



HAL
open science

Incidences d'interactions racines-microorganismes-état hydrique sur la mobilisation et redistribution de métaux dans des sols nickélicifères

Isabelle Paskiewicz

► To cite this version:

Isabelle Paskiewicz. Incidences d'interactions racines-microorganismes-état hydrique sur la mobilisation et redistribution de métaux dans des sols nickélicifères. Sciences de la Terre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10042 . tel-01754320

HAL Id: tel-01754320

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754320v1>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Faculté des Sciences et Techniques

U.F.R. S.T.M.P.
Ecole Doctorale RP2E
Département de Formation Doctorale des
Sciences de la Terre

Thèse
Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de L'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Sciences du Sol - Géomicrobiologie

par **Isabelle PASKIEWICZ**

***INCIDENCES D'INTERACTIONS RACINES-MICROORGANISMES-
ÉTAT HYDRIQUE SUR LA MOBILISATION ET REDISTRIBUTION
DE MÉTAUX DANS DES SOLS NICKÉLIFÈRES***

Soutenue publiquement le 9 Juin 2006 devant un jury composé de :

M. M. JAUZEIN	Professeur - CNRS-LIMOS, Nancy I	Président
M. M. BENEDETTI	Professeur – Laboratoire de Géochimie des Eaux, Paris 7	Rapporteur
M. J.-C. MUNCH	Professeur – GSF Neuherberg, Univ. Munich (Allemagne)	Rapporteur
M. J. BERTHELIN	Directeur de Recherche - CNRS-LIMOS, Nancy I	Directeur de thèse
Mme D. FORTIN	Professeur-Adjointe, Université d'Ottawa (Canada)	Examinateur
M. E. FRITSCH	Directeur de Recherche - IRD Paris, IMPMC, Paris 6	Examinateur
Mme C. LEYVAL	Directeur de Recherche - CNRS-LIMOS, Nancy I	Invitée



CNRS LIMOS UMR 7137
Laboratoire Interactions Microorganismes-Minéraux-Matières
Organiques dans les Sols
Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences
BP 239
54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex
FRANCE

LIMOS

Remerciements

Ce travail a été financé par une allocation de recherche du ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Merci d'avoir rendu possible la réalisation de ce travail.

La première personne que je tiens à remercier est Jacques Berthelin, directeur de thèse et correcteur terriblement efficace et objectif, pour sa confiance, le temps qu'il m'a accordé, mais aussi sa patience, sa bonne humeur, et son talent pour relativiser les choses.

Je remercie également Corinne Leyval qui m'a accueillie dans le tout neuf laboratoire qu'est le LIMOS, et a fait en sorte que nous puissions travailler dans les meilleures conditions possibles.

J'adresse ma vive reconnaissance aux membres du Jury, Danielle Fortin, Corinne Leyval, Marc Benedetti, Emmanuel Fritsch, Michel Jauzein et Jean-Charles Munch pour avoir accepté de juger ce travail malgré leur temps déjà très occupé et un éloignement géographique parfois important.

Des personnes extérieures au LIMOS m'ont aidé dans mes analyses et je tiens à les remercier. Je pense à l'équipe de Danielle Fortin de l'Université d'Ottawa, ainsi qu'à Jérôme Cortot du LCPME qui a pu travailler dans l'urgence et me sortir ainsi de ce que j'appellerai un pépin analytique.

Vient maintenant le tour des anciens du CPB et des "Limosiens", si nombreux et si importants à mes yeux. Je vous remercie donc : James, qui m'a initiée avec humour et poésie aux mystères du fer (il faut bien que le fer aille...) ; Jean-Luc, toujours prêt à rendre service avec ses talents de bricoleur ; Sébastien, formidable encadrant de DEA qui a été d'une patience d'ange malgré mes incessantes questions au cours de mes six mois de stage, et dont le rire a bien manqué au LIMOS ; Stéphanie, toujours à l'écoute et source de bons conseils, à qui je souhaite réussite et bonheur dans sa nouvelle carrière et nouvelle vie de famille ; Denis, compagnon de cantine mais surtout ami toujours attentif et "chromateux" hors paire, et à qui je dois mon petit Woody ; Christine et Jojo (Gisèle et Lucienne), le cœur sur la main, toujours un mot pour rire, aux coups de gueules légendaires, et complices de tant de choses (cafés, chapeaux de Ste Catherine, rires, loto et j'en passe) ; Chantal, si gentille, si douce, si attentive et toujours à l'affût d'une bonne blague ; Monsieur Toutain (merci pour vos caramels et orangettes, et vos histoires toujours passionnantes), Christian, alias Mac Gyver ; Thierry (merci de l'intérêt que tu portes à chacun en ne laissant personne à l'écart, et de ta gentillesse) ; Patrick, nouveau venu à qui je souhaite bonne chance et que j'aurais aimé mieux connaître ; Colette, Nadim, Françoise, Jean-Pierre, Michel, Anne, Dominique, Lise, votre gentillesse à

mon égard a contribué à mon bien être au laboratoire. Et bienvenue à Brice, Emile et Paul, bon courage et bonne chance. Un grand merci également à tous mes colocataires de bureau, qui ont tous été formidables : Kadria, avec qui j'ai adoré discuter pendant des heures (et qui cuisine très très bien) ; Ahmed, toujours gentil et respectueux envers moi ; Babou, colocataire mais surtout amie si pleine de vie, de bonne humeur, d'humour, compagne de toutes les galères et de tous les délires (c'est pas grave si t'es blonde inside, je compatie) ; et enfin la dernière en date, Jane, que je remercie pour son éternel sourire et sa joie de vivre permanente. La liste est loin d'être finie, il reste des personnes qui seront, je pense, des amis de toujours et que je ne remercierai jamais assez : Gégé (elle monte toujours plus au nord...mais où s'arrêtera-t-elle ? pas trop loin j'espère, tu nous manques déjà), Nico (toujours trop jeune, mais de moins en moins), Céline (petite, mais...), Antoine (j'aime ton côté toujours optimiste ; ne t'en défait pas, quels que soient tes choix), Samira (ma complice de DEA et du CPB, qui a toujours été là pour moi), Marie (Ronchonchon, mais pas tant que ça en fait), Marie-France (on n'avait pas un truc à finir ?), Jérôme (grand artiste à ses heures perdues avec Nico, pour mon plus grand plaisir), Judi (la force tranquille), Hervé (Rrrr, Hervé !), Nathalie (a tenté avec courage de corriger ma thèse), Nénette (Aabrrrr), Stéphane (cerveau en fuite), Pierre (je me souviens avec nostalgie de tes histoires de crème chantilly, de charlotte au café et au chocolat, de nougatine...). Je vous remercie tous infiniment d'avoir égayé mon quotidien, et si nos chemins se séparent demain, je garde l'espoir de vous revoir bientôt.

Des stagiaires passent régulièrement par le laboratoire et, en plus de travailler énormément, apportent du sang neuf, des gâteaux, de la fraîcheur, des gâteaux et un peu plus de vie (et de gâteaux) au labo. Je tiens donc à remercier tous ces stagiaires, que je ne nommerais pas car trop nombreux (et je ne voudrais pas en oublier), hormis Jocelin, que j'ai encadré pendant 10 semaines, et Manu, que j'ai eu grand plaisir à encadrer pour son stage de DEA et qu'on aurait bien aimé garder en thèse (hein Jojo). Je leur souhaite une belle carrière.

J'exprime enfin toute ma reconnaissance à mes parents qui ont toujours respecté mes choix et m'ont ainsi permis d'arriver jusque là, ainsi qu'à Jarek, Virginie et (petit) Loïc. Sans vous, rien n'aurait été possible. Je n'oublie pas Jocelyne, Yannick, Erwan, Sophie et Nadège. Vous composez mon univers en dehors du laboratoire et avez contribué ainsi à mon équilibre. Il a été important pour moi d'avoir une vie "dehors".

Un merci tout particulier à mon (grand) Loïc pour sa présence et son soutien sans faille dans les bons mais aussi et surtout les moins bons moments. Ce que tu as fait pour moi est inestimable.

Certains d'entre-vous savent que cela n'a pas toujours été facile, mais au final je ne garderai en mémoire que les bons moments. Et s'il y a eu des bons moments, c'est grâce à vous tous. Merci.

SOMMAIRE

	Pages
<i>1. INTRODUCTION</i>	<i>11</i>
<i>2. ÉTAT DES CONNAISSANCES</i>	<i>19</i>
<i>2.1 Introduction</i>	<i>21</i>
<i>2.2 Le fer dans les sols</i>	<i>23</i>
2.2.1 Généralités	23
2.2.2 Réactions d'oxydo-réduction	23
2.2.3 Importance de l'état hydrique du sol	24
2.2.4 Les oxydes et oxyhydroxydes de fer	26
2.2.5 Propriétés de surface des oxyhydroxydes de fer	28
2.2.6 Les formes réductibles du fer dans les sol	29
2.2.7 Mobilisation-immobilisation du fer	30
<i>2.3 Les éléments associés : Mn, Ni, Cr, Co</i>	<i>31</i>
2.3.1 Le manganèse	31
2.3.2 Le nickel	32
2.3.3 Le chrome	34
2.3.4 Le cobalt	35
<i>2.4 Les microorganismes ferri-réducteurs et mangani-réducteurs</i>	<i>36</i>
2.4.1 Les microorganismes du sol et l'oxygène	36
2.4.2 La réduction dissimilatrice du fer	37
2.4.3 Effet de la teneur en eau du sol sur la réduction bactérienne	41
<i>2.5 La rhizosphère</i>	<i>41</i>
2.5.1 Phytodisponibilité des éléments	41
2.5.2 Les exsudats racinaires et la rhizodéposition	43
2.5.3 Composition des exsudats racinaires	45
2.5.4 Implication de la rhizosphère dans la modification des conditions physico-chimiques du sol	46
2.5.5 Implication des microorganismes de la rhizosphère dans la mobilisation des éléments minéraux	47
2.5.6 Rhizosphère et engorgement du sol	47
<i>2.6 Conclusion</i>	<i>48</i>

3.1 Introduction	51
3.2 Matériels	51
3.2.1 Sols	51
3.2.2 Sables	58
3.2.3 Matériel végétal	58
3.2.4 Microorganismes	58
3.3 Méthodes	59
3.3.1 Stérilisation et désinfection du matériel	59
3.3.2 Mesure de l'humidité équivalente des échantillons de sol	60
3.3.3 Caractérisation de la phase liquide	60
3.3.3.1 Dosage des cations totaux en solution	60
3.3.3.2 Dosage colorimétrique des éléments réduits en solution	61
3.3.3.3 Dosage des anions en solution	61
3.3.3.4 pH et Eh	61
3.3.3.5 Analyse des matières organiques des solutions	62
3.3.4 Caractérisation de la phase solide	63
3.3.4.1 Eléments minéraux totaux	63
3.3.4.2 Compartimentation géochimique	63
3.3.4.3 Minéralogie : spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier	64
3.3.4.4 Composition minérale des plantes	65
3.3.5 Caractérisation de la phase gazeuse	65
3.3.6 Caractérisation des communautés microbiennes cultivables	65
3.3.6.1 Composition des milieux de culture pour bactéries	66
3.3.6.2 Préparation des inoculum	69
3.3.6.3 Dénombrements bactériens	70
3.3.7 Composition des solutions nutritives utilisées pour la culture des plantes	70
3.3.8 Conditions de culture des plantes	72
3.4 Dispositifs expérimentaux	73
3.4.1 Choix d'un paramètre de contrôle de l'humidité du sol en fonction de la croissance de la plante	73
3.4.2 Cultures de plantes en pots	73
3.4.3 Cultures en colonnes axéniques	74
3.4.4 Cultures en colonnes avec variations de la teneur en eau du sol	75
3.4.5 Incubations en batch : systèmes non plantés	78
3.5 Traitement des données – Analyse statistique	79

RÉSULTATS	81
..... <i>PARTIE I : RÔLE DE LA RHIZOSPHERE</i>	83
4. INFLUENCE DE LA RHIZOSPHERE DU MAÏS SUR LA MOBILISATION DU FER, DU MANGANÈSE ET D'ÉLÉMENTS ASSOCIÉS AUX OXYHYDROXYDES (Cr, Co, Ni)	85
<hr/>	
4.1 Introduction	85
4.2 Résultats	86
4.2.1 Croissance et minéralo-masse du maïs	86
4.2.2 Réduction et solubilisation du fer	87
4.2.3 Redistribution des éléments dans les différents compartiments géochimiques	90
4.3 Discussion - Conclusion	95
..... <i>PARTIE II : RÔLE DES MICROORGANISMES</i>	101
5. RECHERCHE ET MISE EN ÉVIDENCE DE COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES FERRI- ET MANGANI-RÉDUCTRICES	103
<hr/>	
5.1 Introduction	103
5.2 Résultats	104
5.2.1 Dénombrements des communautés microbiennes rhizosphériques et non rhizosphériques dans des pots de culture de maïs	104
5.2.2 Isolement et caractérisation préliminaire des communautés bactériennes IM1 et IM2 réduisant Fe et Mn	106
5.2.2.1 Observations macroscopiques et microscopiques	106
5.2.2.2 Réduction-dissolution d'oxydes de fer et de manganèse	109
5.3 Discussion-Conclusion	112
6. INFLUENCE DE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES RHIZOSPHERIQUES AUTOCHTONES OU INOCULÉES	115
<hr/>	
6.1 Introduction	115
6.2 Résultats	116
6.2.1 Croissance et minéralo-masse du maïs	116

6.2.2 Redistribution des éléments dans les différents compartiments géochimiques	118
6.2.3 Evolution du pH et du Eh	127
6.2.4 Dénombrements bactériens	128
6.3 Discussion-Conclusion	129
..... PARTIE III : RÔLE DE L'ÉTAT HYDRIQUE DU SOL	137
7. INFLUENCE DE L'ÉTAT HYDRIQUE DU SOL SUR LA MOBILISATION D'ÉLÉMENTS EN TRACES EN PRÉSENCE OU NON DE PLANTE	139
<hr/>	
7.1 Introduction	139
7.2 Résultats	140
7.2.1 Croissance et minéralo-masse du maïs	140
7.2.2 Evolution du pH et du Eh	143
7.2.2.1 Evolution du pH et du Eh du sol dans les traitements à humidité constante	143
7.2.2.2 Evolution du pH et du Eh du sol dans les traitements soumis à "4×2 jours d'engorgement"	143
7.2.2.3 Evolution du pH et du Eh du sol dans les traitements soumis à "1×8 jours d'engorgement"	144
7.2.3 Evolution de la concentration en anions minéraux	145
7.2.4 Réduction et solubilisation du fer et du manganèse	147
7.2.5 Evolution du carbone organique	149
7.2.6 Altération des phases minérales et répartition des éléments métalliques dans les différents compartiments géochimiques	151
7.2.6.1 Le fer	151
7.2.6.2 Le manganèse	153
7.2.6.3 Le nickel	155
7.2.6.4 Le chrome	157
7.2.6.5 Le cobalt	158
7.3 Discussion-Conclusion	160
8. INFLUENCE DE L'ÉTAT HYDRIQUE ET D'APPORTS D'EXSUDATS RHIZOSPHERIQUES MODÈLES SUR LA RÉDUCTION ET MOBILISATION D'ÉLÉMENTS MAJEURS ET EN TRACES	167
<hr/>	
8.1 Introduction	167
8.2 Résultats	168
8.2.1 Evolution du pH et du Eh	168

8.2.2 Biodégradation et minéralisation des matières organiques du sol	171
8.2.3 Evolution de la quantité d'anions minéraux en solution	175
8.2.4 Solubilisation de Fe, Mn, Ni, Cr et Co	175
8.2.5 Etude de la structure cristalline par spectroscopie infrarouge à Transformé de Fourier	178
8.3 Discussion-Conclusion	182
9. DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	187
<hr/>	
ANNEXES	205
Annexes 1. Iron reduction and dissolution from soils in non-waterlogged conditions: major role of bacterial activity coupling with soil organic matter biodegradation. Paskiewicz <i>et al.</i> , en préparation	207
Annexes 2. Compléments au Chapitre 7 – Altération des phases minérales et répartition des éléments métalliques dans les différents compartiments géochimiques. Graphiques.	229
Annexes 3. Compléments au Chapitre 7 – Spectres IRTF originaux	235
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	241

INTRODUCTION

1

INTRODUCTION

Les phénomènes de mobilisation (solubilisation – transfert vers les eaux et les organismes), d'immobilisation (dépôt – concentration) et de redistribution des éléments minéraux majeurs et en traces dans les systèmes sols - plantes impliquent des processus physiques, chimiques et biologiques qui sont sous la dépendance de divers paramètres (roche mère, climat, organismes vivants, topographie). Parmi ces facteurs, les plantes avec leur rhizosphère et les microorganismes (associés ou non aux racines) sont des agents bien reconnus pour leur implication dans les phénomènes d'altération des minéraux (Berthelin 1983, Berthelin *et al.* 1994, Weiss 2004) et de mobilité d'éléments majeurs et en traces (Berthelin *et al.* 1995, Leyval et Jöner 2001, Quantin *et al.* 2002).

Divers types d'interactions "microorganismes – minéraux – matières organiques" ou "microorganismes – minéraux – racines" sont ou paraissent pouvoir être impliqués (Berthelin *et al.* 1994, Landeweert 2001). Certaines d'entre elles sont déjà bien identifiées pour leur impact sur l'altération des silicates (Leyval et Berthelin 1991) et la mobilisation d'éléments en traces (Quantin *et al.* 2002).

Un problème majeur concerne la mobilisation – dispersion – redistribution d'éléments en traces, contaminants potentiels des eaux et de la chaîne alimentaire, portés par des phases "oxydes" et "oxy-hydroxydes ferriques" (Adriano 2001, Massoura *et al.* 2006). En effet de telles situations sont fréquentes dans de nombreux milieux tant tropicaux que tempérés (Becquer *et al.*, 1995, 1997) et présentent ou peuvent présenter un danger. Par ailleurs, les mécanismes et paramètres fondamentaux impliqués dans les processus qui déterminent ces phénomènes dans la rhizosphère sont encore très incomplètement voire très mal connus (Hinsinger 2001).

Cette problématique a commencé à être étudiée avec les sols de Nouvelle-Calédonie (Ferralsols) qui seront retenus pour ce travail de recherche.

La Nouvelle-Calédonie possède une géologie particulière. 40% de son sous-sol sont en effet composés de roches mères ultrabasiqes (très pauvres en silice, et riches en minéraux ferro-magnésiens tels que les olivines, pyroxènes et serpentines) (DGEMP 1997 ; Sciences au

Sud, le Journal de l'IRD 2003). Exposées pendant plusieurs millions d'années à la chaleur et aux pluies du climat tropical, ces roches ont subies une altération géochimique intense qui a généré un manteau latéritique épais de plusieurs dizaines de mètres par endroit. Lors de la dissolution de la roche saine, le nickel, présent en faible teneur (inférieur à 0,5% en poids) a été libéré, puis s'est concentré pour former les minerais nickélifères riches en silice (les garniérites) et/ou en fer. De ce fait, la Nouvelle-Calédonie est le 4^o pays producteur de nickel (surnommé l'or vert de la Nouvelle-Calédonie) et possède le quart des ressources mondiales en nickel.

Mais cette ressource inespérée a une contrepartie : très pauvres en éléments nutritifs, ces sols latéritiques sont riches en métaux (Ni, Cr, Co, Mn, Fe), reliques des roches ultrabasiqes préservées en surface. Ceux-ci peuvent être d'une grande biodisponibilité et toxicité dans les sols de plaine (L'Huillier 1994) et sont un problème majeur pour l'agriculture locale. En effet, depuis de nombreuses années, la volonté de développement agricole de ces régions réputées infertiles se heurte au déficit de croissance des cultures fruitières et maraîchères par déficit en éléments nutritifs et accumulation de doses toxiques en métaux dans les végétaux (Institut Agronomique Néo-Calédonien, Rapport d'activité 2002). Ce déficit est comblé par des apports de fertilisants dans les sols cultivés, et le phosphore a alors pour effet de déplacer le chrome vers les phases plus disponibles (Becquer *et al.*, 2003). La disponibilité et toxicité de ces métaux, notamment le nickel, est telle qu'elle a favorisé l'apparition d'une flore endémique exceptionnellement riche et remarquable adaptée à ces sols. La flore des forêts sur roches ultramafiques a ainsi des taux d'endémismes plus élevés que celle des forêts sur roches acides et apparaît nettement plus originale (Jaffré *et al.*, 1997). Les mécanismes d'adaptation des plantes sur ces substrats sont variés, parmi lesquels l'hyperaccumulation du nickel (*Sebertia acuminata*, Perrier *et al.*, 2004) et la symbiose mycorrhizienne.

A l'heure du développement durable et de la protection des sols et de l'environnement en général, comprendre les mécanismes de mobilisation des métaux et l'évolution des manteaux d'altération par la définition des cycles biogéochimiques des éléments est d'une importance particulière.

Outre cet intérêt économique certain, les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie sont des sites privilégiés pour les sciences fondamentales traitant de la dynamique du fer et du manganèse et des éléments qui leurs sont associés dans les sols plus ou moins hydromorphes. Le nickel de ces sols est en effet contenu principalement dans les oxyhydroxydes de fer, dont

la stabilité est contrôlée par les conditions physico-chimiques du milieu (conditions d'oxydo-réduction, hydromorphie, pH). L'état d'oxydation du fer et du manganèse est un bon traceur de l'état hydrique des sols. Le couplage entre le cycle du carbone et la dynamique du fer a été proposé puis démontré (Berthelin 1982, Lovley & Phillips 1986, Ehrlich 2002, Stemmler *et al.* 2003), puisque des bactéries aéro-anaérobies et anaérobies utilisent des composés organiques comme source de carbone et d'énergie pour leur activité ferriréductrice. La saturation d'un sol, limitant ou empêchant le renouvellement de l'oxygène, provoque l'anoxie du milieu, et en conséquence le développement de bactéries anaérobies. Celles-ci utilisent alors le fer ferrique comme accepteur d'électrons spécifique final par un processus dit de respiration anaérobie ou parallèlement à des processus de fermentation (Berthelin 1982, Lovley 1991, Berthelin *et al.*, sous presse). Une des conséquences de ces phénomènes biogéochimiques est aisément visible : il s'agit de la variation de la couleur des sols. En effet, en forêt tropicale humide la coloration des sols est liée à la présence d'hématite rouge (oxyde de fer), de goethite brun-jaune (oxy-hydroxyde de fer) et de matières organiques (coloration brune, noire, grise) (Tardy 1993). Un engorgement hydrique prolongé du sol (saturant d'eau la porosité) entraîne une réduction partielle du fer, qui devient soluble et peut migrer. Quand le sol se ressuie, le fer en solution précipite et forme des taches rouilles caractéristiques. Avec le temps, l'élimination progressive du fer entraîne une décoloration du sol. Un sol rouge témoigne donc d'un sol riche en fer. Les sols bruns à tâches rouges témoignent de la mobilisation du fer par la circulation d'eau. Le jaunissement des sols tropicaux correspond à l'élimination d'hématite (Macedo et Bryant 1989). Différents travaux ont ainsi utilisé la couleur du sol pour cartographier l'engorgement (Barthes, 1991; Cantet, 2004).

L'existence de ces phénomènes est bien connue, mais de grandes zones d'ombre subsistent dans la compréhension des mécanismes mis en jeu et de l'implication des paramètres environnementaux sur la réduction-dissolution des phases minérales, la mobilisation des éléments qui leur sont associés et de leur redistribution.

Le but de ce travail est de déterminer le rôle de paramètres environnementaux biotiques (présence ou non de plantes et de microorganismes) et abiotiques (état hydrique du sol, type de matières organiques présentes) sur l'altération des oxy-hydroxydes de fer et de manganèse et la mobilisation des éléments traces qui leur sont associés (Ni, Cr, Co) dans des conditions relativement proches de celles *in situ*. Le projet s'est articulé autour de trois axes représentant l'influence de trois paramètres :

- *la présence ou non de racines dans le sol*, qui pourra jouer sur l'aération et sur la quantité et la nature des matières organiques présentes, et donc la dynamique et l'activité des microorganismes qui vont se développer. Un dispositif simple de culture de maïs en pots (ou vase de végétation) a été utilisé afin de se rapprocher au mieux des conditions environnementales in situ, avec présence de pots-témoins non plantés.

- *la présence ou non de microorganismes plus ou moins spécifiques* (microflore totale, communautés bactériennes isolées de la rhizosphère du maïs pour leur capacité à réduire et dissoudre les oxydes de fer et de manganèse). Un dispositif plus complexe de culture en colonnes axéniques a permis de cultiver des plantes en condition stérile ou en ne conservant qu'une microflore ré-inoculée après stérilisation du système de culture. L'effet des microorganismes a été différencié de celui de la rhizosphère par l'utilisation de pots-témoins non plantés. L'utilisation de communautés bactériennes isolées de la rhizosphère du maïs a permis de distinguer l'effet de populations plus spécifiquement ferri- et mangani-réductrice sur l'altération des minéraux de la population totale et moins spécifique du sol.

- *l'état hydrique du sol* qui va influencer l'oxygénation du milieu et la dynamique et activité des microorganismes. Deux types de dispositifs totalement différents ont permis d'étudier d'une part l'effet d'un engorgement du sol en présence de plantes (dispositif ouvert en colonne avec alimentation en eau) et d'autre part l'effet d'apports d'exsudats racinaires modèles sur le sol placé en condition d'humidité variable et condition atmosphérique contrôlée (systèmes fermés en batch à atmosphère initiale micro-aérophile).

Dans tous les cas, l'altération et/ou biodégradation des constituants minéraux et organo-minéraux des sols ont été suivies et quantifiées par le transfert aux plantes et la dissolution et la redistribution des éléments entre les différents compartiments solubles et insolubles, du plus disponible (éléments hydrosolubles totaux et réduits) au plus stable (oxydes de fer bien cristallisés). En parallèle, les variations des conditions environnementales, l'état des communautés bactériennes et leur activité ont été déterminés par des mesures entre traitements biotiques et abiotiques et en comparant l'impact de paramètres étudiés.

Après cette introduction générale, le manuscrit débute (Chapitre 1) par un état synthétique des connaissances actuelles sur le fer dans les sols, sa chimie et biochimie, ainsi que celles des éléments associés étudiés (Mn, Ni, Cr et Co). Ce chapitre se termine en resituant les phénomènes étudiés dans le cadre de la rhizosphère.

Le Chapitre 2 décrira les matériels, méthodes et dispositifs expérimentaux utilisés tout au long de ce travail.

Les résultats sont ensuite présentés en trois parties correspondant à l'étude des paramètres décrits ci-dessus.

La partie I (Chapitre 4) traite du rôle de la rhizosphère et du sol non rhizosphérique dans l'altération minérale des oxydes et oxy-hydroxydes porteurs d'éléments en traces.

La partie II (Chapitres 5 et 6) concerne le facteur "Microorganismes" avec en premier lieu la recherche et l'isolement de communautés ferri- et mangani-réductrices et la caractérisation du comportement de communautés isolées de la rhizosphère. En second lieu cette deuxième partie des résultats définit le rôle des microorganismes associés ou non à la rhizosphère dans l'altération des constituants des différents compartiments géochimiques définis par extractions séquentielles et la mobilisation et redistribution des éléments étudiés.

La partie III présente l'impact du facteur "état hydrique du sol", avec dans un premier temps l'influence des changements de l'état hydrique en présence ou non de plantes (Chapitres 7). Dans un deuxième temps (Chapitre 8) l'influence des perturbations de l'état hydrique couplé à des apports d'un milieu rhizosphérique modèle (exsudats) en conditions contrôlées est étudiée. Enfin, le Chapitre 9 correspond à la discussion-conclusion générale et aux perspectives en s'attachant à préciser l'influence de la rhizosphère sur la mobilisation du fer, du manganèse et des éléments en traces associés (Ni, Cr, Co), l'impact sur l'altération des oxyhydroxydes du sol et la redistribution des métaux dans les compartiments géochimiques, l'évolution de la biodisponibilité des métaux et le rôle des microorganismes rhizosphériques, des exsudats racinaires et de l'état hydrique du sol.

ETAT DES
CONNAISSANCES

2

ETAT DES CONNAISSANCES

"Le sol peut être défini comme le produit de l'altération, du remaniement et de l'organisation des couches supérieures de la croûte terrestre sous l'action de la vie, de l'atmosphère et de l'organisation des échanges d'énergie qui s'y manifestent"

(Aubert & Boulaine 1967)

2.1 Introduction

Les sols sont des réacteurs biogéochimiques complexes et interactifs, réservoirs de microorganismes qui se situent à l'interface atmosphère – hydrosphère – biosphère – lithosphère (Figure 2.1). Ils supportent la plus grande part des activités humaines, des productions végétales et des écosystèmes terrestres, et leurs caractéristiques bio-physico-chimiques en font des filtres et des milieux actifs assurant la qualité des eaux, de l'air et des productions végétales. Leur rôle en tant que compartiment essentiel du fonctionnement de l'écosystème terrestre n'est plus à démontrer.

Parmi les facteurs qui contrôlent le fonctionnement biogéochimique et/ou bio-physico-chimique des sols, l'implication des microorganismes associés ou non à la rhizosphère des plantes dans les phénomènes d'altération des minéraux et le fonctionnement des cycles des éléments est bien reconnue (Berthelin *et al.* 1994, Gobat *et al.* 2003, Leyval & Berthelin 1991). Ces microorganismes associés ou non au système racinaire sont impliqués dans l'altération (silicates, sulfures, phosphates, oxydes...) et dans la formation (oxydes, phosphates...) de nombreux minéraux et le cycle d'éléments majeurs (N, P, S, Fe...) et en traces (As, Ni, Co, Se...). Ils peuvent mettre en oeuvre divers processus (oxydation, réduction, production de composés acides et/ou complexants, biodégradation de complexes...) particulièrement efficaces. Les incidences concernent aussi bien la formation, le fonctionnement, l'évolution et la dégradation des sols que la libération et la disponibilité d'éléments nutritifs ou toxiques majeurs et en traces. Les minéraux du sol contiennent à la fois des éléments essentiels aux organismes soit en tant que nutriments moyens (potassium,

phosphate...) ou oligo-éléments (Fe, Mn, Cu, Ni...) et des éléments toxiques (Pb, Hg, Cd...) ou potentiellement toxiques à fortes doses (Cu, Zn, Ni) (Bourrelier & Berthelin 1998). Les oxydes de fer, par exemple, contiennent régulièrement des métaux lourds inclus dans leur réseau cristallin. Du phosphate est souvent adsorbé à leur surface. Les oxydes et oxyhydroxydes de fer sont des minéraux très peu solubles sauf si les conditions d'acidité et d'oxydo-réduction sont significativement modifiées (McBride 1994). Les microorganismes du sol et en particulier les bactéries participent à l'altération de ces minéraux, ce qui a pour effet de libérer les éléments dans le milieu naturel et de les rendre biodisponibles. A cela s'ajoute des problèmes d'érosion, notamment dans les zones tropicales où les oxydes de fer sont des constituants majeurs des sols. Ils constituent par ailleurs le "ciment" de ces sols et leur altération peut provoquer des désagrégations importantes.

La dissolution des oxy-hydroxydes de fer étant contrôlée par la chimie du fer, connaître le comportement et la biodisponibilité de cet élément est un enjeu environnemental de taille, tant au niveau de l'évolution et la dégradation des sols qu'au niveau de la qualité des eaux et des végétaux. Une meilleure compréhension des processus et paramètres de mobilisation du fer et des éléments qui lui sont associés constitue un réel intérêt fondamental et appliqué.

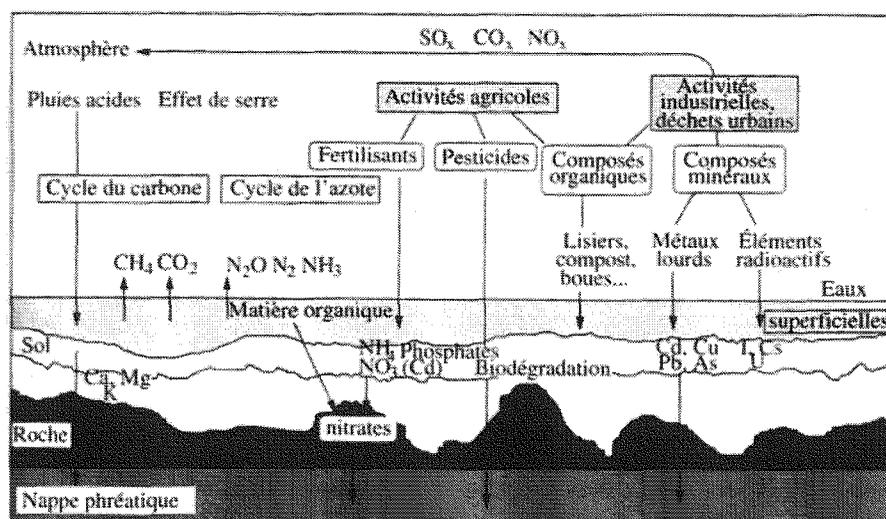


Figure 2.1 Le sol, interface dans l'écosystème (d'après Robert, in Bourrelier et Berthelin, 1998)

2.2 Le fer dans les sols

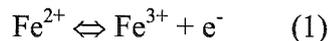
2.2.1 Généralités

Le fer est quantitativement le 4^e élément de l'écorce terrestre, après l'oxygène, le silicium et l'aluminium, et représente 4,7% en masse. C'est un élément essentiel à la vie et son niveau de déficience critique dans les plantes se situe entre 50 et 150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche (MS), ce qui pose d'énormes problèmes dans les productions agricoles, notamment sur sol calcaire où le fer est très peu disponible (Marschner 1986).

