol est mesurée sous la litière (4 répétitions), à 15 cm (4 répétitions, et à 30 et 60 cm de profondeur (2 répétitions). L'humidité du sol est mesurée sur 5 profils au pas de temps de deux heures, par peuplement, à 15, 30 et 60 cm de profondeur, par des sondes enterrées (TDR Système Trase BE Soil Moisture).



extrait de la carte Michelin 243 1:200000

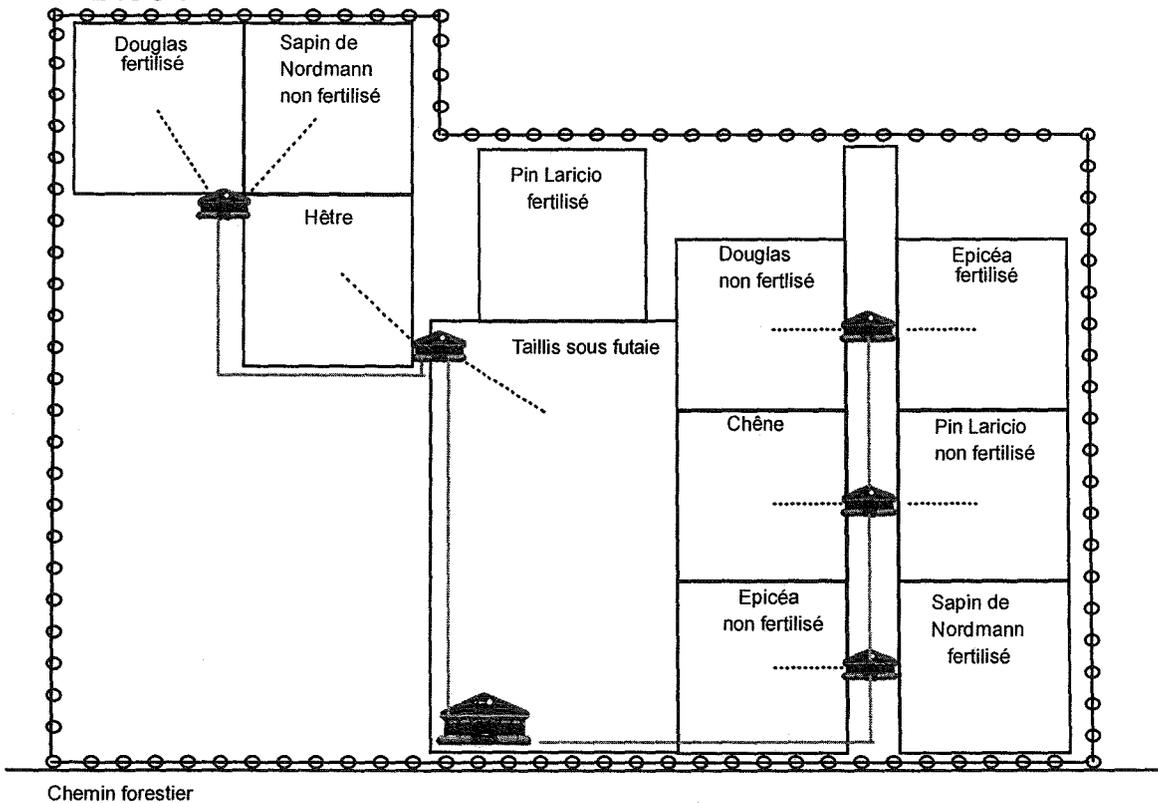


extrait de la carte ign 1:25000 monsauche-les settons 2823 0

Figure 1

# Forêt de Breuil-Chenué

## Bloc I



## Bloc II

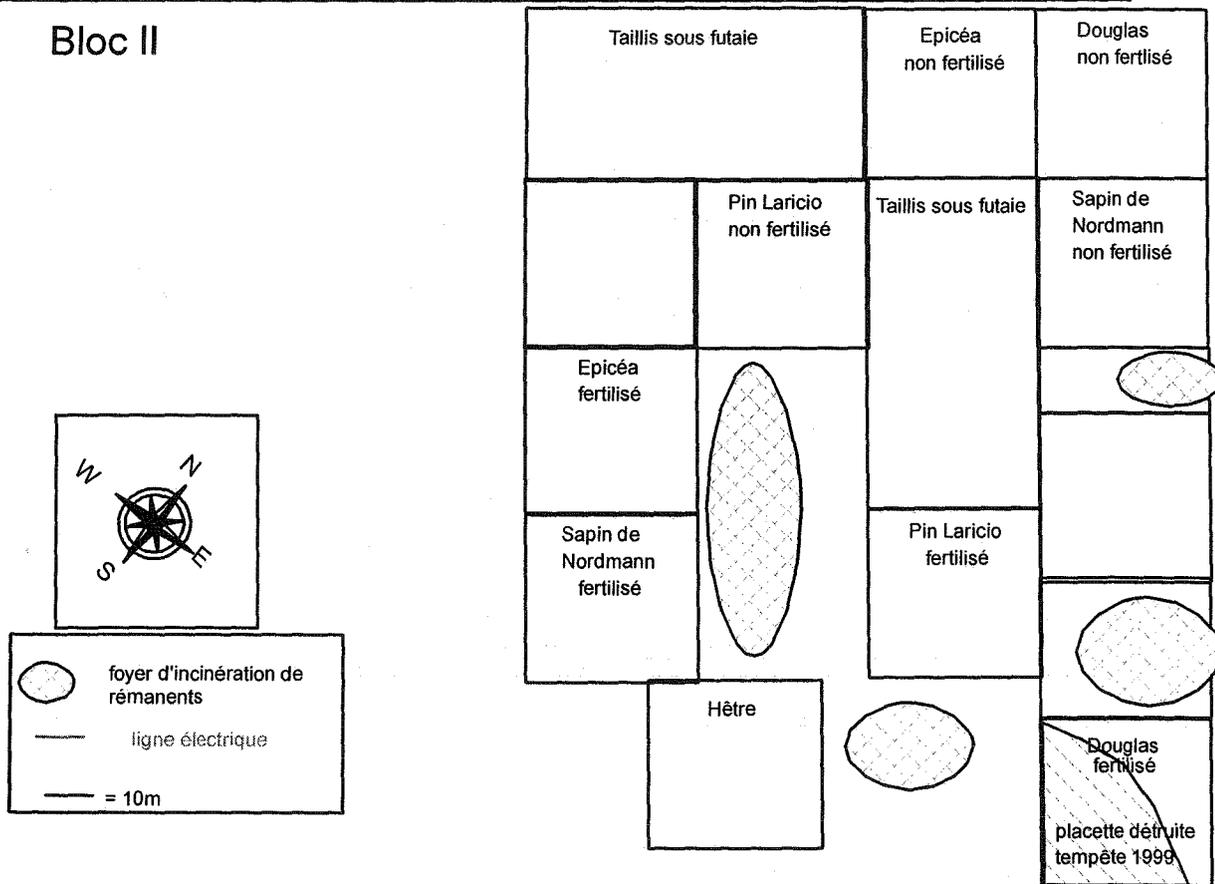


figure 2

### III-3 Mesure des stocks d'éléments dans les compartiments

Le **tableau 1** décrit les mesures réalisées ou en cours de réalisation, sur les peuplements et les sols pour entre autres quantifier les stocks des différents éléments, et les réserves en eau et éléments nutritifs disponibles pour la végétation.

Le dispositif implique un suivi diachronique car l'effet de peuplements ne présentant pas la même vitesse de développement doit être appréhendé au cours des différents stades de leur développement.

<b>Compartiment</b>	<b>Mesure des stocks</b>
<b>Biomasse et minéralomasse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inventaire annuel de tous les peuplements</li> <li>- Prélèvement destructif d'arbres répartis sur toutes les classes de circonférence dans le bloc I (résineux :10 arbres ; feuillus : 15 arbres)</li> <li>- Mesures in situ des paramètres dendrométriques et des poids des différents compartiments (tronc à différentes découpes ; branches)</li> <li>- Echantillonnage par compartiment pour mesurer le degré de siccité et réaliser les analyses chimiques totales (C, N, P, K, Ca, Mg)</li> <li>- Etablissement de tarifs de biomasse et minéralomasse</li> <li>- Quantification des biomasse et minéralomasse compartimentées</li> </ul>
<b>Sols</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Description d'une fosse pédologique dans chaque peuplement</li> <li>- Prélèvement des échantillons pour une caractérisation globale des sols</li> <li>- Prélèvement systématique en 16 points (plantations) ou 20 points (forêt native) répartis sur une grille géoréférencée pour tester l'existence d'une structure géographique liée la variabilité spatiale naturelle ou induite par l'andainage.</li> <li>- 'horizons' prélevés [0-5], [5-10], [10-15], [15-25], [25-40], [40-55], [55-70]</li> <li>- Mesures physiques : granulométrie (4 profils complets dans chaque peuplement + horizons profonds de la fosse centrale) ; densité apparente (tous les prélèvements) ; densité réelle, stabilité structurale, infiltrométrie, courbes rétention en eau (sur des sous-échantillons)</li> <li>- Mesures physico-chimiques et chimiques : <ul style="list-style-type: none"> <li>- éléments totaux : <ul style="list-style-type: none"> <li>• horizons holorganiques : C, N, P K Ca, Mg sur 1/2 profils</li> <li>• horizons organo-minéraux et minéraux : tous éléments sur 2 profils par peuplement</li> </ul> </li> <li>- éléments libres : Fe, Al, Si (voire autres éléments de type Mg) sur 8 profils par peuplement de 0 à 15 cm et 4 profils sur tout le profil ; méthodes</li> </ul> </li> </ul>

	<p>Mehra et Jackson (1962), Tamura (1958), Tamm (1922), McKeague et Schuppli (1982)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- éléments échangeables : analyse systématique sur tous les échantillons (Rouiller et al, 1981)</li> <li>- pHeau, pH KCl, tous les échantillons</li> <li>- Corg, Norg, [0-5], [5-10], [10-15], [15-25], [25-40]</li> <li>- <i>Passi.</i> sur tous les échantillons (Duchaufour et Bonneau, 1959)</li> </ul> <p>- Minéralogie : séparations granulométriques et détermination qualitative des minéraux par RX et analyses chimiques ; étude des argiles y compris les phases très fines (&lt;0,1<math>\mu</math>) (4 profils par peuplement en surface et 2 en profondeur)</p>
--	--

#### III-4- Mesure des flux entre les compartiments de l'écosystème

Le **tableau 2** résume les flux mesurés dans cette expérience et les méthodologies utilisées.

<b>Flux mesuré</b>	<b>Méthode</b>
<b>Chutes de litière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 collecteurs de 0,5 m<sup>2</sup> dans les plantations et de 10 collecteurs dans le TsF</li> <li>- Récolte tous les 3 mois (matière sèche, tri par compartiments, contenu minéral)</li> </ul>
<b>Prélèvement de nutriments par les arbres</b>	- Quantification à partir de l'immobilisation moyenne annuelle et des restitutions par les litières et la récréation (Ranger et Bonneau, 1984).
<b>Minéralisation de la matière organique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minéralisation potentielle de C et N (nette et brute) effectuées sur des échantillons frais de sols et mis à incuber en conditions contrôlées (Kunde, 2001 ; Colin-Belgrand et al., 2002, Pasteur, 2005, Zeller, ; 2005)</li> <li>- Mesures de biodégradation in situ : substrats modèles cellulose &amp; lignine, litières (Moukoumi et al., 2006).</li> <li>- Etude des populations responsables de la biodégradation (Kulhankova et al., 2006)</li> <li>- Mise en place de litière de hêtre marquée par <sup>15</sup>N pour suivre la dynamique de décomposition dans les hêtraies (native et plantation)</li> </ul>

	(Zeller et al., 2001)
<b>Pluies incidentes</b>	- Pluviomètre avec récolte journalière d'échantillon
<b>Pluiolessivats</b>	- 4 gouttières de 2m par peuplement (remplacées par 4 bacs en hiver) - 10 collecteurs de ruissellement de troncs (2 fonctionnels en hiver)
<b>Solutions du sol</b>	- Litières : 2 répétitions de 5 gouttières de 50 x 4 cm par peuplement - Horizons organo-minéraux : 5 répétitions de bougies poreuses à - 15 cm ; - 30 cm ; - 60 cm dans tous les peuplements + 4 répétitions à -100 cm dans le peuplement témoin de la forêt native. - Mini-horizons de surface 4 fois 8 répétitions à -5 et -10 cm dans TsF, épicéa et chêne - Les solutions fortement liées seront prélevées par centrifugation d'échantillons frais (bloc II) (Jaffrain et al., 2006)

La **planche photo** de la dernière page de couverture présente ces matériels installés dans le cadre du site de Breuil.

Détails méthodologiques concernant les solutions (pluies, pluiolessivats, solutions du sol):

- Prélèvements : systématiques toutes les 4 semaines depuis Octobre 2001
- Conditionnement : filtration sur filtre inerte à 0,45 $\mu$  ; stockage en chambre froide en attendant leur analyse réalisée en général sous huitaine
- Analyse chimique minérale:
  - Analyses totales : par spectrophotométrie d'émission atomique à plasma induit (ICP Ultrase Jobin Yvon) pour les éléments Si, Al, Fe, Ca, Mg, Mn, Na, K, S et P ; pour C et N l'analyse de COD et NOD sont effectuée sur analyseur Shimatzu ; pour N minéral, analyse sur Traacs 2000 par spectrométrie moléculaire microflux.
  - Analyses spécifiques : les spéciations chimiques sont réalisées pour
    - . N (Ntot, Norg (Shimatzu), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) : spectromètre moléculaire microflux, chromatographie ionique et analyseur N organique.
    - . S (Stot, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) : ICP + Chromatographie ionique
    - . Al (Al monomérique, Al polymérique, Al lié à MO, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, F, P, Si etc...) : extraction et modélisation à partir d'analyse en ICP et en Chromatographie ionique (au Limos par JP Boudot protocole publié, Boudot et al., 2000)
- Analyse chimique organique :

Le carbone organique dissous (COD) est caractérisé par spectrométrie UV et décomposition des spectres (Simonsson et al., 2003 ; Jaffrain, 2006) pour l'encombrement moléculaire et les

groupes fonctionnels. Un protocole spécifique est en cours de mise au point pour l'étude du caractère complexant de la COD (Titeux, travail en cours).

### III-5 Minéralisation de la matière organique

La biodégradation de la matière organique est étudiée pour la matière organique fraîche (MOF) et pour la matière organique humifiée (MOH).

La biodégradation des MOF est suivie par l'intermédiaire de substrats modèles ou de litières mis à décomposer *in situ*. Des sachets micro-poreux contenant de la cellulose, de la lignine ou des litières de feuilles sont placés dans les 5 premiers cm des horizons superficiels de 4 peuplements (TsF, hêtre chêne Douglas et épicéa). Des tests ont été réalisés sur des mélanges feuillus-résineux pour le suivi de la perte de masse et d'indicateurs biochimiques divers.

La biodégradation des MOH a été observée en conditions contrôlées sur des échantillons prélevés dans les horizons de surface (0-5 cm en général) des sols sous tous les peuplements (forêt native et plantations) à différentes dates, dans les deux blocs. Les paramètres mesurés sont : la minéralisation du carbone par le dosage du CO<sub>2</sub> dégagé, la minéralisation de l'azote par le dosage de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, les composés organiques, les éléments minéraux hydrosolubles et les éléments minéraux échangeables et biodisponibles. Une approche spécifique a été réalisée sur la minéralisation de fractions granulométriques correspondant à des liaisons carbone-matière minérale de plus en plus forte allant des fractions grossières aux fractions fines. L'objectif est de discriminer les MOH récentes issues des peuplements actuels de celles relictuelles du peuplement primitif.

### III-6- Etude de la rhizosphère

La rhizosphère est définie comme la zone étroite du sol qui est influencée par le fonctionnement de la racine notamment par les exsudations et le prélèvement. Des mesures semblables à celles pratiquées dans les horizons entiers sont réalisées (**tableau 3**) après adaptation des méthodes (protocoles échantillonnage, capteurs, protocoles analytiques,...). Ces mesures sont réalisées sur les différents compartiments de la rhizosphère (sol, solution, microbiologie).

<b>Compartiments</b>	<b>Mesures</b>
<b>Sols</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prélèvement systématique en 18 fosses calibrées (35*80 cm) par plantation à trois niveaux [0-3], [3-10], [10-23]</li> <li>- Séparation du sol rhizosphérique (accolé aux racines fines) et du sol global.</li> <li>- Mesures physico-chimiques et chimiques sur tous les échantillons tamisés à 200µm: éléments échangeables (Rouiller et al, 1981) ; pHeau, pH KCl ; Corg, Norg</li> <li>- Minéralogie sur des échantillons moyens: séparations granulométriques et détermination qualitative des minéraux par RX et analyses chimiques ; étude des argiles y compris les phases très fines (&lt;0,1µ) ; analyses des éléments libres.</li> </ul>
<b>Solutions du sol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Par peuplement, 12 répétitions de solution rhizosphérique et solution globale</li> <li>- Solutions récoltées à l'aide de micro-capteurs (Göttlein, 1990) à travers une fenêtre racinaire (prélèvement toutes les 4 semaines et mêmes analyses que celles pratiquées sur les solutions des horizons entiers). Mise au point méthodologique pour les mesures sur faibles volumes.</li> </ul>
<b>Microbiologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prélèvement de sol dans le peuplement de chêne, dans et hors mycorrhizosphère de scléroderme à trois niveaux de profondeur</li> <li>- Collection de bactéries et de champignon pour tous les échantillons</li> <li>- Bio-tests pour définir l'agressivité de ces souches envers les minéraux du sol</li> </ul>

De plus, certains flux potentiels (minéralisation et altération des minéraux) sont également déterminés à l'échelle de la rhizosphère (**tableau 4**).

<b>Flux</b>	<b>Méthodes</b>
<b>Minéralisation de la matière organique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sur les échantillons de sol de surface de 5 fosses par peuplement (sol rhizosphérique et global) prélevés</li> <li>- Mesures de minéralisation potentielle (brute) effectuées sur des</li> </ul>

	échantillons frais de sols et mis à incuber en conditions contrôlées (Colin-Belgrand et al., 2002)
<b>Altération biologique des minéraux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pour chaque peuplement du bloc 2, et pour 2 horizons</li> <li>- Approche expérimentale utilisant des minéraux-test (apatite, plagioclase et phlogopite) placés dans des sacs à mailles variables (minéraux accessibles ou non aux racines) mis à incuber <i>in situ</i>.</li> </ul>

Parallèlement à l'approche *in situ* des travaux en conditions contrôlées visent à déterminer les mécanismes mis en jeu dans l'altération des minéraux et la biodégradation des matières organiques.

### III-7 Etude concernant les micro-horizons diagnostics de surface

Le sol 'climax' se caractérise par le développement d'une crypto-podzolisation de surface assez bien marquée morphologiquement. Il est donc important d'identifier ce mécanisme et d'en qualifier les traits (matière organique, minéralogie, solutions) et l'origine (acido-complexolyse et, et/ou dégradation hydromorphe ?). Le bouleversement voire le léger décapage superficiel du sol lors de la préparation du site pour la plantation font que cet horizon est peu net et relictuel dans les plantations. Il sera intéressant de voir quelle essence favorise le développement le plus rapide de ce mécanisme et d'en analyser les causes

Les test suivants seront réalisés (**tableau 5**):

<b>Phase solide organique</b>	Caractérisation globale (C, N) et fractionnement granulométrique
-------------------------------	--

<b>Phase solide minérale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minéralogie totale et minéralogie des fractions argileuses en particulier des fines qui devraient concentrer les smectites de dégradation</li> <li>- Approche expérimentale utilisant des vermiculites calées (Al) au laboratoire et mises à incuber in situ.</li> </ul>
<b>Solutions du sol</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Installation de collecteurs de solution de faible dimension (rhizons) pour récolter les solutions dans les micro-horizons de surface</li> <li>- Spéciation chimique (organique et minérale)</li> </ul>

### III- 8 Observation des acteurs biologiques et identification de leur activité

#### III-81 La macroflore fongique

Les observations portent sur les communautés des champignons ectomycorhiziens et les communautés de champignons saprophytes. Ces deux communautés essentielles pour la nutrition minérale des arbres et la décomposition de la matière organique, sont décrites par plusieurs campagnes de terrain (printemps et automne). Leur fonctionnalité sera décrite à partir des connaissances acquises et des indicateurs isotopiques de type  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  traçant l'origine du carbone utilisé. De plus, les techniques de biologie moléculaire permettront de comparer les profils locaux aux bases de données existantes ; une étude spécifique sera conduite sur *Laccaria* sous feuillus natifs et Douglas introduits pour comparer cette population.

#### III-82 La microflore du sol

Les observations portent sur l'abondance, la diversité des micro-organismes du sol et abordent le domaine de l'activité. Ces déterminations portent sur 4 traitements : épicéa, Douglas, chêne, hêtre de plantation et taillis sous futaie natif.

L'abondance est estimée à travers la mesure de biomasse microbienne, en utilisant la méthode de fumigation-extraction. Avec cette méthode, on détermine la quantité globale de matière organique « vivante », que l'on exprime d'une part en valeur absolue, d'autre part en pourcentage du carbone organique total du sol.

La diversité microbienne est appréciée par différentes approches. La microflore globale par la méthode dite des empreintes génétiques, identifiée à partir de l'ADN microbien directement extrait du sol. Les profils de bandes obtenus sont indicateurs de la complexité et de la

structure populationnelle des communautés bactériennes et fongiques. Les populations fongiques et bactériennes colonisant les matériaux en incubation *in et/ou ex situ* sont analysées par diverses techniques de biologie moléculaire. L'analyse statistique permet de discriminer les peuplements.

L'activité est abordée par diverses méthodes : utilisation des traceurs isotopiques, utilisation de marqueurs spécifiques d'activité, activité potentielle via les banques de données, approche moléculaire par l'étude de l'ARN.

### III-9 Modélisation biogéochimique

Elle consistera à utiliser un modèle mécaniste (WHAM) pour étudier la distribution des espèces chimiques dans les solutions (c.a.d. la spéciation aqueuse), en plaçant une attention toute particulière sur la complexation des éléments métalliques (en particulier Al, mais pas exclusivement), aux principaux composés du carbone organique dissous (COD). Cet outil devrait aider à appréhender un éventuel effet essence sur la spéciation des solutions et indirectement sur certaines réactions hétérogènes, en particulier celles de dissolution et de précipitation des minéraux.

La modélisation couplée biogéochimie-transferts sera ensuite progressivement utilisée pour le calcul de bilan des éléments nutritifs au sein des différents écosystèmes, notamment à travers le calcul du drainage profond et du flux d'altération (utilisation du modèle MIN3P). Une des étapes préliminaires sera de simuler le bilan hydrique et de valider rigoureusement cette modélisation par rapport aux mesures d'humidité du sol par sondes TDR.

### III-10 Base de données

Actuellement, l'ensemble des données concernant le climat (mésoclimat et pédoclimat), le sol (solide et solutions) et la végétation, a été mis en base de données structurée de type ACCESS par Dominique Gelhaye et Pascal Bonnaud (AI – BEF Nancy), avec l'assistance de Damien Maurice (IE GIP Ecofor).

Ces données sont accessibles aux acteurs des projets menés sur Breuil, moyennant le respect des critères habituels pour leur utilisation.

### **Annexe 3 : Protocole d'analyses des fractions argileuses du site de Breuil**

Les 12 échantillons de sol sont au préalable soumis à **une destruction de la matière organique** qui dure plusieurs mois. La destruction de la matière organique est engendrée par l'ajout d'eau oxygénée et par un léger chauffage (fig. 1 première phase). Le but étant de détruire la matière organique sans altérer la phase minérale. Lorsque la totalité de la matière organique est détruite, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à ce que tous les échantillons de sol soient dépourvus de matière organique.

**Une séparation des différentes fractions granulométriques** (argiles : particules de diamètre inférieures à 2 µm, limons fins : particules de diamètre compris entre 2 et 20 µm, limons grossiers : particules de diamètre compris entre 20 et 50 µm et sables fins : particules de diamètre compris entre 50 et 200 µm) est ensuite réalisée à l'aide d'allonges pour les argiles et les limons fins (fig. 1 deuxième phase) et de tamis pour les limons grossiers et les sables fins (fig. 1 troisième phase). Une partie de la fraction argileuse (< 2µm) est envoyée à l'université de Poitiers où est effectuée une séparation de la fraction (< 0.1µm) par L. Caner et L. Mareschal (stage de 6 mois de DEA de Science du Sol).

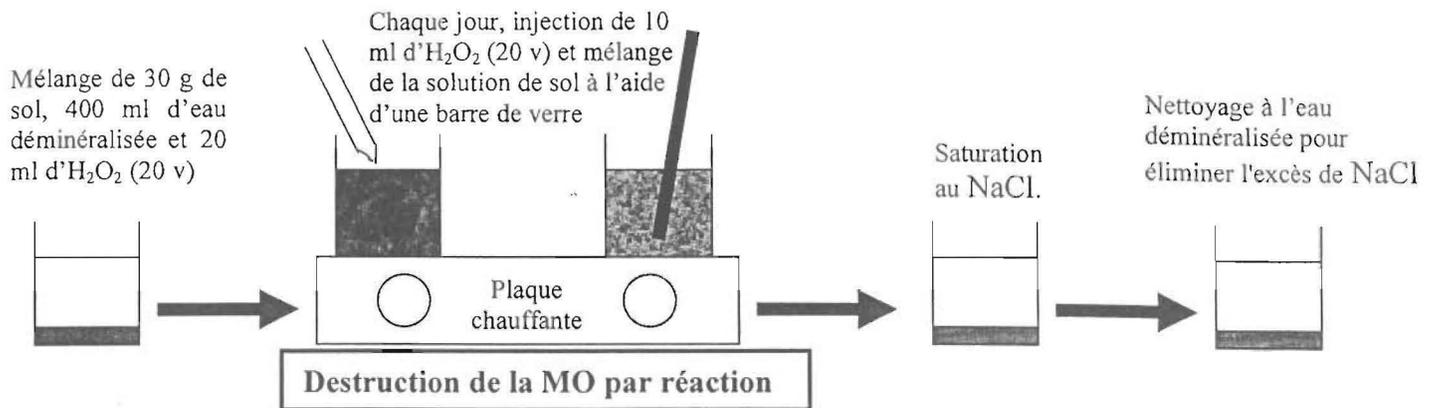
**Une détermination de la granulométrie** (proportion des différentes fractions granulométriques) dans les échantillons de sol est alors réalisée (fig. 1 quatrième phase).

Les deux fractions argileuses (< 0.1 µm et < 2µm) seront par la suite soumises à différentes **analyses** (fig. 1 cinquième phase) : traitement au tricitrate-bicarbonate-dithionite (traitement Mehra-Jackson) et au citrate à chaud (traitement Tamura) afin d'extraire certains composés amorphes. Le fer et l'aluminium extraits sont dosés à l'aide de la torche à plasma (JY180 ULTRACE). Ces échantillons bruts et après traitement sont saturés par Mg et K et sont analysés par diffraction de RX (Siemens D5000) sur dépôts orientés. Les diffractogrammes obtenus sont décomposés à l'aide du logiciel (DECOMP). Ainsi une analyse fine des minéraux interstratifiés peut être obtenue.

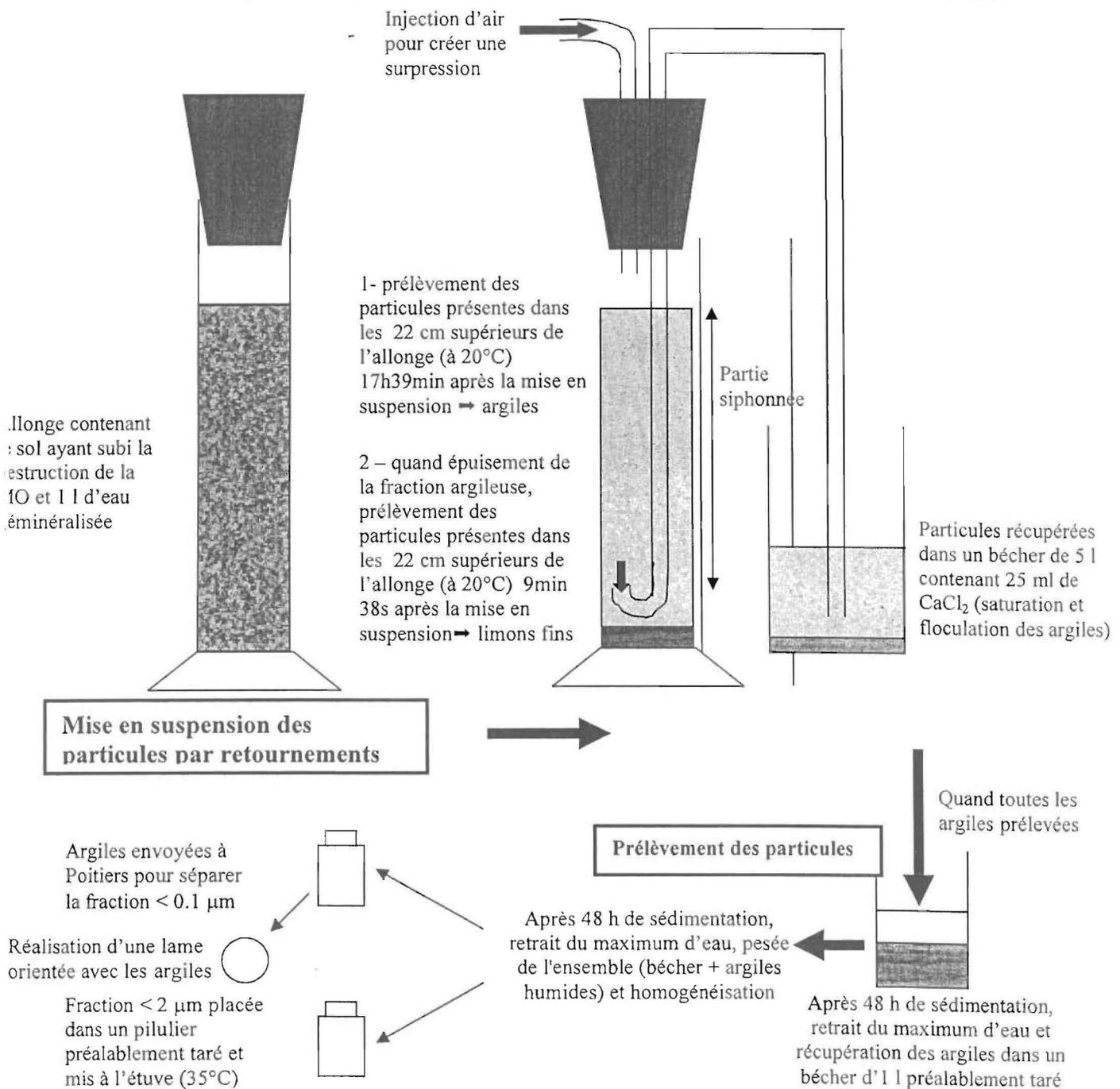
Remarque : Tout le travail effectué dans cette partie minéralogie des sols est détaillé dans un cahier de laboratoire INRA intitulé "Sols de Breuil" et dans un fichier word intitulé "protocole d'analyses" dans le dossier Sols de Breuil.