Dans les sols, les pédologues et chimistes ou géochimistes du sol distinguaient deux familles principales : le fer dit "libre", c'est-à-dire le fer qui n'est pas lié à la structure d'un réseau silicaté, et le fer "silicate". Le fer "libre" est communément considéré comme étant le fer extractible par des réactions de réduction et/ou complexation et mobilisable du sol (Duchaufour 1970). Toutefois diverses études ont bien montré la possibilité de mobiliser, selon les conditions de milieu, le fer des oxydes, oxyhydroxydes mais aussi des silicates, sulfures, et phosphates (Lerman & Meybeck 1988, Ehrlich 2002...).

2.2.2 Réactions d'oxydo-réduction

La chimie du fer est principalement contrôlée par les réactions d'oxydo-réduction (1) et secondairement, de formation de complexes organo-métalliques.



La figure 2.2 représente les domaines d'existence des différentes formes du fer en fonction du pH et du Eh de la solution. Le fer présente trois états d'oxydation : le fer réduit Fe(II), le fer oxydé Fe(III) et le fer métallique à l'état de valence Fe(0). Dans les phases solides et liquides du sol il est présent sous forme Fe(II) ou Fe(III).

3 principaux domaines redox peuvent être définis :

1. Eh : 450-800 mV : O_2 est présent sous forme dissoute et les réactions d'oxydations sont dominantes.

2. Eh : 450-0 mV : $\text{Fe}^{2+} \Leftrightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3$ La teneur en O_2 dissous décroît, le transfert d'électrons se fait vers des accepteurs d'électrons (nitrates, hydroxydes de fer, MnO_3 ...)

3. Eh négatif : 0 à -300 mV : Milieu anoxique (réducteur). Les matières organiques se décomposent en fermentation anaérobie (Eh nul). Il y a réduction des oxydes de fer. Si le

Eh est encore plus négatif : (-200 à -300 mV), les sulfates, en se réduisant, vont conduire à la formation de sulfures de fer (noirs).

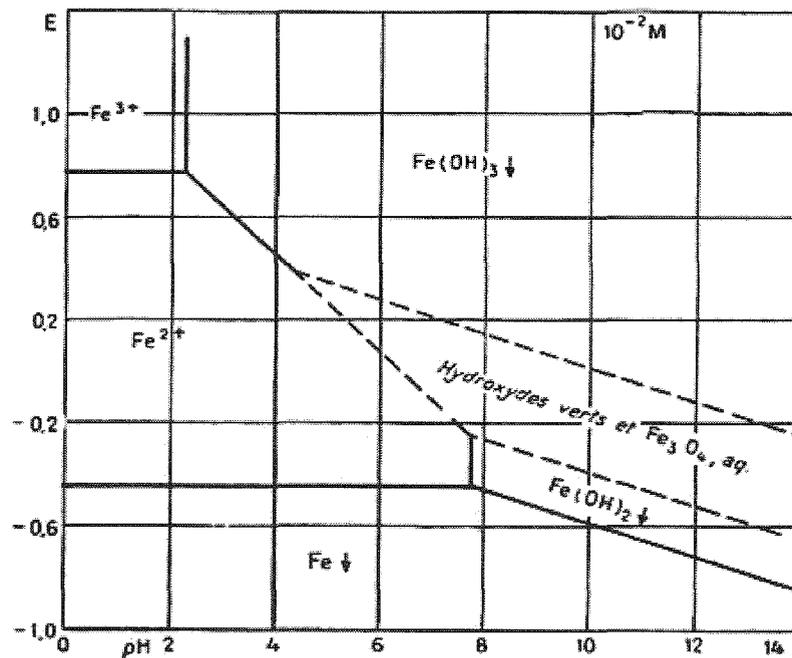


Figure 2.2 Diagramme de Pourbaix (Eh/pH) du fer (Charlot 1983)

Alors qu'il est stable en conditions aérobies acides, Fe^{2+} est facilement oxydé chimiquement en Fe^{3+} à pH supérieur à 5 (Schröder *et al.* 2003). Fe^{3+} est également généré par l'action de différentes communautés bactériennes qui peuvent utiliser Fe^{2+} comme donneur d'électrons dans le cas de la respiration de l'oxygène ou des nitrates, ou comme source d'électrons pour la photosynthèse en conditions anaérobies (Ehrlich 2002). Dans ces différents cas le Fe(III) formé réagit dans les environnement humides en précipitant sous forme d'oxydes, hydroxydes, phosphates ou sulfates avec de très faibles solubilité (10^{-18} M) (Schröder *et al.* 2003). En conséquence, de nombreux milieux qui semblent riches en fer renferment en réalité une teneur en fer disponible inférieure à $1\mu\text{M}$, concentration considérée comme le seuil nécessaire au maintien de la vie (Neilands 1974).

2.2.3 Importance de l'état hydrique du sol

L'humidité du sol règle l'activité biologique et ce, de différentes manières : soit directement (l'eau est indispensable au développement des organismes vivants), soit

indirectement en modifiant les échanges gazeux ou en transportant diverses substances (Dommergues & Mangenot 1970, Paul & Clark 1989). L'engorgement des sols est à l'origine de nombreux changements physico-chimiques. Les changements les plus couramment rencontrés sont une décroissance du potentiel redox, dénitrification par respiration des nitrates, réduction et respiration du manganèse et du fer, fermentation et sulfatoréduction (Levy & Toutain 1994, Frenzel *et al.* 1999, Gotoh & Patrick 1992, Hines *et al.* 1991, Li *et al.* 2001).

Tableau 2.1 Processus biochimiques en fonction du Eh du sol (Levy & Toutain 1994, d'après Takaï & Kamura 1966 et Paar 1969).

	Processus	Eh (mv)	Métabolisme microbien	Matière organique soluble
Phase I	Disparition de O ₂	600 à 300	Aérobiose	Biodégradation
	Disparition de NO ₃ ⁻	500 à 300		
Phase II	Réduction Mn ⁴⁺	400 à 200	Anaérobiose facultative	Accumulation temporaire après apport de matière organique fraîche
	Réduction Fe ³⁺	300 à 100		
Phase III	Réduction SO ₄ ⁻ et Formation H ₂ et CH ₄	0 à - 150 - 150 à - 220	Anaérobiose stricte	Accumulation forte Biodégradation par anaérobiose

Dans un milieu saturé en eau, trois grands niveaux successifs d'oxydo-réduction peuvent être distingués (Tableau 2.1, Levy & Toutain 1994, d'après Takaï & Kamura 1966 et Paar 1969) :

- Phase I : de l'oxygène dissous est présent dans l'eau du sol. La baisse de Eh est corrélée à la diminution de la teneur en oxygène dissous. Les microorganismes aérobies utilisent l'oxygène (respiration aérobie). Cette phase est caractéristique des eaux froides et/ou renouvelées (nappe circulante des alluvions). Le fer reste à l'état ferrique, ce qui conserve une bonne structure. La biodégradation des matières organiques est active.

- Phase II : le Eh continue de baisser alors que l'oxygène dissous a disparu (Berthelin 1982, Figure 2.3). L'anaérobiose n'est pas complète car il existe encore dans le sol des donneurs d'oxygène ou des récepteurs d'électrons comme Mn⁴⁺ ou Fe³⁺ qui entretiennent la semi-anaérobiose ou anaérobiose facultative. Cette phase correspond à des phénomènes

d'hydromorphie temporaire (eaux stagnantes). Si le milieu est acide, l'activité biologique minéralisatrice devient faible. Le fer est réduit au moins partiellement et est susceptible de migrer dans le profil.

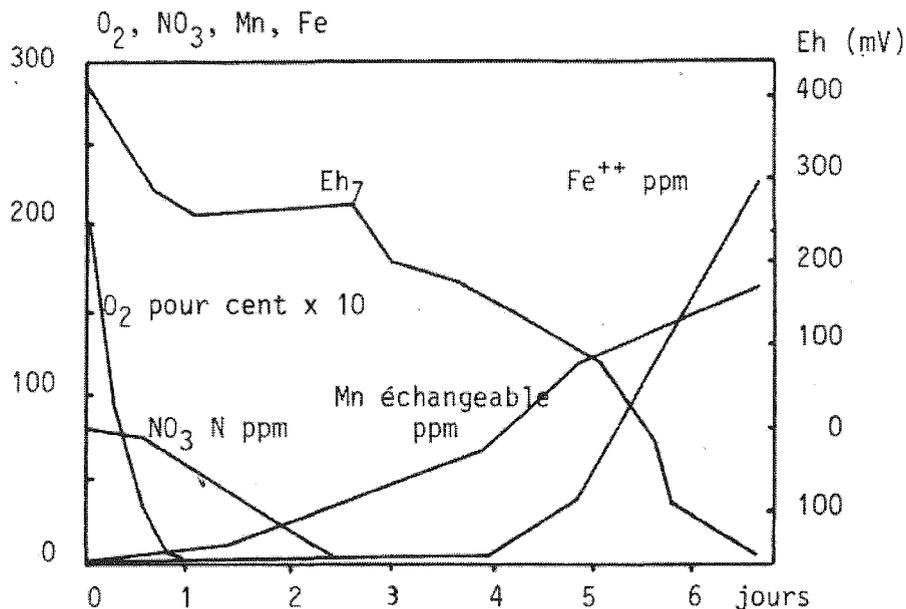


Figure 2.3 Influence de la submersion sur l'évolution des teneurs en O_2 , NO_3^- , Mn^{2+} , Fe^{2+} et les valeurs du Eh d'un sol limono-argileux (Berthelin 1982, d'après Turner & Patrick 1968)

- Phase III : la totalité du Fe^{3+} est réduite, il s'agit d'une phase d'anaérobiose franche, les Eh sont négatifs. Entre 0 et -100 mV a lieu la réduction des sulfates et une accumulation des matières organiques solubles issues des litières. Pour les Eh très bas (-150 à -200 mV) les fermentations anaérobies deviennent très actives, les composés organiques solubles décomposés libèrent des gaz comme H_2 et CH_4 . Cette phase correspond à une hydromorphie provoquée par des eaux stagnantes formant des nappes permanentes, susceptibles de s'échauffer. L'activité biologique est insuffisante, la matière organique fraîche insoluble et les composés organiques solubles s'accumulent dans l'humus en période hivernale ce qui abaisse progressivement le Eh.

2.2.4 Les oxydes et oxyhydroxydes de fer

Le Tableau 2.2 présente la liste des principaux oxydes et oxyhydroxydes de fer ferriques présents dans les sols. Dans ces minéraux le fer occupe des sites octaédriques dont la charpente est constituée par des gros anions (O^{2-} et OH^-) qui occupent la plus grande partie du

volume de ces minéraux. Le mode d'empilement de ces anions assure la différenciation de ces oxydes.

Tableau 2.2 Liste des principaux oxydes de fer des milieux pédologiques (Herbillon 1994)

Nom	Formule	Poids spécifique g.cm ⁻³	Substitution alumineuse maximale (%)	Produit de solubilité pKs
Hématite	$\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$	5,26	15-16	≈ 42,5
Maghémite	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$	4,87	existe	40,5
Goëthite	αFeOOH	4,26	33	≈ 43
Lépidocrocite	γFeOOH	4,09	faible	≈ 41
Ferrihydrite	$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}^*$	≈ 4	≈ 15	≈ 38

* Formule schématique, la constitution anionique de ce minéral demandant encore à être précisée.

Les oxydes et oxyhydroxydes rencontrés communément dans les sols (goëthite, hématite, lépidocrocite, ferrihydrite) peuvent être fortement substitués par d'autres cations de rayons ioniques voisins. L'impureté la plus notable est l'ion Al^{3+} qui peut se substituer au cation Fe^{3+} jusqu'à un rapport d'un à trois sites octaédriques dans la structure. Le fer(III) de l'hématite, de la goëthite, de la ferrihydrite peut ainsi présenter un taux maximal de substitution alumineuse de 16, 33 et 15%. Les oxydes de fer peuvent être de véritables puits et sources de métaux (Cornell & Schwertmann 1996, Schwertmann & Latham 1986, Schwertmann & Taylor 1989). Ils peuvent aussi posséder des degrés de cristallinité très différents et des structures avec de nombreux défauts qui les rendent plus ou moins sensibles aux phénomènes d'altération.

La goëthite

Dans les anciens textes de minéralogie, la goëthite était aussi appelée « fer aciculaire », car elle se présente souvent en agrégats de fins cristaux.

La goëthite appartient à la classe des hydroxydes elle est chimiquement constituée de fer, d'oxygène et d'hydrogène. Elle cristallise dans le système orthorhombique le plus souvent en prismes, parfois très allongés et striés verticalement, moins fréquemment en formes aplaties, constituées de fines tablettes.

Elle est très rare en cristaux isolés et en fait, les cristaux distincts sont presque toujours réunis en agrégats aciculaires, fibreux, foliacés ou écailleux. La goëthite se présente plus communément en masses compactes, réniformes ou stalactiformes, à la structure radiée ou terreuse. Sa couleur est normalement brun noirâtre dans les cristaux, rougeâtre ou jaune-brun

dans les masses compactes, de brun jaunâtre à jaune-ocre dans les variétés terreuses. La couleur de la poudre et de la traînée sur porcelaine poreuse est jaune-brun.

2.2.5 Propriétés de surface des oxydes de fer

Dans les sols, les oxydes de fer sont présents sous forme de minéraux de très petite taille (de quelques dizaines à quelques centaines d'Angström), qu'ils soient ou non bien cristallisés. Ceci leur confère une très grande surface spécifique, de 60 à 200 m²/g pour les hématites et les goethites, de 300 à 600 m².g⁻¹ pour la ferrihydrite (Herbillon 1994).

Les oxydes de fer sont des colloïdes à charge variable, c'est-à-dire que leur charge de surface est déterminée par les paramètres de la solution avec laquelle ils s'équilibrent. Ainsi, en fonction du pH, ils peuvent devenir soit des échangeurs d'anions, soit des échangeurs de cations, soit encore des espèces neutres selon que leur surface adsorbe ou non les protons de la solution (Figure 2.4). Le point isoélectrique, pH pour lequel l'oxyde n'est pas chargé, se situe entre des valeurs de pH de 8 et 9.

A la différence de l'échange d'ions, de nature purement électrostatique, l'adsorption spécifique implique une réaction chimique par échange de ligands. Ces réactions d'échange font des oxydes de fer des épurateurs particulièrement efficaces des solutions du sol. Les sols riches en oxydes de fer sont ainsi connus pour être de gros fixateurs de phosphates.

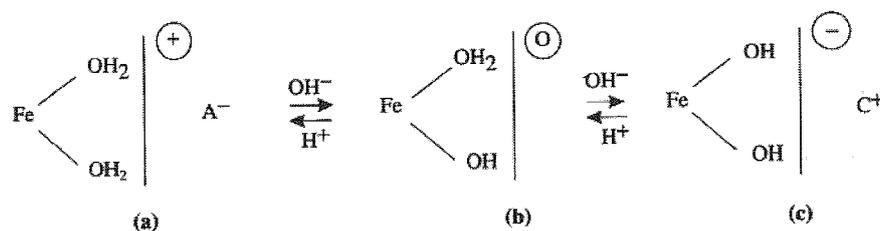


Figure 2.4 Schéma réactionnel des oxydes de fer, états et propriétés d'échange. Les traits verticaux représentent la surface d'un oxyde de fer avec des charges positives (+) en milieu acide (a), neutres (0) au point isoélectrique (b) et négatives (-) en milieu alcalin (c) (Girard et al. 2005, d'après Herbillon 1994)

2.2.6 Les formes réductibles du fer dans les sols

Le fer est présent dans différents compartiments du sol qui ne lui offrent pas tous la même réductibilité. Le fer réductible des sols peut être classé de la manière suivante, par ordre décroissant de réductibilité :

1. Le fer hydrosoluble est entièrement et directement disponible pour la réduction, mais n'est présent qu'en de très faibles concentrations (Gotoh & Patrick 1992).
2. Le fer échangeable est la part de fer directement échangeable avec le complexe d'adsorption des sols. Ce fer est également entièrement réductible, et sa quantité dépend de la capacité d'échange cationique du sol.
3. Le fer lié aux oxydes de fer peu cristallisés ("amorphes") est considéré comme étant la source principale de fer pour la réduction mais n'est que partiellement réductible (Lovley 1991 ; Lovley & Phillips 1986 ; Lovley & Phillips 1988 ; Roden & Zachara 1996).
4. Le fer lié aux oxydes de fer cristallisés est moins disponible pour la réduction. En fonction des minéraux, les réductibilités par voie bactérienne suivantes ont été mesurées sur des oxydes de fer de synthèse :

Minéral	Réductibilité (%)	Source
Lépidocrocite γFeOOH	2,5	Elsgaard & Jorgensen (1992)
Goethite αFeOOH	1	Lovley & Phillips (1988)
	1,5 à 12,5	Roden & Zachara (1996)
Magnétite Fe_3O_4	1,5	Lovley & Phillips (1988)
Hématite Fe_2O_3	0,25	Lovley & Phillips (1988)
	0,64	Roden & Zachara (1996)

Les différences de réductibilité entre les diverses formes d'oxydes de Fe(III) peuvent être expliquées par des différences de surfaces réactives et l'ordre de réductibilité pourrait alors être le suivant : fer amorphe (ferrihydrite) > lépidocrocite > goethite > hématite (Raiswell *et al.* 1994). Toutefois cette échelle est relative puisque, si les conditions

expérimentales sont favorables, une goethite de synthèse bien cristallisée peut être entièrement dissoute par réduction bactérienne (Bousserrhine *et al.* 1999).

Les substitutions cationiques jouent elles aussi un rôle important dans la solubilisation par réduction du fer des oxydes cristallisés qui dépend du taux de substitution et de la nature des cations impliqués (Bousserrhine *et al.* 1999). Pour un même taux de substitution l'ordre suivant de réduction bactérienne a été établi :

goethite pure > Co-goethite \geq Mn-goethite > Al-goethite > Cr-goethite

Ces différences de réduction pourraient être dues à l'accumulation des métaux à la surface des goethites, ou à un moindre accès initial bloquant l'accès des bactéries aux sites normalement utilisés pour la réduction du fer. Une telle inhibition pourrait alors être prévenue par la présence d'un agent complexant ces métaux (Dominik *et al.* 2002).

2.2.7 Mobilisation – Immobilisation du fer

Le fer sous sa forme oxydée est peu soluble, sauf en milieu très acide (cas de la dissolution par les Thiobacilles à pH 1,5-2,0), contrairement au fer réduit, mais sa disponibilité est augmentée dans les environnements riches en composés organiques qui peuvent chélater de nombreux métaux, dont le fer. De plus, de nombreux micro-organismes sécrètent des produits métaboliques comme le citrate ou produisent des sidérophores, molécules de faible poids moléculaire synthétisées par les bactéries, les champignons et les plantes (Braun & Braun 2002, Crosa & Walsh 2002, Visca *et al.* 2002), qui chélatent le Fe³⁺ et le rendent ainsi disponible pour la réduction ou le prélèvement cellulaire (Guerinot 1994).

Les sidérophores d'origine bactérienne ou fongique sont d'excellents agents de dissolution des oxydes (Watteau & Berthelin 1994). Les déficiences en fer causent une augmentation de la concentration en acides organiques dans les exsudats racinaires et les sols. De vraies carences en fer sont nécessaires pour qu'une bactérie ou un champignon développe des voies de synthèse de sidérophores (Watteau & Berthelin 1994, Neilands 1995). Landsberg (1981) suggère que les acides organiques sont la source des protons libérés par les racines. (Ambikadevi & Lalithambika 2000) ont testé différents acides organiques en vue de dissoudre le fer ferrique responsable de la coloration d'une kaolinite, comme les acides acétique, formique, citrique, ascorbique, succinique, tartrique et oxalique. Parmi ceux-ci, l'acide

oxalique a montré une remarquable capacité de dissolution du fer associé à la kaolinite, due à l'action des protons et à la formation de complexes solubles.

Les mécanismes de solubilisation du fer par voie biologique sont décrits dans le chapitre 2.4.

2.3 Les éléments associés : Mn, Ni, Cr, Co

2.3.1 Le manganèse

Le manganèse représente 0,09% (pourcentage massique) de la croûte terrestre. Les oxydes de manganèse sont peu nombreux dans les sols (ils y forment moins de 1% des constituants minéraux) mais ils y jouent deux rôles importants : ils sont la source principale de manganèse qui est soit un oligo-élément essentiel soit un élément toxique, et ils montrent une forte affinité vis-à-vis de nombreux éléments en traces, notamment les métaux lourds. Le niveau de déficience critique en Mn dans le milieu végétal se situe entre 10 et 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans les feuilles quelle que soit la plante, le cultivar et les conditions environnementales de prélèvement (Marschner 1986). Par contre, le niveau critique de toxicité varie énormément en fonction de l'espèce végétale et des conditions environnementales. Ainsi, au sein d'une même espèce végétale, le niveau critique de toxicité peut varier d'un facteur 3 à 5 entre différents cultivars.

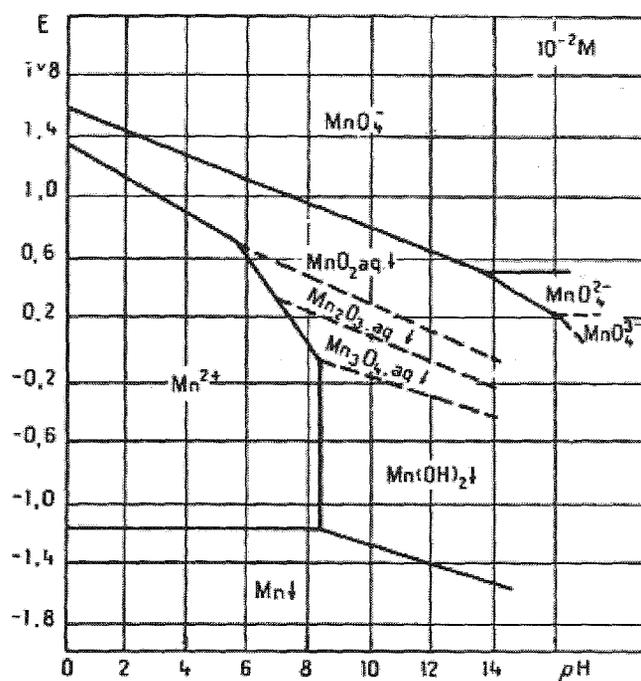


Figure 2.5 Diagramme de Pourbaix du manganèse (Charlot 1983).

Dans les oxydes, le manganèse présente différents états d'oxydation dont les plus courants sont II, III et IV dans les sols. Les oxydes de manganèse sont souvent produits par néoformation, dont la source première est l'ion Mn(II) libéré en solution par l'hydrolyse des silicates primaires ou secondaires ou par la solubilisation par réduction et/ou complexation de formes organo-métalliques.

L'ion Mn(II) est soluble dans une plus large gamme de pH et Eh que Fe(II) (Figure 2.5). Au laboratoire, les solutions de Mn(II) sont connues pour leur métastabilité : en dépit de conditions thermodynamiques favorables, l'oxydation et la précipitation d'oxydes contenant Mn(IV) ne se produisent pas à des vitesses mesurables. Il semble donc que ces processus, à la base de la formation des oxydes de Mn, soient catalysés. Dans les sols, différents agents catalytiques (microorganismes, conditions et paramètres abiotiques, organiques ou inorganiques) ont en effet été mis en évidence. Ainsi, l'oxydation du Mn(II) et sa précipitation sous forme d'oxyde peut être due à l'action de certaines bactéries et de champignons.

2.3.2 Le nickel

Le nickel est le 24^e élément le plus abondant dans la croûte terrestre, avec une concentration moyenne de 50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ soit 0,016%.

La forme ionique la plus stable du Ni, Ni^{2+} , est majoritaire à des pH < 7 (Figure 2.6), où il tend à exister sous forme hydratée $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (Uren 1992). Cette prédominance diminue quand le pH augmente.

Les microorganismes capables de réduire plus ou moins spécifiquement le fer peuvent participer plus ou moins directement à la solubilisation de Ni piégés dans les oxy-hydroxydes de fer et de manganèse. Ainsi, en condition anaérobie, la réduction d'un oxy-hydroxyde de fer naturel ou substitué en nickel contribue à libérer le nickel suite à la dissolution du minéral (Quantin *et al.* 2001, Fredrickson *et al.* 2001).

La biodisponibilité de Ni ne dépend pas que de sa solubilité car certains complexes de Ni sont solubles mais peu absorbés. Le pH est un des facteurs les plus importants (Anderson & Christensen 1988). En effet, $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ est présent à des pH inférieurs ou égaux à 7 et plusieurs études ont montré que la rétention du nickel par le sol diminue fortement quand le pH diminue (Basta & Tabatabai 1992 ; Willaert & Verloo 1988). La réaction de Ni avec les surfaces du sol, principalement avec les groupements -OH, est la suivante (Tinker 1986) :

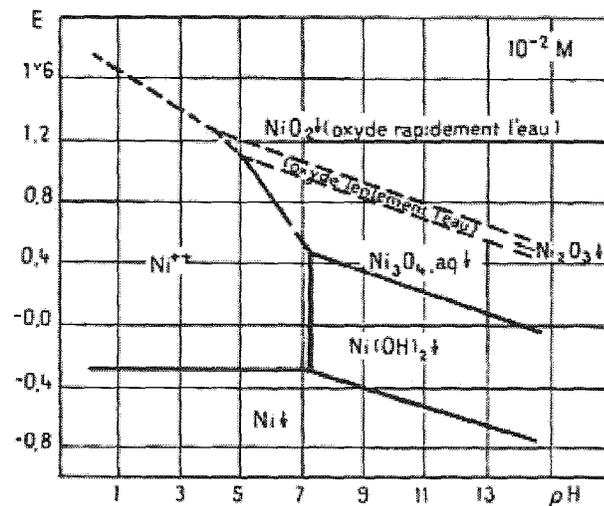
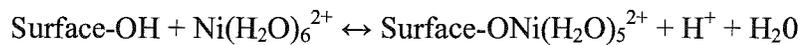


Figure 2.6 Diagramme de Pourbaix du nickel (Charlot 1983).

Une augmentation du nombre de protons déplace donc l'équilibre vers la gauche. Plusieurs études ont ainsi montré qu'une diminution du pH favorise une absorption du nickel par la plante (Lübben & Sauerbeck 1991).

Dans le cas de la Nouvelle-Calédonie, Ni est lié aux oxydes de fer (Becquer *et al.* 1995 ; Quantin 2002). Dans ces sols, le potentiel redox constitue également un facteur important. Les conditions réductrices peuvent en effet favoriser la solubilisation du nickel fixé en réduisant et en solubilisant les oxydes de fer et de manganèse porteurs de cet élément, et en favorisant la formation d'acides complexants solubles pouvant être absorbés par la plante lorsqu'ils sont de faible poids moléculaire. Ainsi, Ni pourrait être davantage absorbé par les plantes en conditions réductrices.

La concentration en Ni des plantes cultivées est généralement comprise entre 0,1 et 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Marschner 1986). Le niveau critique de toxicité pour les plantes modérément tolérantes se situerait entre 10 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. (L'Huillier 1994) a montré que sur des sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie (Ferralsol), le maïs pouvait assimiler jusqu'à 10 μg de nickel par gramme de matière sèche dans ses parties aériennes, et que les concentrations en nickel dans les parties aériennes étaient les plus élevées aux endroits où le

nickel était le plus mobile, confirmant ainsi la relation entre mobilité et biodisponibilité de l'élément.

Exposé à des excès modérés de nickel, le maïs ne manifesterait pas de symptômes spécifiques d'intoxication. Seules des chloroses et des nécroses au niveau des limbes, ainsi qu'un brunissement des apex racinaires se développent dans des cas extrêmes. A des concentrations modérément toxiques, la croissance des parties aériennes et surtout des racines, est ralentie. Ce ralentissement de la croissance, même limité, aboutit à une diminution significative de la production du maïs (L'Huillier 1994). L'analyse des parties aériennes du maïs montre que l'absorption excessive de Ni modifie peu leur composition minérale. Le ralentissement de la croissance induite par des excès de Ni n'est donc pas dû à une carence minérale et par conséquent, Ni présenterait bien une toxicité propre. L'Huillier (1994) a mis en évidence un seuil de toxicité dans une plante cultivée sur sol de $12 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans les parties aériennes du maïs GH 5010, au stade 9 feuilles et mesurant 75 cm de haut, la taille étant alors diminuée de 14% en 34 jours.

2.3.3 Le chrome

Le chrome est le 21^e élément le plus abondant dans la croûte terrestre, avec une concentration moyenne de 100 à 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Il est largement présent dans les roches ignées où il est souvent substitué au fer sous forme de Cr(III). Les concentrations en chrome dans les sols sont de l'ordre de 5 à 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et dépendent du type de roche-mère (Deneux *et al.* 2003). Le chrome est le plus souvent extrait de la chromite, oxyde mixte FeCr_2O_4 .

En solution, Cr(III) existe sous différentes formes : Cr^{3+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, CrO_2^- (Figure 2.7) et différents états d'oxydation, mais les formes les plus souvent rencontrées dans les milieux naturels sont Cr(III) et Cr(VI). Le Cr(III) peut facilement se complexer à des ligands organiques (acides organiques) ou inorganiques (sulfates) présents en solution. En présence de Fe(III) il peut précipiter sous forme d'un hydroxyde mixte amorphe qui contrôle sa solubilité dans le milieu naturel.

Les microorganismes agissent sur la mobilité du Cr en mettant en œuvre des mécanismes spécifiques ou non d'oxydo-réduction (Cervantes *et al.* 2001). Parmi ces mécanismes, la réduction du fer et du manganèse en condition anaérobie par des bactéries telles que *Clostridium butyricum* conduit à la dissolution d'éléments en traces comme le Cr substitué dans le réseau cristallin d'une goethite (Bousserrhine *et al.* 1999).

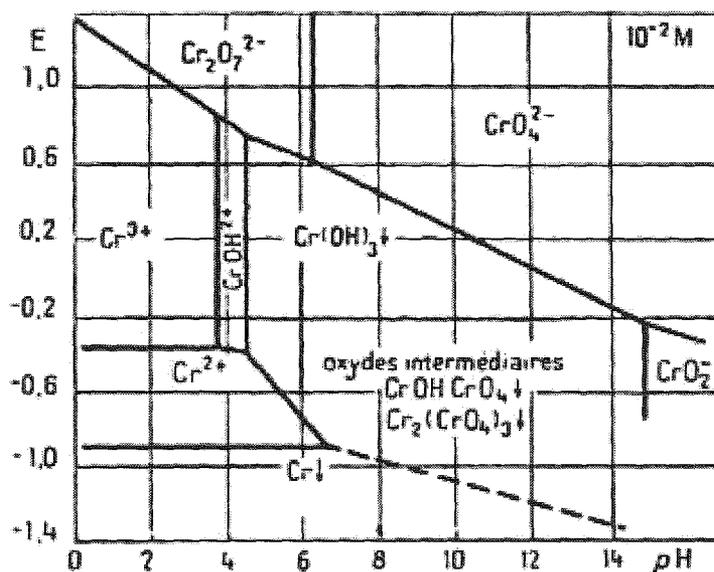


Figure 2.7 Diagramme de Pourbaix du chrome (Charlot 1983)

D'un point de vue "transfert aux plantes", la biodisponibilité du Cr en conditions naturelles est liée aux quantités et formes de Cr présentes dans le sol, et au type de plante. Smith *et al.* (1989) ont montré, en contaminant des cultures de maïs en hydroponie avec du Cr(VI) et du Cr(III) marqué au ^{51}Cr , que le maïs est capable d'accumuler 55 à 95 fois plus de Cr dans les parties racinaires que dans les parties aériennes, sans que les teneurs ne soient mentionnées.

2.3.4 Le cobalt

La croûte terrestre contient $29 \mu\text{g.g}^{-1}$ de Co. La teneur moyenne des sols en Co est d'environ 8 mg.kg^{-1} et la solubilité est fonction du pH. Le cobalt est fixé avant tout sur les oxydes de Mn et de Fe, et donc seule une petite partie est disponible pour les plantes et mobile. Il est présent en solution sous trois états d'oxydation (Figure 2.8) : Co(II), Co(III) qui existe surtout à l'état de complexes, et Co(IV) sous forme oxyde (Charlot 1983). Co^{2+} existe en solution, et Co^{3+} n'existe qu'en milieu très acide en faux équilibre.

Le cobalt est un oligo-élément minéral essentiel. Le niveau de déficience critique dans les plantes dépend de la plante. Mesuré sur des légumes, il varierait entre $0,02$ et $0,04 \mu\text{g Co.g}^{-1}$ de matière sèche dans les parties aériennes (Marschner 1986). Le niveau critique de toxicité varierait de $0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS chez le trèfle à quelques $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS chez le haricot et le chou.