## Première phase : destruction de la matière organique

Figure 1 : Représentation des différentes étapes de traitement des sols rhizosphériques et globaux



## Deuxième phase : séparation des argiles et des limons fins selon la loi de Stokes :



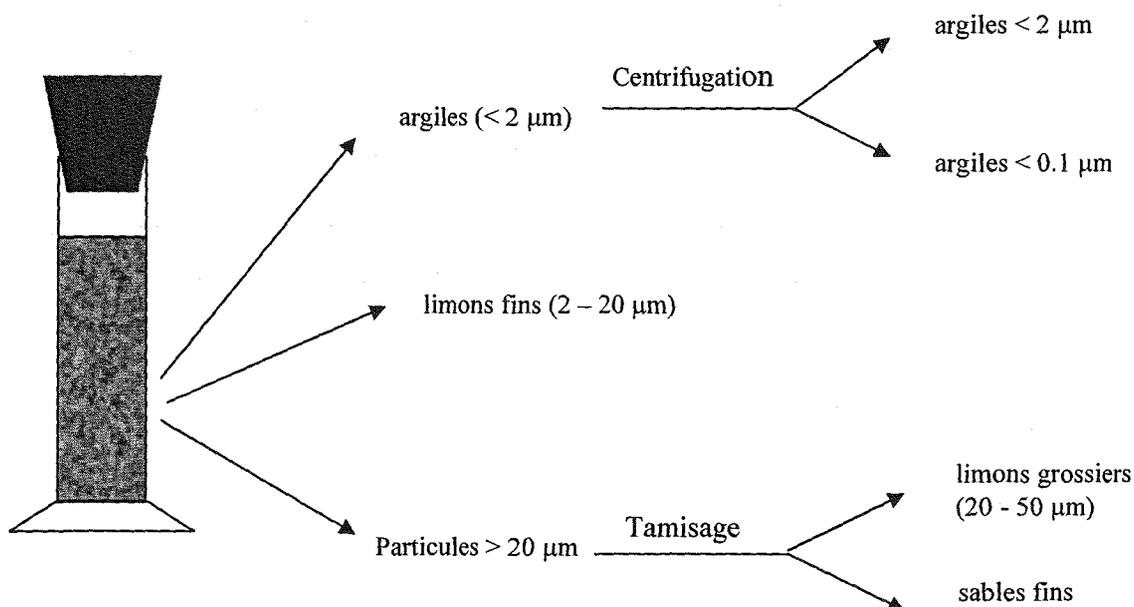
### Troisième phase : séparation des limons grossiers et des sables fins par tamisage

La séparation des limons grossiers et des sables fins est effectuée à l'aide d'un tamis en utilisant le jet de la pissette comme énergie pour déplacer et faire migrer les particules sur et à travers le tamis. On contrôle la séparation tamis par tamis. Puis on récupère, on sèche et on pèse les différentes fractions.

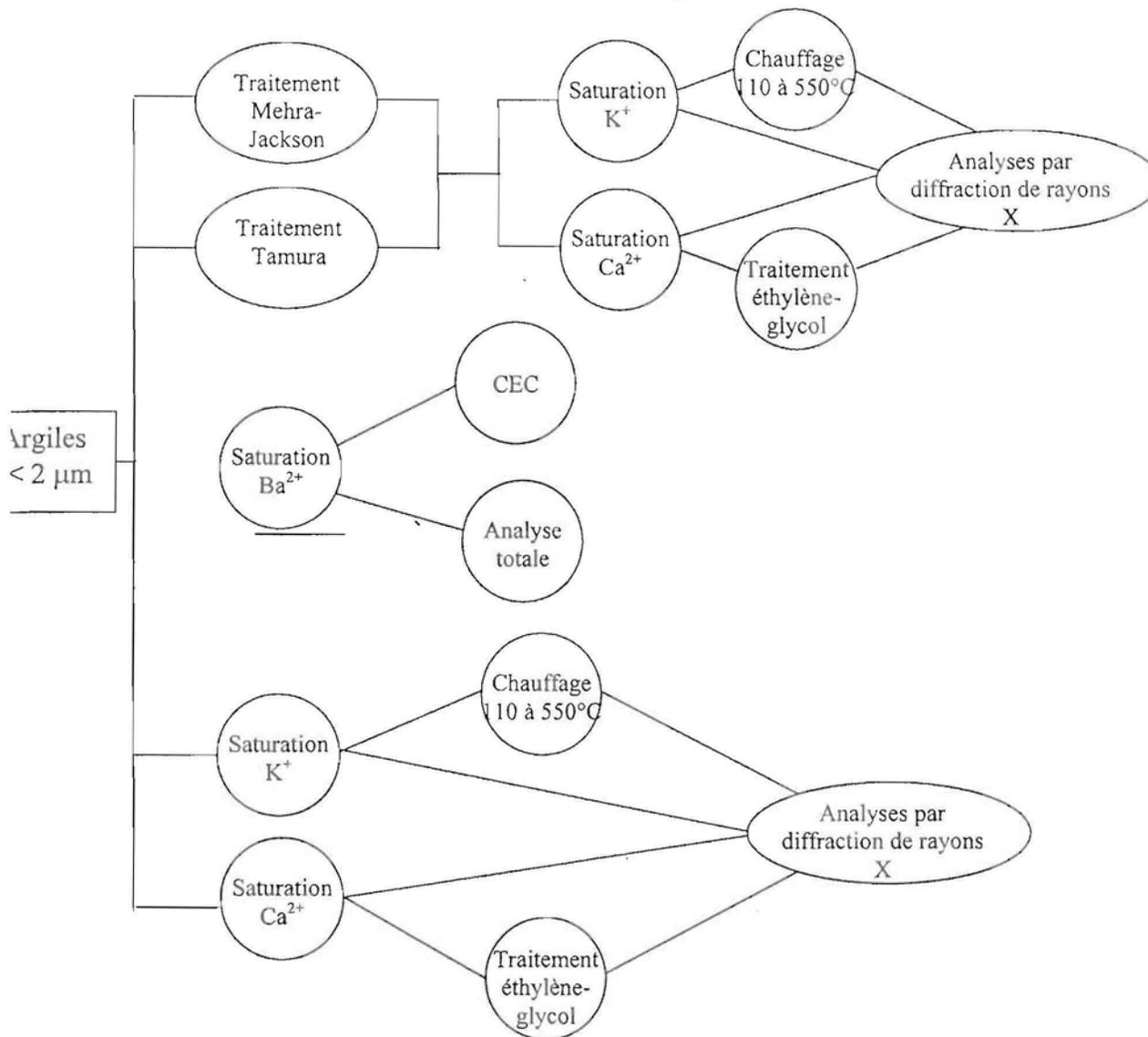
### Quatrième phase : détermination de la granulométrie

Les différentes fractions obtenues par la méthode des allonges et par tamisage sont séchées et pesées. On peut ainsi calculer le pourcentage de chacune des différentes fractions granulométriques par rapport à la masse totale d'échantillon introduit dans l'allonge.

En ce qui concerne les argiles, étant donné qu'une partie est envoyée à l'état humide à Poitiers, il est nécessaire de connaître la masse totale humide des argiles récupérées (= masse de l'ensemble bécher + argiles humides) - (masse du bécher)). Puis on met une partie des argiles humides (celles que l'on garde à Nancy) dans un pilulier taré et on pèse l'ensemble pilulier + argiles humides. L'ensemble est placé à l'étuve à 35°C pendant plusieurs jours et est ensuite pesé. On peut ainsi obtenir la masse sèche totale d'argiles qui est égale à la masse totale humide des argiles récupérées multipliée par le rapport (masse sèche des argiles conservées à Nancy / masse humide des argiles conservées à Nancy).



**Cinquième phase : analyses des fractions argileuses**



**Sixième phase : interprétation des différentes analyses effectués sur les 12 échantillons prélevés**

## **Annexe 4 : Synthèse des méthodes d'extraction sélectives utilisées pour l'étude du sol global et/ou des minéraux-test (par Pascal Bonnaud)**

### **Rappel des différentes formes sous lesquelles on peut trouver les cations dans un sol ou un minéral**

+ Les éléments de constitution (pour les minéraux primaires ou néoformés) sont les éléments du réseau caractérisé par un motif cristallin (maille) et une distribution atomique (composition chimique). Pour les déterminer qualitativement et quantitativement, il est nécessaire de détruire le matériau initial

1) par fusion alcaline (analyse totale) qui consiste à abaisser le point de fusion des silicates par l'intermédiaire d'un fondant (Soude, Carbonates, Métaborates, etc.), détruire la structure cristalline et faire passer les éléments de constitution en solution dans de l'acide nitrique.

2) par attaque avec des acides concentrés à chaud (HF, HCl, triacides, nitroperchlorique, eau régale,...).

+ Les formes libres qui se divisent en deux groupes :

- les oxydes ou oxyhydroxydes : ils se présentent sous forme cristallisée, ils sont formés par des groupements avec de l'oxygène ou des groupes oxhydrile (OH). On ne peut toutefois associer la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) dans ce groupe, du fait de sa formation particulière qui ne peut être obtenue au cours de la pédogenèse (minéral primaire).

- Les amorphes qui sont des produits provenant de l'altération des formes déjà exposées et qui ne présentent pas de forme cristallines ou tout au moins, une organisation suffisante pour obtenir des figures de diffraction en conditions classiques.

+ Les éléments échangeables :

La présence de cette forme est due aux substitutions qui interviennent au niveau des éléments de constitution, qui se traduisent par des déséquilibres électriques et impliquent la fixation d'éléments en périphérie (éléments échangeables) de manière à conserver la neutralité électrique du minéral initial.

La somme de ces éléments constitue le stock de cations minéraux directement assimilables par les plantes.

Remarque : il existe une capacité d'échange anionique dans les sols, en particulier quant ils contiennent des oxydes (sols méditerranéens ou tropicaux). Celle-ci est très faible en sols tempérés (sauf pour les Andosols).

### **Les méthodes et protocoles d'analyses physico-chimiques**

Dans tous les cas, un témoin minéral initial ou un échantillon de référence devra être traité en même temps que les échantillons. Il servira de référence analytique pour comparer les résultats des différentes séries analysées dans le temps.

#### 1) Le pH de contact.

Il permet de faire une première approche du type d'évolution qu'a pu subir le sol ou le minéral. Par exemple, un pH de contact se situant vers le pôle très acide (3,5) traduit souvent une capacité d'échange élevée donc un faible blocage des sites échangeables d'une vermiculite. (l'aluminium est fixé sous forme échangeable :  $Al^{3+}$ ) Par contre un pH voisin du  $pK_a$  de l'aluminium (4 à 5) peut traduire un blocage de l'aluminium à l'état non échangeable (baisse de la capacité d'échange). Un pH supérieur au  $pK_a$  de l'aluminium, traduit la non intervention de ce dernier.

#### 2) La capacité d'échange cationique (CEC). (Rouiller J., Guillet B. et Bruckert S., 1980)

Cette méthode informe sur la nature et la quantité d'éléments échangeables qui sont disponibles pour la végétation et qui caractérisent le fonctionnement et la fertilité actuelle du sol. Pour évaluer cette CEC, une double extraction (KCl et  $NH_4Cl$ ) est nécessaire. L'extrait KCl servant à doser le Ca, Mg, Mn, Na, Fe, Al, H et l'extrait  $NH_4Cl$  le K.

La méthode de routine pour la détermination de la CEC est la méthode regroupant les résultats des deux extractions KCl N et  $NH_4Cl$  N (protocole ci après).

A la suite de différents tests effectués aux laboratoires, cette méthode de référence a été légèrement adaptée pour permettre d'évaluer correctement la CEC des vermiculites de "basse charge". De ce fait, pour déterminer la CEC de la vermiculite de "basse charge" (vermiculite de Prayssac) la solution d'extraction KCl est remplacée par une solution normale de  $SrCl_2$  pour le dosage de K, Ca, Mg, Mn, Na, Fe et Al. Le proton ( $H^+$ ) est déterminé par dosage de l'acidité sur une extraction à KCl normal ( $H^+$  n'est pas déterminable par titration à partir de l'extrait  $SrCl_2$  car le pH de celui-ci est supérieur à 5.5).

### 3) Les éléments "libres".

Ce sont les éléments non disponibles directement par la végétation, leur quantification permet, comme pour la CEC de connaître le fonctionnement d'un sol. De manière générale, quand la quantité d'éléments "libres" augmente, la capacité d'échange (CEC) a tendance à diminuer ce qui entraîne une baisse de fertilité.

Par ailleurs, nous savons que les éléments susceptibles de bloquer la capacité d'échange sont principalement le fer et l'aluminium donc, les extractions utilisées pour quantifier ces éléments seront spécifiques :

De nombreux protocoles existent pour extraire ces éléments, ils sont tous basés sur le même principe initial qui s'appuie sur le fait que le Fer est sensible à la réduction et l'aluminium à la complexation. En ce qui nous concerne, nous avons adopté les extractions suivantes.

- le réactif Mehra et Jackson (Mehra O.P., et Jackson M.L., 1960), réducteur du Fer par la présence de dithionite et complexant par son tricitrate est tamponné à pH environ 7 par le bicarbonate. (quantification Fer libre).

- le réactif Tamura (Tamura T., 1957 Tamura T., 1958) puissant complexant de l'aluminium par la présence de tricitrate (quantification Aluminium libre).

- le réactif Tamm (Tamm O., 1922) qui, comme le réactif de Tamura est un complexant va jouer sur l'aluminium. La différence de complexant (oxalate pour Tamm ; tricitrate pour Tamura), ainsi que la température et le pH du réactif font que l'aluminium extrait par cette méthode est uniquement de l'aluminium "amorphe".

- L'extraction au pyrophosphate de Na (Mc Keague J.A. et Schuppli P.A., 1982)

Le pyrophosphate s'attaque à la matière organique qu'il détruit et, par son pouvoir complexant, il maintient en solution le fer et l'aluminium libéré par la destruction de la celle-ci.

Les éléments quantifiés par l'intermédiaire de cette méthode d'extraction, bien que n'appartenant pas au groupe des éléments libres extrait par les méthodes précédentes sont pris en compte dans ces trois extraits.

Ce traitement permettra donc de quantifier exactement les éléments libres extraits par les méthodes classiques.

## La capacité d'échange cationique (CEC).

Rouiller J., Guillet B. et Bruckert S., 1980 - Cations acides échangeables et acidité de surface. Approche analytique et incidences pédogénétiques. Science du Sol, Bull. A.F.E.S., 2 161-175.

### Extraction KCL 1N

Le nombre d'échantillons traités dans une même série est défini par la capacité maximum de la centrifugeuse utilisée. Dans notre cas, 40 tubes pour les extractions de volume inférieur à 20 ml et 24 tubes pour les extractions de volume inférieur à 50 ou 100 ml.

Un minimum de : un tube "échantillon témoin" et un tube "témoin de milieu" doivent être insérés dans chaque série pour permettre la validation des résultats.

Les gammes d'étalonnage des appareils de dosage doivent impérativement être réalisées dans le même milieu que les échantillons (après dilution). Pour cela, il est indispensable :

i) de préparer le volume total d'extractant nécessaire en une seule fois (dans un récipient unique) ce qui élimine le risque de travailler avec des solutions différentes.

ii) d'utiliser des échantillons "témoin de milieu" pour préparer les solutions étalons ce qui permet de s'affranchir de l'effet d'une pollution éventuelle du milieu d'origine.

### Mode opératoire :

- introduire le poids d'échantillon (cf tableau pour rapport minéral / solution en fonction du type d'échantillon) dans un tube de centrifugeuse (le choix de la capacité du tube est fonction du volume d'extractant utilisé).

- ajouter la solution de KCl 1N (cf tableau pour rapport minéral / solution en fonction du type d'échantillon) et fermer les tubes hermétiquement .

- l'extraction s'effectue sur un agitateur par retournement pendant 1 heure à température ambiante

- aussitôt après l'agitation, retirer les bouchons tout en les disposant de manière à les réutiliser sur le même tube pour la seconde extraction

- centrifugation (15 mn à 4500 tours).

- récupérer le surnageant dans un pilulier.

- faire une 2<sup>ème</sup> extraction dans les mêmes conditions sur le même culot et mélanger le nouveau surnageant avec le premier.

NB : Considérant que la concentration en éléments minéraux de chacune des solutions d'extraction recueillie est homogène.

Pour éliminer l'erreur liée i) au volume d'extractant qui reste dans le fond du tube de centrifugeuse ii) aux pertes éventuelles en cours de manipulation, les dosages seront réalisés sur la solution brute d'extraction. Le volume total de solution utilisable pour le dosage (et les calculs qui suivent) sera égal à la somme des volumes utilisés pour les deux extractions successives. Ne pas ajuster le volume final même s'il y a eu des pertes car celles ci ne vont concerner qu'un simple aliquot.

Solution d'extraction :

+ filtration sur filtre papier (filtration moyenne) si nécessaire.

+ dosage après dilution au 1/10 (Ca, Mg, Mn, Na, Fe, Al, ...)

+ acidité :

neutraliser jusqu'à pH >8 pour prendre en compte la neutralisation du H<sup>+</sup> et du Al<sup>3+</sup> (H<sup>+</sup> : pKa ≈4,6 et Al<sup>3+</sup> : pKa ≈6,8).

Pour les minéraux tests le dosage s'effectue sur 10 cc d'extrait avec NaOH N/100.

Pour les sols, le dosage s'effectue sur 10 à 20 cc d'extrait avec NaOH N/50.

Culot d'extraction :

D'une manière générale, le culot d'extraction de sol est éliminé mais il peut être conservé si nécessaire.

En ce qui concerne le culot d'extraction des minéraux purs (minéraux tests), celui ci est récupéré après lavage en vue de l'analyse aux rayons X.

- lavage du culot d'extraction

+ laver 3 fois ou plus avec de l'eau déminéralisée (jusqu'à élimination des chlorures : test AgNO<sub>3</sub>)

+ récupérer le culot

+ sécher à 30°C maximum

+ RX

## **Extraction NH<sub>4</sub>Cl 1N**

Mode opératoire :

- idem extraction avec KCl 1N

Solution d'extraction :

- + filtration sur filtre papier (filtration moyenne) si nécessaire.
- + dosage après dilution au 1/10 (K)
- + éventuellement doser le Mg pour comparer avec l'extraction KCl.

Culot d'extraction :

En général, sans intérêt pour le reste de la manipulation.

## **Extraction MEHRA - JACKSON**

Mehra O.P., et Jackson M.L., 1960 -Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clays Minerals*, 7, 317-327.

Le nombre d'échantillons traités dans une même série est défini par la capacité maximum de la centrifugeuse utilisée. Dans notre cas, 40 tubes pour les extractions de volume inférieur à 20 ml et 24 tubes pour les extractions de volume inférieur à 50 ou 100 ml.

Un minimum de : un tube "échantillon témoin" et un tube "témoin de milieu" doivent être insérés dans chaque série pour permettre la validation des résultats.

Les gammes d'étalonnage des appareils de dosages doivent impérativement être réalisées dans le même milieu que les échantillons (après dilution). Pour cela, il est indispensable :

- i) de préparer le volume total d'extractant nécessaire en une seule fois (dans un récipient unique) ce qui élimine le risque de travailler avec des solutions différentes.
- ii) d'utiliser des échantillons "témoin de milieu" pour préparer les solutions étalons ce qui permet de s'affranchir de l'effet d'une pollution éventuelle du milieu d'origine.

Pour ajouter la dose de dithionite de sodium prévue par le protocole en effectuant un travail rapide et constant, il est très vivement recommandé de les préparer à l'avance (doses

individuelles). L'ajout par l'intermédiaire d'une cuillère doseuse est à proscrire (trop imprécise).

Mode opératoire :

a) Réactif.(0,3 M tricitrate + M bicarbonate)

Dissoudre 78,42 g de tricitrate de sodium RP + 9,34 g de bicarbonate de sodium RP dans un litre. Ajuster avec de l'eau déminéralisée.

b) Extraction.(cf tableau pour rapport minéral / solution en fonction du type d'échantillon)

- Introduire l'échantillon (broyé modérément pour les sols) dans les pots de centrifugeuse en plastique (le choix de la capacité du tube est fonction du volume d'extractant utilisé).

- Ajouter un barreau aimanté et le réactif de citrate bicarbonate (cf tableau pour rapport minéral / solution en fonction du type d'échantillon).

- Porter à 80°C dans un bain-marie munie d'une agitation magnétique .

- Au bout d'un quart d'heure, ajouter une dose de dithionite de sodium (le poids de dithionite ajouté est identique au poids de matière à analyser) et laisser au bain-marie 1/2 heure.

- Centrifuger (15 mn à 5000 t/mn).

- Récupérer le surnageant dans un pilulier plastique.

- Laver le culot (5 mn) avec un volume de solution de citrate bicarbonate égal à la moitié du volume ayant servi à l'extraction.

- centrifuger et récupérer le surnageant dans le même pilulier que précédemment.

NB : Considérant que la concentration en éléments minéraux de chacune des solutions d'extraction recueillie est homogène.

Pour éliminer l'erreur liée i) au volume d'extractant qui reste dans le fond du tube de centrifugeuse ii) aux pertes éventuelles en cours de manipulation, les dosages seront réalisés

sur la solution brute d'extraction. Le volume total de solution utilisable pour le dosage (et les calculs qui suivent) sera égal à la somme des volumes utilisés (extraction et lavage). Ne pas ajuster le volume final même s'il y a eu des pertes.

- filtration sur filtre papier (filtration moyenne) si nécessaire.

c) Dosages.

Fe, Al, Si après dilution au 1/5 (pour limiter les inconvénients d'un milieu très chargé en sels).

d) culot d'extraction :

D'une manière générale, le culot d'extraction de sol est éliminé. Dans le cas où ce culot doit être conservé, une attention particulière doit être apportée au moment des lavages à l'eau déminéralisée du fait de la dispersion des argiles saturées Na.

En ce qui concerne le culot d'extraction des vermiculites (minéraux tests), celui-ci est récupéré et saturé après lavage en vue de l'analyse aux rayons X.

- lavage du culot d'extraction

+ laver 3 fois avec de l'eau déminéralisée

+ séparer le culot en deux fractions à peu près équivalentes (en tube de centrifugeuse)

+ procéder à la saturation finale en vue de l'analyse aux rayons X.

La saturation du culot d'extraction est réalisée conformément au protocole d'extraction de la capacité d'échange cationique (Protocole "extraction avec KCl N" décrit ci avant).

Sur une partie du culot : saturation avec KCl normale pour vérifier la fermeture du feuillet (de 14 Å vers 10 Å)

Sur la seconde partie de culot : saturation avec MgCl<sub>2</sub> normal pour vérifier la non destruction du minéral initial.

NB : cette saturation peut être différée. Dans ce cas, conserver la fraction saturée Na après séchage en étuve à 30°C maximum.

## Extraction TAMURA

Tamura T., 1957. - Identification of the 14 Å clay mineral component. Am. Mineralogist 42, 107-110.

Tamura T., 1958. - Identification of clays minerals from acid soils. J. Soil Science, 9, 141-147.

Le nombre d'échantillons traités dans une même série est défini par la capacité maximum de la centrifugeuse utilisée. Dans notre cas, 40 tubes pour les extractions de volume inférieur à 20 ml et 24 tubes pour les extractions de volume inférieur à 50 ou 100 ml.

Un minimum de : un tube "échantillon témoin" et un tube "témoin de milieu" doivent être insérés dans chaque série pour permettre la validation des résultats.

Les gammes d'étalonnage des appareils de dosages doivent impérativement être réalisées dans le même milieu que les échantillons (après dilution). Pour cela, il est indispensable :

i) de préparer le volume total d'extractant nécessaire en une seule fois (dans un récipient unique) ce qui élimine le risque de travailler avec des solutions différentes.

ii) d'utiliser des échantillons "témoin de milieu" pour préparer les solutions étalons ce qui permet de s'affranchir de l'effet d'une pollution éventuelle du milieu d'origine.

Mode opératoire :

a) Réactif.:

tricitrate de sodium ( $C_6 H_5 Na_3 O_7 \cdot 2 H_2O$ ) la solution d'extraction doit être normale et ajustée à pH 7.3 (ajout de HCl).

b) Extraction (rapport d'extraction : cf tableau pour rapport minéral / solution en fonction du type d'échantillon)

- Introduire l'échantillon (broyé modérément pour les sols) dans les pots de centrifugeuse en plastique (le choix de la capacité du tube est fonction du volume d'extractant utilisé).

- ajouter le tricitrate de Na (cf tableau pour rapport minéral / solution en fonction du type d'échantillon) et couvrir avec un doigt de gant (dispositif permettant de limiter les pertes d'eau par évaporation).

- plonger ces tubes dans un bain-marie à ébullition (l'ébullition est comptée à partir d'une température de 95°C).

- Après 1 heure d'ébullition :

+ retirer les tubes du bain-marie, enlever les dispositifs anti perte tout en les disposant de manière à les réutiliser sur le même tube lors de l'extraction suivante.

+ centrifuger (15 mn à 4500 tours).

+ récupérer le surnageant dans un pilulier en plastique.

d) Recommencer l'extraction encore deux fois. Le surnageant obtenu à la fin de la deuxième et troisième extraction est ajouté à celui de la première.

NB : Considérant que la concentration en éléments minéraux de chacune des solutions d'extraction recueillie est homogène.

Pour éliminer l'erreur liée i) au volume d'extractant qui reste dans le fond du tube de centrifugeuse ii) aux pertes éventuelles en cours de manipulation, les dosages seront réalisés sur la solution brute d'extraction. Le volume total de solution utilisable pour le dosage (et les calculs qui suivent) sera égal à la somme des volumes utilisés. Ne pas ajuster le volume final même s'il y a eu des pertes.

e) filtration sur filtre papier (filtration moyenne) si nécessaire.

f) Dosages.

Fe, Al, Si après dilution au 1/5 (pour limiter les inconvénients d'un milieu très chargé en sels).

g) culot d'extraction :

D'une manière générale, le culot d'extraction de sol est éliminé. Dans le cas où ce culot doit être conservé, une attention particulière doit être apportée au moment des lavages à l'eau déminéralisée du fait de la dispersion des argiles saturées Na.

En ce qui concerne le culot d'extraction des vermiculites (minéraux tests), celui-ci est récupéré et saturé après lavage en vue de l'analyse aux rayons X.

- lavage du culot d'extraction

+ laver 3 fois avec de l'eau déminéralisée

+ séparer le culot en deux fractions à peu près équivalentes (en tubes de centrifugeuse)

+ procéder à la saturation finale en vue de l'analyse aux rayons X.

La saturation du culot d'extraction est réalisée conformément au protocole d'extraction de la capacité d'échange cationique (Protocole "extraction avec KCl 1N" décrit ci avant).

Sur une partie du culot : saturation avec KCl normale pour vérifier la fermeture du feuillet (de 14 Å vers 10 Å)

Sur la seconde partie de culot : saturation avec MgCl<sub>2</sub> normal pour vérifier la non destruction du minéral initial.

NB : cette saturation peut être différée. Dans ce cas, conserver la fraction saturée Na après séchage en étuve à 30°C maximum.

**Annexe 5 : Composition des différents milieux utilisés pour les biotests :**

**Milieu Tryptic Soy Agar 10% (TSA) :** 3 g de Tryptic Soy Broth et 15 g d'agar dans 1 l d'eau distillée stérile.

**Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) :** 39 g de Potato Dextrose Agar dans 1 l d'eau distillée stérile.

**Milieu Chrome Azurol S (CAS) :** 34.63 g de Buffer Pipes Na<sub>2</sub> (tampon) ; 0.3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.5 g de NaCl ; 1 g de NH<sub>4</sub>Cl ; 0.246 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ; 0.0147 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 4 g de glucose ; 0.0905 g de Chrome Azurol S ; 0.0024 g de FeCl<sub>3</sub> ; 0.1640 g de HDTMA et 15 g d'agar dans 1 litre d'eau ultra-pure stérile.

**Milieu Tri Calcium Phosphate (TCP) :** 5 g de NH<sub>4</sub>Cl ; 1 g de NaCl ; 1 g de MgSO<sub>4</sub> ; 10 g de glucose ; 20 g d' agar ; 4 g de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dans 1 litre d'eau ultra-pure stérile.

**Milieu Luria Bertani (LB) :** 10 g de tryptone peptone Difco ; 5 g de Bacto yeast ; 10 g de NaCl.

**Milieu Busnell-Hall modifié (BHm) :** 20 mg de KCl ; 150 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ; 80 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 2H<sub>2</sub>O, 65 mg de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 100mg de KNO<sub>3</sub> ; 20 mg de CaCl<sub>2</sub>.

## **Annexe 6 : Protocole d'échantillonnage des mycorhizes *S. citrinum* et du sol global.**

### **Première étape : observation de la pousse et choix des carpophores de *Scleroderma citrinum*.**

Repérer les carpophores de *S. citrinum* qui sont jaunâtres et ont un diamètre d'une dizaine de centimètres. Afin d'être utilisables pour cette collection, ces carpophores doivent se trouver dans le peuplement ou en bordure (1 à 2 m maximum mais vérification que ce sont bien des racines de l'essence voulue). Choisir entre trois et cinq carpophores, dont les extrêmes géographiquement sont distants de plusieurs mètres, en vérifiant la présence de mycorhizes. Ces mycorhizes sont de couleur blanc, beige, jaunâtre et ont une odeur caractéristique.

### **Deuxième étape : Echantillonnage du sol global et des mycorhizes avec leur sol adhérent.**

Elimination de la litière et du sol sur 5 cm. En effet, cette collection ne sera réalisée que dans l'horizon 5-10 cm (minéral).

Recherche des morphotypes de mycorhizes *S. citrinum* sur les racines.

Collecter 20 à 30 mycorhizes par carpophore (si possible) et les mettre dans un sac. Recouvrir les mycorhizes avec un peu de sol et fermer hermétiquement.

Prélever du sol global dans la même zone et placer dans un sac que l'on ferme hermétiquement.

Penser à baliser la zone de prélèvement et numéroter les carpophores. Tous les prélèvements sont replacés sur un plan et les sacs contenant les échantillons sont numérotés. Par exemple le sac contenant les mycorhizes prélevées sous le carpophore numéro 3 sera indexé PM3. Le sol global prélevé à proximité du carpophore 3 sera indexé PN3.

Conserver tous les d'échantillons dans une glacière.

Collecter les carpophores sous lesquels ont été effectués les prélèvements et les rapporter au laboratoire dans une glacière.

## **Annexe 7 : Protocoles de préparation des inocula bactériens et fongiques.**

❖ Préparation d'un inoculum bactérien pour les biotests en boîtes de Petri, en microplaques et pour les expériences en colonnes.

### 1) Réalisation d'étalements trois secteurs : LE VENDREDI (J0)

A l'aide d'un cure-dent, on étale à trois densités différentes, une souche bactérienne pure conservée au congélateur à -80°C, sur une boîte de Petri contenant du milieu TSA 10%. Les boîtes sont placées en chambre de culture à 25°C et à l'obscurité durant 2 jours et demi.

### 2) Réalisation d'un tapis bactérien : LE LUNDI (J+3)

On prélève des bactéries dans le secteur le plus dense à l'aide d'un râteau.

On place ces bactéries dans un tube à bouchon rouge contenant 2 ml d'EUP stérile.

On homogénéise la solution en la vortexant.

On prélève 20 microlitres de cette solution que l'on inocule au centre d'une boîte de Petri contenant du milieu TSA 10%.

On étale cette goutte à l'aide d'un râteau (mouvement de rotation de la boîte jusqu'à ce que le râteau colle au milieu).

Les boîtes sont placées en chambre de culture à 25°C et à l'obscurité durant 2 jours et demi.

### 3) Préparation de la solution bactérienne : LE JEUDI (J+6)

On injecte sur la boîte de Petri 2 ml d'EUP stérile et à l'aide d'un râteau, on récupère le maximum de bactéries (tapis bactérien).

On récupère la solution dans un tube eppendorf.

On centrifuge 10 minutes à 14000 tours/minutes.

On retire le surnageant, on ajoute 100 microlitres d'EUP stérile et on homogénéise.

On centrifuge 10 minutes à 14000 tours/minutes.

On retire le surnageant, on ajoute 100 microlitres d'EUP stérile et on homogénéise.

On centrifuge 10 minutes à 14000 tours/minutes.