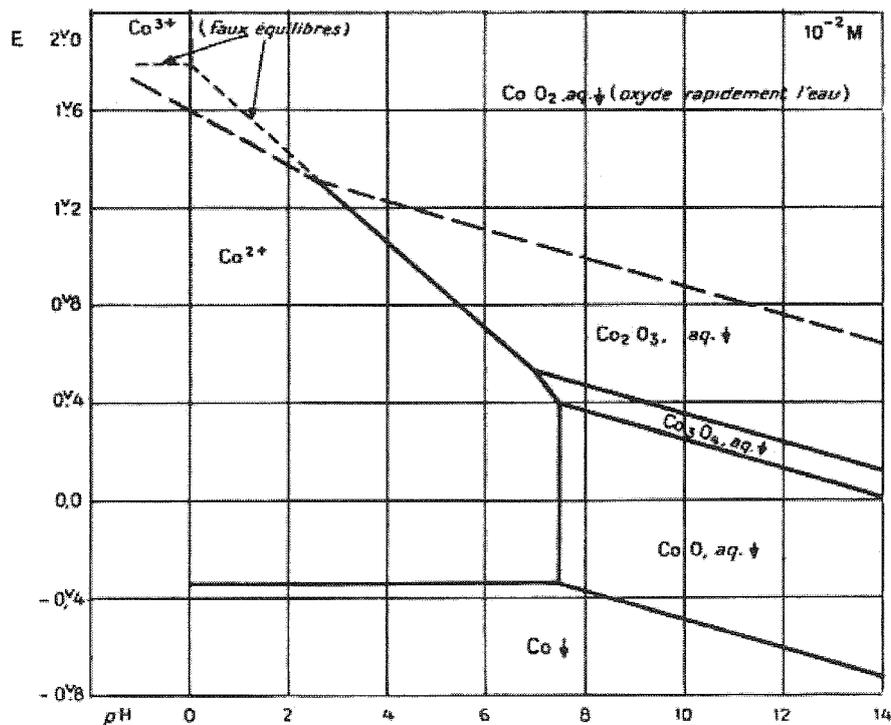


Figure 2.8 Diagramme de Pourbaix du cobalt (Charlot 1983)

2.4 Les microorganismes ferri-réducteurs et mangani-réducteurs

2.4.1 Les microorganismes du sol et l'oxygène

Les micro-organismes du sol peuvent se classer en quatre groupes suivant leur comportement vis-à-vis de l'oxygène atmosphérique et de la nature de l'accepteur final d'électrons (Figure 2.9) :

- micro-organismes aérobies obligatoires (ou aérobies stricts) : l'oxygène est indispensable à leur développement et même à leur survie et est le seul accepteur d'électrons.
- micro-organismes anaérobies facultatifs ou aéro-anaérobies : ils peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène à condition de disposer de substrats convenables et d'accepteurs d'électrons (respiration aérobie ou anaérobie, utilisant NO_3^- , Mn^{4+} ou Fe^{3+} comme accepteurs d'électrons).
- micro-organismes anaérobies obligatoires (ou anaérobies stricts) : ils sont inhibés ou tués par des concentrations même faibles d'oxygène, vraisemblablement parce que l'oxygène provoque l'oxydation irréversible des transporteurs d'électron ou permet la formation de

peroxyde toxique. Ils utilisent la respiration anaérobie (accepteurs d'électrons Fe^{3+} , Mn^{4+} , SO_4^{2-}) ou les fermentations.

- micro-organismes micro-aérophiles : ce sont des micro-organismes aérobies obligatoires dont la croissance est favorisée par de faibles concentrations en oxygène.

- micro-organismes fermentaires (bactéries et champignons comme les levures) : la fermentation est une réaction biochimique consistant à libérer de l'énergie à partir d'hydrates de carbones (sucres comme le glucose la plupart du temps) en utilisant un accepteur d'électrons et produit par l'organisme lui-même. La fermentation ne nécessite pas de dioxygène, elle peut donc avoir lieu en milieu anaérobie. Elle se distingue par son faible rendement énergétique de la respiration cellulaire.

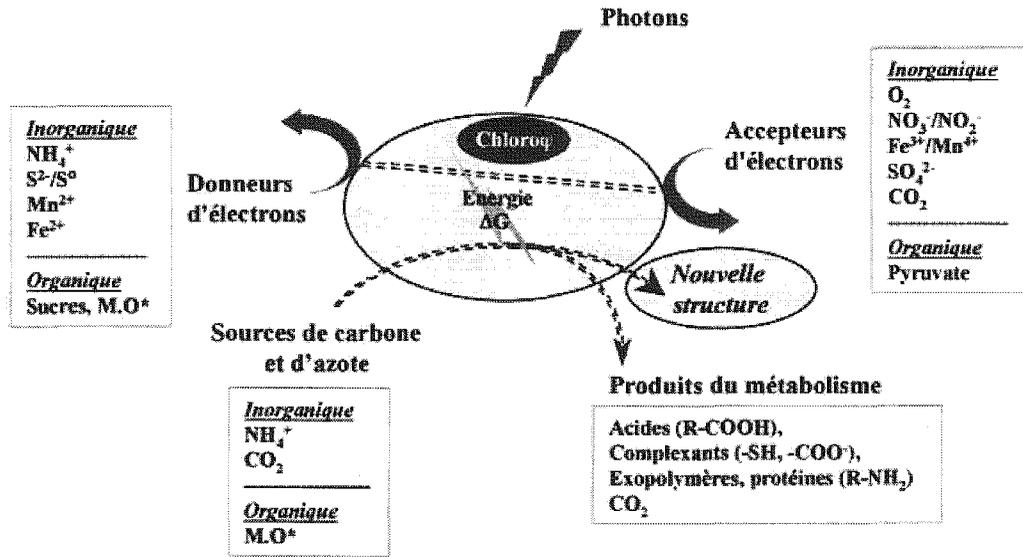
La diminution de la teneur en oxygène de l'atmosphère du sol favorise les micro-organismes micro-aérophiles, aéro-anaérobies et enfin les anaérobies obligatoires.

Deux types de réduction bactérienne du fer sont utilisés par les microorganismes : la réduction dite "assimilatrice" qui concerne la nutrition de nombreux microorganismes (bactéries et champignons) et qui est un phénomène très général, et d'autre part la réduction dite "dissimilatrice" qui correspond à une respiration anaérobie ou à une réduction se manifestant en complément ou en parallèle d'une fermentation (Schröder *et al.* 2003). Les phénomènes liés à l'altération des oxyhydroxydes de fer sont principalement liés à la réduction dissimilatrice qui sera présentée plus en détails.

2.4.2 La réduction dissimilatrice du fer

L'altération bactérienne des oxy-hydroxydes de fer se fait essentiellement *via* la réduction du fer qu'ils contiennent (Figure 2.10), et plus spécifiquement la réduction dissimilatrice du fer.

Les ferri-réductases dissimilatrices, exclusivement présentes chez des bactéries spécialisées, participent significativement au cycle du fer (Figure 2.10) (Lovley & Coates 2000, Lovley *et al.* 1998, Straub *et al.* 2001, Vargas *et al.* 1998). Le Fe(III) inorganique précipité et diverses espèces complexées de Fe(III) peuvent être utilisées comme accepteur terminal d'électron dans la réduction dissimilatrice du fer (Lovley 1993, Lovley & Blunt-Harris 1999, Lovley *et al.* 1996). Le Fe^{2+} produit est disponible pour les micro-organismes qui vivent en syntrophie avec ces bactéries ferri-réductrices.



* M.O : matières organiques

Figure 2.9 Principaux donneurs et accepteurs d'électrons (Deneux et al. 2003, modifié d'après Berthelin 1988)

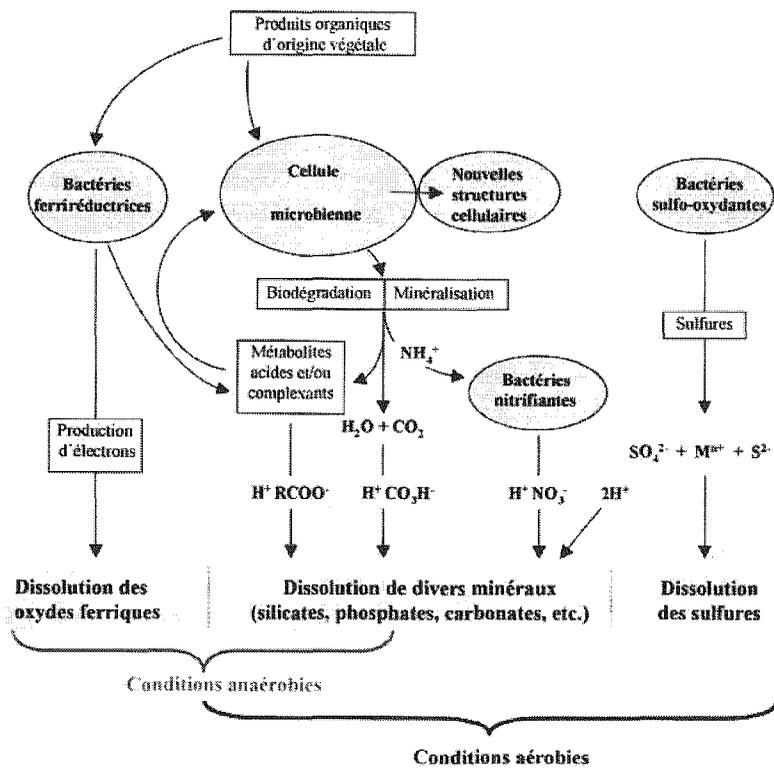


Figure 2.10 Principales interventions des microorganismes du sol sur la dissolution et l'altération des minéraux (D'après Berthelin 1998).

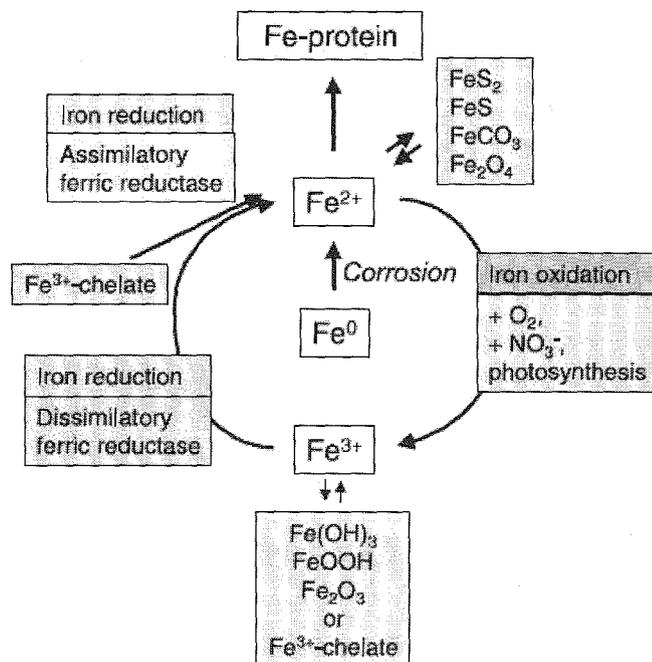


Figure 2.11 Rôle des ferri-réductases dans le cycle du fer (Schröder *et al.* 2003)

Dans la réduction dissimilatrice du fer, les ferri-réductases agissent comme la réductase terminale d'une chaîne de transport d'électrons qui apparaît liée à la membrane cytoplasmique. La réduction du fer ferrique est couplée à la génération de la force motrice de protons à travers la membrane cytoplasmique, qui est ensuite utilisée pour générer l'ATP par une ATP-synthase liée à la membrane et ainsi alimenter en énergie le transport actif de nutriments. La force motrice de protons peut également être utilisée pour réduire le NAD(P) chez les chimiolithotrophes pour des réactions d'anabolisme (biosynthèse de constituants cellulaires). Comme pour la réduction des sulfates, la réduction dissimilatrice du fer est considérée comme étant un des processus de génération d'énergie les plus anciens développés sur terre. La respiration du fer pourrait même précéder la respiration des nitrates et de l'oxygène (Richardson 2000 ; Vargas *et al.* 1998).

Trois stratégies sont évoquées pour la respiration du fer (Schröder *et al.* 2003) :

1. Réduction du fer insoluble via un transporteur d'électron

Les substances humiques, naturellement abondantes dans de nombreux environnements, peuvent servir de transporteurs d'électrons (navettes) vers les oxydes de Fe^{3+} (Lovley &

Blunt-Harris 1999, Lovley *et al.* 1996, Lovley *et al.* 1998, Lovley *et al.* 2000). Les substances humiques contiennent des molécules de type quinones qui peuvent subir des cycles d'oxydo-réduction. Dans leur état oxydé, elles agissent comme des accepteurs terminaux d'électrons pour une chaîne de respiration. Sous forme réduite, elles peuvent être chimiquement oxydées en utilisant les oxydes de Fe^{3+} comme accepteurs d'électrons.

Récemment, Newman & Kolter (2000) ont découvert que certaines bactéries réduisent Fe^{3+} en produisant de petits composés redox diffusibles qui peuvent servir de transporteurs d'électrons entre le micro-organisme et l'oxyde de fer insoluble. Les micro-organismes n'ont donc pas besoin d'un contact direct avec le fer. Ces molécules diffusibles incluent des quinones hydrophiles de nature encore inconnue synthétisées par *Shewanella oneidensis* et *Geothrix fermentans* (Nevin & Lovley 2002, Newman & Kolter 2000) ou des mélanines synthétisées par *Shewanella algae* (Turick *et al.* 2002).

2. Sécrétion de chélatants spécifiques au Fe^{3+} ou de molécules complexantes

Nevin & Lovley (2002) ont noté qu'en plus des quinones *Geothrix fermentans* et *Shewanella algae* synthétisaient des composés chélatant le fer et permettant une solubilisation significative des oxydes de fer. La nature de ces sidérophores est encore à déterminer et il n'est pas encore établi si ces complexes du fer peuvent servir d'accepteurs terminaux d'électrons pour la réduction dissimilatrice du fer. Il se pourrait même que les sidérophores ne soient pas utilisables en tant qu'accepteurs d'électrons en raison de leur potentiel redox négatif.

3. Respiration du fer via un contact direct avec le fer insoluble

Geobacter metallireducens utilise un mode de respiration du fer fondamentalement différent des cas précédents. Cette bactérie anaérobie ferri-réductrice doit être directement en contact avec l'oxyde pour la réduction, à moins qu'un accepteur d'électron soluble comme le citrate ferrique soit disponible. Quand elle est mise en présence d'une forme insoluble du fer ou du manganèse, *G. metallireducens* produit flagelle et pili pour permettre la chemotaxie et l'attachement à l'oxyde. Par contre, aucun appendice n'est formé en présence de citrate ferrique.

Parallèlement aux processus de respiration anaérobie, le fer peut être réduit parallèlement aux processus de fermentation. Les mécanismes impliqués sont encore peu connus malgré l'abondance et l'impact possible de ces bactéries dans les phénomènes de transformation du fer (Bousserrhine *et al.* 1996, Stemmler & Berthelin 2003).

2.4.3 Effet de la teneur en eau du sol sur la réduction bactérienne

L'activité des bactéries ferri-réductrices était considérée comme se manifestant dans des sols engorgés (Munch & Ottow 1983). Toutefois quelques observations récentes montrent que la ferri-réduction se manifeste dans des milieux drainés quand l'activité microbienne consommant l'oxygène conduit à un état anoxique (Paskiewicz *et al.* Annexe 1, Stemmler *et al.* 2004). Il apparaît donc que des interactions entre état hydrique et disponibilité des matières organiques biodégradables sont à prendre en considération.

2.5 La rhizosphère

En 1904, Hiltner employa le terme "rhizosphère" pour qualifier la zone d'intense activité bactérienne autour des racines des Légumineuses. Sa définition a ensuite été étendue à la zone du sol influencée par la présence de racines (Lynch 1990).

Les composants de la rhizosphère sont en fait la racine, dont l'anatomie varie avec l'espèce végétale, l'état physiologique de la plante, les conditions de culture..., les exsudats racinaires et la rhizodéposition, les microorganismes symbiotiques ou non présents à cet interface racine-sol, le sol dont les propriétés physiques, chimiques, physico-chimiques sont propres à l'environnement racinaire.

Pour cette étude nous nous sommes attachés plus particulièrement à certains des paramètres de la rhizosphère qui contribuent ou peuvent contribuer, ou sont plus ou moins impliqués dans les phénomènes de mobilisation d'éléments minéraux et en particulier du fer et du manganèse et d'éléments associés.

2.5.1 Phytodisponibilité des éléments

La biodisponibilité d'un élément du sol pour la plante est à distinguer de la mobilité de cet élément. La mobilité de l'élément est son aptitude à passer dans les compartiments du sol

où il est de moins en moins énergétiquement retenu, alors que la biodisponibilité est son aptitude à être absorbé par un organisme vivant à partir d'un compartiment quelconque du sol (Juste 1988). Ainsi, la phytodisponibilité peut être définie comme la quantité d'un élément qui peut être transférée dans la plante durant son développement. C'est donc la quantité mesurée de l'élément dans les tissus à la maturité ou à la récolte. Dans un sol, la quantité phytodisponible d'un élément en traces donné n'est pas la quantité totale de l'élément mais un ensemble d'ions qui, pendant la durée de la culture, ont la capacité à s'échanger avec les ions en solution (Figure 2.13, Morel 1997).

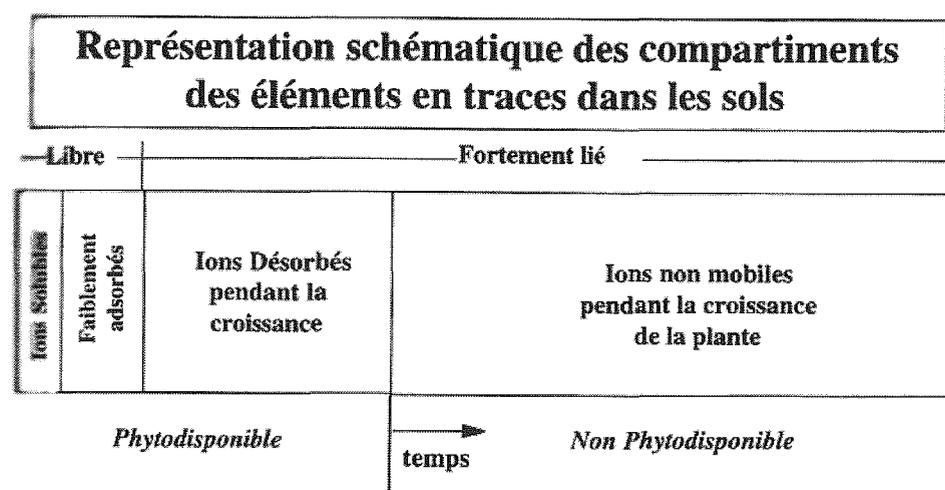


Figure 2.13 Représentation schématique des compartiments des éléments en traces dans les sols (Morel 1997)

La phytodisponibilité d'un élément est dépendante de nombreux processus (Figure 2.14, d'après Morel 1996) comme la libération d'un élément donné du sol vers les compartiments phytodisponibles, le transport de cet élément (e.g. par diffusion) vers les racines, et enfin son absorption par les racines et sa translocation vers les parties aériennes de la plante.

Ces processus sont dépendants des conditions biologiques, physiques et chimiques du milieu liées au sol (matières organiques, formes des éléments présents, pH, Eh, Figure 2.14), à la plante (capacité d'absorption et de translocation), au climat (Température, humidité) et aux pratiques agricoles (fertilisation, drainage).

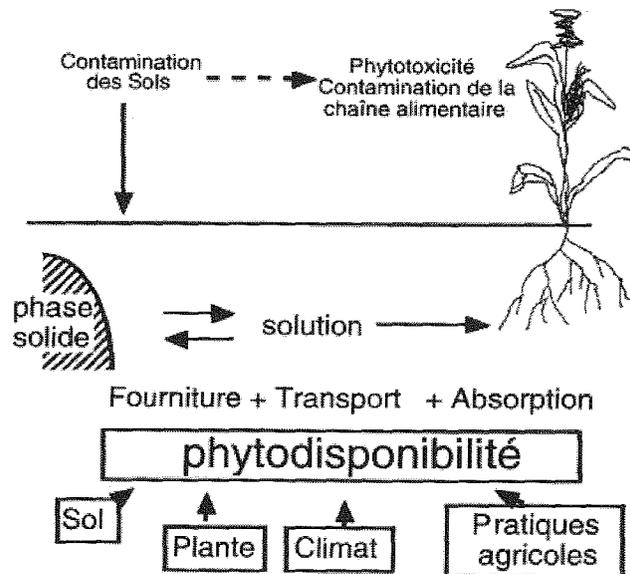


Figure 2.14 Phytodisponibilité des éléments en traces dans les sols (d'après Morel 1996)

2.5.2 Les exsudats racinaires et la rhizodéposition

Rovira *et al.* (1979) ont proposé la terminologie suivante pour définir les différents composés libérés de manière active ou passive et les lysats racinaires :

- les exsudats au sens strict correspondent à des composés de faible masse moléculaire, hydrosolubles, libérés de manière passive par diffusion sous l'effet de gradients de potentiels électrochimiques, contrôlés par la perméabilité membranaire.

- les sécrétions sont des composés libérés par des processus métaboliques actifs, comme les enzymes.

- les mucilages sont des composés de type polysaccharidique produits par la coiffe racinaire et les cellules épidermiques.

- le mucigel correspond au composés gélatineux observés à la surface des racines de plantes non stériles et regroupant les mucilages végétaux et microbiens ainsi que des particules organiques et inorganiques du sol. Ils protègent la racine contre la dessiccation, interviennent comme lubrifiants et améliorent le contact entre racine et sol. Ils favorisent ainsi la nutrition minérale et la mobilisation des éléments minéraux.

- les lysats proviennent de l'autolyse par dégénérescence des poils absorbants, des parois cellulaires, des cellules épidermiques et corticales et des racines entières.

Tableau 2.3. Composition en sucres, en acides aminés et en acides organiques des exsudats racinaires du maïs (% des composés hydrosolubles recueillis).

Composés		(Lespinat & Berlier 1975)	(Matsumoto <i>et al.</i> 1979)	(Krafczyk <i>et al.</i> 1984)	
				Stériles	Non stériles
Composés glucidiques	Glucose	+	14,1	51,6	44,6
	Galactose	+			
	Xylose	+			
	Arabinose	+		20,1	20,0
	Rhamose	+			
	Maltose	+			
	Stackyose		34,1		
	Fructose	+	51,8	17,1	16,0
	Saccharose			11,1	19,6
Acides aminés	Alanine	+	17,6	16,5	12,7
	Asparagine	+			
	Serine	+	6	7,3	6,2
	Valine	+	2,6	2,9	3,3
	Leucine	+	0,6	4,8	2,8
	Isoleucine	+	0,7		
	acide γ -aminobutyrique			8,4	5,2
	acide aspartique	+	0,4	17,6	14,8
	Phénylalanine	+	0,9		
	Acide glutamique	+	64,2	19,7	36,4
	tyrosine	+	0,2		
	Lysine	+	3,3		
	Arginine	+		8,6	4,4
	Histidine	+	1,5		
Glutamine	+	1,1	3,4	5,1	
Thréonine					
Glycine		0,7	10,8	9,1	
Acides organiques	Acide tartrique			0,9	1,5
	Acide oxalacétique			27,9	32,3
	Acide malique	+	+	3,7	2,0
	Acide lactique		+		
	Acide succinique	+		4,4	4,9
	Acide fumarique			52,0	49,2
	Acide citrique	+	+	6,5	5,5
	Acide isocitrique		+		
	Acide pyruvique		+		
	Acide glutarique			0,4	0,5
	Acide benzoïque			2,7	2,9
	Acide hydroxybenzoïque	+			
Acide aconitique			1,3	1,1	

L'ensemble des ces composés libérés par la racine et les microorganismes de la rhizosphère est appelée la rhizodéposition et est à la base des conditions énergétiques et nutritionnelles qui déterminent une dynamique et activité plus ou moins spécifique des communautés microbiennes de la rhizosphère.

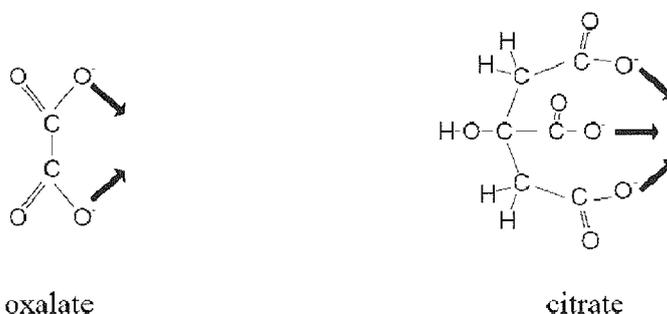
2.5.3 Composition des exsudats racinaires

Les exsudats racinaires sont composés d'acides aminés, acides organiques, sucres, enzymes, pigments, nucléotides, produits secondaires (alcaloïdes, opines...). 40 à 90% du carbone transféré aux racines est perdu en rhizodépôt dans le sol (Lynch & Whipps 1990). Le tableau 2.3 récapitule quelques données concernant la composition en glucides, acides organiques et acides aminés des exsudats du maïs.

Tableau 2.4. Formules des acides aliphatiques et phénoliques rhizosphériques

Acides aliphatiques		
monoacides simples	formique	H-COOH
	acétique	CH ₃ -COOH
	propionique	CH ₃ -CH ₂ -COOH
	butyrique	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH
acides cétoniques	pyruvique	CH ₃ -CO-COOH
diacides simples	oxalique	HOOC-COOH
	malonique	HOOC-CH ₂ -COOH
	succinique	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH
	fumarique	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH
monoacides alcools	glycolique	CH ₂ OH-COOH
polyacides alcools	malique	HOOC-CHOH-CH ₂ -COOH
	tartrique	HOOC-CHOH-CHOH-COOH
	citrique	(COOH) ₂ -CHO-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Acides phénoliques		
protohydroxybenzoïque protocatéchique vanilique galique coumarique		

Des acides organiques simples sont synthétisés par les organismes et les racines, comme des acides aliphatiques (acides oxalique, formique, citrique...), des acides phénoliques (Tableau 2.4), et sont de bons agents d'altération de minéraux en formant des complexes comme ceux schématisés ci-dessous mais sont aussi des substrats énergétiques (Munier-Lamy & Berthelin, 1991).



Des molécules chélatantes exsudées par les racines de certaines plantes (graminées) forment des complexes plus ou moins spécifiques très stables avec le fer. Ces composés, appelés phytosidérophores, jouent un rôle important dans la mobilisation de cet élément en particulier dans les sols calci-magnésiques où le fer est peu disponible (Chaignon *et al.* 2002, Marschner 1994).

2.5.4 Implication de la rhizosphère dans la modification des conditions physico-chimiques du sol

Les racines des plantes et les organismes associés déterminent les conditions physico-chimiques, chimiques et physiques du milieu ce qui entraîne des modifications de la mobilité et de la spéciation des métaux.

En prélevant de l'eau et des éléments minéraux, les racines modifient le potentiel de l'eau et les concentrations ioniques dans la rhizosphère. L'absorption racinaire est sélective et peut conduire à l'appauvrissement significatif des solutions du sol et du sol rhizosphérique pour certains éléments comme le phosphore ou le potassium. La racine fonctionne alors comme une pompe à ions qui déplace les réactions d'équilibre et provoque la désorption des éléments échangeables.

Le contrôle du pH dans la rhizosphère fait intervenir divers processus qui peuvent acidifier la rhizosphère jusqu'à 2 unités pH (Ruiz & Arvieu 1990) : excrétion ou exsorption de

H^+ ou OH^- et/ou CO_3H^- par les racines qui compense l'absorption de cations ou d'anions (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} ...) par la racine, contrôle de la pCO_2 par la respiration des racines et des microorganismes associés qui minéralisent les tissus morts, production d'acides (HNO_3 , HCO_3^- , acides organiques : citrique, oxalique, tartrique, malique) (Robert & Berthelin 1986).

Le Eh peut aussi être déterminé par ces phénomènes cités ci-dessus qui, comme la minéralisation des produits organiques, peuvent contribuer à sa baisse significative.

2.5.5 Implication des microorganismes de la rhizosphère dans la mobilisation des éléments minéraux

La mobilisation des éléments minéraux peut être reliée directement aux activités racinaires qui peuvent impliquer la présence d'enzymes de type réductases modifiant les états d'éléments comme le fer, le manganèse, la production de protons, d'exsudats dont certains présentent des propriétés acides et complexantes. Le tableau 2.4 donne les compositions d'exsudats observées dans diverses études. Tous les travaux soulignent la présence d'acides aliphatiques carboxyliques, hydroxycarboxyliques, polycarboxyliques... (e.g. acide tartrique, citrique). Par ailleurs ces exsudats constituent une excellente source de carbone et d'énergie pour les microorganismes de la rhizosphère. La composition du milieu dit "rhizosphérique", utilisé dans cette étude, s'inspire d'ailleurs de ces travaux sur les exsudats racinaires.

Les exsudats d'origine racinaire peuvent, comme les phytosidérophores, être particulièrement efficaces pour mobiliser le fer ou d'autres éléments. Les microorganismes, pour leur part, peuvent en utilisant les exsudats comme source de carbone et d'énergie produire des substances plus ou moins complexantes dont des sidérophores. Divers travaux ont déjà montré, en distinguant pour certains d'entre eux la part liée aux racines de celle liée aux activités microbiennes, que les activités rhizosphériques contribuent à l'altération des minéraux comme les silicates (Berthelin & Leyval, Calvaruso *et al.* 2006), les phosphates (Laheurte et Berthelin) et les oxydes de fer (Watteau et Berthelin, Hinsinger 2001) (Jongmans *et al.* 1997, Van Breemen *et al.* 2000).

2.5.6 Rhizosphère et engorgement du sol

La présence des racines dans un sol plus ou moins hydromorphe perturbe les phénomènes normalement observables par deux processus inverses : 1. consommation d' O_2 et dégagement de CO_2 par les racines et les microorganismes associés ; 2. diffusion d' O_2 par

suite du transport d'O₂ des parties aériennes de la plante vers les racines (Dommergues & Mangenot 1970, Gobat *et al.*, 2002). Par ailleurs les plantes vont modifier le régime hydrique par évapotranspiration et par modification de la porosité du sol. Si l'effet net de ces processus se traduit par une perte d'O₂ il y a aggravation de l'anoxie ; si au contraire l'effet net se traduit par un gain de O₂, le potentiel d'oxydoréduction s'élève localement et l'anoxie perd de son intensité.

2.5 Conclusion

Le fonctionnement du cycle biogéochimique du fer apparaît régulé par des activités microbiennes. Les phénomènes de réduction sont ainsi sous la dépendance du couplage entre les cycles du carbone et du fer. Ils interviennent pour modifier la mobilité des éléments associés aux oxydes et oxyhydroxydes ferriques dont les éléments en traces (Ni, Co, Cr). Ces processus sont souvent impliqués dans l'altération des oxydes de manganèse, puits et sources d'éléments en traces.

La rhizosphère apparaît, en raison des conditions qu'elle développe, comme un site où ces interactions peuvent intervenir de façon très fondamentale sur le comportement et la biodisponibilité de Fe, Mn et des éléments qui peuvent leur être associés.

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

METHODES
ET
DISPOSITIFS
EXPERIMENTAUX

3

METHODES ET DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

3.1 Introduction

Les études de paramètre biotiques et abiotiques impliqués dans la mobilisation du fer, du manganèse et de métaux associés, hors et dans la rhizosphère, ont été conduites en mettant en œuvre des approches essentiellement expérimentales. Le choix des sols et des végétaux a été guidé par le résultats d'études agronomiques et biogéochimiques (L'Huillier et Edighoffer 1996 ; Becquer *et al.* 1997 ; Quantin *et al.* 2002) qui ont montré que des phénomènes de mobilisation du fer, du manganèse et d'éléments associés (Ni, Cr, Co) se manifestent dans les sols de Nouvelle-Calédonie. Ces mobilisations de métaux se développent sous l'influence d'activités microbiennes dégradant des matières organiques, dans des milieux plus ou moins temporairement engorgés, mais aussi en présence de cultures de maïs dans des essais de type agronomique.

3.2 Matériels

3.2.1 Sols

Les échantillons de terre proviennent de la toposéquence de la station de Ouénarou située en Nouvelle-Calédonie (E166° 44' – S22° 8'), au sud-est de la Grande Terre (Figure 3.1) dans la région de Nouméa.

Les 3 types d'échantillons utilisés au cours de cette étude ont été prélevés au sein d'un même profil pédologique et correspondent à 3 horizons différents du sol désignés respectivement par Ouénarou 4.1 (OUE 4.1), Ouénarou 4.2 (OUE 4.2) et Ouénarou 4.3 (OUE 4.3) (sol de terrasse alluviale). Leurs caractéristiques sont présentées dans les tableaux 3.1 et 3.2.

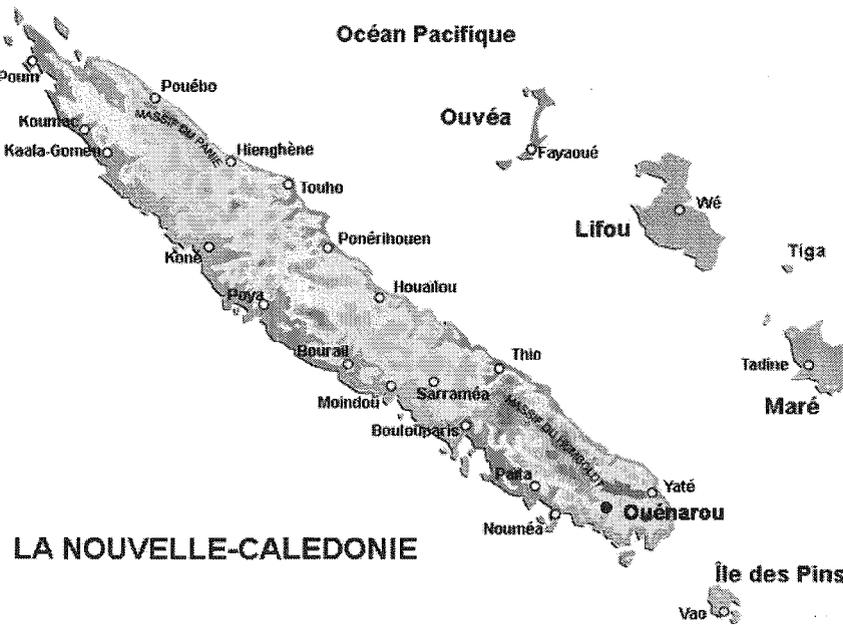


Figure 3.1 Carte géographique de la Nouvelle-Calédonie

Tableau 3.1 Caractéristiques physicochimiques des horizons échantillonnés (d'après Quantin 2001)(SG : sables grossiers, SF : sables fins, LG : limons grossiers, LF : limons fins, A : argiles).

cm		Granulométrie (%)					pH		Carbone organique total (%)
		SG	SF	LG	LF	A	H ₂ O	KCl	
OUE 4.1	0-4	4,5	1,5	0,3	38	54,8	4,6	4,7	2,6
OUE 4.2	5-9	7		10,7		82,9	4,7	5,4	3,2
OUE 4.3	10-39	39		27		34	5,0	6,2	1,0

Ce sol, de type Geric Ferralsol (sol ferrallitique, FAO, 1998), est acide ($\text{pH}_{\text{eau}} < 5$) et relativement pauvre en matières organiques (Tableau 3.1). Il est soumis à engorgements temporaires, notamment pendant la saison humide. Ceci se traduit par de nombreuses concrétions ferro-manganiques dans l'ensemble du profil. L'exploitation agricole de ce sol se développe depuis les années 80, notamment pour des productions maraîchères et fruitières. La granulométrie évolue en devenant de plus en plus grossière de la surface (OUE 4.1) vers l'horizon le plus profond (OUE 4.3). L'horizon de surface est en effet très riche en argiles granulométriques et limons fins ($\text{LF} + \text{A} = 92,8\%$). Cette fraction granulométrique devient

Tableau 3.2 Analyse élémentaire des horizons de sol échantillonnés

cm	Bases échangeables (cmol.kg ⁻¹)				Eléments totaux (%)														
	Ca	Mg	K	Na	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO ₂	NiO	Cr ₂ O ₃	CoO	TiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	PF	
OUE 4.1	0-4	0,9	1,1	0,2	0,1	10,4	6,9	57,0	0,64	1,0	1,6	0,03	0,16	0,0	0,05	2,54	0,0	0,04	17,2
OUE 4.2	5-9	0,1	0,5	0,1	0,1	9,56	7,72	60,8	0,66	1,2	2,3	0,1	0,18	0,0	0,02	2,6	0,0	0,0	15,8
OUE 4.3	10-39	0,0	0,1	0,0	0,0	10,2	8,79	57,0	0,70	1,0	3,2	0,1	0,22	0,0	0,03	2,8	0,0	0,0	15,8

plus faible dans l'horizon intermédiaire (OUE 4.2) avec 82,9%, et est de seulement 34% dans l'horizon le plus profond (OUE 4.3). Cet appauvrissement en particules les plus fines se fait au profit des particules les plus grossières, à savoir les sables fins et grossiers et les limons grossiers. Cette différence de granulométrie peut avoir un impact sur la disponibilité des éléments en relation avec des différences de surfaces spécifiques des phases organo-minérales présentes, ainsi que sur le comportement hydrique du sol.

Les constituants minéraux essentiels sont les oxydes et les oxyhydroxydes de fer. En fait, la minéralogie de ce sol est dominée par la goéthite bien cristallisée (Figure 3.2). L'hématite et éventuellement la magnétite ne s'y trouvent que sous forme de traces (Quantin 2001). Les silicates, et principalement le talc, sont peu présents.

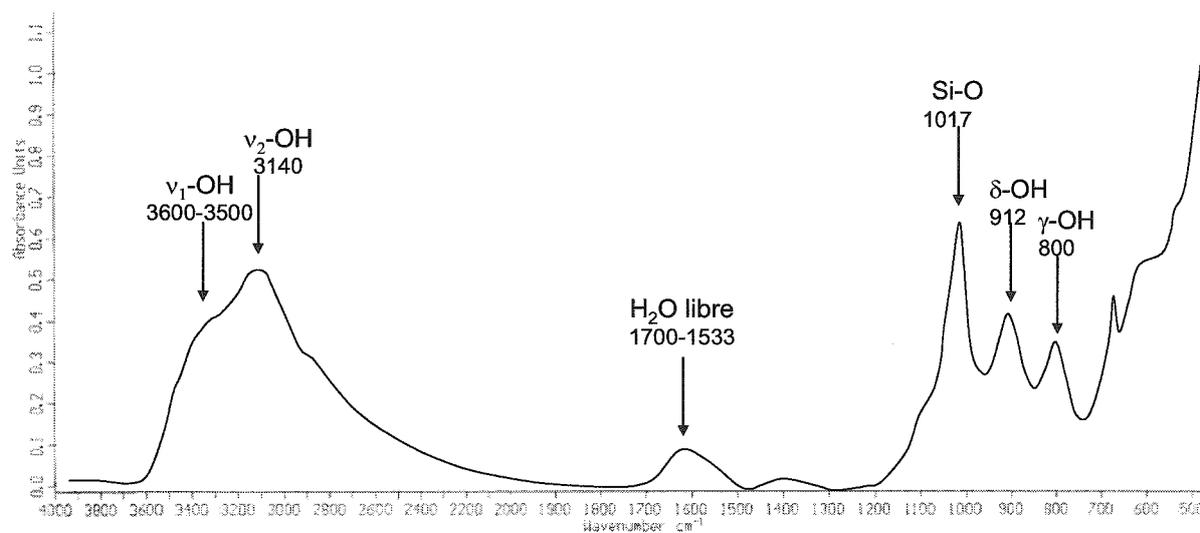


Figure 3.2 Spectre IRTF de l'échantillon de sol de OUE 4.1, fraction <2 mm

La spectroscopie infrarouge à Transformé de Fourier (IRTF) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par les minéraux du sol. Elle a permis, via la détection de vibrations caractéristiques de certaines liaisons chimiques, de caractériser le sol de Ouénarou d'un point de vue des fonctions chimiques présentes.

Dans la goéthite (FeOOH), seul oxy-hydroxyde de fer détectable dans l'échantillon de sol de OUE 4.1, chaque atome de fer est entouré de 3O^{2-} et 3OH^- pour donner des octaèdres $\text{FeO}_3(\text{OH})_3$. Ces octaèdres s'associent en une structure hexagonale compacte d'anions empilés selon la direction [100]. En spectroscopie IRTF, les vibrations des liaisons Fe-OH et Fe-O sont détectées et quatre pics principaux sont observables sur les spectres (Cornell & Schwertman 1996) :

- hydroxyles $\nu_1\text{OH}$ de surface entre 3660 et 3483 cm^{-1}
- hydroxyles $\nu_2\text{OH}$ d'élongation à 3140 cm^{-1}
- hydroxyles δOH , déformation angulaire dans le plan d'empilement [100] à 892 cm^{-1}
- hydroxyles γOH , déformation angulaire hors du plan d'empilement [100] à 795 cm^{-1}

La Figure 3.2 représente le spectre IRTF de l'échantillon de sol OUE 4.1. Les spectres correspondants aux échantillons de sol OUE 4.2 et 4.3 sont parfaitement superposables à celui de OUE 4.1 et ne sont donc pas représentés ici. Les pics les plus visibles correspondent aux 4 pics principaux de la goethite listés ci-dessus, le pic de silice Si-O à 1017 cm^{-1} servant à l'ajustement des spectres entre eux, et une zone entre 1700 et 1533 cm^{-1} correspondant à de l'eau libre dont la présence témoigne d'une insuffisance de la dessiccation des échantillons de sol.

Les deux pics de la goethite δOH et γOH sont légèrement décalés vers la gauche par rapport aux données de la littérature, et se situe respectivement à 912 et 800 cm^{-1} au lieu de 892 et 795 cm^{-1} . Ce décalage est l'expression d'une substitution du fer par un autre cation dans le réseau cristallin (Cornell et Schwertman 1996). Compte tenu de la chimie de l'échantillon de sol, il pourrait s'agir de Ni et/ou Cr.

Le fer est l'élément dominant. Des teneurs relativement importantes en Mn, Ni, Cr et Co sont à souligner. Les éléments minéraux nutritifs (bases échangeables) sont aussi présents mais en faible teneur et seulement dans les horizons de surface et sont absents de l'horizon OUE 4.3. La matière organique doit jouer ici un rôle essentiel pour fixer et recycler les nutriments. Comme dans tous ces types de sols le phosphore est peu présent voire absent et non disponible car sorbé (Becquer *et al.* 2003).

Pour caractériser la répartition de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différents compartiments géochimiques des échantillons de sols de Ouénarou OUE 4.1, OUE 4.2 et OUE 4.3, nous avons réalisé des extractions séquentielles avec des réactifs spécifiques des différents compartiments géochimiques selon le protocole décrit dans le chapitre 3.2.4.2.

Les trois horizons de sol présentent la même répartition ou des répartitions voisines des éléments dans les différents compartiments géochimiques. Les éléments les plus disponibles, éléments des phases hydrosoluble (*Hydro*), acidosoluble (*Acido*) et échangeable (*Ech*), sont peu abondants (Tableaux 3.3 pour l'échantillon OUE 4.1, 3.4 pour l'échantillon

OUE 4.2 et 3.5 pour l'échantillon OUE 4.3). C'est le manganèse qui apparaît le plus abondant dans ces compartiments ($118 \mu\text{gMn.g}^{-1}$ sol OUE 4.1), suivi de Ni ($27 \mu\text{gNi.g}^{-1}$ sol OUE 4.1) puis Co ($5 \mu\text{gCo.g}^{-1}$ sol OUE 4.1), Fe ($1,5 \mu\text{gFe.g}^{-1}$ sol OUE 4.1) et enfin Cr qui en est absent. Le fer est principalement contenu dans les oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*, 96%), les oxydes de fer peu cristallisés (*Fe-ox1*, 2,96 %) et les matières organiques (*MO*, 0,55%). Le manganèse se concentre principalement dans les oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*). Le nickel est présent à 97 % dans le compartiment *Fe-ox2* et Co se partage entre le compartiment *Mn-ox* (52%) et le compartiment *Fe-ox2* (40%).

Ces résultats montrent l'association de Ni et Cr aux oxydes de fer et Co aux oxydes de manganèse. Des quantités relativement importantes de Fe ($2333 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sol) sont associées aux matières organiques (*MO*) alors que Mn, présent dans les compartiments *Ech* et *Mn-ox*, est peu présent dans le compartiment *MO*.

Tableau 3.3 Répartition de Fe, Mn, et des éléments en traces associés dans les différents compartiments géochimiques du sol de OUE 4.1 (quantité de l'élément en $\mu\text{g élément.g}^{-1}$ de sol sec ; entre parenthèses : pourcentage de l'élément).

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
Hydro	0,011 ($2,5.10^{-6}$ %)	1,30 (0,03 %)	0,097 ($1,2.10^{-3}$ %)	0,00 (0%)	0,018 ($2,82.10^{-3}$ %)
HCl	0,023 ($5,4.10^{-6}$ %)	1,47 (0,03 %)	0,105 ($1,3.10^{-3}$ %)	0,00 (0%)	0,046 ($7,21.10^{-3}$ %)
KCl	1,52 ($3,5.10^{-4}$ %)	115 (2,67 %)	26,80 (0,327 %)	0,00 (0%)	4,78 (0,75 %)
Mn-ox	248 ($5,8.10^{-2}$ %)	3 033 (70,34 %)	82 (1 %)	1,53 ($1,77.10^{-2}$ %)	330 (51,72 %)
Fe-ox1	12 667 (2,96 %)	354 (8,21 %)	104 (1,27 %)	141 (1,63 %)	47 (7,37 %)
Fe-ox2	412 333 (96 %)	789 (18,30 %)	7 933 (96,7 %)	8 433 (97,4 %)	253 (39,65 %)
MO	2 333 (0,55 %)	18,57 (0,43 %)	54 (0,66 %)	80 (0,92 %)	3,3 (0,52 %)

Tableau 3.4 Répartition de Fe, Mn, et des éléments en traces associés dans les différents compartiments géochimiques du sol de OUE 4.2 (quantité de l'élément en μg élément. g^{-1} de sol sec ; entre parenthèses : pourcentage de l'élément).

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
Hydro	0,010 ($2,35.10^{-6}$ %)	1,18 ($2,8.10^{-2}$ %)	0,087 ($1,5.10^{-3}$ %)	0,00 (0,00 %)	0,017 ($2,4.10^{-3}$ %)
HCl	0,039 ($9,16.10^{-6}$ %)	1,45 ($3,4.10^{-2}$ %)	0,122 ($2,1.10^{-3}$ %)	0,00 (0,00 %)	0,064 ($9,2.10^{-3}$ %)
KCl	1,72 ($4,04.10^{-4}$ %)	83 (1,95 %)	14,13 (0,25 %)	0,00 (0,00 %)	4,23 (0,61 %)
Mn-ox	263 ($6,2.10^{-2}$ %)	2 961 (69,72 %)	86 (1,5 %)	2,97 ($3,4.10^{-2}$ %)	403 (57,82 %)
Fe-ox1	12 767 (3,00 %)	331 (7,79 %)	119 (2,1 %)	170 (1,97 %)	49 (7,03 %)
Fe-ox2	410 333 (96,4 %)	851 (20 %)	5 457 (95,4 %)	8 393 (97,1 %)	237 (34 %)
MO	2 380 (0,56 %)	18,40 (0,43 %)	46 (0,8 %)	81 (0,94 %)	3,3 (0,47 %)

Tableau 3.5 Répartition de Fe, Mn, et des éléments en traces associés dans les différents compartiments géochimiques du sol de OUE 4.3 (quantité de l'élément en μg élément. g^{-1} de sol sec ; entre parenthèses : pourcentage de l'élément).

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
Hydro	0,009 ($2,3.10^{-6}$ %)	1,12 ($2,7.10^{-2}$ %)	0,081 ($1,1.10^{-3}$ %)	0,00 (0,00 %)	0,015 ($1,8.10^{-3}$ %)
HCl	0,032 ($8,1.10^{-6}$ %)	1,32 ($3,1.10^{-2}$ %)	0,139 ($1,9.10^{-3}$ %)	0,00 (0,00 %)	0,087 ($1,0.10^{-2}$ %)
KCl	2,07 ($5,2.10^{-4}$ %)	41 (0,97 %)	7,12 ($9,7.10^{-2}$ %)	0,00 (0,00 %)	2,03 (0,24 %)
Mn-ox	204 ($5,2.10^{-2}$ %)	3 024 (71,8 %)	82 (1,1 %)	4,10 ($5,2.10^{-2}$ %)	486 (58,48 %)
Fe-ox1	8 620 (2,18 %)	356 (8,45 %)	152 (2,1 %)	123 (1,56 %)	77 (9,3 %)
Fe-ox2	384 333 (97,2 %)	870 (20,7 %)	7 040 (96,1 %)	7 590 (97,4 %)	263 (31,6 %)
MO	2 228 (0,56 %)	17,60 (0,42 %)	43 (0,59 %)	78 (1,0 %)	3,2 (0,38 %)

Les échantillons prélevés ont été séchés à l'air à température ambiante jusqu'à poids constant, tamisés à 2 mm pour conserver la terre fine (fraction 0-2 mm), puis quartés.

3.2.2 Sable

Les sables utilisés en mélange avec les échantillons de sol dans les dispositifs expérimentaux de culture de plantes sont lavés par une solution acide à pH=2 (avec HCl) puis par une solution alcaline à pH=11 (avec NaOH), rincés à l'eau osmosée entre chaque lavage jusqu'à l'obtention d'un pH neutre de l'eau de rinçage, puis séchés 4h à 150°C. Les lavages sont destinés à éliminer les fraction minérales et organiques qui pourraient être sensibles aux phénomènes d'altération et/ou biodégradation.

Le mélange de sables est constitué de :

- 70 % de sable grossier d'aquarium, diamètre moyen 500 µm, 100% quartz et garanti sans solvant (Sable Aquaprime Decoquartz Spécial Aquarium, Girard & Cie, F-71290 Cuisery, distribué par Botanic).

- 30 % de sable de Fontainebleau SiO₂ 125-315 µm, diamètre moyen 246 µm, 100% quartz (VWR International – Prolabo, Ref. 27 460.364).

3.2.3 Matériel végétal

Le choix s'est porté sur le maïs (*Zea mays* L.) en raison de la rapidité de sa croissance, de sa forte masse racinaire et d'essais agronomiques effectués par L'Huillier (1994) sur ces sols de Nouvelle-Calédonie. De plus, de nombreux laboratoires, dont le LIMOS, l'utilisent comme plante expérimentale. Ses conditions de culture et son comportement sont relativement bien définis. Enfin, sa production d'exudats racinaires a été relativement bien étudiée et leur composition déterminée pour diverses familles de composés et dans diverses conditions de culture (Laheurte & Berthelin 1988 ; Laheurte *et al.* 1990 ; Groleau-Renaud *et al.* 1998).

Le cultivar sélectionné est le DK 250, garanti sans traitement antifongique. Les graines sélectionnées sont de poids homogène, compris entre 310 et 330 mg.

3.2.4 Les microorganismes

Les activités microbiennes observées pour divers phénomènes (minéralisation des matières organiques, réduction-dissolution du fer, du manganèse) sont celles des communautés des échantillons de sol prélevés. La distinction entre phénomènes biotiques et abiotiques se fait en utilisant des inhibiteurs de l'activité microbienne (par exemple

thimerosal) ou par stérilisation d'échantillons de sol (autoclavage, rayonnement γ). Par ailleurs, des communautés bactériennes ont été isolées pour étudier leur capacité à réduire et dissoudre le fer, le manganèse et pour préciser leur nature et leur mode d'activité.

3.3 Méthodes

Elles concernent les phases gazeuses, liquides et solides et les organismes impliqués (plantes et microorganismes).

3.3.1 Stérilisation et désinfection du matériel

Pour évaluer l'activité de communautés bactériennes définies ou pour obtenir des témoins abiotiques, le matériel expérimental a subi une stérilisation totale en utilisant diverses méthodes :

- Afin de préserver au mieux les caractéristiques physicochimiques des sols, les échantillons ont été totalement stérilisés par rayonnement gamma à 38 kGy au Commissariat à l'Energie Atomique de Cadarache pour les échantillons utilisés dans les expériences avec plantes.

- Dans les expériences avec incubations en batch (cuves), les échantillons abiotiques sont obtenus par ajout d'une solution de merthiolate de sodium 1‰ (thimérosal) dans l'eau d'humidification des sols. Cet apport n'affecte pas la solubilisation des éléments minéraux à l'exception de Mg et Ca qui sont légèrement déplacés par échange (Berthelin & Kogblevi, 1974).

- Le sable a subi une stérilisation par chaleur sèche au four à 150°C pendant 4h.

- Le mélange du sol et du sable stérilisés a été préparé sous hotte à flux laminaire dans des récipients préalablement stérilisés par autoclavage (110°C pendant 30 mn).

- Les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage (110°C pendant 30 mn).

- Les solutions nutritives des plantes ont été stérilisées par filtration à 0,2 μm pour éviter des éventuelles précipitations d'éléments minéraux.

- La désinfection des graines est obtenue par agitation dans H₂O₂ 30% pendant 30 minutes puis rinçage 1 fois à l'eau distillée stérile (Laheurte 1985). Les graines sont ensuite mises à germer à l'obscurité sur milieu Nutrient Broth en boîte de Pétri (Photographie 3.1). Les plantules non contaminées sont sélectionnées pour la mise en culture au bout de 5 jours.



Photo 3.1 Germination des graines sur boîte de Pétri stérile

3.3.2 Mesure de l'humidité équivalente (HE) des échantillons de sol

L'humidité équivalente (HE) des échantillons est mesurée par la méthode d'imbibition-ressuyage (Bouyoucos 1936, décrit par Duchaufour 1966). Les échantillons sont humectés par imbibition jusqu'à sursaturation puis ressuyés pendant 24h de manière à évacuer les eaux gravitaires. L'échantillon est ensuite pesé humide puis sec (séché à 110°C jusqu'à poids constant). La valeur de l'humidité équivalente est obtenue par différence entre les poids de l'échantillon sec et humide, rapportée au poids de sol sec.

3.3.3 Caractérisation de la phase liquide

3.3.3.1 Dosage des cations totaux en solution

Les solutions sont stabilisées par ajout d'une goutte d'acide chlorhydrique concentré (36N) et filtrées à 0,45 μm . Les cations totaux en solution sont ensuite dosés par spectrométrie d'émission ICP-AES Jobin Yvon 2038 (16-18 rue du canal 91165 Longjumeau Cedex).

Le dosage de l'ammonium en solution utilise le réactif de Berthelot, fourni dans un kit Merck™ Ammonium Test 14752¹. Le domaine de validité de cette colorimétrie est compris entre 0 et 3,9 mg.L⁻¹ NH₄⁺ pour des mesures effectuées à 690 nm.

3.3.3.2 Dosage colorimétrique des éléments réduits en solution

Le fer réduit Fe²⁺ est dosé par colorimétrie avec la méthode Aquamerck Eisen-Test 8023 (Merck¹), basée sur la formation d'un complexe rouge foncé très stable lors de la mise en contact de Fe²⁺ avec la 2,2'-bipyridine. Les densités optiques sont mesurées à 523 nm et converties en mg.L⁻¹ grâce à une gamme étalon.

Le manganèse réduit Mn²⁺ est dosé selon le protocole de Charlot (1974) basé sur la formation d'une coloration jaune du complexe Mn²⁺-formaldoxime. À 20 ml de solution de l'échantillon sont ajoutés 1 ml de solution de formaldoxime (8 g de chlorure d'hydroxylammonium sont dissous dans 100 ml d'eau ; 4 ml de formaldéhyde 35% sont ajoutés et le tout est complété à 200 ml avec de l'eau) et 1 ml d'ammoniac 6 M. Après 3 minutes 1 ml d'EDTA est ajouté puis 2 ml d'hydroxylamine. La mesure photométrique est effectuée 15 minutes plus tard à 450 nm.

3.3.3.3 Dosage des anions en solution

La chromatographie ionique d'échange anionique (DIONEX 4500i, 164-166 Avenue Joseph Kessel 78960 Voisin-Le-Bretonneux) a été utilisée pour doser les ions fluorure (F⁻), chlorure (Cl⁻), phosphate (PO₄²⁻), nitrate (NO₃⁻) et sulfate (SO₄²⁻). Les conditions opératoires sont les suivantes : couple pré-colonne/colonne analytique AG9-HC/AS9-HC, éluant : carbonate de sodium 9 mmol., détection conductimétrique avec système d'autosuppression.

3.3.3.4 pH et Eh

La mesure du pH_{eau} et du pH_{KCl} du sol se fait sur la même prise (rapport sol/solution 10/25, Bonneau et Souchier, 1994). Le mode opératoire est le suivant : 10 g de sol sec sont placés dans 25 mL d'eau distillée, puis agités 1 heure et reposés 5 mn. Le pH_{eau} est alors

¹ E. Merck, Frankfurter Str. 250, D-6100 Darmstadt, Postfach 4119

mesuré (Tacussel PHN 81, Choffel Electronique, Moulin-Saint-Nabor, BP 58, 88202 Remiremont Cedex)). Après ajout de 1 g de KCl en poudre, la suspension est agitée 1 heure et reposée 5 mn. On mesure alors le pH_{KCl}

Le ΔpH , correspondant à la différence $\text{pH}_{\text{KCl}} - \text{pH}_{\text{eau}}$, permet d'obtenir une première estimation de l'importance et de la valeur relative des charges variables.

Pour les expériences en colonnes de sol avec ou sans plante, le pH et le Eh sont mesurés directement sur les solutions d'engorgement des colonnes.

3.3.3.5 Analyse des matières organiques des solutions

Le carbone organique dissous (COD) des solutions d'incubations et des solutions de sol est mesuré par l'analyseur élémentaire TCM DohrmannTM DC 190 Total Organic Carbon Analyseur.

Le dosage des phénols totaux hydrosolubles (PTH) est effectué à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma AldrichTM), selon la méthode de Box (1983). 0,4 ml de solution à doser est mélangé à 5 ml d'eau osmosée, 0,75 ml de Na_2CO_3 20% et 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. La lecture de la densité optique (DO) est effectuée à 750 nm après une heure de contact à 20°C. Les teneurs sont établies par comparaison avec une gamme étalon de protocatéchine traitée selon le même mode opératoire et sont exprimés en équivalents d'acide protocatéchique.

Les sucres totaux (ST) sont dosés comme suit : 1 ml de solution est mélangé avec 1 ml de phénol 5% (m/v) suivi de l'ajout de 5 ml d' H_2SO_4 concentré. Après agitation et refroidissement, la DO est mesurée à 490 nm. Les mesures sont effectuées par comparaison à une gamme étalon établie avec du glucose selon le même mode opératoire. Les résultats sont exprimés en équivalents glucose.

Les sucres réducteurs totaux (SRT) sont dosés sur une aliquote de solution d'incubation filtrée à 0,22 μm . Ce dosage est réalisé selon la méthode de Somogyi-Nelson (Somogyi 1952, Criquet 1999). 2 ml de la solution d'incubation reçoivent 2 ml de réactif de Somogyi. Après 15 mn de contact en bain marie à 100°C, 2 ml de réactif de Nelson et 4 ml d'eau distillée sont ajoutés. La densité optique est mesurée à 520 nm. La gamme étalon est

établie selon le même protocole avec du glucose. Les résultats sont exprimés en équivalent glucose.

3.3.4 Caractérisation de la phase solide

3.3.4.1 *Éléments minéraux totaux*

La détermination de la teneur totale des éléments des échantillons de sol a été faite après fusion alcaline. 100 mg d'échantillon finement broyé sont mélangés avec 1 g de fondant (métaborate de lithium LiBO_2 / tétraborate de lithium LiB_4O_7 80% / 20%, Spectroflux). Le tout est porté dans un four à haute fréquence à une température proche de 1000°C. La perle obtenue est dissoute dans une solution aqueuse à 1% HNO_3 . Les éléments de la solution obtenue sont ensuite dosés par ICP-AES, Jobin Yvon 2038.

3.3.4.2 *Compartmentation géochimique*

Le principe d'extractions séquentielles (Tableau 3.6) a été utilisé dans le but de déterminer la répartition et d'éventuels transferts d'éléments entre différents compartiments géochimiques des échantillons de sol. Les différentes étapes d'extractions se succèdent les unes aux autres en reprenant le culot de l'extraction précédente, en allant du compartiment le plus accessible au plus stable. Le protocole, adapté d'après Quantin *et al.* 2002, est appliqué à un échantillon de 1g de sol sec et décrit dans le tableau 3.3. Les éléments associés au compartiment des *MO* sont extraits hors séquence sur un échantillon de sol séché différent de celui utilisé pour les extractions séquentielles.

Parallèlement à ces extractions séquentielles, une extraction des éléments hydrosolubles a été réalisée sur échantillon frais (non séché). L'échantillon est mis à agiter pendant une heure dans 20 ml d'eau osmosée dégazée par bullage d'azote, puis centrifugé et filtré à 0,2 μm .

Tableau 3.6 Protocole d'extractions séquentielles réalisées sur les échantillons de sol, pour 1g de sol sec

ETAPES	FRACTION	REACTIFS	VOLUME DE REACTIF	CONDITIONS
1	Acidosolubles <i>Acido</i>	HCl 0,5 N	25 ml	20°C, 1h d'agitation rotative
2	Echangeables <i>Ech</i>	KCl 0,1M	20 ml	20°C, 2h d'agitation rotative
3	Oxydes très facilement réductibles <i>Mn-ox</i>	NH ₂ OH.HCl 0,1M	20 ml	20°C, 30 mn d'agitation rotative
4	Oxydes de Fe peu cristallisés <i>Fe-ox1</i>	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ 0,2M + H ₂ C ₂ O ₄ 0,2M	20 ml	20°C, 4h d'agitation rotative à l'obscurité
5	Oxydes de Fe cristallisés <i>Fe-ox2</i>	◦ Na ₂ -citrate (78,4g/L) + NaHCO ₃ (9,82 g/L) ◦ Na ₂ S ₂ O ₄	40 ml CB + 1g Na ₂ S ₂ O ₄	80°C, 15 mn d'agitation magnétique puis 30 mn après ajout de dithionite
Hors séquence	Matières organiques <i>MO</i>	NaOH 0,1M + Na-Pyrophosphate 1%	40 ml	20°C, 2h d'agitation rotative

3.3.4.3 Minéralogie : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a permis l'analyse des oxydes de fer et en particulier de la goethite. Basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé, elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Les spectres IR sont obtenus sur pastilles formées sous vide, constituées de 200 mg de KBr anhydre (conservé en étuve à 110°C) et d'1 mg d'échantillon minéral (conservé en dessiccateur sous vide en présence d'acide phosphorique). Les mesures sont effectuées pour des longueurs d'onde de 4000 à 399,2 cm⁻¹ avec un spectromètre BrukerTM Vector 22 (Wisseburg).

3.3.4.4 Composition minérale des plantes

En fin de culture, les parties aériennes et racinaires des plantes sont séchées à 105°C en étuve jusqu'à poids constant puis homogénéisées par broyage dans l'azote liquide. Afin de déterminer sa composition en éléments minéraux, le végétal est minéralisé. 4 ml de HNO₃ 69% et 2 ml de H₂O₂ 30% sont ajoutés à 200 mg d'échantillon sec puis le tout est porté à 170°C pendant 10 mn dans un four à micro-ondes MARS 5. La solution est dosée par ICP-AES.

3.3.5 Caractérisation de la phase gazeuse

Le CO₂ émis dans l'atmosphère des réacteurs fermés (incubations en batch) a servi d'indicateur de l'activité bactérienne. Les échantillons ne contenant pas de carbonates, le dioxyde de carbone provient de la minéralisation des matières organiques. De précédentes études ayant montré l'absence d'un tel dégagement en absence d'activité microbienne, le CO₂ émis traduit donc l'intensité de l'activité microbienne.

Des prélèvements de gaz sont effectués à l'aide de seringues stériles à travers les bouchons hermétiques des flacons. La concentration en CO₂ est déterminée par spectrométrie infrarouge (détecteur Binos 1004, Infra-Red Gaz Analyser, Rosemount (Allemagne) ; automate réalisé au laboratoire, Christian Mustin, montée par SGAE, Roussillon). Le CO₂ absorbe les radiations infrarouges à un nombre d'onde de 2325,6 cm⁻¹. Le gaz est injecté à l'aide d'une seringue dans un flux d'azote "débarassé" du CO₂ et de l'humidité de l'air pour éviter toute pollution du signal. La concentration en CO₂ mesurée est convertie en taux de minéralisation C-CO₂ ‰C_{org}.

3.3.6 Caractérisation des communautés microbiennes cultivables

Les activités microbiennes sont évaluées par différences de mesures entre traitements biotiques et abiotiques et concernent les mesures effectuées sur les phases liquides, solides et gazeuses présentées ci-dessus.

Par ailleurs, des dénombrements des communautés réductrices du fer et du manganèse et des microflore totales ont été effectués sur différents milieux.