On retire le surnageant, on ajoute 100 microlitres d'EUP stérile et on homogénéise.

On prélève 20 microlitres de cette solution bactérienne concentrée que l'on dilue dans 2 ml d'EUP stérile (dilution 100X) dans un tube à bouchon rouge.

On mesure la DO de cette solution diluée 100X.

On calcule la concentration bactérienne dans cette solution :  $S_0 = 10^{(8.3+DO)}$ .

On calcule le facteur de dilution à utiliser pour obtenir une solution bactérienne dont la concentration est de  $10^{7.6}$  :  $F = (100 * 10^{(8.3+DO)}) / 10^{7.6}$ .

On calcule la quantité de solution bactérienne concentrée Q à ajouter à la quantité d'EUP stérile nécessaire pour l'inoculum X (cette quantité est fonction du volume de substrat à inoculer) afin d'avoir une concentration de  $10^{7.6}$  UFC/ml :  $Q = X/F$ .

#### 4) Inoculation : LE JEUDI (J+6)

Pour l'expérience en microplaques, on inocule 20 microlitres de la suspension ainsi préparée dans chaque puits.

Pour l'expérience en colonnes, on inocule 1.8 ml de la solution bactérienne précédemment définie dans chaque colonne.

En parallèle, on réalise des étalements au Spiral system de la suspension bactérienne dans quatre boîtes de Petri contenant du milieu TSA 10%, afin de vérifier la quantité de spores inoculée dans les colonnes.

#### ❖ Préparation d'un inoculum fongique pour les expériences en colonnes.

##### 1) Repiquage des implants : LE VENDREDI (J+0)

On prélève à l'aide d'une pince un morceau de champignon contenu dans le tube (glycérol) de la collection et conservé au frigo à 4°C. On le dépose sur du milieu PDA (39 g.l<sup>-1</sup> of Potato Dextrose Agar from Difco) recouvert d'une membrane de cellophane qui a été précédemment bouillie dans de l'eau ultra-pure contenant de l'EDTA (372 mg.l<sup>-1</sup>) durant 15 minutes et lavée abondamment avec de l'eau ultra-pure puis stérilisée deux fois par autoclavage. Les boîtes sont placées en chambre de culture à 25°C et à l'obscurité durant 7 jours.

##### 2) Repiquage des implants : LE VENDREDI (J+7)

A l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre, on prélève un morceau de champignon en périphérie de la colonie et on le transfère au centre d'une boîte de Petri contenant du milieu PDA recouvert d'une membrane de cellophane traitée identiquement à la première phase. Les boîtes sont placées en chambre de culture à 25°C et à l'obscurité durant 6 jours.

##### 3) Préparation de l'inoculum fongique : LE JEUDI (J+13)

Récupération des spores sur le milieu PDA en injectant 10 ml d'EUP stérile sur chaque boîte puis on mélange les 40 ml prélevés dans un tube à bouchon vert. Par la suite, on réalise des

comptages au microscope, du nombre de spores par millilitre de la suspension fongique à l'aide de lames de Malassez. On réalise des dilutions afin d'obtenir une concentration d'environ 1000 spores par millilitre.

#### 4) Inoculation : LE JEUDI (J+13)

Inoculation de 1.8 ml de suspension fongique dans les colonnes.

En parallèle, on inocule 100 µl de la suspension fongique dans une boîte de Petri contenant du milieu PDA afin de vérifier la quantité de spores inoculée dans les colonnes.

#### ❖ Préparation de plants de pin mycorhizés pour les expériences en colonnes.

On prépare un mélange tourbe (tamisée à 1 cm) – vermiculite en proportions 50-50. Ce mélange est légèrement humidifié.

On mélange l'inoculum de *Laccaria bicolor* S238N (bocaux) avec le substrat tourbe – vermiculite en proportion 10% d'inoculum pour 90% de substrat. On dépose 4 graines par godet que l'on recouvre de 2-3 mm de substrat sans tasser.

Les plaques sont placées en serre pendant deux mois.

## **Annexe 8 : protocole de l'expérience d'interactions champignon – phlogopite en boîtes de Petri.**

1) Stérilisation de la phlogopite 0.5-1 mm par ionisation.

2) – Préparation des milieux

- Milieu sur lequel on va déposer le champignon:

pour un litre, 1.250 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; 0.869g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0.050 gr. de  $\text{CaCl}_2$  ; 0.1 ml de solution d'oligoéléments Kanieltra (6.0 g/l de fer, 0.27 g/l de molybdène, 8.45 g/l de bore, 5.0 g/l de manganèse, 0.625 g/l de Cu, 2.27 g/l de Zn) ; 1 ml de thiamine HCl à 100 mgr. par litre ; 1 ml de biotine à 5 mg par litre ; 1 g de glucose anhydre et 20 g d'agar..

- Milieu sur lequel on va déposer le minéral:

5 g de glucose et 20 g d'agar

Les deux solutions sont mises à l'autoclave 20 minutes à 120°C.

3) Préparation de la cellophane:

Faire bouillir les membranes prédécoupées dans un bain d'EDTA à 372 mg par litre d'eau ultra-pure pendant 15 minutes.

Bien rincer les membranes à l'eau ultra-pure.

Autoclaver 2 fois 20 minutes à 120°C les membranes rincées dans de l'eau ultra-pure dans une boîte de Petri en verre.

4) Coulage des milieux

Coulage des 2 milieux dans les deux compartiments de la boîte de Petri en prenant soin que la quantité de milieu déposée arrive à la limite de la barrière centrale afin qu'il y ait le moins de dénivelé possible.

5) Pose de la cellophane sur le milieu eau gélosée.

6) Dépôt de 25 mg de phlogopite sur la cellophane en utilisant un système permettant de répartir de manière homogène le minéral sur le milieu.

7) Repiquage de 5 mycéliums de champignons espacés de 5 mm et à 5 mm du milieu eau gélosée.

8) Laisser incuber à 25°C durant 105 jours.

9) Echantillonnage des minéraux :

Mettre le champignon dans un tube à bouchon rouge contenant 2 ml d'EUP stérile et vortexer 30 secondes à puissance maximale afin de détacher les minéraux du champignon.

10) Réalisation de dépôts orientés sur des lames à partir du minéral prélevé. Analyses par diffractométrie de rayons X des particules de phlogopite.

## Alteration of Chrysotile in the Rhizosphere of the Nickel Hyperaccumulator *Leptoplax emarginata*

Vanessa Chardot<sup>1</sup>, Guillaume Echevarria<sup>1</sup>, Christophe Calvaruso<sup>2</sup>, Marie-Pierre Turpault<sup>2</sup>, Jean-Louis Morel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire « Sols et Environnement », ENSAIA/INRA-INPL, 2, avenue de la Forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy, Cédex, France; <sup>2</sup> Laboratoire « Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers », UR INRA 1138, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France.

### ABSTRACT

Ni phytoextraction processes needs further understanding of the relationships between Ni availability in soils and its absorption by plant roots. It was established that both the efficient metal uptake and the release of organic ligands (citrate or malate) by several hyperaccumulator species could accelerate the weathering process of Ni-bearing phases in the rhizosphere. Columns experiments were performed to assess the effect of *L. emarginata* and the contribution of both rhizobacteria and organic acids on the dissolution rate of the Ni-bearing chrysotile (low-available Ni source). Mineral weathering was monitored by measuring Ni and Mg contents leached and absorbed by plant along the experiment. *L. emarginata* increased more than 2-fold chrysotile dissolution and more than 7-fold Ni mobilization. Inoculation of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of *L. emarginata* showed no significant changes on chrysotile dissolution in this context. But, citric acid treatment (without plant) increased about 1.5-fold chrysotile dissolution rate and so its exudation by *L. emarginata* could be involved for Ni uptake. Finally, after 15 weeks of culture, up to 2.00 % of the total Ni content of the system was mobilized in the plant treatments compared to 0.03 % in the control treatment. Moreover, 88 % in average of total mobilized Ni was removed by the hyperaccumulator *L. emarginata*.

### INTRODUCTION

The mineralogy of serpentine soils largely depends on the geochemistry and the mineralogy of the ultramafic parent rock e.g. serpentinized peridotite. Current minerals in these soils are

serpentine with global formula  $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ , or others silicates such as talc, smectite, chlorite, and Fe oxides such as goethite or magnetite (1, 2). Chrysotile is one type of serpentine minerals. It is a trioctahedral hydrous phyllosilicate based on a 1:1 layer structure: one Si-occupied tetrahedral layer is bonded to one Mg-occupied octahedral layer (brucite) (3). Chrysotile is easily recognizable compared to the others species of the serpentine group (*i.e.* lizardite and antigorite) because of its typical fibrous form which is due to elementary cross-fiber associations (4). In serpentinic soils, serpentine dissolution releases Mg and Si to the soil solution. Translocation and concentration of these serpentine dissolution products can result in neoformation of a low-charge, Mg-rich dioctahedral smectite (5). Mg release from chrysotile exhibits smaller pH dependence than observed for cation release from other silicate and oxide minerals. This suggests that Mg hydroxide is more easily dissolved than minerals such as aluminium oxide, and that attack by  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{H}^+$  are both important in chrysotile dissolution. The dissolution rate of chrysotile suspended in a  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  inorganic electrolyte at pH 8 is  $10^{-15.7} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (6). The dissolution rate of chrysotile is however limited with time. The initial rate for Mg release is of the same order of magnitude as that for brucite dissolution in the pH 7.5-8.5 (*i.e.*  $10^{-13} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). The gradual decline in rate with time could in part reflect a decrease in the total number of surface Mg sites as well as a decrease in the number of higher energy sites created during sample preparation (6). In weak complexing environments (*e.g.* oxalic acid at  $10^{-6}$  or  $10^{-4} \text{ M}$ ), Mg lixiviation largely slows down because of the development of a superficial hydrated silica layer (4, 7).

Serpentine soils often contain large amounts of Ni, included for example in serpentine minerals through substitutions with Mg. The rich-Mg biogeochemistry and the high available metal contents of these soils often conduct to distinctive or unique plant communities such as hyperaccumulator species. Hyperaccumulators can actively take up metals from the soil and accumulate them to extremely high levels in shoots ( $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  for Ni) (8, 9). Phytoextraction is a cheap and non-destructive strategy consisting of making successive croppings of these plants to achieve stabilization and/or decontamination of metal polluted soils. The optimization of this process largely depends on metal phytoavailability in soils and on the plant's potential to produce biomass and to extract metal (10, 11, 12). It was established that both the efficient metal uptake and the release of organic ligands (citrate or malate in particular) by several hyperaccumulator species could accelerate the weathering process of Ni-bearing phases in the rhizosphere (13, 14). Plants usually absorb Ni from the soil solution as the free hydrated ions  $\text{Ni}^{2+}$  (15, 16). Ni availability largely depends on Ni speciation: Ni is more available for plants when it is located on border sites of minerals,

especially amorphous iron oxides (17). Recently, the hyperaccumulator species *Thlaspi caerulescens* J & C Presl and *Alyssum murale* Waldst. & Kit., despite their high metal uptake, were shown to extract Ni only from the labile pool in soils *i.e.* the pool of isotopically-exchangeable ions (11, 18). However, many studies showed that plants could accelerate mineral weathering. For example, goethite (Fe-hydroxide) weathering, except for alkaline pH, was promoted by plant root exudations of organic compounds (citrate or malate) (19) and plagioclase dissolution rates in solutions containing organic acids were enhanced up to ten times more than the rates determined in solutions containing inorganic acids, at the same acidity (20). A strong correlation between the levels of Ni and citric acid in the leaves of several New Caledonian hyperaccumulators species was found (21). And, high Ni accumulation in shoots of ryegrass was closely related to high xylem transport rates of Ni and to accumulation of citric and malic acids (22). Moreover, rhizospheric interactions between plant roots and microorganisms seem to play a major role in increasing the weathering of minerals (23, 24, 20) and consequently improving plant nutrition (25). Specific microflora of hyperaccumulators could have significant impact on Ni mobilization and so on Ni absorption by plants. Re-inoculation of seeds of *A. murale* grown in nonsterile soil with its specific rhizobacteria increased Ni-uptake into shoot up to 30 % compared to uninoculated controls (26). These results show that rhizobacteria, hyperaccumulator performance and Ni speciation in soils are all important factors for the optimization of phytoextraction. Currently, the relationships between these parameters are still seldom studied and would need further understanding.

*Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz is an efficient Greek Ni hyperaccumulator endemic to serpentine soils recently studied for its phytoextraction potential (12). This plant shows high capacities to accumulate Ni in its aerial parts, especially because of its high biomass production. Consequently, it seems to be a potential species for phytomining. This work was undertaken to show whether *L. emarginata* was able to enhance Ni-bearing mineral dissolution in the case of low availability of Ni. We studied the impact of *L. emarginata* on the weathering of chrysotile, a low-available Ni source, in two columns experiments. The first one consisted in the evaluation of the role of *L. emarginata*, and also the role of inoculated Ni-resistant bacteria, in Ni mobilization and its consequences on the absorption by the hyperaccumulator plant. The second one consisted in the estimation of the contribution of an organic acid potentially released by hyperaccumulator roots (*i.e.* citric acid) on chrysotile dissolution.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

**Mineral.** The initial material sampled was raw asbestos ore from sterile heaps in Dobšiná (Slovakia). X-ray diffraction and transmission electronic microscopy analyses shown that principal components of the ore were: Ni-bearing chrysotile and magnetite (iron oxide). Laboratory purification and calibration procedures were performed to obtain pure and homogeneous chrysotile samples. First, the ore was ground to small particles with an automatic grinder. Then, it was suspended in deionized water and magnetite was collected under stirring with a magnetic bar. Finally, the suspension was filtered on a mesh and calibrated between 20 and 40  $\mu\text{m}$ . Total Ni concentration in chrysotile sample after purification, “Ch” was 2260  $\text{mg kg}^{-1}$ . Its composition was 43.59 %  $\text{SiO}_2$ , 39.00 %  $\text{MgO}$ , 0.20 %  $\text{NiO}$ , 4.78 %  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 1.18 %  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 0.12 %  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , 0.02 %  $\text{Na}_2\text{O}$ , 0.02 %  $\text{K}_2\text{O}$ , 0.06 %  $\text{CaO}$ , 0.02 %  $\text{TiO}_2$ , 0.03 %  $\text{MnO}$ , 11.00 %  $\text{H}_2\text{O}$ , and its exact chemical formula was  $(\text{Mg}_{2.755}\text{Fe}_{0.083}\text{Al}_{0.064}\text{Ni}_{0.008}\text{Cr}_{0.005}\text{Ca}_{0.003}\text{Mn}_{0.001}\text{K}_{0.001}\text{Na}_{0.001}\text{Ti}_{0.001})\text{Si}_{2.07}\text{O}_5(\text{OH})_{3.5}$ .

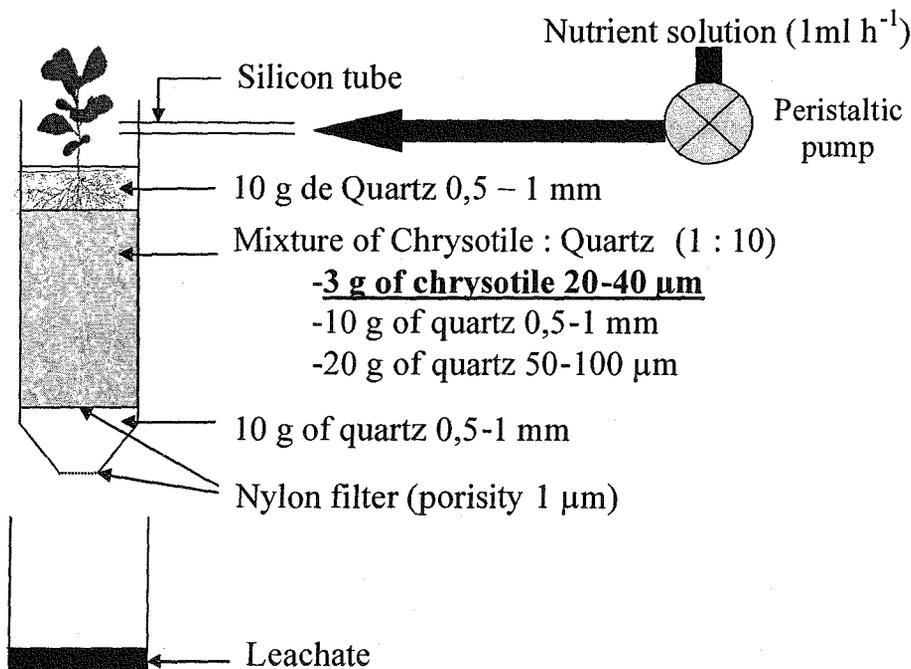
**Plant.** Seeds of *Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz (*Brassicaceae*) were collected in late July 2002 at Katara Pass (Pindus Mountains near Metzovo) in northern Greece, at an altitude of 1670 m, on serpentine soils with low nutrients (especially Ca) and low summer water contents. *L. emarginata*'s classification, distribution and growth environment have been previously reported (12). This species can contain Ni concentrations in shoots up to 34 000  $\text{mg kg}^{-1}$ . Moreover, some specimens in the field can be almost 2 m high at flowering stage.