3.3.6.1 Composition des milieux de cultures pour bactéries

5 milieux de cultures dont la composition de base est décrite dans le tableau 3.5 sont utilisés pour dénombrer, isoler et mesurer l'activité de communautés bactériennes anaérobies et aéro-anaérobies réduisant et solubilisant le fer et le manganèse d'oxydes :

- milieu Bromfield modifié à 1000 mg/L de Fe (noté BrFe)
- milieu Bromfield modifié dans lequel le fer est remplacé par 1000 mg/L de Mn, dit "Bromfield Manganèse" (BrMn)
- milieux "Rhizosphérique" (Rh)
- milieu "Rhizosphérique Fer" (RhFe)
- milieu "Rhizosphérique Manganèse" (RhMn)

Les 4 derniers milieux ont été mis au point dans le cadre d'un stage de DEA (E. Bourguignon, 2003) à partir d'une étude bibliographique tenant compte de la composition d'exudats racinaires du maïs. La composition des milieux "rhizosphériques" est établie pour leur teneur en sucres, en acides carboxyliques et en amino-acides d'après des résultats d'analyses d'exsudats racinaires du maïs de Gransee et Wittenmayer (2000), Rengel (1997), Laheurte (1985) et Rovira (1969). Ces milieux sont utilisés soit liquide pour les expériences en microplaques, soit solide pour les incubations et isolements en boîtes de Pétri et ajustés à pH 6,2.

Les milieux rhizosphériques RhFe et RhMn reçoivent $1,754 \text{ g.L}^{-1}$ d'oxyde de fer ou $1,562 \text{ g.L}^{-1}$ d'oxyde de manganèse en suspension (soit 1 g.L^{-1} de Fe ou Mn).

Les milieux gélosés sont obtenus par ajout de 14 g de gélose par litre de milieu.

Les milieux de culture BrFe et RhFe contiennent une source de fer de type goethite amorphe. Celle-ci confère au milieu une couleur rouge vif. Les colonies ferri-réductrices se développant sur ces milieux gélosés forment autour d'elles un halo translucide de dissolution facilement repérable à l'œil nu (cf. photo 3.2). Cette auréole correspond à une zone de dissolution importante du fer par réduction de Fe^{3+} rouge insoluble en Fe^{2+} gris ou peu coloré, et soluble. Le phénomène est semblable dans le cas du manganèse, où la mangani-réduction se manifeste par une décoloration du milieu initialement gris sombre.

Tableau 3.5 Composition des milieux de culture utilisés pour incuber et isoler les bactéries

Milieu Bromfield "Fer"		Milieu Bromfield "Manganèse"	
Eléments	Concentration (g.L ⁻¹)	Eléments	Concentration (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,500	KH ₂ PO ₄	0,500
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,500	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,500
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,000	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,000
CaCO ₃	0,067	CaCO ₃	0,067
FeOOH ⁽¹⁾	1,591 (=1 g Fe.L ⁻¹)	MnO ₂ ⁽²⁾	1,562 (=1 g Mn.L ⁻¹)
Extraits de levure	0,150	Extraits de levure	0,150
D-glucose	10,000	D-glucose	10,000

Milieu rhizosphérique	
Eléments	Concentration (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,5000
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5000
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,000
Extrait de levure	0,150
Casamino acids	0,350
Glucose (-D)	0,540
Xylose (-D)	0,240
Galactose (-D)	0,120
Fructose (-D)	0,180
Saccharose (-D)	0,120
Acide tartrique	0,100
Acide citrique	0,050
Acide fumarique	0,050
Acide malique	0,050
Acide succinique	0,050

⁽¹⁾ Fe₂O₃.2H₂O Prolabo, N°lot 508F⁽²⁾ MnO₂, Aldrich, ref. 21,764-6

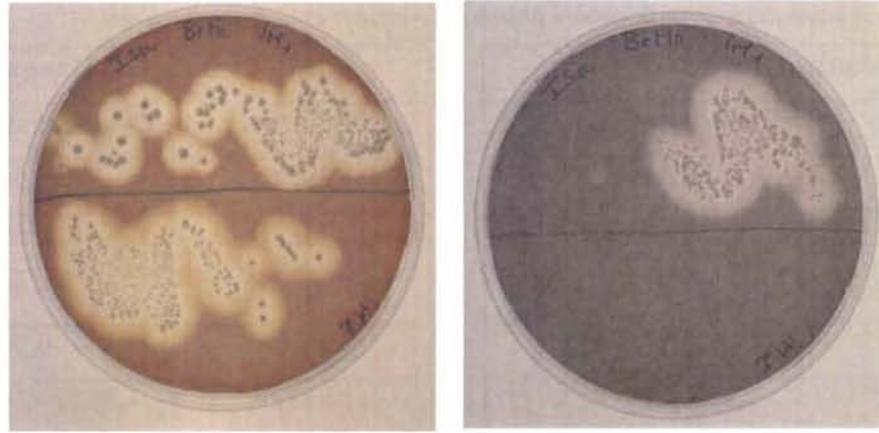


Photo 3.2 Colonies ferri- et mangani-réductrices sur milieu Bromfield-fer (à gauche) et Bromfield-manganèse (à droite)

Le spectre de diffraction RX de l'oxyde de Mn utilisé dans ces milieux de culture (Figure 3.3) décrit un oxyde de manganèse MnO_2 de type psilomélanc. Le spectre de diffraction RX de l'oxyde de Fe (Figure 3.4) décrit une goethite faiblement cristallisée (Cornell & Schwertmann 1996).

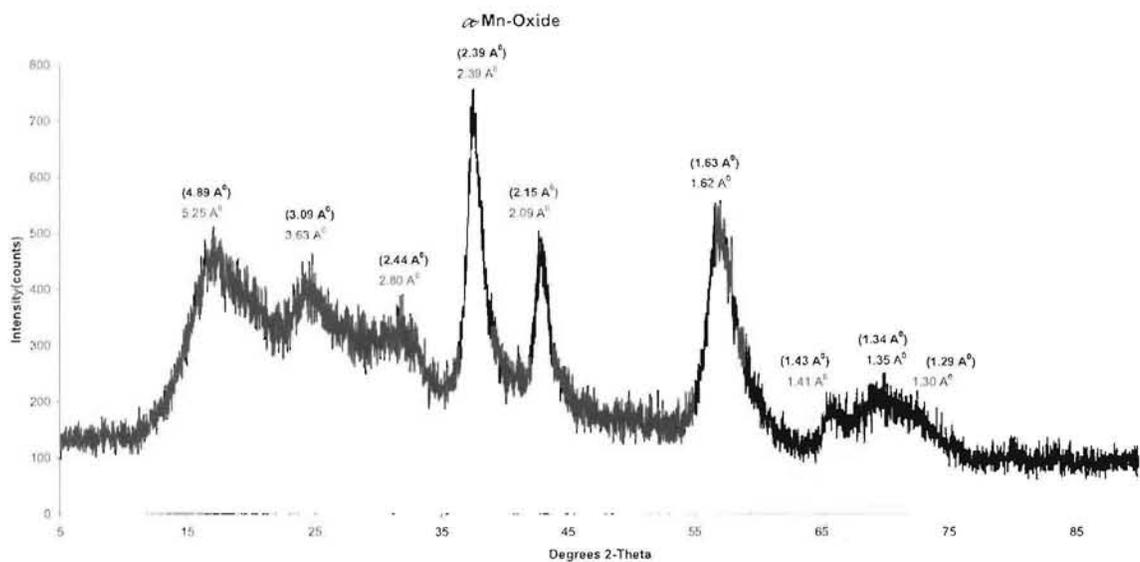


Figure 3.3 Diffractogramme RX de l'oxyde de Mn (MnO_2 , Aldrich, ref. 21,764-6) utilisé dans les milieux de culture destinés à l'incubation et l'isolement des bactéries (D. Fortin, communication personnelle).

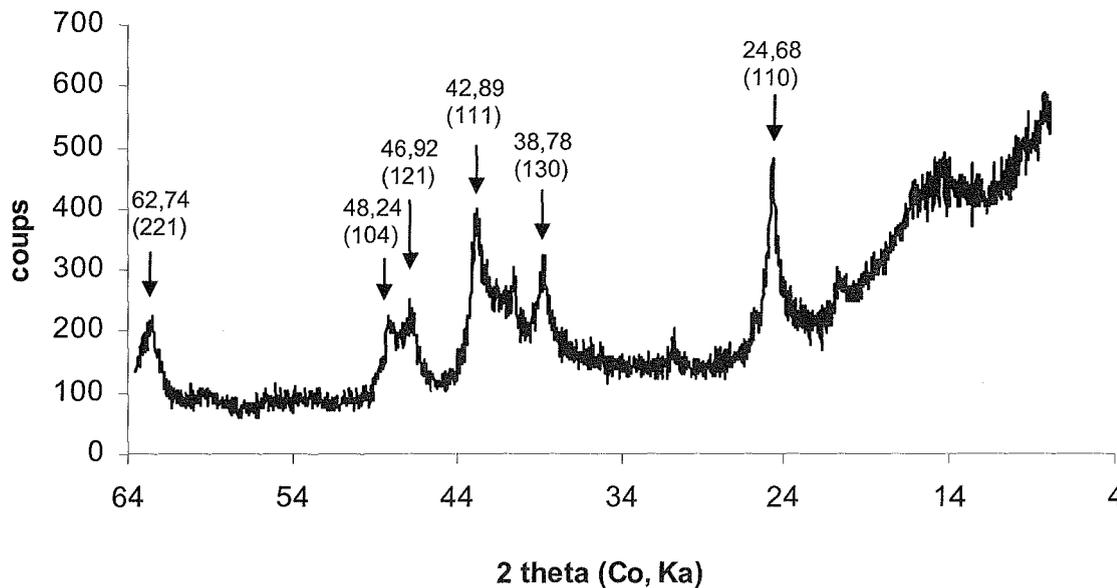


Figure 3.4 Diffractogramme RX de l'oxyde de Fe (Prolabo ref 508F) utilisé dans les milieux de culture destinés à l'incubation et l'isolement des bactéries (S. Lawniczak, communication personnelle).

3.3.6.2 Préparation des inoculum

Les boîtesensemencées par repiquage des associations bactériennes isolées IM1 et IM2 sont maintenues dans des jarres fermées hermétiquement, dans lesquelles l'anaérobiose est obtenue par dégazage à l'aide de l'Anoxomat (MART[®] Anoxomat, TTO France sarl, 37 rue d'Amsterdam, 75008, Paris) et introduction d'une atmosphère d'azote (80 %), d'hydrogène (10 %) et de dioxyde de carbone (10 %). Dans les jarres, la présence d'un catalyseur au palladium permet à l'oxygène résiduel de se combiner avec l'hydrogène et ainsi former de l'eau, garantissant une bonne qualité d'anaérobiose. Les jarres sont incubées à 28°C dans l'obscurité.

Pour la préparation d'un inoculum bactérien destiné à l'ensemencement des dispositifs en colonnes (avec ou sans plante), 2 à 3 ml d'eau physiologique (NaCl 8g/L) sont ajoutés sur la surface de la boîte de Pétri. La surface de la gélose est raclée de façon à détacher les colonies. La suspension bactérienne ainsi obtenue est centrifugée à 10 000t/mn pendant 15 mn, afin d'éliminer les produits organiques avec le surnageant. Le culot bactérien est remis en suspension dans de l'eau physiologique (NaCl 8 g/L) pour être utilisé comme inoculum.

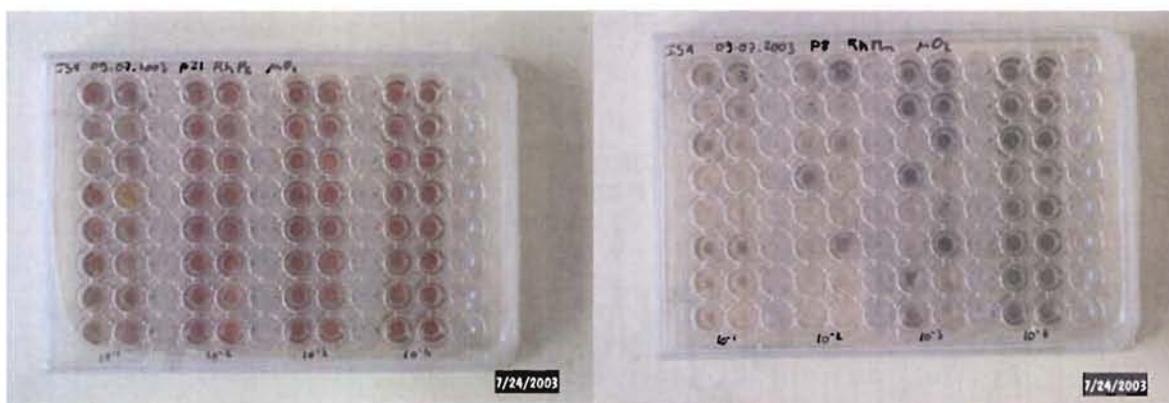


Photo 3.3 Communautés ferri- et manganiréductrices sur milieu Rhizosphérique-fer (à gauche) et Rhizosphérique-manganèse (à droite) en microplaque

3.3.6.3 Dénombrements bactériens

Les méthodes adoptées sont celles des suspensions-dilutions en milieu liquide (microplaque ou plaque de microtitration, Photographie 3.3) pour dénombrer les communautés par l'évaluation du nombre le plus probable (NPP) de bactéries cultivables. Les suspensions de sol (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...) sont transférées dans des microplaques. Chaque microplaque (96 puits) contient un milieu de culture, et recevra 4 dilutions (10^{-1} à 10^{-4}) à raison d'une dilution pour 2 séries de puits et 4 rangées de huit puits contenant de la résazurine (indicateur d'anaérobie). Les puits contiennent 200 μ L de milieu et 50 μ L de suspension de sol. Les microplaques sont placées dans des jarres anaérobies et incubées à 28°C pendant 14 jours. Des microplaques témoins stériles sont réalisées de la même manière. Après 14 jours, un lecteur de microplaques est utilisé pour compter le nombre de puits positifs. Les résultats obtenus sont traités par un programme (Most Probable Number Calculator Version 4.04 – United States EPA) calculant le nombre le plus probable (NPP) de bactéries réductrices du fer et du manganèse.

3.3.7 Composition des solutions nutritives utilisées pour la culture des plantes

La composition de la solution nutritive a été établie d'après L'Huillier (1994). Pour les traitements sans apport de fer par le sol (cultures sur sable) 8,1 mg de Fe-EDTA sont ajoutés par litre de solution nutritive.

Les solutions nutritives sont apportées en 3 fois : à la mise en pot des plantules, au dixième et au vingtième jour de culture, en quantité calculée de manière à respecter les concentrations totales en éléments nutritifs figurant au tableau 4. **Le fer et le manganèse solubles sous forme de nutriments ne sont apportés que dans les pots de culture à 100% de sable et 0% de sol.** Les substrats de culture composés d'un mélange de terre et de sable ne reçoivent ni fer ni manganèse dans le milieu de culture de manière à exercer un "stress" pour la plante et/ou les microorganismes de la rhizosphère et du sol non rhizosphérique, et favoriser le développement de mécanismes de solubilisation de ces éléments.

L'arrosage quotidien des plantes s'effectue manuellement de manière à conserver une humidité à 80% de la capacité au champ HE (pesée quotidienne).

Tableau 3.4 composition de la solution nutritive utilisée pour la culture des plantes

	Eléments	mg/kg de sol
Macro-éléments	N (NO ₃ ⁻)	88,75
	N (NH ₄ ⁺)	105
	P	32,25
	K	94,75
	Ca	51
	Mg	31
	S	40,75
Micro-éléments	B	0,975
	Zn	1,525
	Cu	2,25
	Mo	0,25
	Mn (uniquement dans traitements non carencés)	0,975

Les éléments nutritifs sont apportés par les solutions S sous les formes suivantes :

Macro-éléments

S1	NH_4NO_3
S2 ²	KH_2PO_4
S3	KNO_3
S4	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
S5	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
S6	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Micro-éléments

S7	H_3BO_3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Pour les traitements non carencés

S8	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	Fe-EDTA

3.3.8 Conditions de culture des plantes

Les plantes sont cultivées dans des phytotrons thermorégulés à 24°C le jour (16 heures) et 20°C la nuit (8 heures), avec une atmosphère à 70% d'humidité. L'intensité lumineuse moyenne mesurée est de $419 \pm 27 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$. Celle-ci varie en fonction de la position des pots ou colonnes de culture par rapport aux lampes et en fonction de la hauteur de la plante.

Le substrat de culture des plantes est composé soit de sable (voir chapitre 3.2.2), soit d'un mélange 10% sol / 90% sable pour minimiser les effets toxiques du nickel contenu dans

² La quantité de KH_2PO_4 est doublée par rapport à L'Huillier 1994 car ce sol retient fortement les phosphates, ce qui provoque des carences.

Le substrat de culture des plantes est composé soit de sable (voir chapitre 3.2.2), soit d'un mélange 10% sol / 90% sable pour minimiser les effets toxiques du nickel contenu dans le sol. Le mélange sol-sable a été réalisé dans des flacons (préalablement stérilisés si le mélange est stérile) par agitation par retournement pendant 12 heures à $26 \text{ tours} \cdot \text{mn}^{-1}$.

3.4 Dispositifs expérimentaux

Les dispositifs expérimentaux sont d'abord destinés à étudier les paramètres biotiques et abiotiques de la réduction bactérienne du fer et du manganèse dans le sol non rhizosphérique et dans le sol rhizosphérique. Ils font appel à des systèmes en cuve (batch) ou à des systèmes permettant la culture de plantes (pots ou colonnes).

3.4.1 Choix d'un paramètre de contrôle de l'humidité du sol en fonction de la croissance de la plante

Dans une première série d'expériences de cultures en pots, les quantités d'eau à apporter régulièrement pour maintenir l'humidité du sol ont été déterminées par pesées des pots. Cette méthode convient pour les plantes de petite taille et à croissance moins importante (e.g. ray grass, trèfle), mais est insuffisante avec des plantes à forte croissance et production de biomasse. Leur masse représente en effet une forte quantité d'eau dont il faut tenir compte pour maintenir le sol ou le support de culture à l'humidité voulue (80% de la capacité au champ).

Des cultures ont donc été effectuées en pot (voir ci-dessous) en mesurant différents paramètres du végétal, de manière à établir un abaque de croissance : taille de la plante, nombre de feuilles visibles, circonférence au premier nœud, hauteur de chaque nœud, poids de la plante fraîche et sèche. Le paramètre le plus pertinent et retenu est la hauteur de la plante qui permet une bonne évaluation de l'eau à ajouter pour maintenir l'humidité choisie. Lors de la pesée des pots avant arrosage, le poids total du dispositif a ainsi pu être corrigé en fonction de la taille et donc de la masse de la plante.

3.4.2 Cultures de plantes en pots

Les cultures de maïs du chapitre 4 ont été réalisées dans des pots en plastique d'une contenance de 1,1 kg de substrat de culture, et dont le fond a été étanchéifié par un sac plastique (Figure 3.5). Après germination et culture pendant 5 jours sur milieu Nutrient Broth (chapitre 3.3.1), la plantule a été placée dans le pot et recouverte d'une légère couche de substrat de culture. L'arrosage a été effectué manuellement et quotidiennement. La quantité d'eau à apporter a été déterminée par différence de poids des pots d'un jour à l'autre pour garder l'humidité voulue (80% HE) et en tenant compte de la croissance du maïs (chapitre 3.4.1). Des pots non plantés et placés dans les mêmes conditions ont servi de témoins.



Figure 3.5 Dispositif de culture de plantes en pot

3.4.3 Cultures en colonnes axéniques

Un dispositif avec colonne en verre a été mis en place afin de contrôler les conditions de stérilité des cultures (Chapitre 6). Le matériel a été entièrement stérilisé deux fois à 24h d'intervalle puis assemblé sous hotte stérile à flux laminaire, pour obtenir le dispositif schématisé dans la figure 3.6.

Des colonnes en verre de 5,2 cm de diamètre et 20 cm de hauteur ont été bouchées hermétiquement en bas par des bouchons de caoutchouc et du ruban Téflon[®]. 400g d'un mélange sol OUE 4.2 (10%)-sable (90%) ont été introduits ainsi que la plantule après germination et culture pendant 5 jours sur milieu Nutrient Broth (chapitre 3.3.1). Un film synthétique Biofolies[®] a été utilisé pour garder la plantule dans des conditions contrôlées. Il est imperméable aux particules et protège donc de la contamination par les microorganismes, mais perméable aux gaz (Figure 3.6). Il a permis de maintenir des conditions stériles à

l'intérieur de son enceinte tout en laissant respirer la plante. Il a été fixé à la colonne par des élastiques en caoutchouc et du scotch résistant à l'humidité. L'alimentation en eau et solution nutritive a été effectuée par un tuyau muni d'un filtre à 0,2 μm disposé dans le sac Biofolies[®], de manière à garder une humidité du substrat à 80% HE. La colonne de verre est ensuite recouverte de papier aluminium pour maintenir les racines à l'obscurité.



Figure 3.6 Dispositif de culture de plantes en colonnes axéniques

3.4.4 Cultures en colonnes avec variation de la teneur en eau du sol

Ce dispositif a été mis en place dans le but de pouvoir faire varier le niveau de saturation en eau d'un substrat planté en fonction du temps (Chapitre 7). 300g de mélange du sol OUE 4.1 (10% en poids) : sable (90% en poids) sont introduits dans une colonne de verre (cf. figure 3.7 et photographie 3.4). Le bas de la colonne est fermé par un bouchon de caoutchouc percé d'un orifice permettant l'entrée ou la sortie de l'eau.

L'humectation du substrat a été réalisée par imbibition par le dessous de la colonne pour remplir toute la porosité du substrat et limiter ainsi la présence de poches d'air éventuelles.

Les eaux de ressuyage ont été récoltées grâce à un système de double aiguille, permettant la collecte des solutions dans des récipients clos hermétiquement et préalablement purgés à l'azote. Le ressuyage a été assisté par pompe et s'est poursuivi jusqu'à l'obtention de l'humidité voulue (estimée par la mesure du poids de la colonne ou par hauteur du niveau d'eau dans le flacon d'alimentation et la colonne).

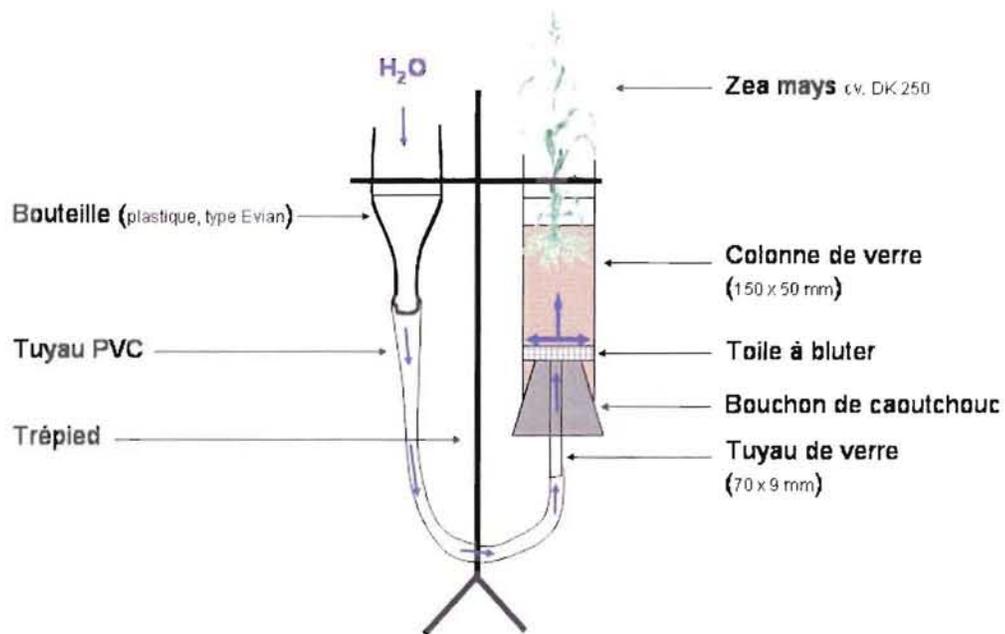
La colonne a été alimentée en eau par une bouteille reliée à la colonne par un tuyau Tygon®.

Pour limiter l'évacuation de particules depuis la colonne vers le tuyau, un niveau de toile à bluter de 1 μ m de maille a été placé au fond de la colonne.



Photo 3.4 Dispositif de culture de plante en colonne avec variation du niveau de saturation en eau

IMBIBITION



RESSUYAGE

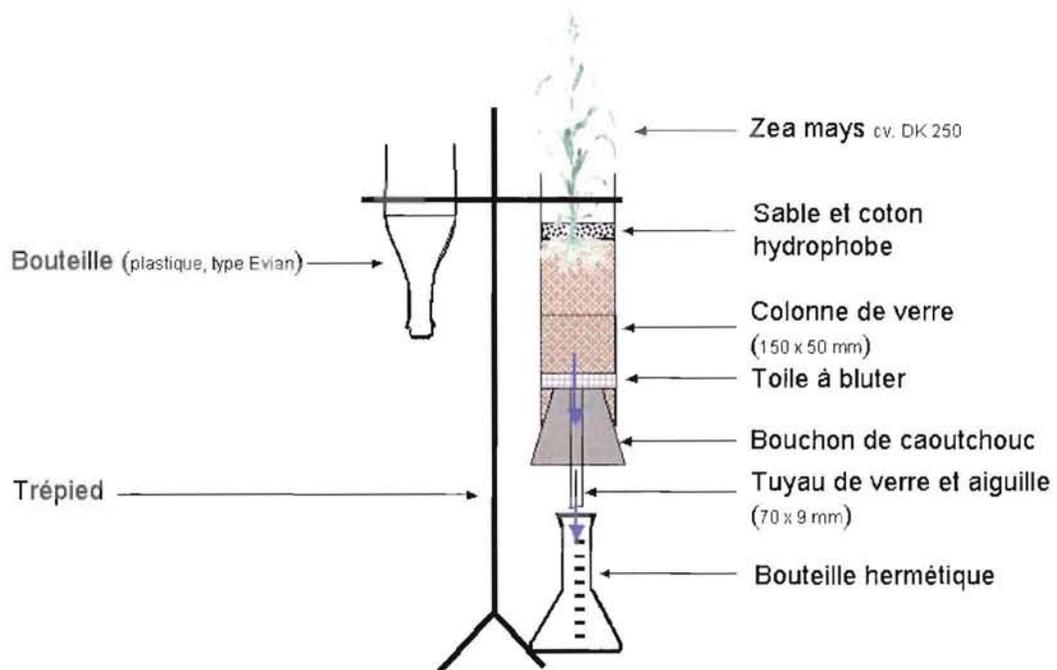


Figure 3.7 Dispositif d'imbibition/ressuyage des colonnes avec variation du niveau de saturation en eau

3.4.5 Incubations en batch : systèmes non plantés

Des expériences destinées à mesurer les activités ferri-réductrices et mangani-réductrices de communautés bactériennes autochtones et l'influence de paramètres nutritionnels et physiques (Chapitre 8) ont été réalisées dans des dispositifs simples en batch, constitués par des flacons sérum clos de 250 ml de volume total (Figure 3.8).

Les expériences ont été effectuées sur des échantillons de sol non mélangés à du sable, portés à différentes teneurs en eau.

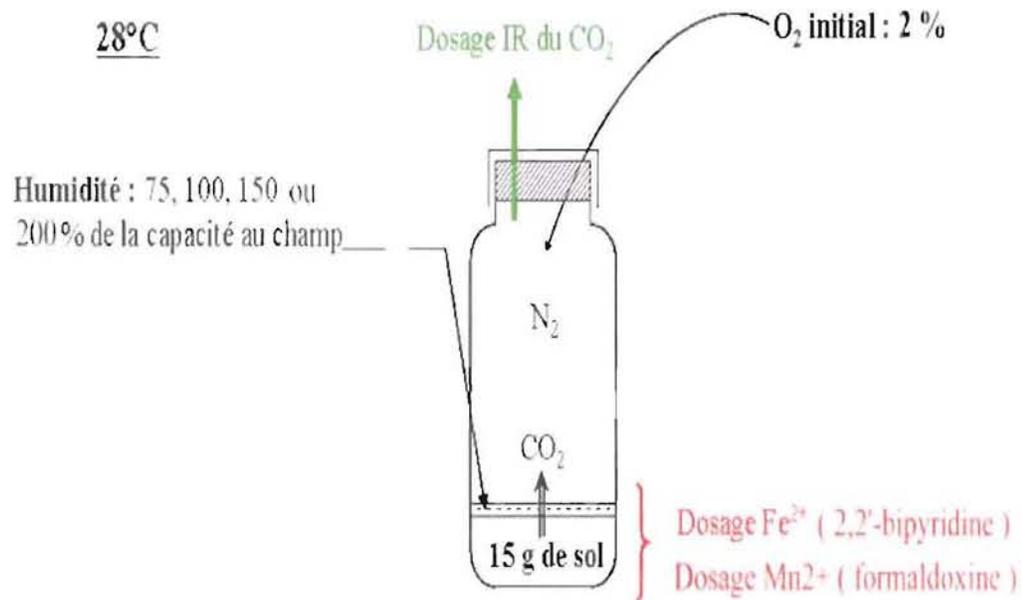


Figure 3.8 Dispositif d'incubations en batch

15 g de sol sont introduits dans des flacons de 250 ml et humidifiés à 75, 100, 150 ou 200% de l'humidité équivalente (HE) avec de l'eau dégazée ou une solution d'exsudats racinaires modèle. Le flacon est clos hermétiquement par un bouchon en caoutchouc maintenu par une virole en aluminium. Les incubations sont réalisées en microaérophilie (2%O₂, 98% N₂), à l'obscurité, à 28°C et en position statique. La microaérophilie est obtenue grâce à l'Anoxomat MART[®] qui réalise plusieurs cycles de dégazage et d'injection d'azote, pour au final obtenir un taux en oxygène de l'ordre de 2,3%.

Les dispositifs sont incubés à 28°C en présence (conditions biotiques) ou absence de micro-organismes (conditions abiotiques), pour distinguer les processus d'origine biologique et physico-chimique.

3.5 Traitement des données – analyse statistique

Les résultats présentés sont la moyenne d'au moins trois répétitions réalisées pour les différents traitements au cours des différentes expériences. Les erreurs et barres d'erreurs figurées correspondent aux valeurs minimales et maximales observées, et en aucun cas à des écarts-types.

L'analyse statistique des données a été effectuée par le test *t* de Student (risque de 5%) avec le logiciel SigmaPlot 9.0 (Systat Software 2004).

Les résultats ont été exprimés selon quatre indices définis de la manière suivante :

- **Indice de disponibilité I_d** : quantité d'éléments liée aux compartiments "hydrosolubles" (Hydro), "échangeables" (Ech) et "plante" (P) en mg d'élément par pot et par plante.
- **Indice de redistribution I_r** : il indique l'évolution de la quantité d'un élément dans un compartiment géochimique, en g d'élément pour 100g d'élément total.
- **Facteur de transfert** : il correspond à la concentration de l'élément prélevé par la plante par rapport à sa concentration dans le sol (Deneux *et al.*, 2003) :

$$F_t = \frac{C_{\text{plante}}}{C_{\text{sol}}}$$

- **Indice de minéralisation du carbone organique $C\text{-CO}_2 / C_{\text{tot}}$** : quantité de carbone organique minéralisée par rapport à la quantité initiale de carbone organique présente.
- **Vitesse de minéralisation $C\text{-CO}_2 / C_{\text{tot}} / \text{jour}$** : quantité de carbone organique minéralisée par unité de temps (jour) par rapport à la quantité initiale de carbone organique présente.

RESULTATS

Les résultats sont présentés en trois parties correspondant à l'étude des trois paramètres étudiés :

- Partie I. Rôle de la rhizosphère
- Partie II. Rôle des microorganismes
- Partie III. Rôle de l'état hydrique du sol

PARTIE I

Rôle de la rhizosphère

4

INFLUENCE DE LA RHIZOSPHERE DU MAÏS SUR LA MOBILISATION DU FER, DU MANGANESE ET D'ÉLÉMENTS ASSOCIÉS AUX OXYHYDROXYDES (Cr, Co, Ni)

4.1 Introduction

Les travaux de L'Huillier (1994) concernant la mobilité du nickel dans les sols de Nouvelle-Calédonie et ses effets sur le développement et la physiologie du maïs ont mis en évidence la biodisponibilité du nickel dans ces sols par son transfert aux plantes et un effet toxique. En étudiant l'origine de ce nickel, Becquer *et al.* (1997) avaient évoqués la possibilité d'une réduction des oxyhydroxydes de fer suite à des phases d'engorgement temporaires de ces sols. Bertrand et Hinsinger (2000) ont montré la capacité de plantes à stratégie I (dicotylédones et monocotylédones non herbacées comme le pin, le colza) à prélever du fer d'oxyhydroxydes (goethite) en quantités non négligeables. Ces plantes agissent par excrétion de protons et par une augmentation de leur activité réductrice en situation de carence en fer. En revanche dans la même étude, le maïs (plante de stratégie II produisant des phytosidérophores en situation de carence en fer) a montré la plus faible capacité à prélever du fer de la goethite. L'ordre décroissant suivant à prélever du fer de la goethite a été observé : colza > lupin > pois > maïs. Par ailleurs, les sols de Nouvelle-Calédonie renferment des communautés bactériennes ferri-réductrices non rhizosphériques capables d'intervenir dans la réduction-dissolution et redistribution de Fe, Mn, Ni, Cr et Co (Quantin *et al.* 2002).

Suite à ces diverses constatations, l'expérience dont les résultats sont présentés dans ce chapitre, avait pour but de déterminer la capacité de la rhizosphère du maïs à altérer les oxyhydroxydes de fer du sol OUE 4.3 dilué dix fois dans du sable (voir chapitre 3.3.8) et à dissoudre le fer, le manganèse et les éléments traces qui leurs sont associés (Ni, Cr, Co). Les expériences ont été faites dans des dispositifs simples de culture en pot décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes (Chapitre 3.4.2) et en ayant des pots plantés (5 réplcats) et

des témoins avec "sol" non plantés (3 réplicats). Par ailleurs pour un des traitements le maïs était cultivé sur sable en milieu non carencé en Fe et Mn (ajout de Fe et Mn dans la solution nutritive) (5 réplicats). Les cations métalliques Fe, Mn, Ni, Cr et Co ont été dosés, après six semaines de culture, dans la plante, la solution du sol (ou support de culture) et chacun des compartiments géochimiques extraits en séquences.

4.2 Résultats

4.2.1 Croissance et Minéralo-masse du maïs

La masse moyenne d'une plante après 6 semaines de culture en pots sur le mélange sol/sable est de $6,0 \pm 1,0$ g de matière sèche, dont $4,6 \pm 0,3$ g de matière sèche pour les parties aériennes et $1,4 \pm 0,8$ g de matière sèche pour les racines. Pour les cultures sur sable seul, avec une solution nutritive non carencée en Fe et Mn, la biomasse totale est de $14,9 \pm 2,0$ g par plante sèche, dont $9,8 \pm 2,2$ g pour les parties aériennes et $5,1 \pm 1,6$ g pour les racines. La présence de sol dans le substrat de culture aurait donc une influence négative sur la croissance du maïs. La carence en Fe et Mn du milieu ne semble pas devoir intervenir au vu des teneurs des végétaux. La biomasse des parties aériennes et des racines a été largement diminuée (moins 53% en poids pour les parties aériennes, moins 72% en poids pour les racines).

Les quantités d'éléments prélevées par les plantes cultivées sur le substrat contenant uniquement du sable, exprimées par la teneur dans les parties aériennes et par la minéralo-masse (Tableau 4.1), indiquent que la plante a prélevé 51 μg de Fe et 56 μg de Mn par gramme de matière sèche. Ces éléments ont été fournis par la solution nutritive sous forme soluble. Des traces de Ni (2 μg Ni / g de matière sèche) et de Cr (1 μg Cr / g matière sèche) ont également été détectées. Ces éléments proviennent du sable utilisé pour la culture des plantes qui contient 0,6 μg de nickel et 1,0 μg de Cr par gramme de sable.

Les quantités d'éléments prélevées par la plante sur le substrat contenant du sol, exprimées par la teneur dans les parties aériennes et par la minéralo-masse (Tableau 4.1), indiquent que l'ensemble des éléments analysés, sauf le Cr, sont absorbés en quantités beaucoup plus importantes. Une véritable mobilisation, nettement plus significative, de Fe, Mn, Ni et Co présents dans le sol et transférés aux parties aériennes du maïs. Le nickel est très significativement absorbé par la plante, au-delà de la concentration toxique fixée à

12µg Ni/g plante sèche par L'Huillier (1994). En effet elle atteint 28 µg Ni /g de plante sèche. Le chrome est très peu absorbé (1 µg de Cr par gramme de matière sèche). Les minéralo-masses du fer sont les mêmes pour les parties aériennes du maïs cultivé sur mélange sol/sable et sur sable, mais les teneurs sont beaucoup plus élevées dans les cultures sur le mélange sol/sable. Le maïs cultivé sur le mélange sable-sol a aussi absorbé des quantités beaucoup plus importantes de Mn et Co.

Tableau 4.1 Teneur en éléments et minéralo-masse du maïs après 6 semaines de culture sur substrat sans sol (0% sol) ou avec sol (10% sol). Les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer éléments par éléments, et séparément pour la minéralo-masse et les concentrations.

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
	µg / g matière sèche (parties aériennes)				
<i>0% sol</i>	51 ± 13 (a)	56 ± 4 (a)	2 ± 2 (a)	1 ± 1 (a)	0 ± 0 (a)
<i>10% sol</i>	94 ± 23 (b)	364 ± 49 (b)	28 ± 3 (b)	1 ± 0 (a)	18 ± 2 (b)
	µg / plante				
<i>0% sol</i>	503 ± 13 (a)	549 ± 40 (a)	17 ± 16 (a)	10 ± 6 (a)	0 ± 0 (a)
<i>10% sol</i>	503 ± 122 (a)	1948 ± 262 (b)	148 ± 16 (b)	8 ± 2 (a)	94 ± 11 (b)

4.2.2 Réduction et solubilisation du fer

Le fer solubilisé et réduit a été dosé dans trois compartiments du "sol" contenu dans les pots : la rhizosphère (sur l'ensemble du sol rhizosphérique du pot), l'horizon supérieur non rhizosphérique (moitié supérieure du pot) et l'horizon inférieur non rhizosphérique (moitié inférieure du pot). Ce fractionnement en horizons ne correspond en aucun cas à une stratification observée au sein du sol in situ, mais à une distinction conventionnelle de deux horizons dans les pots après incubation sans plante ou dans les pots cultivés.

Culture sur substrat composé à 100% de sable

Le fer des pots contenant un substrat composé à 100% de sable a été apporté par une solution de Fe-EDTA ; il est donc présent dans ces traitements sous forme soluble, contrairement aux pots contenant le mélange sol:sable / 10 : 90 où il est présent sous forme d'oxyhydroxydes insolubles. La Figure 4.1 indique que, sur support de culture 100% sable, ce fer soluble ne s'est pas réparti de manière uniforme dans le pot mais qu'il se concentre

principalement dans le sol rhizosphérique. Le flux d'absorption d'eau par les racines pourrait contribuer à transporter le fer hydrosoluble vers la rhizosphère.

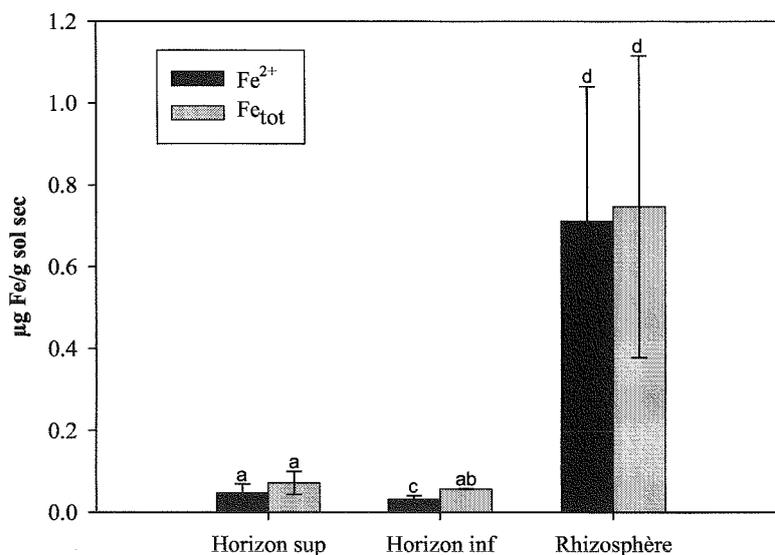


Figure 4.1 Quantité de fer solubilisé dans les sols non rhizosphériques et dans le sol rhizosphérique des pots plantés avec *Zea mays* sur un substrat 100% sable

Cultures sur substrat composé à 10% de sol et 90% de sable

Les horizons inférieurs et supérieurs des sols non plantés en maïs montrent une solubilisation-réduction du fer différente. La solubilisation du fer sous forme réduite Fe²⁺ et les quantités de fer total solubles sont significativement plus importantes dans les horizons supérieurs que dans les horizons inférieurs des pots de sol cultivés par le maïs (Figures 4.2 et 4.3, respectivement 0,05 µg Fe²⁺ / g sol sec dans l'horizon supérieur contre 0,02 dans l'horizon inférieur des pots plantés, avec un risque α de 5%). Il en est de même dans les sols non plantés mais avec des teneurs beaucoup plus faibles (respectivement 0,04 et 0,015 µg Fe²⁺ / g sol sec).

Dans les horizons supérieurs, le fer total solubilisé est significativement plus abondant que les quantités de fer solubilisées sous forme Fe²⁺ (0.065 µg Fe_{tot}/g sol sec contre 0,040 µg Fe²⁺/ g sol sec dans les sols non plantés, avec un risque α de 5%, Figure 4.3). Le fer solubilisé est donc présent sous forme ferreuse Fe²⁺, et aussi sans doute sous forme de complexes organo-métalliques ferreux ou ferriques.

Dans les horizons inférieurs des pots, le fer solubilisé sous forme Fe²⁺ n'est pas significativement différent du fer total en solution (0 à 0,03 µg Fe / g sol sec) même s'il est sensiblement moins abondant.

Ces résultats sont à mettre en relation avec la biodégradation des MO (Paskiewicz *et al.*, en préparation, Annexe 1). Dans l'horizon supérieur les activités minéralisatrices des MO par les microorganismes sont sans doute favorisées par l'accessibilité meilleure de l'oxygène qui doit aussi s'y trouver en plus grande quantité que dans l'horizon inférieur qui par ailleurs peut présenter une plus forte teneur en eau. L'oxydation des MO favorise la consommation de l'O₂ et la mise en place de conditions favorables à la réduction bactérienne du fer, au moins au sein de microsites (Paskiewicz *et al.*, en préparation, Annexe 1). Par ailleurs la biodégradation des MO dans cet horizon peut libérer des substances complexantes.

Dans les pots de sol non plantés en maïs, la quantité de fer solubilisé, tant sous forme Fe²⁺ que sous forme de fer total dont la spéciation n'est pas définie, est moins importante que dans le sol planté non rhizosphérique. Un effet de la plante est observé qui entraînerait soit des conditions nutritionnelles et énergétiques ou de conditions physiques plus favorables à l'activité microbienne.

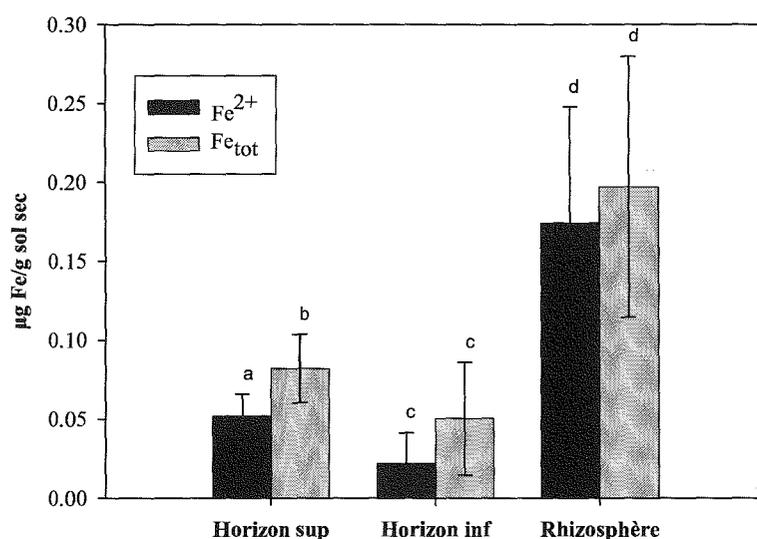


Figure 4.2 Quantité de fer solubilisé dans les sols non rhizosphériques et dans le sol rhizosphérique des pots plantés avec *Zea mays* sur un substrat 10% sol/90% sable

Dans la rhizosphère du maïs, la solubilisation du fer (Fe²⁺ et Fe_{tot}) est significativement plus importante que dans les autres parties du support de culture (0,20 $\mu\text{g Fe}_{\text{tot}} / \text{g sol sec}$, Figure 4.2). La presque totalité du fer est solubilisée sous forme Fe²⁺. La rhizosphère du maïs a donc, au moins dans les conditions expérimentales adoptées, une influence stimulante sur la réduction du fer. L'apport d'exsudats et débris racinaires

favoriserait l'activité microbienne, la consommation d'oxygène et la mise en place de conditions favorables à la dissolution et la réduction qui pourrait impliquer des bactéries ferri-réductrices. Le flux d'absorption d'eau pourrait aussi participer au flux de fer en solution vers les racines et la zone racinaire.

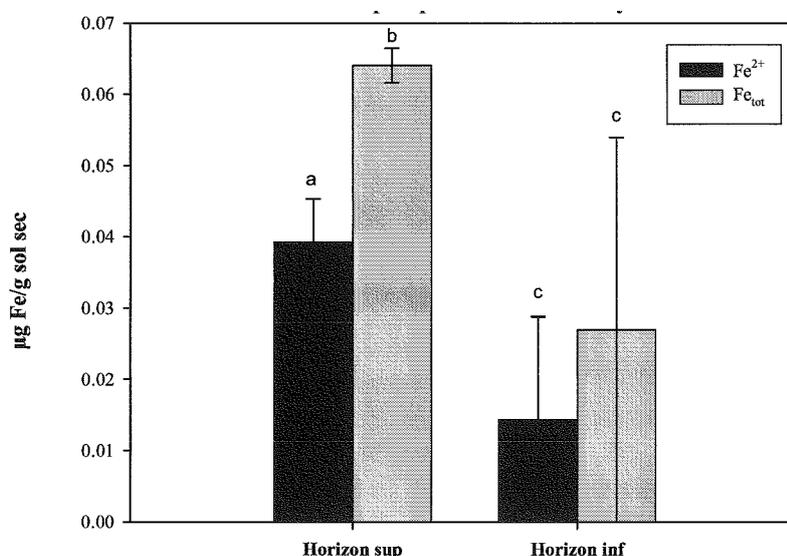


Figure 4.3 Quantité de fer solubilisé dans les sols des pots non plantés sur un substrat 10% sol/90% sable

4.2.3 Distribution des éléments dans les différents compartiments géochimiques

Les résultats des extractions séquentielles distinguant les formes échangeables (Ech), les formes associées aux oxydes très facilement réductibles comme les oxydes de Mn (Mn-ox), et les oxyhydroxydes de fer plus ou moins cristallisés (respectivement *Fe-ox1* et *Fe-ox2*) ou par extraction séparée des matières organiques (MO) montrent des redistributions des éléments. Ces différences de comportement sont fonction des traitements (sols plantés ou non plantés) et donc des microsites concernés (rhizosphère et sol non rhizosphérique). Elles ont été réalisées sur les substrats composés à 10% de sol et 90% de sable avant (témoin) et après incubation du mélange sol-sable non planté et dans les traitements avec culture de maïs (traitement dit "planté").

Remarque : le compartiment des éléments hydrosolubles, désigné par "Hydro" et dont les caractéristiques ont été présentés ci-dessus, est également distingué.

Le fer

La répartition du fer dans les différents compartiments géochimiques est modifiée sous l'influence des incubations de sol en pots non plantés, c'est-à-dire sous l'influence des microorganismes dégradant les MO, et sous l'influence des cultures de maïs, c'est-à-dire par un effet rhizosphérique. Globalement ces deux types d'effet entraînent une augmentation de la proportion de fer par rapport au fer total dans les compartiments dit *Hydro*, *Ech*, *Mn-ox* et *Fe-ox1*. En revanche une diminution est notée dans le compartiment des matières organiques (*MO*) et dans celui des oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*, Figure 4.4).

L'effet rhizosphérique est dominant, c'est-à-dire qu'il entraîne une augmentation plus importante de la quantité de fer dans les compartiments *Hydro* et *Ech*. Pour le compartiment *Fe-ox1* l'augmentation notée est plus marquée pour le traitement avec microorganismes seuls qu'avec racines et microorganismes associés. Pour le compartiment *Fe-ox2* la diminution est plus marquée sous l'effet des seuls microorganismes que sous l'effet rhizosphérique. Une forte "amorphisation" des oxydes est à noter sous l'effet des facteurs biotiques (augmentation de la quantité de fer associée au compartiment *Fe-ox1*).

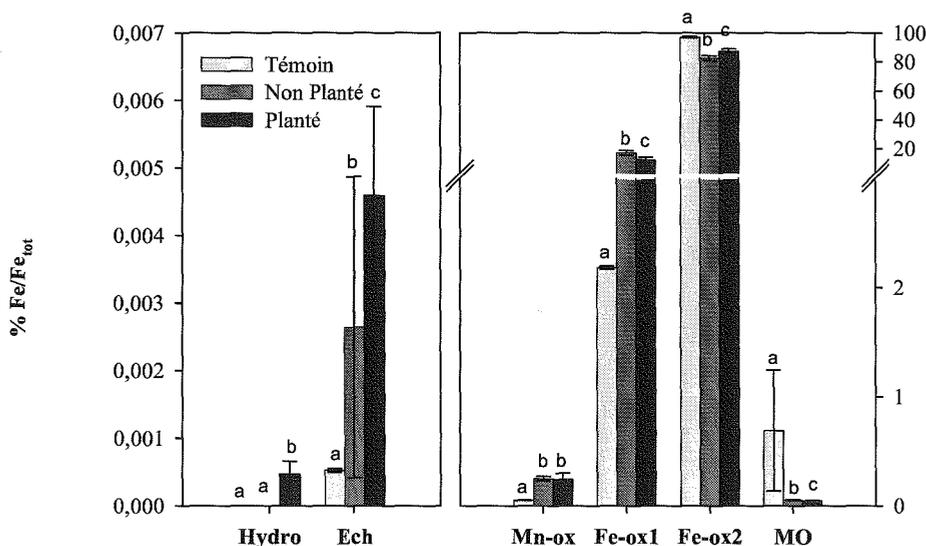


Figure 4.4 Répartition du fer dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux du support de culture 10% sol / 90% sable avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs

Le manganèse

En ce qui concerne le manganèse, une dissolution significative (*Hydro*) dans les "sols" cultivés est à souligner (Figure 4.5). La quantité relative de Mn par rapport au manganèse total diminue dans le compartiment échangeable (*Ech*), le compartiment des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) et dans le compartiment des matières organiques (*MO*) des sols non plantés. En revanche elle augmente dans le compartiment des oxydes de fer peu cristallisés. La présence du maïs, donc l'effet rhizosphérique, augmente de façon très significative la teneur relative du manganèse dans les compartiments hydrosolubles et échangeables et dans celle des oxydes de fer mal et bien cristallisés, mais la diminue dans les compartiments *Mn-ox* et *MO*. Aucune influence significative de la rhizosphère par rapport à la seule biodégradation des matières organiques n'est observée sur le compartiment manganèse lié aux oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) et au compartiment "matières organiques" (*MO*). Pour ces deux compartiments les effets de la biodégradation des MO du sol sans culture de plante sont semblables à ceux de la plante.

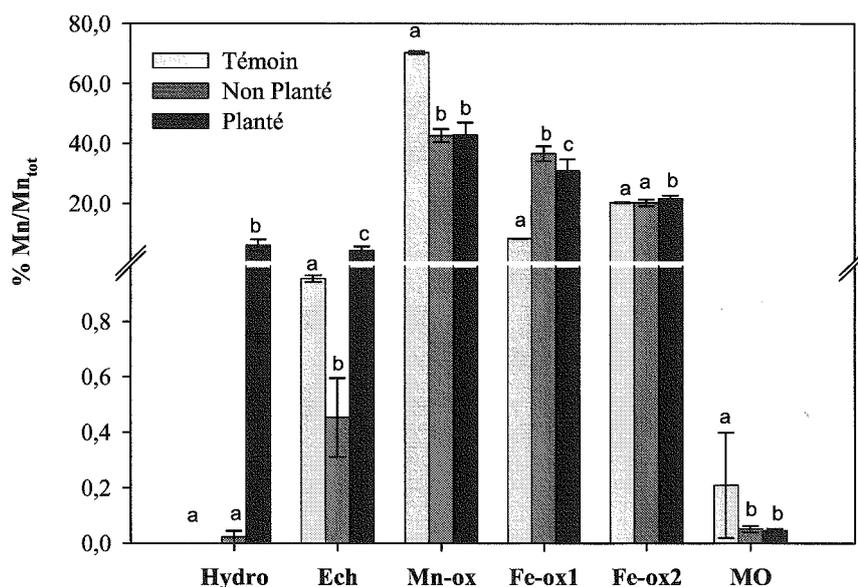


Figure 4.5 Répartition du manganèse dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux du support de culture 10% sol / 90% sable avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs.

Le chrome

La répartition initiale et l'évolution de la répartition du chrome dans les sols mis en incubation sans culture de plante et dans les sols plantés suivent celles du fer dans les traitements expérimentaux. Sa teneur relative augmente dans les compartiments des oxydes de fer peu cristallisés et des oxydes très facilement réductibles, alors qu'il diminue dans celui des oxydes de fer bien cristallisés et celui des MO (Figure 4.6). La culture du maïs et l'effet rhizosphérique favorisent une augmentation plus faible des quantités relatives de chrome liées aux compartiments des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) et des oxydes de fer peu cristallisés (*Fe-ox1*), mais une baisse moins importante du chrome lié au compartiment des oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*) comparativement à l'impact de seule présence des microorganismes intervenant sur la biodégradation des MO du sol.

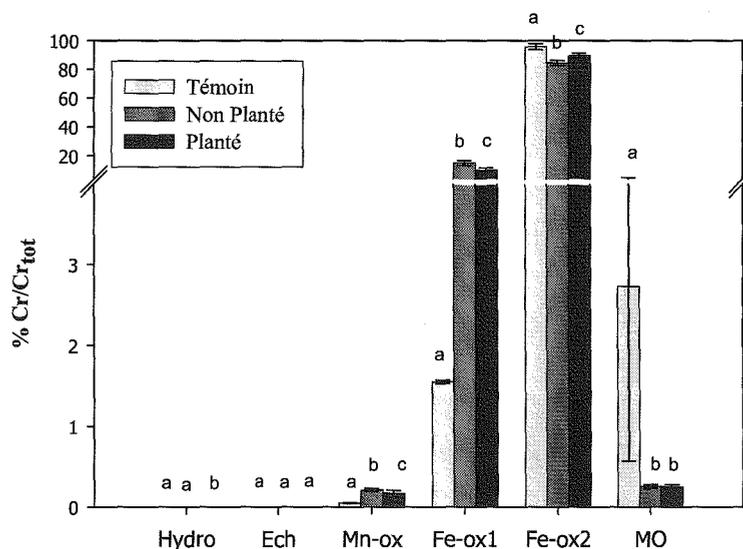


Figure 4.6 Répartition du chrome dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux du support de culture 10% sol / 90% sable avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs

Le Nickel

Tout comme le chrome, le nickel suit l'évolution du fer. Sa quantité relative augmente dans le compartiment échangeable des sols plantés (Figure 4.7), dans le compartiment des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) et celui des oxydes de fer peu cristallisés pour les sols dits "plantés" et "non plantés". En revanche il diminue dans le compartiment échangeable (*Ech*) des sols incubés non plantés, ainsi que dans les

compartiments des oxydes de fer bien cristallisés ($Fe-ox2$) et des MO des deux types de traitement planté et non planté par rapport au sol initial. La culture et le développement du maïs entraîne donc une augmentation significative du nickel lié aux compartiments échangeables et plus facilement réductible ($Mn-ox$), mais une diminution des quantités liées aux compartiments des oxydes de fer bien cristallisés ($Fe-ox2$) et à celui des MO . L'augmentation des quantités de nickel lié aux oxydes très facilement réductibles et aux oxydes de fer peu cristallisés ($Fe-ox1$) est moins importante en présence du maïs que sous l'action de la seule microflore autochtone liée à la biodégradation des MO .

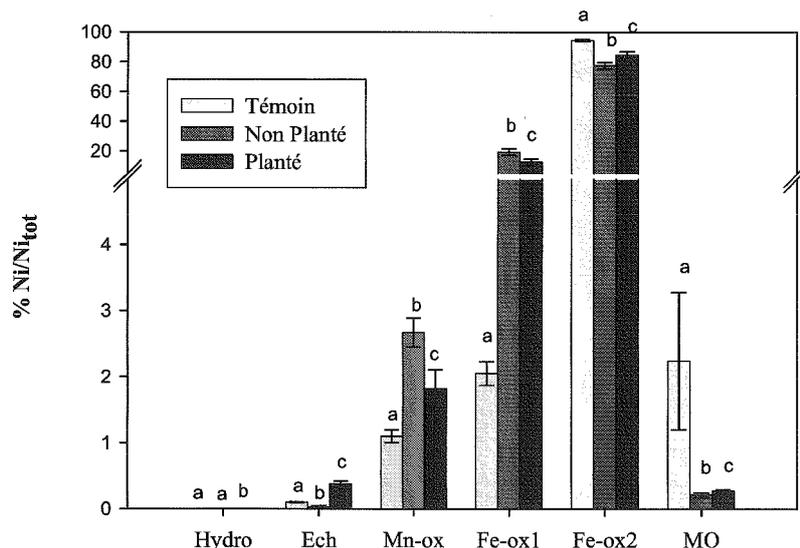


Figure 4.7 Répartition du nickel dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux du support de culture 10% sol / 90% sable avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs.

Le cobalt

Le cobalt suit l'évolution du manganèse. Par rapport au témoin non incubé, la teneur relative en cobalt augmente dans le compartiment échangeable et dans celui des oxydes de fer peu cristallisés (Figure 4.8) des sols plantés en maïs. Il diminue dans le compartiment échangeable des sols non plantés et celui des oxydes très facilement réductibles ($Mn-ox$), des oxydes de fer bien cristallisés ($Fe-ox2$) et de la matière organique (MO).

La présence du maïs a pour conséquence une augmentation très significative du cobalt lié au compartiment échangeable (Ech) et une augmentation plus faible dans le compartiment lié aux oxydes de fer faiblement cristallisés ($Fe-ox1$).

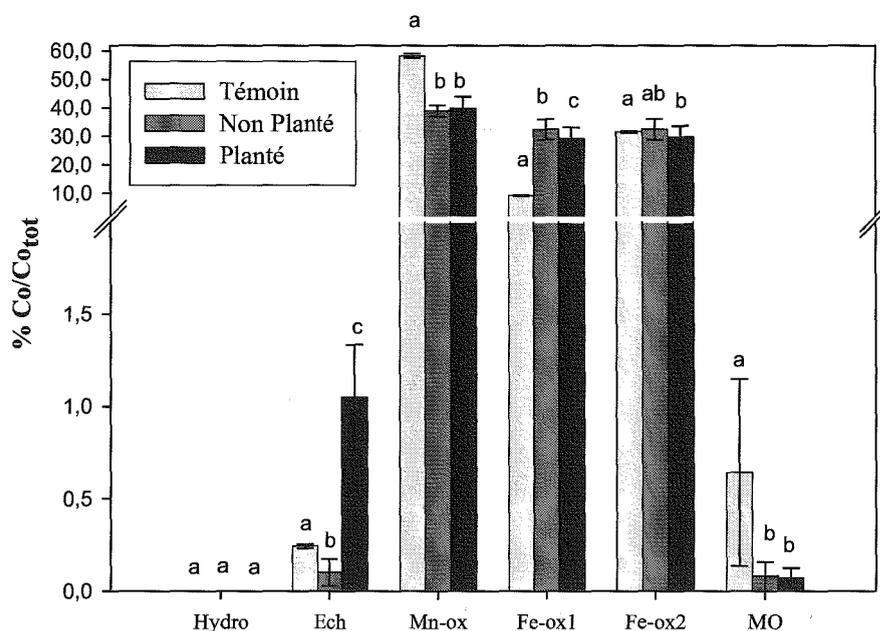


Figure 4.8 Répartition du cobalt dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux du support de culture 10% sol / 90% sable avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs.

4.3 Conclusion-Discussion

Les résultats de cette expérience montrent que le maïs a mobilisé et absorbé dans les conditions expérimentales adoptées des quantités relativement importantes d'éléments métalliques en traces dont le nickel et le cobalt. Pour Ni la teneur dépasse largement celle fixée comme présentant une toxicité. Cette toxicité s'est traduite par une diminution importante de la biomasse végétale (de l'ordre de 50%). Sur support de culture contenant 10% de sol et 90% de sable, une toxicité du cobalt n'est pas à exclure du fait de sa forte concentration dans la plante ($18 \mu\text{g.g}^{-1}$). Toutefois, aucune donnée de la littérature ne nous fournit une valeur fiable de seuil critique de toxicité pour Co, qui varie de $0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS chez le trèfle à quelques $\mu\text{g.g}^{-1}$ chez le chou. Aucun des éléments dosés ne se situe sous le seuil de déficience critique et donc aucune carence en ces éléments n'est envisagée ici.

Comparativement entre eux, on note pour Fe, Mn, Ni, Co et Cr deux types de comportements. Le fer, le nickel et le chrome suivent la même évolution dans leur mobilisation relative et leur redistribution dans les compartiments géochimiques. Comme indiqué dans le chapitre 3.1.1, ils sont principalement associés aux oxydes de fer (plus ou

moins bien cristallisés, *Fe-ox1* et *Fe-ox2*). Toutefois une quantité relativement importante de Fe est associée au compartiment des *MO*.

Le manganèse et le cobalt présentent des comportements semblables ou très voisins et sont initialement préférentiellement associés aux oxydes très facilement réductibles de type oxydes de manganèse (*Mn-ox*) (Quantin 2002). Une partie non négligeable de Mn est échangeable.

L'altération des oxydes de fer suite à la culture du maïs (traitement avec plante) ou lié à la dégradation des MO du sol (traitement sans plante) se traduit par une amorphisation des oxydes, avec redistribution du fer, nickel et chrome des compartiments "oxydes bien cristallisés (*Fe-ox2*)" et "matières organiques (*MO*)" vers les compartiments "oxydes de fer faiblement cristallisés" (*Fe-ox1*) et "oxydes très facilement réductibles" (*Mn-ox*) (Tableaux 4.2, 4.4 et 4.5). L'influence de la rhizosphère du maïs entraîne une diminution moins importante de Fe, Cr et Ni des compartiments *Fe-ox2* et un enrichissement plus faible du compartiment *Fe-ox1* par ces mêmes éléments que dans le traitement non planté où l'évolution se fait essentiellement sous l'influence de la biodégradation des MO du sol. En revanche le fer est libéré et évolue vers des formes hydrosolubles et échangeables en quantité plus importante sous l'influence de la rhizosphère.

L'altération des oxydes de manganèse, présents principalement sous forme très facilement réductible (*Mn-ox*), se traduit par une diminution des quantités de manganèse et de cobalt liés à ce compartiment. Cette évolution contribue à l'enrichissement du compartiment lié aux oxydes de fer faiblement cristallisés (*Fe-ox1*) et aux compartiments plus labiles et plus disponibles sous formes hydrosolubles et échangeables (Tableaux 4.3 et 4.6). Il apparaît donc que le manganèse et le cobalt libérés lors de l'altération des oxydes très facilement réductibles deviennent partiellement plus disponibles, mais également pour partie moins disponibles en se redistribuant dans ces trois types de compartiments. Ces éléments pourraient dans ce cas précis être "intégrés" dans le compartiment des oxydes de fer lors de "l'amorphisation" de ces derniers. La présence des racines du maïs a pour conséquence une redistribution différente du manganèse issu du compartiment *Mn-ox* par rapport aux incubations du sol non planté puisqu'elle favorise très nettement le passage vers les deux compartiments les plus disponibles (*Hydro* et *Ech*).

Tableau 4.2 Evolution de la quantité de Fe dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de fer redistribué pour 100g de fer total présent dans le substrat, par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_r).

	Sol non planté	Sol planté
Hydro	+ 6,8.10 ⁻⁶	+ 5,0.10 ⁻⁵
Ech	+ 2,1.10 ⁻³	+ 4,1.10 ⁻³
Mn-ox	+ 1,9.10 ⁻¹	+ 2,0.10 ⁻¹
Fe-ox1	+ 14,9	+ 10,3
Fe-ox2	- 14,5	- 9,8
MO	- 5,1.10 ⁻¹	- 5,2.10 ⁻¹

Tableau 4.3 Evolution de la quantité de Mn dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Mn redistribué pour 100g de Mn total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_r).

	Sol non planté	Sol planté
Hydro	+ 2,0.10 ⁻²	+ 4,1
Ech	- 5,0.10 ⁻¹	+ 3,4
Mn-ox	- 27,7	- 27,4
Fe-ox1	+ 28,3	+ 22,7
Fe-ox2	- 1,8.10 ⁻²	+ 1,5
MO	- 3,6.10 ⁻¹	- 3,6.10 ⁻¹

Tableau 4.4 Evolution de la quantité de Ni dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Ni redistribué pour 100g de Ni total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_r).

	Sol non planté	Sol planté
Hydro	+ 0,0	+ 9,5.10 ⁻³
Ech	- 7,1.10 ⁻²	+ 2,8.10 ⁻¹
Mn-ox	+ 1,5	+ 7,0.10 ⁻¹
Fe-ox1	+ 17,4	+ 10,7
Fe-ox2	- 18,5	- 11,3
MO	- 3,8.10 ⁻¹	- 3,2.10 ⁻¹

Tableau 4.5 Evolution de la quantité de Cr dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Cr redistribué pour 100g de Cr total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_p).