**Bacteria.** Two treatments with *L. emarginata* were inoculated with two different Ni-resistant bacterial strains previously known to increase Fe mobilization in ultramafic soils of New Caledonia. The first one, “B1”, was isolated from *Trisaniopsis guillainii* mycelium, and the second one, “B2”, was isolated from *Nothofagus codonandra* ectomycorrhizes. The samples were collected in Koniambo mountain in New Caledonia.

**Experimental devices.** Columns were made from sterile inert polypropylene tubes, 7 cm high and 3 cm in diameter, with a hole drilled at the bottom (Figure 1). Columns were filled with both Ch (3 g per column) and purified inert quartz, “Qz” (50-100  $\mu\text{m}$  and 0.5-1 mm particle sizes). Quartz purification consisted in successive washing in oxalic acid (1.0  $\text{g L}^{-1}$ ) and HCl (0.1 M), then rinsing with deionised water and finally autoclaved (20 min at 120 °C) for sterilization. Qz was used for create an appropriate porosity. Each column was supplied with a

sterile nutrient solution at a constant rate with a peristaltic pump. The composition of the nutrient solution was adjusted so that it only contained elements that were essential to *L. emarginata* growth. Its composition was also representative of the soil solutions usually found in serpentine soils *i.e.* 2.50 mg L<sup>-1</sup> of calcium, 2.00 mg L<sup>-1</sup> of sulfur, 1.19 mg L<sup>-1</sup> of phosphorus, 1.50 mg L<sup>-1</sup> of potassium, 5.00 mg L<sup>-1</sup> of nitrogen, 15.00 µg L<sup>-1</sup> of zinc, 15.00 µg L<sup>-1</sup> of manganese. The mineral was the only source in the system of magnesium, nickel and iron for plant nutrition. Drained solution on leaving the columns was filtered through nylon fabric (1-µm porosity) fixed at the bottom of each column and collected in inert flasks.

**Figure 1:** Experimental column scheme.



## Methods

### *Culture conditions.*

*First experiment.* Seeds of *L. emarginata* were allowed to germinate on pure quartz matrix in a growth chamber under controlled conditions (photoperiod of 18 h; temperature of 22 °C during daylight and 16 °C during night). Matrix moisture was maintained by daily watering with deionized water. After germination, seedlings were transplanted into 18 columns at the rate of one plant per column. Remaining seedlings, used as reference, were washed with deionized water and oven dried at 70 °C for 48 h. Six columns were inoculated with *B1* (“*P+B1*” treatment) and six others columns with *B2* (“*P+B2*” treatment). Bacteria were grown on 10 % TSA medium (3 g L<sup>-1</sup> tryptic soy broth from Disco and 15 g L<sup>-1</sup> agar) at 25 °C

for 48 h. Then, bacteria were suspended in sterile deionized water and washed three times. Inoculum's concentrations were adjusted to  $4 \times 10^{7.6}$  CFU mL<sup>-1</sup> according to *A600* standard curve calibrated by plate enumeration. The experiment was conducted for 15 weeks in a growth chamber under controlled conditions (photoperiod of 16 h; temperature of 22 °C during daylight and 15 °C during night; air moisture 60 %). Control columns without plant and bacteria inoculation were also prepared in the same conditions as the treatments with *L. emarginata*. After 15 weeks, shoots and roots of *L. emarginata* were collected, washed with deionized water and oven dried at 70 °C for 48 h. The mixture *Ch-Qz* was homogenized and oven dried at 50 °C for one week. Bacteria quantification was realized after one week at 28 °C on 10 % TSA medium.

*Second experiment.* This experiment was realized to evaluate the citric acid effect on chrysotile weathering. The experiment was monitored for 30 days in a dark chamber at 20 °C and was conducted in the same way as the first experiment. Three columns, *CA*, were supplied with a sterile solution containing citric acid (20 mg L<sup>-1</sup>) added to the original nutrient solution. Three control columns, *C'*, were supplied with the original solution without citric acid and prepared in the same conditions.

### ***Chemical analyses***

*Mg, Ni contents and pH measurements in the leachates.* The volume of all the drained solutions was measured every week. Then, Mg content was analysed by Induction-Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Liberty RL, Varian). And, Ni content was analysed by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ETAAS, Zeeman 220, Varian). pH of all leachates samples was measured with a pH-meter SCHOTT CG842 (Electrod SCHOTT, BlueLine 24pH).

*Calculation of Chrysotile dissolution rate.* Dissolution rate of chrysotile was calculated according to the following formula:

$$K_d = Q_{Mg} / t * AS * m$$

Where  $K_d$  is the dissolution rate (in mole s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>),  $Q_{Mg}$  is the total lixivied Mg amounts after experiment,  $t$  is the experiment period,  $AS$  is the specific area of chrysotile (in m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) and  $m$  is the mineral mass in the system.

Balance-sheet calculation of chrysotile weathering. Balance-sheet was realized according to Mg and Ni amounts in the leachates and in *L. emarginata*. After 15 weeks, plant shoots and roots were washed, oven-dried at 70°C for 48 hours, weighed and crushed. Then, samples of plant dry matter were acid-digested at 250 °C in 6 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> (purity: 98%) and 6 mL of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (purity: 30 %). The final solution was filtered and made up to 25 mL with deionized water and Mg and Ni contents in plant shoots and roots were measured by ICP-AES. Leachates collected for 15 weeks were mixed and homogenized. Then, Ni and Mg contents of the global solution were measured respectively by ETAAS and ICP-AES.

Characterization of phytoavailable Ni by Isotopic Exchange Kinetics (IEK) method.

*Principle.* The isotopic exchange kinetics (IEK) in soil suspensions allow full description of the availability of elements in soil, and the determination of the contribution of the different available pools in the solid phase to buffer the concentration of the element in the soil solution. The method quantifies the three factors that characterize the metal availability in soils (27): the intensity factor -C<sub>Ni</sub>- (*i.e.* the concentration of Ni in the soil solution, in µg l<sup>-1</sup>), the quantity factor -E<sub>t</sub>- (*i.e.* the amount of Ni ions from the soil that are able to supply the soil solution according to their average time of exchange, *t*, in mg kg<sup>-1</sup>) and the capacity factor -C- (*i.e.* the buffering capacity of the soil solid phase compartments to thermodynamically maintain Ni ions in the soil solution, in L kg<sup>-1</sup>).

*Experiments.* Suspensions of soil and deionized water (1:20 soil:solution ratio (w:v)) were mixed on an end-over-end shaker for 20 h until the concentration of Ni in the solution was constant. One milliliter of a <sup>63</sup>Ni<sup>2+</sup> solution was then injected into the suspension, which was kept under continuous shaking. Four aliquots of the suspension were sampled with a syringe after 1, 4, 10, and 40 min, and immediately filtered through cellulose ester filters (porosity 0.22 µm, Rotilabo®-Spritzenfilter). Radioactivity in the solution was measured in the four filtered aliquots. The concentration of free Ni (C<sub>Ni</sub>) in solution was measured in the filtered solutions (ETAAS) from the suspension after particle deposition (about one day).

*Calculation of E<sub>t</sub>.* When radioactive tracers such <sup>63</sup>Ni<sup>2+</sup> are added to a solid phase:solution system at a thermodynamically steady state, the radioactivity in solution decreases with time *t* according to the following equation:

$$\frac{r_t}{R_s} = \frac{r_1}{R_s} \times \left[ t + \left( \frac{r_1}{R} \right)^{1/n} \right]^{-n} + \frac{Ni_s}{Ni_t} \quad (1)$$

where  $r_t$  is the radioactivity in the soil solution at time  $t$  (in Bq) and  $R_S$  the total radioactivity introduced at time  $t=0$  (in Bq). The ratio  $r_t/R_S$  is the dilution of the total radioactivity added into total Ni in soil in a time  $t$ ,  $r_1$  is the radioactivity in the solution at 1 min,  $n$  is a parameter which describes the rate of transfer of the tracer from the solution to the solid phase of the soil after 1 min,  $Ni_S$  is the amount of Ni in soil solution for a 1:20 soil solution ratio,  $Ni_T$  is the total content of Ni in soil.

The quantity factor ( $E_{(t)}$ ) can be extrapolated to the experiment duration or any other duration with equation (1). This equation can be derived from equation (2) with the hypothesis that the specific radioactivity of the isotopically exchangeable Ni pool is the same as that of the soil solution over time. Therefore, equation (2) can be expressed:

$$E_{(t)} = \frac{Ni_S \times R_S}{r_t} \quad (2)$$

*Calculation of Ni average flow.* The average flow ( $F_m$ ) describes exchanges between the solution and the different Ni exchangeable pools of the mineral.

$$F_m = Q_{Ni} * n / (r_1/R)^{(1/n)} \quad (3)$$

Where  $F_m$  is the mean flow within each column (in  $\mu\text{g Ni min}^{-1}$ ) and  $Q_{Ni}$  is the amount of Ni in the solution within each column.

### ***Statistical analyses.***

Results presented in all tables and figures correspond to mean values. Significant statistical differences among values were evaluated by analyses of variance using STATBOXPRO™ program (Grimmer Logiciels Version 6.40, 1997-2002) and Newman-Keuls test at the threshold level of a P value of 0.05. Values with the same letter are not significantly different at  $p=0.05$ .

## **RESULTS**

### **Chrysotile weathering characterization.**

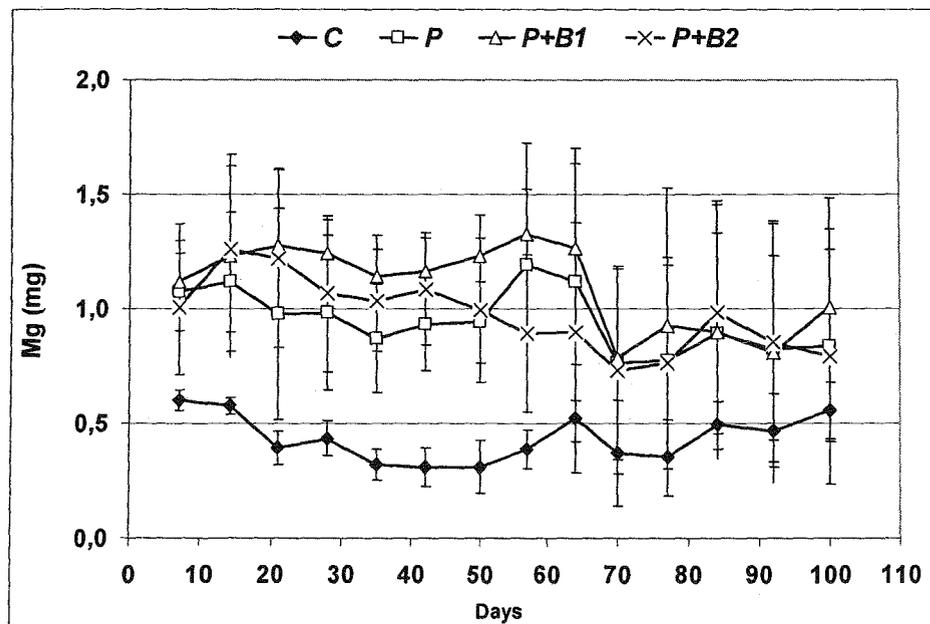
XRD analyses showed that there was not mineralogical difference between initial chrysotile samples and samples of all treatments collected after the experiment. Moreover, neither precipitations of new mineral phases nor transformation were found by SEM analyses. These results showed that the major process involved in chrysotile weathering certainly corresponds to dissolution.

## Impact of *L. emarginata* and contribution of bacteria inoculation on chrysotile dissolution.

- Mg amounts leached from dissolved chrysotile

Mg amounts percolated from dissolved chrysotile (" $Ql_{Mg}$ ") were measured each week in the leachates for 14 weeks (Figure 2).  $Ql_{Mg}$  values permitted to evaluate chrysotile dissolution along the experiment relatively to the different treatments.  $Ql_{Mg}$  values measured for all *L. emarginata*'s treatments (i.e. *P*, *P+B1* and *P+B2*) were 2-fold higher on average than those measured for control treatment without plant, especially for the first 60 days of the experiment. But, bacteria inoculation (i.e. *P+B1* and *P+B2* treatments) had no significant effect on  $Ql_{Mg}$  values compared to *P* treatment without inoculation.

**Figure 2:** Quantities of leached Mg along of the experiment.



$Ql_{Mg}$  measured for the control treatment *C*, appeared rather stable along the experiment, corresponding to a mean value of 0.4 mg per week. All plant treatments had the same behaviour: firstly,  $Ql_{Mg}$  values were rather high (about 1.0 mg of Mg on average), then, after the 64<sup>th</sup> day,  $Ql_{Mg}$  values decreased and stabilized to 0.9 mg.

- Characterization of the Ni availability by IEK

IEK technique permitted to characterize the different isotopically exchangeable pools of Ni in the mixture *Ch-Qz* (Table 1). Results showed that Ni concentration in solution was very weak, ranging from 3 to 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for *C* and *P+B2*, respectively. Moreover, Ni exchangeable between 0 and 15 weeks (i.e.  $E_{(0-15\text{min})}$  added to  $E_{(15\text{min}-10\text{weeks})}$  and  $E_{(10\text{min}-15\text{weeks})}$ ) represented only

11 % of the total Ni content of the system. Consequently, the major part of Ni in the system was not exchangeable during the experiment period.  $C_{Ni}$  and  $E_{(0-1min)}$  values in the system *Ch-Qz* were significantly higher before experiment compared to the control treatment. On the contrary, *P* and *P+B2* treatments significantly increased  $E_{(0-1min)}$  values compared to the control without plant. But these treatments showed no significant difference with values measured before experiment. *P+B1* treatment did not present significant difference compared to both *before experiment* measurements and *C* treatments, except for  $E_{(10min-15weeks)}$ . The total Ni content of the system was 2 % lower on average in all the treatments with *L. emarginata* compared to *C*. But, bacteria inoculation had no significant effect on the Ni availability compared to *P* treatment without inoculation.

**Table 1:** Parameters from IEK before and after 15 weeks of experiment (*C*, *P*, *P+B1* and *P+B2* treatments).

	$C_{NiH_2O}$	$E_{(0-1min)}$	$E_{(1min-10min)}$	$E_{(10min-15 weeks)}$	$E_{(>15 weeks)}$	Total Ni
	$\mu g L^{-1}$	$mg Kg^{-1}$				
<i>Before experiment</i>	4.5 a	0.18 ab	0.23 ab	13.26 ab	114.33 n.s.	128.00 a
<i>C</i>	3.0 b	0.13 c	0.20 ab	19.65 a	107.91 n.s.	127.89 a
<i>P</i>	4.1 ab	0.19 ab	0.23 ab	13.76 ab	111.53 n.s.	125.71 b
<i>P+B1</i>	3.9 ab	0.16 bc	0.18 b	9.98 b	114.73 n.s.	125.04 b
<i>P+B2</i>	5.0 a	0.22 a	0.26 a	13.36 ab	112.13 n.s.	125.97 b

Ni mean flow (Table 2) calculation permitted to quantify Ni movements between the solid phase and the solution in the system *Ch-Qz*. Ni mean flows was very weak, *i.e.* about  $10 \mu g min^{-1}$  in each column. *L. emarginata* had no significant effect on Ni exchanges between solid phase and solution compared to both treatments *before experiment* and without plant, except for *P+B2* where  $F_m$  increased significantly compared to *C*.