	Sol non planté	Sol planté
Hydro	+ 0,0	+ 0,0
Ech	+ 0,0	+ 0,0
Mn-ox	+ 1,6.10 ⁻¹	+ 1,2.10 ⁻¹
Fe-ox1	+ 13,4	+ 8,5
Fe-ox2	- 12,8	- 8,0
MO	- 7,4.10 ⁻¹	- 7,5.10 ⁻¹

Tableau 4.6 Evolution de la quantité de Co dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Co redistribué pour 100g de Co total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_p).

	Sol non planté	Sol planté
Hydro	+ 5,4.10 ⁻³	+ 9,9.10 ⁻³
Ech	- 1,4.10 ⁻¹	+ 8,0.10 ⁻¹
Mn-ox	- 19,5	- 18,7
Fe-ox1	+ 23,3	+ 20,1
Fe-ox2	- 3,4	- 1,9
MO	- 3,0.10 ⁻¹	- 3,1.10 ⁻¹

L'altération des oxyhydroxydes de fer et de manganèse des sols de Nouvelle-Calédonie, sous l'effet de la rhizosphère du maïs et de la biodégradation des MO du sol se traduit donc par une redistribution des éléments dans les différents compartiments organo-minéraux et minéraux des sols. Le degré de cristallisation des oxydes diminue, et les éléments sont principalement redistribués vers les compartiments les plus labiles et en particulier les plus disponibles, hydrosolubles et échangeables. Un effet rhizosphérique est nettement observé par un enrichissement plus important dans les traitements dits "plantés" que dans les traitements non plantés de ces compartiments les plus disponibles (Tableaux 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 et 4.11). Les quantités de fer, manganèse et nickel exportées vers le compartiment "Plante" sont importantes. Pour le fer, ce passage vers la biomasse végétale est plus important que ce qui reste en solution (0,50 contre 0,22 µg de fer par plante). La quantité de fer biodisponible (absorbé par la plante, sous-estimé car ne prenant pas en

compte le fer des racines) et qui peut être considérée comme facilement biodisponible dans le sol (hydrosoluble "*Hydro*", échangeable "*Ech*") est multipliée par 12 par rapport à sa répartition dans le sol initial et par presque 3 par rapport à l'effet de la biodégradation des MO du sol.

Pour le manganèse et le nickel ces quantités biodisponibles ou facilement biodisponibles sont multipliées par 12 par rapport au sol initial et par 30 et 42 par rapport au sol subissant la biodégradation des MO du sol. Pour Co cette biodisponibilité est multipliée par 5 sous l'influence de la rhizosphère.

La rhizosphère du maïs et sa microflore associée contribuent donc à accroître significativement la disponibilité d'éléments peu solubles comme Fe, Mn, Ni, Cr et Co en altérant les oxydes et oxyhydroxydes de fer et de manganèse.

Tableau 4.7 Evolution de la quantité de fer dans les compartiments les plus labiles, en mg de fer par pot et par plante (Indices de disponibilité I_d)

Compartiment	Sol initial	Sol non planté	Sol planté
Plante	-	-	0,50 ± 0,12
<i>Hydro</i>	0	0,03 ± 0,03	0,22 ± 0,09
<i>Ech</i>	0,23 ± 0,01	1,00 ± 0,87	2,13 ± 0,19
Total	0,23 ± 0,01	1,03 ± 0,90	2,85 ± 0,40

Tableau 4.8 Evolution de la quantité de manganèse dans les compartiments les plus labiles, en mg de manganèse par pot et par plante (Indices de disponibilité I_d)

Compartiment	Sol initial	Sol non planté	Sol planté
Plante	-	-	1,95 ± 0,26
<i>Hydro</i>	0,01 ± 0,01	0,12 ± 0,12	32,80 ± 10,40
<i>Ech</i>	4,51 ± 0,06	1,75 ± 0,64	21,80 ± 5,94
Total	4,52 ± 0,07	1,87 ± 0,78	56,55 ± 16,6

Tableau 4.9 Evolution de la quantité de nickel dans les phases les plus labiles, en mg de nickel par pot et par plante (Indices de disponibilité I_d)

Compartiment	Sol initial	Sol non planté	Sol planté
Plante	-	-	0,15 ± 0,02
Hydro	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	5,29 ± 2,35
Ech	0,78 ± 0,02	0,21 ± 0,17	3,86 ± 0,32
Total	0,79 ± 0,03	0,22 ± 0,18	9,30 ± 2,69

Tableau 4.10 Evolution de la quantité de chrome dans les phases les plus labiles, en mg de chrome par pot et par plante (Indices de disponibilité I_d)

Compartiment	Sol initial	Sol non planté	Sol planté
Plante	-	-	0,01 ± 0,00
Hydro	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ech	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Total	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00

Tableau 4.11 Evolution de la quantité de cobalt dans les phases les plus labiles, en mg de cobalt par pot et par plante (Indices de disponibilité I_d)

Compartiment	Sol initial	Sol non planté	Sol planté
Plante	-	-	0,09 ± 0,01
Hydro	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Ech	0,22 ± 0,01	0,08 ± 0,06	1,07 ± 0,27
Total	0,24 ± 0,03	0,10 ± 0,08	1,18 ± 0,29

PARTIE II

Rôle des microorganismes

5

RECHERCHE ET MISE EN ÉVIDENCE DE COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES FERRI- ET MANGANI-RÉDUCTRICES

5.1 Introduction

Les sols contiennent des microorganismes impliqués dans les phénomènes d'altération des minéraux en faisant intervenir divers processus (Berthelin 1983, 1988, 1994, 1999, Ehrlich 2002, Hines *et al.* 1991) et, entre autres, des mécanismes de réduction du fer et du manganèse qui entraînent la dissolution des oxy-hydroxydes (Lovley 1991, Quantin *et al.*, 2002). De nombreux types de sols (Munch et Ottow 1981, Leyval et Berthelin 1983, Stemmler et Berthelin 2003) dont les Ferralsols Néo-Calédoniens (Quantin *et al.*, 2002) renferment des communautés ferri-réductrices efficaces.

Dans cette étude, il est apparu nécessaire de rechercher et dénombrer ces communautés ferri- et mangani-réductrices, en particulier dans la rhizosphère du maïs. Ces travaux ont été conduits pour des bactéries cultivables sur deux principaux types de milieu de culture, l'un favorisant le développement de bactéries fermentaires (milieu de Bromfield (1954) modifié, désigné par Br, avec des oxydes de fer (BrFe) ou de manganèse (BrMn)) et l'autre modélisant l'apport d'exsudats racinaires (désigné par Rh), tous deux décrits dans le chapitre 3.3.6.1. Par ailleurs, des communautés bactériennes isolées sur ces milieux pour leur capacité à réduire et dissoudre des oxydes de fer (communauté IM1) et de manganèse (communauté IM2), ont été étudiées dans des dispositifs de culture en cuves (ou microplaques, voir chapitre 3.3.6.3), en présence d'un oxyde de fer ou de manganèse.

5.2 Résultats

5.2.1 Dénombrements des communautés microbiennes rhizosphériques et non rhizosphériques dans des pots de culture de maïs

Après 5 semaines de culture en pots de maïs sur un mélange de sol (OUE 4.2) et de sable (Chapitre 3.4.2), les microflore totale, ferri- et mangani-réductrice cultivables ont été dénombrées sur différents milieux de culture présentés dans le chapitre 3.3.6.1. La microflore totale cultivable du mélange sol:sable/10:90 a été déterminée sur les milieux Rh ne contenant pas d'oxydes de Fe ou de Mn. Les microflore cultivables ferri- et mangani-réductrices ont été dénombrées dans des milieux additionnés d'oxyde de fer (RhFe et BrFe) ou de manganèse (RhMn ou BrMn).

Les résultats de ces dénombrements de bactéries cultivables issues du sol rhizosphérique ou non-rhizosphérique (non plantés) sont présentés dans la figure 5.1.

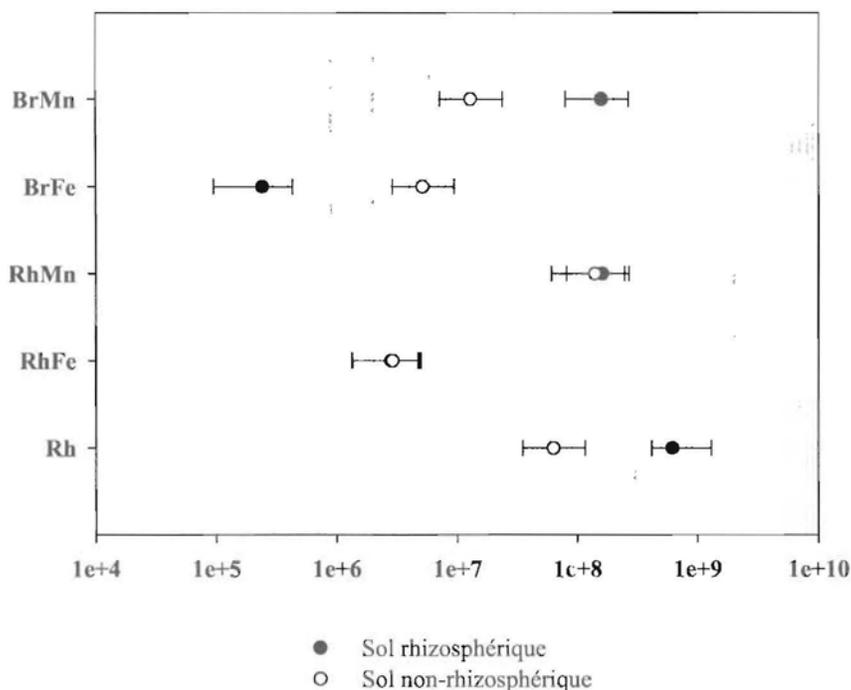


Figure 5.1 Dénombrement des communautés bactériennes anaérobies et des communautés réductrices de Fe et Mn dans le sol rhizosphérique et non-rhizosphérique sur les milieux de culture Rh, RhFe, RhMn, BrFe et BrMn. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.

Effet de la nature des milieux de culture sur les dénombrements bactériens

Le milieu Rh modélisant des apports d'exsudats racinaires a permis de dénombrer le plus grand nombre de bactéries aéro-anaérobies et anaérobies avec $6,15 \cdot 10^8$ ($4,15 \cdot 10^8 - 1,29 \cdot 10^9$) bactéries.g⁻¹ de "sol" rhizosphérique. Le nombre de bactéries non-rhizosphériques est de $6,30 \cdot 10^7$.g⁻¹ de "sol" non-rhizosphérique. Les bactéries à activité spécifique de réduction de Fe et Mn sont moins nombreuses (de $2,43 \cdot 10^5$ ($9,58 \cdot 10^4 - 4,33 \cdot 10^5$) bactéries.g⁻¹ sol sec pour le sol rhizosphérique sur BrFe, à $1,60 \cdot 10^8$ ($8,10 \cdot 10^7 - 2,67 \cdot 10^8$) bactéries.g⁻¹ sol sec pour le sol rhizosphérique sur RhMn).

En ce qui concerne les bactéries ferri-réductrices, la nature du milieu de culture n'a eu d'influence que sur le nombre de bactéries issues de la rhizosphère du maïs avec un nombre de bactéries plus élevé sur le milieu RhFe ($2,84 \cdot 10^6$ ($1,36 \cdot 10^6 - 4,76 \cdot 10^6$) bactéries.g⁻¹ sol sec) que sur le milieu BrFe ($2,43 \cdot 10^5$ ($9,58 \cdot 10^4 - 4,33 \cdot 10^5$) bactéries.g⁻¹ sol sec. Par contre le phénomène est inversé pour les bactéries mangani-réductrices : le milieu de culture n'a aucune influence sur le nombre de bactéries issues de la rhizosphère du maïs ($1,58 \cdot 10^8$ ($7,91 \cdot 10^7 - 2,65 \cdot 10^8$) bactéries.g⁻¹ sol sec sur milieu BrMn et $1,60 \cdot 10^8$ ($8,10 \cdot 10^7 - 2,67 \cdot 10^8$) bactéries.g⁻¹ sol sec sur milieu RhMn), alors qu'il a une influence sur le nombre de bactéries issues du sol non planté (donc non rhizosphérique) ($1,30 \cdot 10^7$ ($7,23 \cdot 10^6 - 2,40 \cdot 10^7$) bactéries.g⁻¹ sol sec sur le milieu BrMn et $1,40 \cdot 10^8$ ($6,10 \cdot 10^7 - 2,47 \cdot 10^8$) bactéries.g⁻¹ sol sec sur le milieu RhMn.

Dans tous les cas, les bactéries mangani-réductrices cultivables sont plus nombreuses que les ferri-réductrices

Effet "Rhizosphère"

Les résultats de la Figure 5.1 ont montré un effet de la rhizosphère sur le nombre "total" de bactéries (microflore complexe et non spécifique), avec un nombre plus élevé de bactéries cultivables dans la rhizosphère ($6,15 \cdot 10^8$ ($4,15 \cdot 10^8 - 1,29 \cdot 10^9$) bactéries.g⁻¹ sol sec) que dans le sol non planté ($6,30 \cdot 10^7$ ($3,52 \cdot 10^7 - 1,15 \cdot 10^7$) bactéries.g⁻¹ sol sec). Le coefficient rhizosphérique R (bactéries dénombrées dans la rhizosphère) / NR (bactéries dénombrées dans le sol Non Rhizosphérique) est en effet de 10. Cette stimulation de la communauté bactérienne aéro-anaérobie et anaérobie totale ne se retrouvent pas pour les communautés bactériennes ferri- et mangani-réductrices croissant sur Rh. La rhizosphère n'a eu d'effet que sur le nombre de bactéries cultivées sur le milieu Bromfield (BrFe et BrMn) avec deux effets différents. Les bactéries réduisant le fer sont moins nombreuses dans la rhizosphère ($2,43 \cdot 10^5$

($9,58 \cdot 10^4 - 4,33 \cdot 10^5$) bactéries.g⁻¹ sol sec) que dans le sol non planté ($5,18 \cdot 10^6$ ($2,90 \cdot 10^6 - 9,51 \cdot 10^6$) bactéries.g⁻¹ sol sec) (R/S = 0,05) pour les ferri-réductrices. Dans le cas des bactéries mangani-réductrices, l'effet est inverse : les bactéries sont plus nombreuses dans la rhizosphère du maïs ($1,58 \cdot 10^8$ ($7,82 \cdot 10^7 - 2,65 \cdot 10^8$) bactéries.g⁻¹ sol sec) que dans le sol non planté ($1,30 \cdot 10^7$ ($7,25 \cdot 10^6 - 2,44 \cdot 10^7$) bactéries.g⁻¹ sol sec) (R/S = 12).

5.2.2 Isolement et caractérisation préliminaires des communautés bactériennes IM1 et IM2 réduisant le fer et le manganèse

Des communautés bactériennes (IM1 et IM2) ont été isolées de la rhizosphère de *Zea mays* cv. DK 250 au bout de 5 semaines de culture. IM1 a été isolée sur le milieu BrFe pour ses capacités de ferri-réduction et IM2 sur le milieu BrMn pour ses capacités de mangani-réduction. Elles sont, dans une première approche, caractérisées morphologiquement et pour leur capacité à réduire et dissoudre des oxydes de fer et de manganèse en conditions de culture contrôlées dans des milieux de synthèse favorisant les fermentations (Br) avec du glucose comme source de carbone et d'énergie, ou modélisant un apport d'exsudats racinaires (Rh) (voir chapitre 3).

5.2.2.1 Observations macroscopique et microscopique

Les observations ci-dessous ont été réalisées après 10 repiquages successifs des colonies bactériennes provenant des isolats IM1 et IM2.

La photographie 5.1 représente les communautés bactériennes IM1 et IM2 cultivées en boîtes de Pétri en anaérobiose sur les milieux BrFe et BrMn.

Les colonies de la communauté bactérienne IM1 sont punctiformes, laiteuses légèrement jaunâtres quel que soit le milieu sur lequel elles sont cultivées. La taille des colonies varie en fonction du milieu de culture. Le diamètre d'une colonie isolée sur milieu de Bromfield (BrFe ou BrMn) peut atteindre 2 à 4 mm alors qu'il atteint rarement les 2 mm sur le milieu "rhizosphérique" (Rh, RhFe ou RhMn).



Photo 5.1 Observation macroscopique des communautés IM1 (en haut) et IM2 (en bas) cultivées sur milieux Br (à gauche) et Rh (à droite) en boîtes de Pétri

La communauté bactérienne IM2 montre des caractéristiques macroscopiques différentes en fonction du milieu de culture. Sur le milieu BrFe ou BrMn, les colonies isolées sont ponctiformes, laiteuses et légèrement orangées. Sur les milieux Rh, RhFe et RhMn les colonies isolées forment des dendrites parfaitement rectilignes de couleur blanche à orangée, de plusieurs centimètres de long. Ces différences morphologiques suggèrent la présence de plusieurs colonies, et l'importance de la source carbonée sur le métabolisme et l'expression de l'activité des microorganismes.

Ces différences du métabolisme et de l'activité en fonction du milieu de culture sont également suggérées par la morphologie de l'auréole de réduction et solubilisation des oxydes de fer et de manganèse. Celle-ci est totalement transparente et incolore sur milieu BrFe ou BrMn, mais plus translucide ou laiteuse sur milieu RhFe ou RhMn, alors qu'initialement et en absence de Fe et Mn ces deux milieux sont parfaitement incolores et transparents. Des différences dans la dynamique et l'activité des populations de ces communautés et les

mécanismes de réduction impliqués peuvent être à l'origine de ces phénomènes observés sur boîtes de Pétri.

Les photographies 5.2 et 5.3 représentent les observations des communautés IM1 et IM2 au microscope optique ($\times 400$) : on peut noter une grande diversité morphologique des microorganismes présents dans chaque consortium. Aucune des deux communautés n'apparaît pure, mais composées de plusieurs types de bactéries, ce qui confirme les hypothèses de consortia suite aux observations macroscopiques, et leur désignation en tant que "communautés bactériennes".

Le consortium IM1 (Photo 5.2) est constitué à 81% (comptage sur cellule de Thoma) de bactéries allongées avec la présence d'une spore déformante à l'une de leurs extrémités. La présence de cette spore et le niveau de déformation de ces bactéries dépendent de leur état de stress (durée de l'observation, stade de développement). Une coloration de Gram indique que ce sont des bactéries de type Gram + Ce qui suggère la présence dominante de bactéries du genre *Clostridium*. Un autre type de bactéries est observable en plus faible proportion (19%) et correspondent à des bactéries de type cocci Gram+.

Le consortium IM2 (Photo 5.3) contient environ 12% de bactéries de type cocci Gram+ ainsi que des bactéries morphologiquement différentes de IM1 mais Gram+ également. Elles ont la forme de bâtonnets plus ou moins allongés et épais dont certains sont organisés en chaînettes. Les observations suggèrent que IM2 contiendrait des *Bacillus* (33%) et *Lactobacillus* (55%).

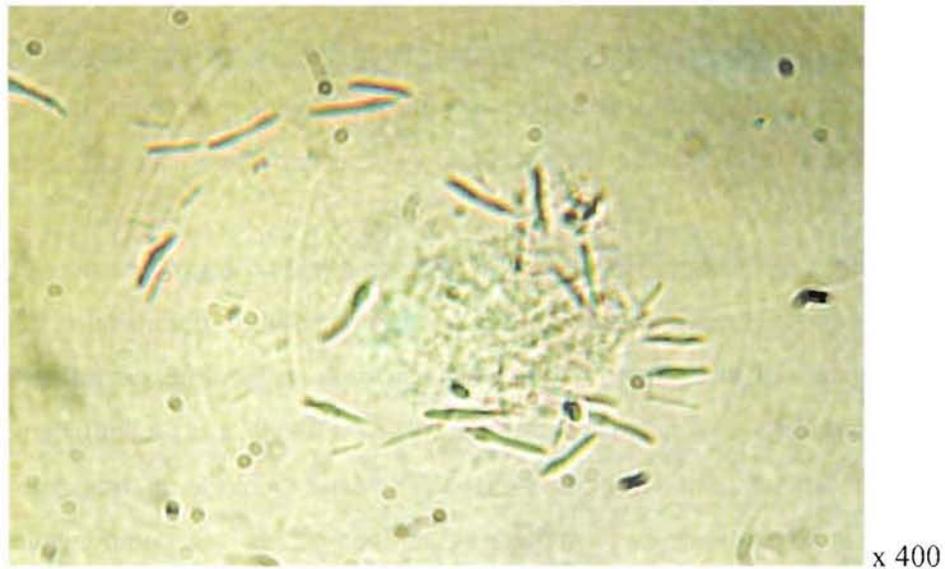


Photo 5.2 Communauté IM1.

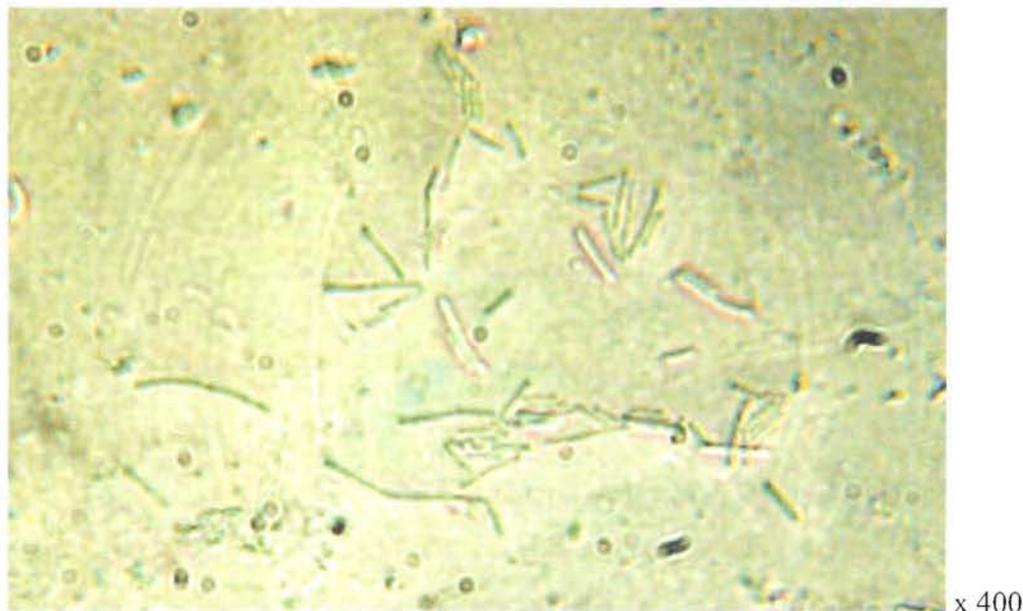


Photo 5.3 · Communauté IM2.

5.2.2.2 Réduction – dissolution d'oxydes de fer et de manganèse

- Capacité de réduction sur milieu solide

De simples tests ont été réalisés en boîtes de Pétri par des inoculations croisées : IM1 (isolée pour ses capacités de ferri-réduction) a été cultivée sur les milieux BrMn et RhMn, et IM2 (isolée pour ses capacités de mangani-réduction) a été cultivée sur les milieux de culture BrFe et RhFe. Les résultats après 14 jours de culture en anaérobiose sont présentés dans le Tableau 6.1 en indiquant la capacité de réduction/solubilisation en fonction du nombre d'UFC capables de réduire et solubiliser Fe et Mn des oxy-hydroxydes ajoutés dans le milieu.

IM1 et IM2 ont toutes les deux la capacité de réduire Fe et Mn. IM1 réduit mieux Fe que Mn (100% des UFC sont positives pour Fe, 90-95% des UFC sont positives pour Mn), alors que IM2 montre la même capacité de réduction et dissolution du fer et du manganèse (100% des UFC positives pour Fe et Mn).

Tableau 5.1 : Capacités de réduction/solubilisation des oxydes de Fe et Mn par IM1 et IM2. +++ très bonne capacité (100% des UFC ont réduit et solubilisé Fe ou Mn). ++ bonne capacité (90-95% des UFC ont réduit Fe ou Mn).

Communauté	Milieu d'isolement	Capacité de réduction/solubilisation	
		Fe	Mn
IM1	BrFe	+++	++
IM2	BrMn	+++	+++

- Réduction – dissolution en milieu liquide

Des cultures en conditions anaérobies en microplaques sur différents milieux de culture liquides (BrFe, BrMn, RhFe et RhMn) ont mis en évidence, après 0, 6, 9, 14 et 17 jours d'incubation, différentes cinétiques de dissolution de Fe et Mn des oxydes sous forme Fe^{2+} et Mn^{2+} .

Réduction et solubilisation du fer

Les résultats présentés dans la figure 5.4 montrent dans tous les cas une forte activité réductrice des isolats (IM1 et IM2) qui est meilleure sur le milieu BrFe que sur le milieu RhFe. Par ailleurs différentes étapes de réduction sont observables au cours du temps. Sur le milieu BrFe le consortium IM1 montre 2 phases de réduction, avant le sixième puis après le neuvième jour et deux phases stationnaires ou de légère décroissance. IM2 présente aussi 2 phases de réduction et une seule période stationnaire entre le sixième et le neuvième jour.

En ce qui concerne le milieu RhFe la tendance est très différente. IM1 montre une période de latence plus longue que pour IM2. Les activités des deux communautés sont ensuite identiques et stationnaires après le neuvième jour.

Ces résultats suggèrent que : 1) la quantité de substrat énergétique (donneur d'électrons) limiterait en milieu Rh l'activité et la croissance par rapport au milieu Br, 2) les consortiums utiliseraient différemment le ou les substrats disponibles ce qui entraînerait des différences dans leur dynamique et leurs activités de réduction, 3) l'allure des cinétiques (phases de latence, phases d'activité, phases stationnaires et de décroissance, plus ou moins marquées) suggère des développements et successions de populations bactériennes correspondant à l'utilisation différente des substrats et éventuellement de leurs produits de transformation.

Comme pour les cinétiques de réduction, le milieu BrFe apparaît favorable à la dissolution des oxydes comparativement au milieu RhFe (Figure 6.4). En outre, la forme du fer dissout n'est pas la même selon que l'on soit sur milieu BrFe ou RhFe : sur le milieu RhFe, 100% du fer dissout est présent sous la forme de Fe^{2+} alors que ce dernier ne représente que 52 à 75% du fer total en milieu Br (Figure 5.5).

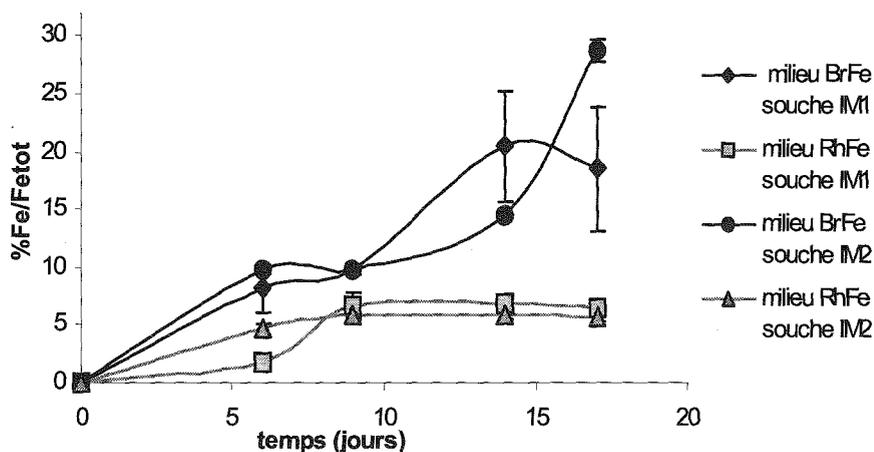


Figure 5.4 Cinétique de réduction et solubilisation de Fe par les communautés IM1 et IM2 en fonction du temps dans deux milieux de culture.

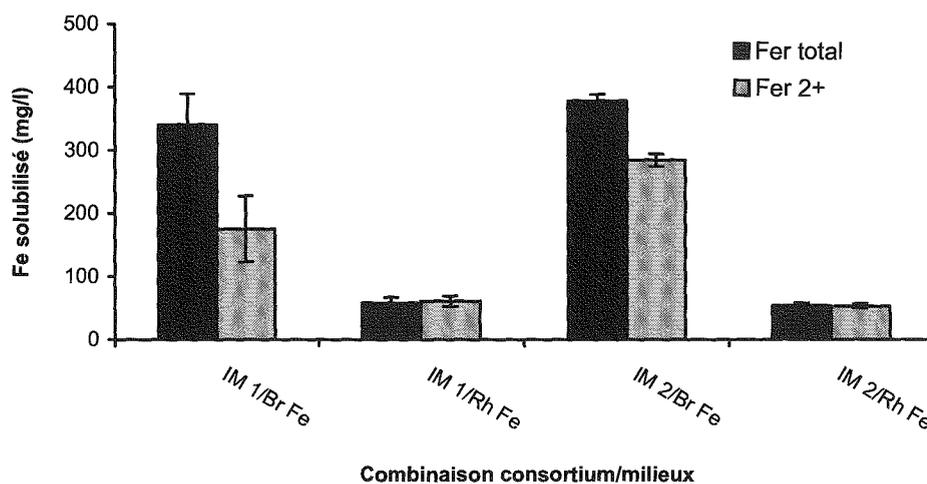


Figure 5.5 Comparaison des différentes formes de fer en solution ($mg.L^{-1}$) après 17 jours d'incubation en microplaques en milieu Rh et Br pour les isolats IM1 et IM2.

Ces différences peuvent être expliquées par la composition des milieux BrFe et RhFe. En effet le milieu BrFe contient du glucose utilisé par les bactéries ferri-réductrices

fermentaires pour une dissolution efficace des oxydes. La biodégradation du glucose peut conduire à la production de composés organiques qui peuvent avoir un effet complexant sur le fer, expliquant ainsi la plus faible proportion de Fe^{2+} en solution. Une partie du fer peut-être aussi réoxydée et rester en solution sous forme de complexe.

En revanche dans le cas du milieu RhFe, la faible quantité de sucres ne conduirait pas ou peu à la production de composés complexants, et le fer réduit resterait sous forme Fe^{2+} .

Solubilisation du manganèse

Seules les analyses portant sur le manganèse total en solution sont présentés (Figure 5.6). Ces résultats montrent une forte dissolution de Mn en fin d'incubation avec des cinétiques d'allure très différentes de celles du fer et une longue phase de latence. La plus forte solubilisation de Mn est observée pour la souche IM2 cultivée sur le milieu RhMn. La plus faible dissolution est observée pour IM1 cultivée sur le milieu RhMn. Les cultures sur milieu BrMn donnent des résultats intermédiaires.

Des contrôles qualitatifs colorimétriques ont montré qu'une partie du manganèse dissout est présent sous la forme réduite Mn^{2+} .

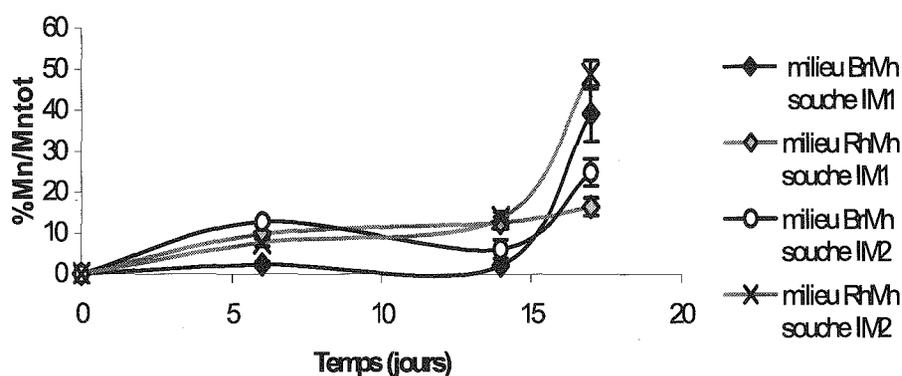


Figure 5.6 Cinétique de réduction et solubilisation de Mn par IM1 et IM2 en fonction du temps dans deux milieux de culture

5.3 Discussion - Conclusion

Effet rhizosphère

La rhizosphère du maïs a un effet stimulant sur le nombre total de bactéries anaérobies cultivables (microflore complexe) (R/S = 10) du sol de OUE 4.2 ainsi que sur le nombre de bactéries mangani-réductrices fermentaires (cultivées sur le milieu Bromfield Br) (R/S = 12),

En revanche on observe un effet limitant sur le nombre de bactéries ferri-réductrices fermentaires ($R/S = 0,05$). Aucun effet ne se manifeste sur le nombre de bactéries cultivées sur le milieu Rh simulant un apport d'exsudats racinaires complexes ($R/S = 1$). La rhizosphère n'influencerait donc que certaines communautés bactériennes présentant des activités ferri- et mangani-réductrices. L'activité de ces communautés ferri- et mangani-réductrices nécessitent des conditions anoxiques et des potentiels redox bas (Munch & Ottow 1983), or la rhizosphère peut ne pas favoriser de telles conditions en raison par exemple du développement d'un système d'aération des racines exposées à l'hypoxie (Bragina *et al.* 2001) suite à une augmentation du développement des aerenchymes dans le cortex des racines adventives. En revanche la forte teneur en carbone organique de la rhizosphère peut favoriser la consommation d'oxygène et le développement de bactéries fermentaires mangani-réductrices comme c'est ici le cas et qui sont généralement anaérobies facultatives. Par ailleurs ces bactéries peuvent être présentes et viables dans un environnement relativement aéré sans toutefois exprimer leur activité de réduction.