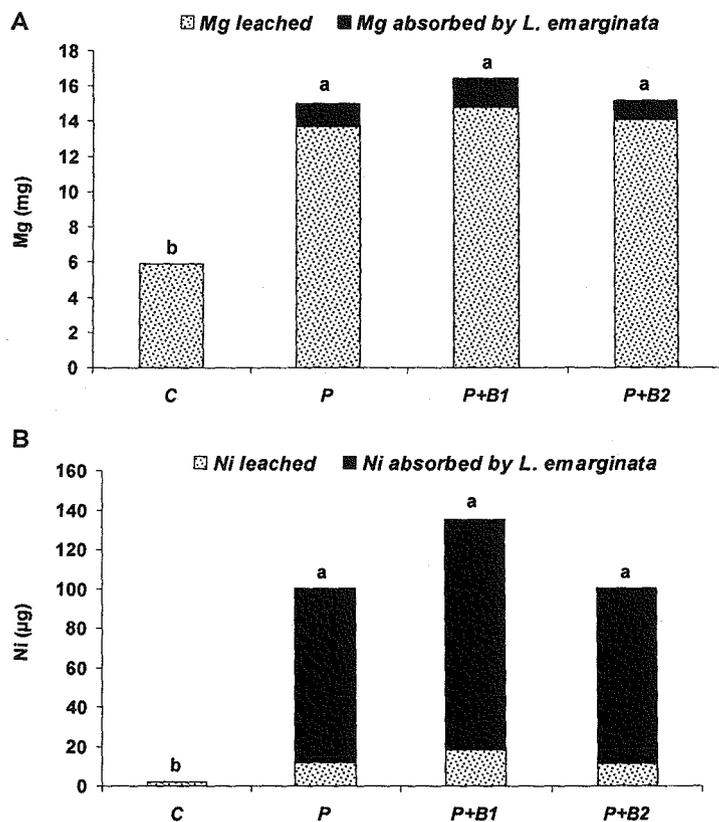
**Table 2:** Ni means flows calculated from IEK parameters.

Treatments	$F_m$ in each column	
	$\mu g min^{-1}$	
<i>Before culture</i>	10.52	ab
<i>C</i>	6.15	b
<i>P</i>	12.55	ab
<i>P+B1</i>	9.32	b
<i>P+B2</i>	17.59	a

- Mass balance of Mg and Ni from chrysotile dissolution after 15 weeks

After 15 weeks, a balance-sheet of chrysotile dissolution was realized according to Mg and Ni amounts leached and absorbed by *L. emarginata*, i.e. total Mg and Ni quantities ( $Q_{Mg}$  and  $Q_{Ni}$ ) released from dissolved chrysotile (Figure 3). Results showed that  $Q_{Mg}$  and  $Q_{Ni}$  were significantly higher for all treatments with *L. emarginata* compared to control without plant. Effectively, the amounts of elements released from chrysotile dissolution were more than 2-fold higher with *L. emarginata* for Mg and more than 7-fold for Ni. Bacteria inoculation had no significant effect on chrysotile dissolution. Ni partitioning between the leachates and the plant was different for Mg and Ni. 91 % on average of  $Q_{Mg}$  for the three plant treatments were percolated compared to 12 % for  $Q_{Ni}$ . Thus, Ni was preferentially absorbed by *L. emarginata*. The plant absorbed up to 2 % of the initial total Ni content of the system.

**Figure 3:** Mass balance of total Mg (A) and Ni (B) released from dissolved chrysotile after 15 weeks of experiment with or without *L. emarginata* and inoculated bacteria.



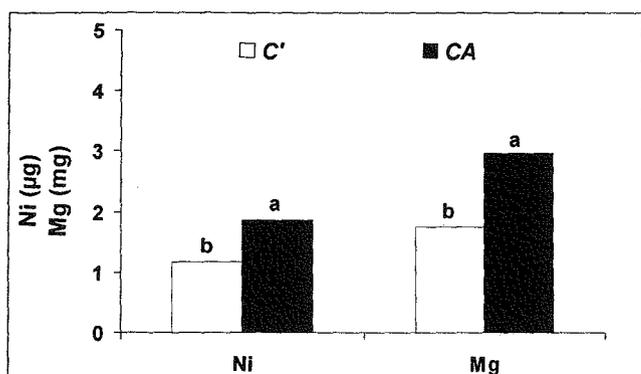
**Citric acid effect on chrysotile dissolution**

- Mass balance of Mg and Ni from chrysotile dissolution after 30 days

At the end of the experiment, the balance sheet of chrysotile dissolution was realized according to the total Mg and Ni amounts leached ( $Q_{Mg}$  and  $Q_{Ni}$ ) in the solution on leaving the

columns (Figure 4).  $Q_{Mg}$  and  $Q_{Ni}$  were significantly higher with citric acid compared to control treatment  $C'$  without citric acid. After 30 days, 1.76 mg of Mg and 1.18  $\mu$ g of Ni were released from dissolved chrysotile for  $C'$  compared to respectively 2.97 mg and 1.87  $\mu$ g for  $CA$ .  $Q_{Mg}$  released with citric acid represented 72 % of the  $Q_{Mg}$  released after 28 days with *L. emarginata* ( $P$  treatment).

**Figure 4:** Quantities of Mg and Ni released from dissolved chrysotile after 30 days with citric acid ( $AC$ ) or without ( $C'$ ). Comparison with Mg values ( $C$  and  $P$  treatments) measured from the first experiment after 28 days.



### Chrysotile dissolution rates

Chrysotile dissolution rates (" $K_d$ ") were calculated from the total quantities of Mg released from chrysotile dissolution after the two experimental periods (Table 3). Control treatments of the 2 experiments have similar values, that is to say  $2.5 \cdot 10^{-13}$  and  $2.6 \cdot 10^{-13}$   $\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  respectively for  $C$  and  $C'$ . So,  $K_d$  values estimation appeared as coherent values. That is why the comparison between treatments with *L. emarginata* and citric acid was possible.  $K_d$  values were about 2-fold higher with *L. emarginata* and citric acid compared to control treatments. Bacteria inoculation had no significant effect on chrysotile dissolution rates compared to  $P$  treatment.

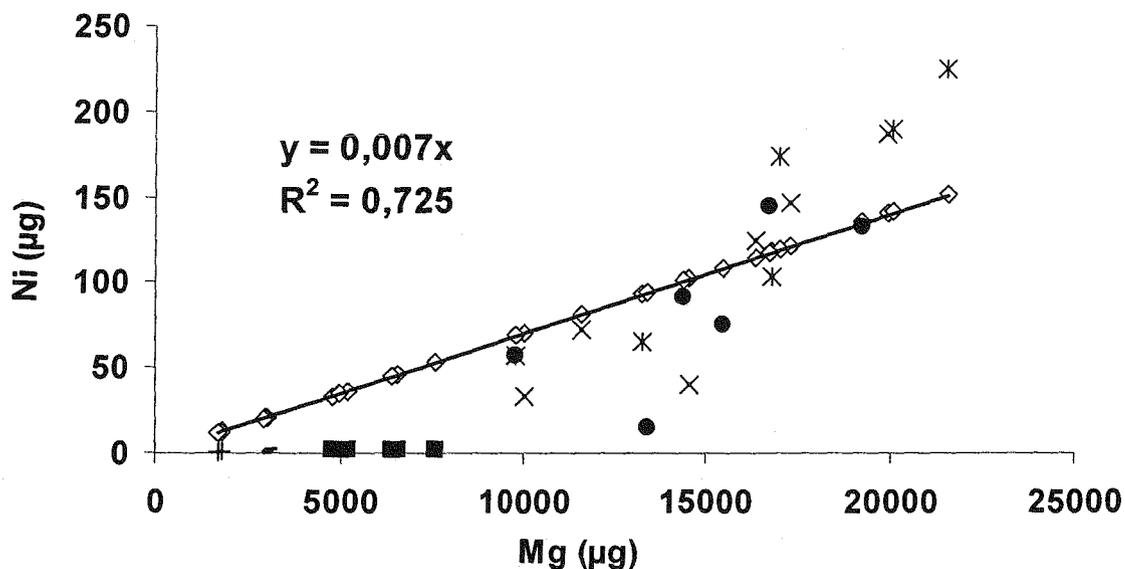
**Table 3:** Chrysotile dissolution rates ( $K_d$ ).

	$K_d \text{ mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$	
$C$	2.5E-13	b
$P$	5.7E-13	a
$P+B1$	6.2E-13	a
$P+B2$	5.8E-13	a
$C'$	2.6E-13	b'
$AC$	4.4E-13	a'

### Chrysotile dissolution stoichiometry

The analyses of the relations between total Mg and Ni amounts released from chrysotile dissolution for all treatments of the two experiments showed a highly significant positive correlation ( $R^2=0.73$ ) (Figure 5). Theoretical amounts of total Ni released were calculated for each amount of Mg measured, according to the exact chrysotile formula  $((Mg_{2,755}Fe_{0,083}Al_{0,064}Ni_{0,008}Cr_{0,005}Ca_{0,03})Si_{2,066}O_{5,000}(OH)_{3,475})$ . Regression line calculated from measured points corresponds to the theoretical points (*i.e.*  $y = 0.007x$ ). Thus, the total amounts of Mg ( $Q_{Mg}$ ) released from Chrysotile dissolution were about 140-fold higher than those of released Ni.  $Q_{Ni}$  measured for controls *C* and *C'* and for *CA* treatments were lower compared to theoretical values. On the contrary,  $Q_{Ni}$  measured for *P+BI* treatment were higher than theoretical values.

**Figure 5:** Chrysotile dissolution stoichiometry. Theoretical values calculated from both chrysotile formula and measured  $Q_{Mg}$  values ( $\diamond$ ). Regression line ( $y = 0.007x$ ) corresponds to measured Ni values partitioning as following: *Control* ( $\blacksquare$ ), *P* ( $\times$ ), *P+BI* ( $*$ ) and *P+B2* ( $\bullet$ ).



### DISCUSSION

XRD and SEM analyses did not give evidence of new mineral phase formation from the system *Ch-Qz*. Thus, the major process involved in this context was certainly dissolution reactions. *L. emarginata* increased more than 2-fold chrysotile dissolution, and about 7-fold Ni availability. But the inoculation of the strains *BI* and *B2*, in this context, had no significant effect on mineral dissolution. These results may be due either to the unadapted

environmental conditions of the experiment for *B1* and *B2* strains (e.g. Alkaline pH, lack of soil organic matter), or to a competition between inoculated bacteria and the original microflora associated with *L. emarginata* which was observed in the three plant treatments. Indeed, bacteria counting in the uninoculated *P* treatment and in the two inoculated *P+B1* and *P+B2* treatments at the end of the experiment were not significantly different (data not shown). Control treatment was the only one showing significant lower values. Moreover, the strains observed in inoculated treatments appeared as the same as the original strains found in the natural microflora of *L. emarginata*'s rhizosphere (*P* treatment). The different strains associated with *L. emarginata* might possibly play an active part in chrysotile dissolution.

The quantities of Mg leached showed that, for the first weeks, chrysotile dissolution rate was significantly higher with *L. emarginata* compared to control without plant. Chrysotile dissolution rate was rather constant for all treatments for the first 64 days. After this period, chrysotile dissolution rate decreased and stabilized towards lower values, except for control treatment for which it was constant all along the experiment. The deficit of leached Mg during the last six weeks corresponded approximately to Mg uptake by *L. emarginata* at the end of the experiment. Most of the Mg uptake by plants might have occurred during this period.

The comparison of Ni availability before and after experiment by IEK techniques reinforced the hypothesis of a major dissolution in chrysotile weathering. In the control treatment *C* without plant,  $C_{Ni}$  in solution and the labile pool  $E_{(0-1min)}$  significantly decreased compared to treatment before experiment. The quantity of Ni leached after 15 weeks was  $0.04 \text{ mg kg}^{-1}$  for *C*. This value approximately corresponded to the difference between  $E_{(0-1min)}$  values of before experiment and control treatments after the experiment *i.e.*  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ . Despite a high Ni uptake by *L. emarginata* ( $156 \text{ } \mu\text{g}$  of Ni on average), Ni partitioning between the solution and the different exchangeable pools of the system was the same as before experiment. These results showed that the solution was not buffered by the most exchangeable pools of the system but Ni in solution was rather directly supplied from dissolved chrysotile, expressed by an apparent equilibrium of the system. Ni mean flows between solution and Ni exchangeable pools were very weak about  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . So, to absorb sufficiently high Ni quantities, *L. emarginata* would mobilize Ni inducing chrysotile dissolution. Citric acid is an organic compound released in the rhizosphere of some hyperaccumulators to mobilize Ni and facilitate its transfer towards roots when there is a lack of bioavailable Ni (14). Citric acid increased chrysotile dissolution. After 30 days, Mg and Ni amounts released by dissolved mineral were about 1.5-fold higher with citric acid compared to control treatment without citric acid. Citric acid exudation by *L. emarginata* could be one

of the strategies used by hyperaccumulators species to mobilize Ni. Chrysotile dissolution rates were estimated for all treatments of the two experiments. Chrysotile dissolution was significantly faster with *L. emarginata* or with citric acid compared to control treatments without both plant and citric acid addition. The comparison between the two experiments, according to the total amounts of Mg released from dissolved chrysotile ( $Q_{Mg}$ ), showed that control treatments *C* and *C'* had similar values *i.e.* 2.00 mg and 1.76 mg of Mg, respectively. But,  $Q_{Mg}$  value obtained for the treatment *P* with *L. emarginata* after 28 days (*i.e.* 4.15 mg of Mg) was higher than those obtained for *AC* treatment after 30 days (*i.e.* 2.97 mg of Mg). The concentration of citric acid artificially provided in *AC* treatment, *i.e.* about 100  $\mu$ M, was maybe lower than the actual citric acid concentration in the rhizosphere of *L. emarginata*.

The analyses of the relations between total Mg and Ni amounts released from chrysotile dissolution ( $Q_{Mg}$  and  $Q_{Ni}$ ) for all treatments of the two experiments showed that chrysotile dissolution was stoichiometrical. Regression line calculated from measured points corresponds to the theoretical points calculated according to the precise chrysotile formula. However, when dissolution was weak (*C* treatment) and/or when experiment period was short (*C'* and *AC* treatments),  $Q_{Ni}$  measured were lower than theoretical values according to  $Q_{Mg}$  values. Preferential and fast dissolution of Ni-free external layers of Mg hydroxides would explain the massive Mg release compared to Ni release at this stage. When the dissolution was intense,  $Q_{Ni}$  measured were higher than theoretical values according to  $Q_{Mg}$  values (*P+BI* treatment). Now, Ni was rapidly taken up by *L. emarginata* in unlimited quantities *i.e.* the highest the bioavailable Ni in the system, the highest the Ni uptake by the plant. In return, Mg uptake by *L. emarginata* was limited. Thus, precipitation of Mg layers around the roots could appear and so artificially decrease the expected amount of Mg leached. Roots had been washed prior to mineralization and a part of this Mg adhering to roots may have been discarded during this step. Moreover, these results showed that the unlimited Ni uptake by the hyperaccumulator species in addition to organic acid exudation might certainly activate chrysotile dissolution.

*L. emarginata* was able to extract from the system up to 2 % of the total Ni whereas chrysotile was a low-availability Ni source. Organic acids released by plant roots were certainly involved in Ni mobilization. And we suppose that the original microflora from the rhizosphere of *L. emarginata* played a role as well. That is why, it would be interesting to isolate and test rhizobacteria associated with *L. emarginata* in order to know if their stimulation could increase Ni bioavailability in soils and so Ni uptake by hyperaccumulators improving phytomining processes.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the French Ministry of National Education, Research and Technology and Continental Ecosphere national program (Ecotoxicology and Ecodynamics of contaminants) for financial support for this research.

## REFERENCES

- (1) Lee, B.D.; Sears, S.K.; Graham, R.C.; Amrhein, C.; Vali, H. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2003, 67, 1309-1317.
- (2) Coleman, R.G.; Joves, C. In *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*; Proceedings 1<sup>st</sup> intern. Conf. on Serpentine Ecology. Baker A.J.M.; Proctor J.; Reeves R.D. Eds.; Intercept Ltd, Andover, Hampshire, 1992.
- (3) Wicks, F.J.; O'Hanley, D.S. In *Hydrous Phyllosilicates*, Bailey, S.W. Ed., Reviews in Mineralogy, *Mineralogical Society of America*, 1988, 19, pp 91-167.
- (4) Touray J.C. In *La dissolution des minéraux. Aspects cinétiques*. Masson, Paris, 1980, pp 84-95.
- (5) Lee, B.D.; Sears, S.K.; Graham, R.C.; Amrhein, C.; Vali, H. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2003, 67, 1309-1317.
- (6) Bales, R.C.; Morgan J.J. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 1985, 49, 2281-2288.
- (7) Thomassin, J.H.; Goni, J.; Baillif, P.; Touray, J.C.; Jaurand, M.C. *Physics and Chemistry of Minerals.* 1977, 1 (4), 385- 398.
- (8) Brooks, R.R.; Lee, J.; Reeves, R.D.; Jaffre, T. *J. Geochem. Explor.* 1977, 7, 49-57.
- (9) Jaffré, T.; Brooks, R.R.; Lee, J.; Reeves, R.D. *Science.* 1976, 193, 579-580.
- (10) Baker, A.J.M.; McGrath, S.P.; Sidoli, C.M.D.; Reeves, R.D. *Resources, Conservation and Recycling.* 1994, 11, 41-49.
- (11) Massoura, S.T.; Echevarria, G.; Leclerc-Cessac, E.; Morel, J.L. *Australian Journal of Soil Research.* 2004, 42, 933-938.
- (12) Chardot, V.; Massoura, S.T.; Echevarria, G.; Reeves, R.D.; Morel, J.L. *Int. J. Phytoremediation.* 2005, 7, 323-335.
- (13) Wenzel, W. W.; Bunkowski, M.; Puschenreiter, M.; Horak, O. *Environ. Pollut.* 2003, 123, 131-138.
- (14) Boominathan, R.; Doran, P.M. *J Biotech.* 2003, 101, 131-146.
- (15) Mishra, D. ; Kar, M. *Bot. Rev.* 1974, 40, 395-452.

- (16) L'Huillier, L. In *Biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitique ferritique de Nouvelle Calédonie. Effets toxiques de Ni sur le développement et la physiologie du maïs*. PhD University of Montpellier, 1994, 249 pp.
- (17) Massoura, S.T. ; Echevarria, G. ; Becquer, T. ; Ghanbaja, J. ; Leclerc-Cessac, E. ; Morel, J.L. *Geoderma*. 2006, *in press*, doi:10.1016/j.geoderma.2006.01.008.
- (18) Shallari, S.; Echevarria, G.; Schwartz, C.; Morel, J.L. *S. Afr. J. Sci.*, 2001, 97, 568-570.
- (19) Jones, D.L.; Darah, P.R.; Kochian, L.V. *Plant and Soil*.1996, 180 (1), 57 - 66
- (20) Welch, S.A.; Ullman, W.J. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1993, 57, 2725-2736.
- (21) Lee, J.; Reeves, R.D.; Brooks, R.R.; Jaffré, T. *Phytochemistry*. 1977, 16(10), 1503-1505.
- (22) Yang, X. E.; Baligar, V. C.; Foster, J. G.; Martens, D. C. *Plant and Soil*. 1997, 196(2), 271-276.
- (23) Calvaruso, C.; Turpault, M.P.; Frey-Klett, P. *Appl. Environ. Microbiol*. 2006, 72, 1258-1266.
- (24) Leyval, C.; Berthelin, J. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 1991, 55, 1009–1016.
- (25) Marschner, H. In *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London, UK, 1986, pp 447-476.
- (26) Abou-Shanab, R. A.; Angle, J. S.; Delorme, T. A.; Chaney, R. L.; Van Berkum, P.; Moawad, H.; Ghanem, K.; Ghazlan, H. A. *New Phytol*. 2003, 158, 219-224.
- (27) Echevarria, G.; Morel, J.L.; Fardeau, J.C.; Leclerc-Cessac, E. *Soils J. Environ. Quality*. 1998, 27, 1064-1070.

## Annexe 10 : Propriétés physico-chimiques des sols de Bure, Fougères et Breuil.

### Sol de Bure

Prof. (cm)	pH eau	Granulométrie					C ‰	N ‰	C/N	Cations échangeables				CEC cmol <sub>c</sub> /kg	S/T %
		%								cmol+/kg					
		A	LF	LG	SF	SG				Ca	Mg	K	Na		
0-20	8.2	38.6	37.8	12.9	2.8	7.9	19.5	1.95	10.0	42.3	0.67	0.72	0.04	10.0	Sat.

### Sol de Breuil

Prof. (cm)	pH eau	Granulométrie					C ‰	N ‰	C/N	Cations échangeables				CEC cmol <sub>c</sub> /kg	S/T
		%								échangeables					
		A	LF	LG	SF	SG				Ca	Mg	K	Na		
0-8	4.3	15.9	10	5	5	47	7.9	nd	nd	0	0.5	0.3	nd	12.2	7.7
10-18	4.6	13.2	19	7	8	51	1.2	nd	nd	0	0.3	0.2	nd	10.5	5
20-28	4.7	14.5	18	6	7	52	0.9	nd	nd	0	0.2	0.1	nd	8.9	3.5

### Sol de Fougères

Prof. (cm)	pH eau	Granulométrie					C ‰	N ‰	C/N	Cations échangeables				CEC cmol <sub>c</sub> /kg	S/T
		%								échangeables					
		A	LF	LG	SF	SG				Ca	Mg	K	Na		
0-8	3.6	15.8	23.9	49.1	10.6	6	7.6	0.4	19.6	0.6	0.4	0.3	0.1	8.3	16.9
8-16	4.0	13.1	24.4	50.7	11.1	7	2.2	1.0	22.0	0.1	0.1	0.1	0.1	5.5	6.3
16-35	4.3	13.5	23.9	50.5	11.2	9	1.5	0.7	19.6	0.1	0	0.1	0.1	3.7	6.2

A : argiles, LF : limons fins, LG : limons grossiers, SF : sables fins, SG : sables grossiers.

**Annexe 11: Liste des publications, rapports et communications issus de ce travail de thèse.**

**Publications**

• **Articles publiés :**

Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees : a budgeting analysis.

Calvaruso Christophe, Turpault Marie-Pierre et Frey-Klett Pascale.

Applied and Environmental Microbiology 72, 2, pp. 1258-1266.

Altération microbienne des minéraux.

Uroz Stéphane, Calvaruso Christophe, Turpault Marie-Pierre et Frey-Klett Pascale.

Biofutur 268, pp. 37-41.

• **Articles soumis :**

Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization process.

Calvaruso Christophe, Turpault Marie-Pierre, Leclerc-Cessac Elisabeth and Frey-Klett Pascale.

Microbial Ecology, le 11 septembre 2006.

Mycorrhizosphere effect on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil.

Uroz Stéphane, Calvaruso Christophe, Turpault Marie-Pierre, Pierrat Jean-Claude, Mustin Christian et Frey-Klett Pascale.

Applied and Environmental Microbiology, le 02 octobre 2006.

• **Articles en préparation :**

Rapid clay weathering in the rhizosphere of different tree species in an acid forest ecosystem.

Calvaruso Christophe, Mareschal Louis, Leclerc Elisabeth et Turpault Marie-Pierre.

Forest trees select high mineral weathering bacteria to balance low nutrient availability.

Calvaruso Christophe, Turpault Marie-Pierre, Uroz Stéphane, Leclerc Elisabeth, Ranger Jacques, Garbaye Jean et Frey-Klett Pascale.

Alteration of chrysotile in the rhizosphere of the nickel hyperaccumulator *Leptoplax emarginata*.

Chardot Vanessa, Echevarria Guillaume, Calvaruso Christophe, Turpault Marie-Pierre et Jean-Louis Morel.

Biological, environmental and anthropogenic effects on the test-mineral dissolution in a forest ecosystem.

Turpault Marie-Pierre, Nys Claude et Calvaruso Christophe.

### **Communications courtes dans congrès, symposiums**

TURPAULT M-P, CALVARUSO C., NOURRISSON G. (2004) Rhizosphere in forest ecosystems : a favorable interface for tree nutrition. Rhizosphere12-17 september 2004, Munich, Germany [résumé, poster].

CALVARUSO C., TURPAULT M-P, FREY-KLETT P. (2004) Effect of plants and soil bacteria on the mineral weathering. Rhizosphere12-17 september 2004, Munich, Germany [résumé, communication orale].

TURPAULT M.-P., CALVARUSO C., E. LECLERC-CESSAC, NOURRISSON G., RENAUD J.-P. AND NDIRA V. (2004) Effect of forest tree species on rhizospheric soil. Eurosoil 2004 4-12 september, Freiburg Germany [résumé, poster].

CALVARUSO C., TURPAULT M.-P., FREY-KLETT P. (2004) The effect of plants and soil bacteria on the mineral weathering. Eurosoil 2004 4-12 september, Freiburg Germany [communication orale].

- CALVARUSO C., TURPAULT M.P., FREY-KLETT P. (2004) The effect of plant and soil bacteria on mineral weathering. VIèmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Rennes, 10-12 mars 2004 [poster].
- CALVARUSO C., TURPAULT M.P., MUSTIN C., AMELLAL N., FREY-KLETT P. (2004) Structuration fonctionnelle des communautés bactériennes dans l'ectomycorhizosphère du chêne, en relation avec les processus d'altération des minéraux des sols. VIèmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Rennes, 10-12 mars 2004 [résumé, poster].
- CALVARUSO C., FREY-KLETT P., TURPAULT M.P. & MUSTIN C. (2003) Structuration of bacterial communities in the mycorrhizosphere of oak, in relation to mineral weathering processes. 2nd Joint Meeting of COST 631 Management Committee and Working Groups. Montpellier du 24-27 octobre 2003 [résumé, poster].
- TURPAULT M.-P., FREY-KLETT P., MUSTIN C., CALVARUSO C. & RAFIE O. (2003) Weathering rates in forest soils : the influence of plant roots and microorganisms. 16th International Symposium on Environmental Biogeochemistry. Oirase 1-7 september. [résumé étendu, conférence invitée].
- TURPAULT M.-P., BAKKER M., BOUDOT J.-P., CALVARUSO C., CHAUSSIDON M., COLIN-BELGRAND M., DAMBRINE E., FREY-KLETT P., GARBAYE J., GERARD F., HUMBERT B., LAPEYRIE F., LEYVAL C., LUIS B., MUSTIN C., NOURRISSON G., PIERRAT J.-C. & WALCARIUS A. (2003) Quantification de l'altération biologique des minéraux du sol. Etude des interfaces plantes-microorganismes-solutions-minéraux-phases gazeuses dans des écosystèmes forestiers et en conditions contrôlées. Vèmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Nancy, 12-14 mars 2003. [résumé, poster].
- FREY-KLETT P., CALVARUSO C., SATRANI B., RAY P., AMELLAL N., LAPEYRIE F., GARBAYE J. & TURPAULT M.-P. (2003). Les bactéries du sol jouent-elles un rôle dans l'altération des minéraux? Vèmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Nancy, 12-14 mars 2003. [résumé, poster].

#### **Autres supports**

- TURPAULT M.-P., FREY-KLETT P., MUSTIN C., CALVARUSO C. & RAFIE O. (2003) Weathering rates in forest soils : the influence of plant roots and micro-

organisms. In Biochemical aspect of earth system and bioremediation of polluted environments. Ed. T. Hattori, ISEB16, Sendai, Japan.

TURPAULT M.-P., BOUDOT J.P., CALVARUSO C., CHAUSSIDON M., COLIN-BELGRAND M., FREY-KLETT P., MUSTIN C., WALCARIUS A. (2004)  
Quantification de l'altération biologique des minéraux du sol. Rapport Final ACI  
Ecologie quantitative-Contrat 1317A, 109p.

SCD UHP NANCY 1  
Faculté des Sciences  
Rue de l'Université - CS 20148  
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

Monsieur CALVARUSO Christophe

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en GEOSCIENCES

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER *N° 1318*

Nancy, le *29/11/06*

Le Président de l'Université



## Résumé

L'importance du processus d'altération des minéraux pour la nutrition des arbres en sols forestiers acides est aujourd'hui admise. En revanche, la contribution du facteur biologique dans ce processus reste inconnue. Dans ce contexte, en associant des études et des expérimentations en forêt à des expériences de laboratoire, notre travail a eu pour objectif de quantifier l'effet de la rhizosphère d'arbres forestiers (racines et microorganismes associés) sur l'altération des minéraux du sol.

Nous avons mis en évidence une augmentation de l'altération des minéraux (dissolution et transformation) dans la rhizosphère des arbres en forêt, suggérant un rôle important de ce compartiment dans la dynamique des éléments minéraux et dans l'évolution des sols. Grâce à la caractérisation *in vitro* du potentiel d'altération de souches microbiennes isolées de sol forestier global et d'ectomycorhizes, nous avons pu montrer une structuration fonctionnelle des communautés bactériennes cultivables, qui suggère une sélection exercée par la symbiose ectomycorhizienne en faveur des souches améliorant la nutrition minérale. Par ailleurs, grâce à un dispositif de culture en colonne que nous avons développé, nous avons démontré lors de différentes interactions plante - bactéries - champignons que racines et bactéries augmentent de manière significative la mobilisation de certains cations (Mg, K, Fe, Ni, Cs), *via* l'altération d'un minéral test. Ce processus biologique est affecté en présence d'éléments toxiques comme l'uranium.

Au vu de l'ensemble de nos résultats, notre travail permet de proposer l'hypothèse que, dans les sols forestiers, la disponibilité en nutriments contrôlerait l'altération biologique par son impact sur l'activité des racines et des microorganismes associés. Ceci suggère une forte plasticité des écosystèmes forestiers dans le domaine de la nutrition, qui pourrait expliquer en partie la durabilité de ces écosystèmes.

Mots-clés : altération des minéraux, bactéries, champignons, études et expérimentations en forêt, expérimentations en laboratoire, racines, rhizosphère.

## Summary

The impact of the mineral weathering process on tree nutrition in acidic forest soils is well known. However, the quantitative effect of different biological factors on this process remains to be clarified. In this context, the aim of the present work was to quantify the impact of the rhizosphere of forest trees (roots and microorganisms) on the weathering of soil minerals.

In forest, we observed an increase of the weathering of minerals (dissolution and transformation) in the rhizosphere of trees, suggesting an important impact of the tree rhizosphere on the dynamics of minerals as well as on soil evolution. We characterized *in vitro* the weathering potential of microorganisms which were isolated in forest from bulk soil and ectomycorrhizas. We showed that the ectomycorrhizal symbiosis significantly structures the functional diversity of culturable bacterial communities and selects strains potentially beneficial to tree nutrition. We developed a column experiment to quantify the respective impact of plant, bacteria and fungi on the weathering process. We demonstrated that tree roots and bacteria significantly increase Mg, K, Fe, Ni, Cs mobilisation *via* the weathering of a reference mineral. This process is altered in the presence of toxic elements such as uranium.

Considering the whole of our results, we can propose the following hypothesis: in forest soils, the nutrient bioavailability determines the mineral weathering due to its impact on the root and microorganism activity. This suggests an important plasticity of forest ecosystems towards nutrition, which could partly explain the sustainability of these ecosystems.

Key-words: bacteria, experiment in laboratory, fungi, mineral weathering, observations in forest, roots, rhizosphere.