Caractérisation préliminaire des isolats bactériens ferri- et mangani-réducteurs IM1 et IM2.

Les communautés bactériennes anaérobies IM1 et IM2 ont chacune été isolées pour des capacités différentes, IM1 pour ses propriétés ferri-réductrices, et IM2 pour ses propriétés mangani-réductrices. Après 10 repiquages successifs, il s'est avéré que ces isolats étaient en fait des communautés renfermant divers types de populations. Des essais d'isolement plus complets se sont soldés par une perte des capacités réductrices et donc de la composition de la communauté. Il semblerait donc que les bactéries présentes dans ces communautés vivent en véritable synergie, associations étroites, pour manifester des activités ferri- et mangani-réductrices. Ceci n'est guère surprenant car des successions de population plus ou moins spécifiques peuvent se manifester en particulier en conditions anaérobies (Madigan *et al.* 2000). Lovley et Phillips (1986) ont ainsi montré que certaines bactéries réduisent le fer en parallèle de la fermentation du glucose en utilisant l'acétate issu de cette fermentation. Les cultures de la communauté IM2 montrent des différences entre les colonies développées sur milieu "Bromfield" et "Rhizosphérique" qui peuvent correspondre soit au développement préférentiel d'une espèce par rapport à d'autres en fonction de la source de carbone, soit à une différence de mode de croissance d'une même espèce.

Les activités réductrices des deux communautés ne sont pas équivalentes. IM1 et IM2 paraissent toutes les deux capables de réduire et dissoudre très efficacement le fer et le

manganèse, mais IM1 serait toutefois moins efficace pour la réduction du manganèse sur milieu solide à base de glucose (Br). Les études cinétiques en milieu liquide (microplaques) indiquent que sur milieu dit "rhizosphérique" la communauté IM2 qui solubilise 51% de Mn présent est la plus efficace. IM1 ne parvient à réduire et solubiliser que 12% du Mn. En revanche IM1 est plus efficace sur milieu Br à base de glucose. IM1 posséderait des communautés fermentaires qui exprimeraient une activité ferri-réductrice plus forte que IM2. Ces activités s'exprimeraient donc différemment en fonction du milieu qui favoriserait le développement des certaines communautés fermentaires ou non, ou entraînerait des phases de latence tant qu'un substrat n'est disponible ou tant qu'une population efficace ne se soit suffisamment développées.

6

INFLUENCE DE COMMUNAUTES MICROBIENNES RHIZOSPHERIQUES AUTOCHTONES OU INOCULEES

6.1 Introduction

La rhizosphère des plantes est un site particulier du sol où les racines modifient par leur croissance les propriétés physiques, chimiques et physico-chimiques mais aussi biologiques du sol. Les racines mortes et les exsudats racinaires fournissent des conditions énergétiques et nutritionnelles favorables au développement et à l'activité des microorganismes. Ces interactions "microorganismes-racines" favorisent l'altération des minéraux, la mobilisation des éléments et leur transfert aux plantes, comme l'ont démontré Leyval & Berthelin (1991) en observant l'altération d'un mica phlogopite en vermiculite dans la rhizosphère du pin sylvestre, sous l'effet de bactéries produisant des acides aliphatiques carboxyliques. Antérieurement Leyval & Berthelin (1983) avaient observé que la rhizosphère de diverses plantes (fétuque, molinie, mercuriale, callune, myrtille) caractéristiques de divers types de sol de régions tempérées, pouvaient favoriser, au moins à certaines saisons, le développement de communautés bactériennes ferri-réductrices. Ces effets rhizosphériques se manifestaient par un coefficient R/S (communautés rhizosphériques/communautés du sol non rhizosphérique) atteignant 10 et même 100. Toutefois aucune étude visant à déterminer l'effet des communautés rhizosphériques sur l'altération et en particulier la réduction des oxydes de fer et de manganèse et mobilisation de Fe, Mn, et d'éléments associés à des oxydes de fer pédogénétiques n'a été effectuée. Or il y a là un enjeu majeur concernant la connaissance du cycle du fer et d'éléments associés dans des systèmes sol-plante et le fonctionnement de la rhizosphère. Le but de l'expérience présentée dans ce chapitre est de différencier l'influence de la rhizosphère de celle des bactéries rhizosphériques qui s'y développent sur l'altération des oxydes de fer et de manganèse dans le sol de Ouénarou OUE 4.2 et sur la mobilisation des éléments traces associés à ces oxydes (Ni, Cr, Co).

Le dispositif de culture mis en place permet de distinguer des paramètres microbiologiques définis, soit en maintenant le sol stérile sans microorganismes (stérilisation du sol par rayonnement gamma, voir chapitre 3.3.1), soit en conservant l'ensemble de la communauté microbienne du sol, soit en inoculant des communautés bactériennes isolées de la rhizosphère du maïs pour leur capacité à réduire et dissoudre les oxydes de fer (communauté IM1) et de manganèse (communauté IM2). Les conditions axéniques sont maintenues grâce à un film perméable aux gaz mais imperméable aux microorganismes (Biofolies®) englobant le support de culture et la plante, dans un dispositif décrit dans le chapitre 3.4.3. Les traitements appliqués sont les suivants :

- Pot planté (P) par du maïs sur substrat de culture non stérilisé, avec microflore totale (MT), désigné par P/MT (3 réplicats)
- Pot planté (P) par du maïs sur substrat de culture stérilisé (S), désigné par P/S (7 réplicats)
- Pot planté (P) par du maïs, sur substrat de culture stérilisé puis ré-inoculé avec la communauté bactérienne IM1 (IM1), désigné par P/IM1 (5 réplicats)
- Pot planté (P) par du maïs, sur substrat de culture stérilisé puis ré-inoculé avec la communauté bactérienne IM2 (IM2), désigné par P/IM2 (5 réplicats)
- Pot non planté (NP) avec substrat non stérilisé, avec microflore totale (MT), désigné par NP/MT (3 réplicats)
- Pot non planté (NP) avec substrat stérilisé (S), désigné par NP/MT (5 réplicats)

6.2 Résultats

6.2.1 Croissance et minéralo-masse du maïs

Comme le montre la Figure 6.1 qui présente le poids de matières sèches (parties aériennes et racines) après 8 semaines de culture, la croissance du maïs est significativement différentes en fonction de la présence ou de l'absence de microorganismes dans le support de culture (sol (10%) – sable (90%)). Le poids de plante le plus élevé correspond aux traitements dans lesquels l'ensemble des communautés microbiennes du sol sont présentes (sol non stérilisé P/MT) ($1,2 \pm 0,1$ g) et le sol stérilisé ayant reçu une des deux communautés bactériennes (P/IM2 ($1,1 \pm 0,1$ g)). La croissance la plus faible correspond aux plantes cultivées en milieu stérile (P/S, $0,7 \pm 0,1$ g). Le traitement P/IM1 ayant reçu l'autre

communauté présente une croissance intermédiaire du maïs ($1,0 \pm 0,0$ g). En présence d'une microflore (traitements P/MT, P/IM1 et P/IM2), les poids des parties aériennes d'un côté, et des racines, de l'autre, ne présentent pas de différences significatives. Seul les plantes cultivées en milieu stérile ont eu une croissance des parties aériennes significativement plus faible que pour les autres traitements, et une croissance des racines significativement plus faibles que dans le cas d'une inoculation avec les communautés IM1 et IM2.

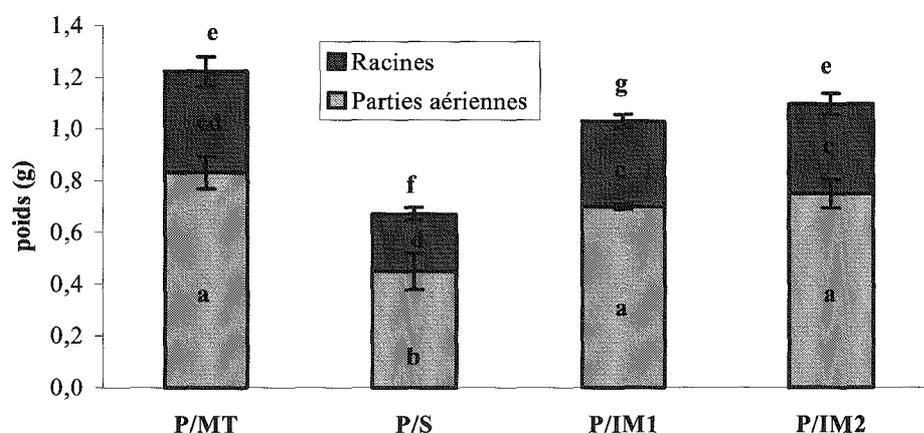


Figure 6.1 Poids des plantes sèches (g) en fonction des traitements après 8 semaines de culture. Les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%)

Tableau 6.2 Teneur en éléments métalliques et minéralo-masse du maïs après 8 semaines de culture. Les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer éléments par éléments, et séparément pour la minéralo-masse et les concentrations.

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
µg / g matière sèche (parties aériennes)					
P/MT	94 ± 9 (a)	318 ± 14 (a)	28 ± 2 (a)	5 ± 3 (a)	17 ± 1 (a)
P/S	60 ± 6 (b)	183 ± 26 (b)	18 ± 4 (b)	6 ± 5 (a)	6 ± 1 (b)
P/IM1	100 ± 10 (a)	232 ± 13 (c)	24 ± 1 (c)	3 ± 2 (a)	10 ± 2 (c)
P/IM2	89 ± 10 (a)	228 ± 9 (c)	23 ± 2 (c)	4 ± 1 (a)	8 ± 1 (c)
µg / plante (parties aériennes)					
P/MT	78 ± 8 (a)	264 ± 12 (a)	24 ± 1 (a)	4 ± 3 (a)	14 ± 1 (a)
P/S	27 ± 3 (b)	82 ± 12 (b)	8 ± 2 (b)	3 ± 2 (a)	3 ± 1 (b)
P/IM1	70 ± 7 (a)	162 ± 9 (c)	16 ± 1 (c)	2 ± 2 (a)	7 ± 1 (c)
P/IM2	67 ± 8 (a)	171 ± 7 (c)	17 ± 1 (c)	3 ± 1 (a)	6 ± 1 (c)

Le Tableau 6.1 représente la minéralo-masse et la concentration en métaux des parties aériennes du maïs après 8 semaines de culture. Ces résultats mettent en évidence une différence dans l'absorption des métaux en fonction du type de microflore présente. Ainsi, le fer, le manganèse, le nickel et le cobalt sont significativement plus absorbés (tant pour la minéralo-masse que pour la teneur) en présence de communautés microbiennes ou bactériennes (traitements P/MT, P/IM1 et P/IM2) qu'en conditions stériles (P/S). En ce qui concerne le chrome, aucune différence significative n'est observée entre les différents traitements.

Le type de communauté paraît aussi avoir une influence significative uniquement pour Mn, Ni et Co : on constate en effet leur absorption plus faible quand le sol a été stérilisé puis ré-inoculé avec IM1 et IM2 que lorsque l'ensemble de la microflore du sol a été maintenue (sol non stérilisé). Aucune différence significative n'a été observée entre les inoculations soit avec IM1 soit avec IM2. En ce qui concerne le fer, les différences ne sont pas significatives entre les trois traitements dans lesquels les microorganismes du sol ont été conservés ou qui ont reçu l'une des deux communautés bactériennes (P/MT, P/IM1 et P/IM2). Cette mobilisation des éléments et leur transfert dans le maïs sont d'ailleurs sous-estimés puisque les analyses des racines n'ont pas été faites en raison des contaminations par des particules minérales. Toutefois, il faut insister sur l'effet remarquable des microorganismes sur la mobilisation et le transfert de Mn mais aussi Ni et Co.

6.2.2 Distribution des éléments dans les différents compartiments géochimiques

Le fer

Après 8 semaines de culture on constate que la proportion de fer présent dans le compartiment des éléments hydrosolubles (*Hydro*) par rapport au fer total ($\%Fe_{hydro}/Fe_{tot}$) augmente significativement uniquement en présence de plantes (traitements P/MT, PS, P/IM1 et P/IM2) (Figure 6.2a). Le type de microflore présente (microflore totale du sol, communautés IM1 ou IM2) n'a pas d'influence significative sur cette solubilisation du fer. Il n'y a pas de mobilisation significative dans les traitements sans plante par rapport au sol initial.

Dans le compartiment des éléments acidosolubles (*Acido*), la proportion de fer par rapport au fer total a augmenté dans l'ensemble des traitements avec ou sans plante par rapport au sol initial. Cependant, l'ampleur de cette augmentation dépend de la présence ou non de la plante, et du type de microflore. En effet, l'augmentation a été la plus forte lorsque

le substrat de culture a été stérilisé puis ré-inoculé avec IM1 ou IM2 en présence du maïs. L'augmentation la plus faible des quantités relatives de fer dans ce compartiment correspond aux colonnes non plantées (traitements NP/MT et NP/S). Les traitements "support de culture avec microflore totale planté en maïs" (P/MT) et "sol stérilisé" (P/T) ont donné des résultats intermédiaires.

La quantité de fer contenue dans le compartiment des éléments échangeables (*Ech*) a également augmenté, avec des intensités dépendantes du type de traitement. L'augmentation a été maximale dans les traitements "plantés" avec stérilisation du substrat et ré-inoculation par les communautés bactériennes IM1 ou IM2. Dans un deuxième groupe de traitements on note des augmentations dans l'ordre suivant : traitement NP/S, puis $P/S \approx NP/MT$. La plus faible augmentation de la phase échangeable correspond au traitement P/MT.

Le compartiment des oxydes facilement réductibles (*Mn-ox*) a vu sa quantité de fer augmenter de façon significative quel que soit le traitement par rapport au substrat initial. L'augmentation est maximale pour les traitements avec plante en présence ou en absence de la microflore totale (traitements P/MT et P/S). L'augmentation la plus faible correspond au traitement "sol non planté stérile" (NP/S) et inoculé par une des deux communautés (P/IM2). En ce qui concerne les communautés IM1 et IM2, l'augmentation de la quantité de fer dans ce compartiment est la plus forte dans le cas de l'inoculation de IM1. On observe un effet "plante" qui favoriserait la répartition du fer vers ce compartiment facilement réductible.

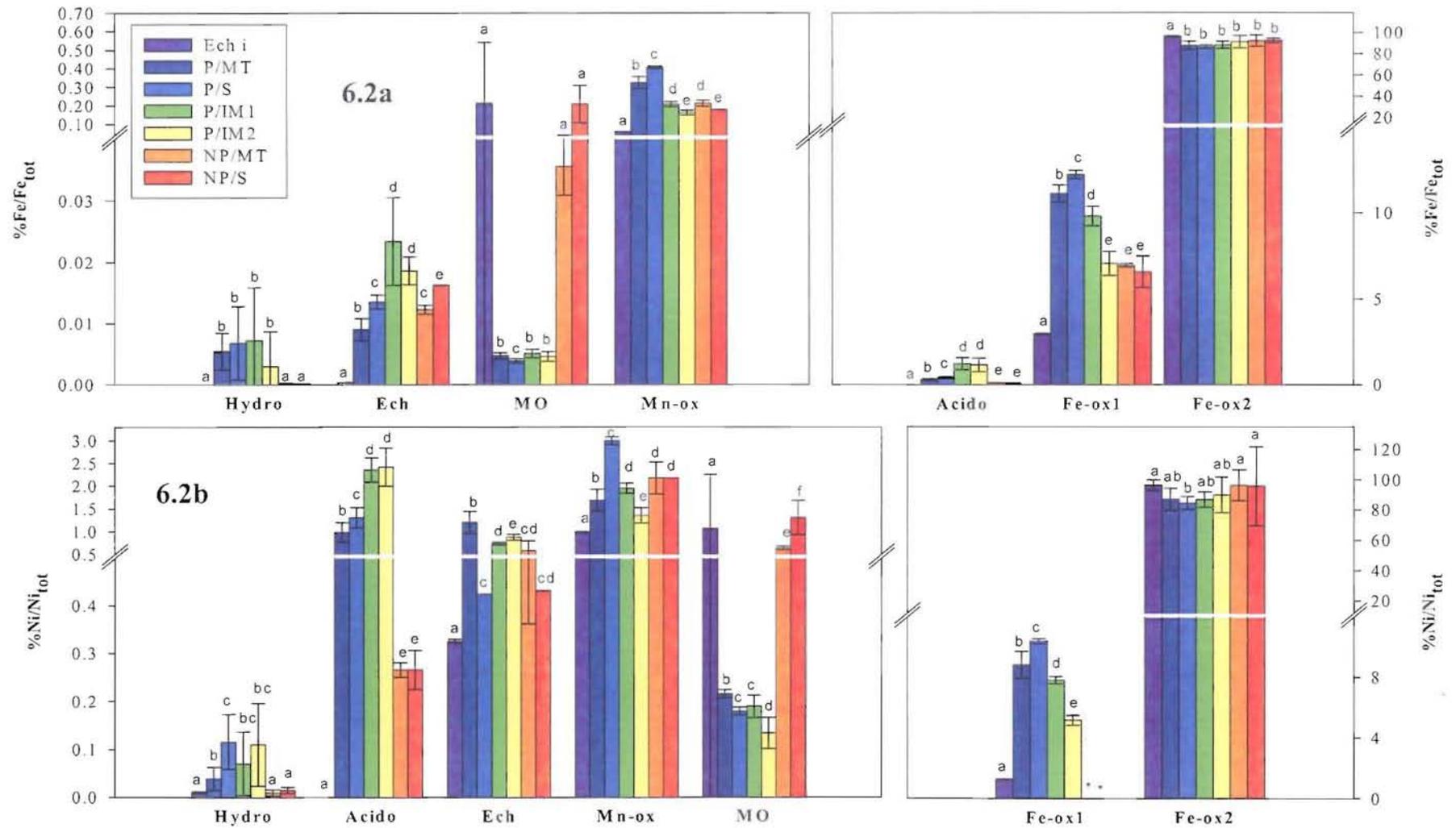


Figure 6.2. Répartition de Fe (6.2a) et Ni (6.2b) dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux des échantillons de sol avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs (* non déterminé), les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer éléments par éléments, et séparément pour chaque compartiment minéral et organo-minéral.

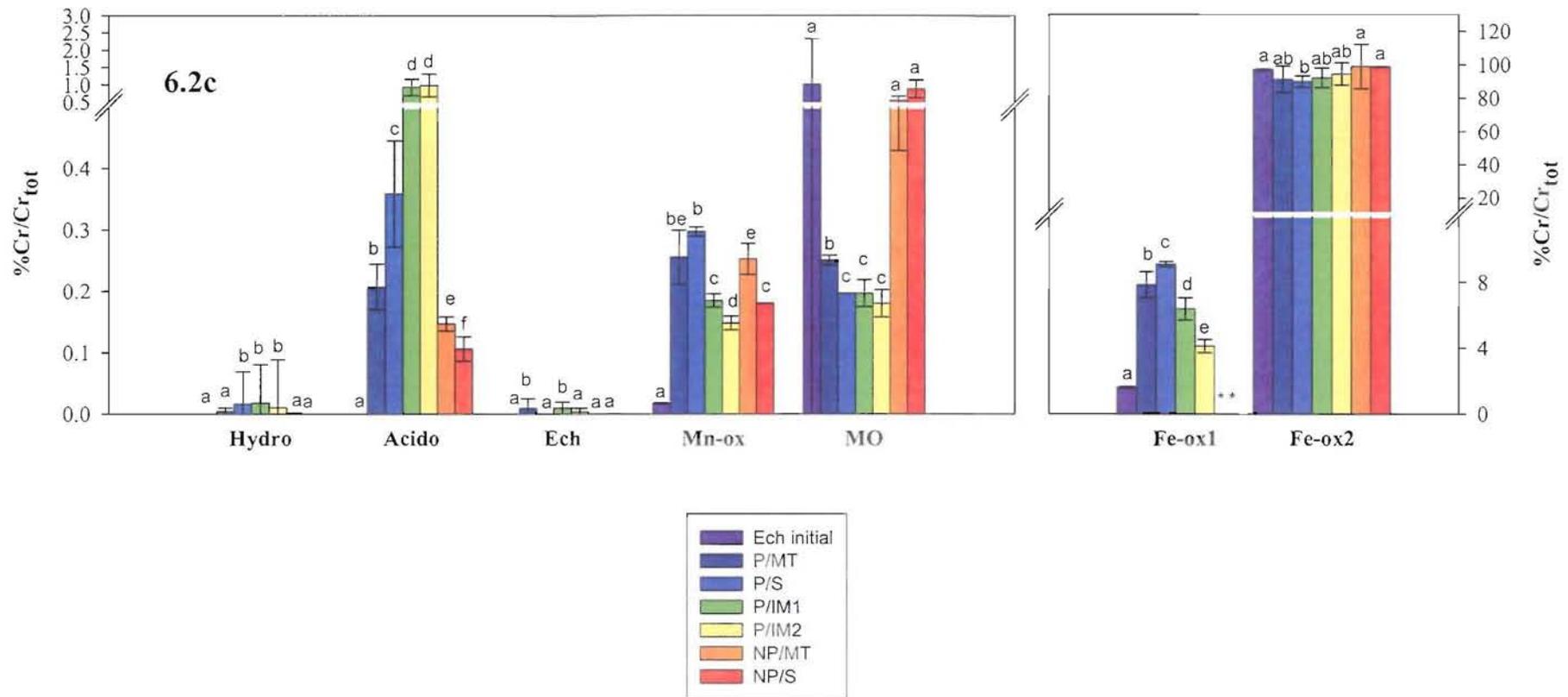


Figure 6.2c. Répartition de Cr dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux des échantillons de sol avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs (* non déterminé) ; les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer éléments par éléments, et séparément pour chaque compartiment minéral et organo-minéral.

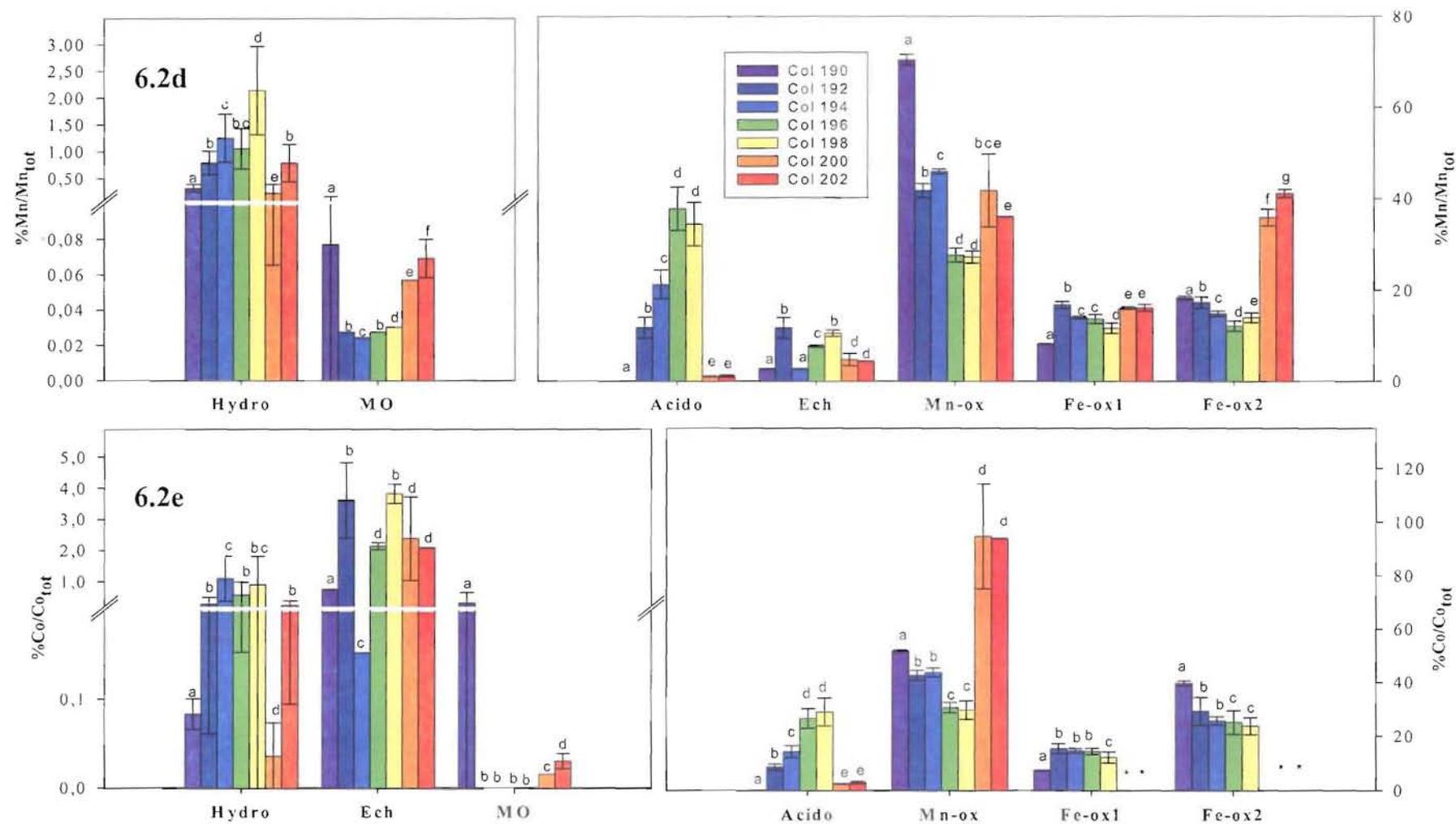


Figure 6.2. Répartition de Mn (6.2d) et Co (6.2e) dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux des échantillons de sol avant (témoin) et après incubation du substrat planté ou non de maïs (* non déterminé), les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer éléments par éléments, et séparément pour chaque compartiment minéral et organo-minéral.

La quantité de fer lié aux oxyhydroxydes de fer peu cristallisés (*Fe-ox1*) augmente de façon significative quel que soit le traitement. L'augmentation est maximale pour le traitement avec maïs cultivé sur sol stérilisé (P/S), puis pour les traitements avec maïs cultivé avec sa microflore (P/MT) ou une communauté bactérienne ré-inoculée (P/IM1). L'augmentation est la plus faible pour les traitements P/IM2 et les traitements "non plantés" (NP/MT et NP/S).

La quantité de fer lié aux oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*) diminue quel que soit le traitement expérimental par rapport au sol initial, sans qu'il y ait de différence significative entre les différents traitements.

Enfin, la quantité de fer contenue dans le compartiment des matières organiques diminue significativement uniquement dans les systèmes plantés, avec une diminution maximale significative pour le traitement P/S (maïs cultivé sur sol stérile).

La culture de plante (maïs) et de microorganismes contribue donc à diminuer les quantités de fer présent dans le compartiment des oxydes bien cristallisés et des matières organiques. Dans les autres compartiments géochimiques, il y a en général une augmentation qui est sous la dépendance soit de l'effet "plante" (e.g. *Mn-ox*) soit de l'effet "microorganismes et plante" (e.g. *Acido* et *Ech*).

Le Nickel

Le nickel a évolué dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux du sol de manière voisine de celle du fer (Figure 6.2b). On constate que la présence de plante avec ou sans microorganismes associés aux racines entraîne une augmentation de la quantité de Ni présent dans le compartiment dit "hydrosoluble" et le compartiment dit "échangeable". La présence de microorganismes accroît cette redistribution.

Pour le compartiment acidosoluble on constate aussi un effet "plante", mais cet effet "rhizosphère" est significativement amélioré par la présence de communautés inoculées qui apparaît aussi pour le nickel présent dans le compartiment dit "oxydes de fer peu cristallisés" (*Fe-ox1*).

La quantité de Ni présent dans le compartiment associé aux matières organiques diminue significativement pour l'ensemble des traitements avec plante, qu'il y ait ou non des microorganismes présents ou inoculés.

La différence la plus notable se situe au niveau du compartiment des éléments liés aux oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*). La quantité de nickel dans ce compartiment diminue significativement dans les systèmes plantés P/MT, P/S et P/IM1 et sans qu'il y ait de

différence significative entre ces traitements, mais pas dans les systèmes non plantés. Dans le traitement P/IM2 la dispersion des résultats ne permet pas de noter d'effet significatif.

Le chrome

De même que le nickel, le chrome présente une évolution de sa répartition entre les différents compartiments minéraux et organo-minéraux très proche de celle du fer (Figure 6.2c). La culture du maïs entraîne une augmentation significative du Cr dans les phases hydrosoluble (*Hydro*) et "acidosoluble" (*Acido*) et la phase des oxydes mal cristallisés (*Fe-ox1*). L'inoculation par les communautés bactériennes IM1 et IM2 accroît très significativement les quantités de Cr présent dans la phase "acido-soluble". Pour le compartiment associé aux matières organiques, on observe une diminution des quantités de Cr dans tous les traitements avec culture de plante. Les différences les plus notables avec les changements de répartition du fer se situent au niveau du compartiment des éléments échangeables (*Ech*) et liés aux oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*). La quantité de chrome n'augmente significativement dans le compartiment *Ech* que pour les traitements P/MT et P/IM1. En ce qui concerne le compartiment *Fe-ox2*, la quantité de chrome n'y diminue de façon significative par rapport à l'échantillon initial que pour le traitement P/S et les différences entre tous les autres traitements ne sont pas significatives.

L'effet "rhizosphère" de plante non inoculée sans microflore du sol est très marqué pour les compartiments *Mn-ox*, *Fe-ox1* et *Fe-ox2*, avec un accroissement du Cr dans les deux premiers et une diminution dans le troisième de ces compartiments.

Le manganèse

Par rapport au manganèse total et à sa répartition dans le substrat initial, la proportion de manganèse (%Mn/Mn_{tot}) augmente dans le compartiment des éléments hydrosolubles pour tous les traitements sauf pour le traitement "non planté incubé avec sa microflore totale" (NP/MT) où cette proportion diminue (Figure 6.2d). Dans ce compartiment, l'augmentation la plus forte a été observée dans le traitement "planté et inoculé par la communauté bactérienne IM2 (P/IM2)", et la plus faible pour les traitements "planté avec microflore totale du sol (P/MT)" et "non planté stérile (NP/S)". En absence ou en présence de maïs, l'augmentation de Mn lié à ce compartiment est plus importante dans le sol préalablement stérilisé (S) qu'en présence de la microflore totale (MT). Dans les colonnes de sol plantées en maïs, la stérilisation et ré-inoculation du substrat (sol + sable) par la communauté bactérienne IM1 n'a pas d'effet significatif sur la solubilisation du manganèse par rapport aux traitements planté

avec microflore totale (P/MT) et planté stérile (P/S), alors que la ré-inoculation avec IM2 augmente de façon significative la quantité de Mn hydrosoluble.

La quantité de manganèse liée au compartiment acidosoluble augmente quel que soit le traitement appliqué. Cette augmentation est relativement faible en absence de plante par rapport à l'augmentation considérable dans les traitements où le sol stérilisé a été ré-inoculé par les communautés IM1 ou IM2. Aucune différence significative n'a été observée entre les effets de ces deux communautés bactériennes. Enfin, en présence de maïs, l'augmentation de Mn dans ce compartiment est plus importante quand le substrat a été stérilisé (P/S) qu'en présence de la microflore totale (P/MT). La présence ou l'absence de microflore au sein du système non planté n'entraîne aucune différence significative entre ces deux traitements en ce qui concerne la quantité de manganèse dans ce compartiment.

La quantité de Mn liée au compartiment échangeable (*Ech*) augmente dans tous les traitements sauf suite à une stérilisation totale du substrat (sol + sable) planté en maïs (P/S) où la proportion de Mn par rapport au Mn total est restée stable. L'augmentation la plus faible de Mn dans ce compartiment correspond aux traitements non plantés (NP/MT et NP/S) et la plus forte aux traitements P/MT et P/IM2. Le traitement P/IM1 favorise une augmentation de Mn dans ce compartiment, inférieure à celle observée dans ces deux traitements précédents.

La quantité de Mn liée au compartiment des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) diminue pour à tous les traitements, avec un maximum observé pour le sol stérilisé cultivé en maïs et ré-inoculé avec les communautés IM1 et IM2. Pour le substrat de culture planté cette diminution est la plus faible en absence totale de microflore (sol stérile, P/S). Une forte mobilisation de Mn est observée par un effet de la microflore.

Dans le compartiment *Fe-ox1* la proportion de Mn par rapport au Mn total augmente pour tous les traitements par rapport à sa répartition dans l'échantillon initial. Cette augmentation est la plus faible dans le traitement P/IM2 et maximale dans le traitement P/MT. La stérilisation du sol et son inoculation par IM1 en présence de culture de maïs augmente plus la quantité de Mn dans ce compartiment que l'inoculation par la communauté IM2. En présence du maïs, l'augmentation des quantités de Mn dans ce compartiment est la plus importante en présence de la microflore totale. Aucune différence significative n'est observée entre les traitements "sol non planté et incubé avec microflore totale" et "sol non planté stérilisé".

Dans le compartiment *Fe-ox2* des oxydes de fer bien cristallisés, on observe que la proportion de Mn par rapport au Mn total augmente très significativement en absence de plante par rapport à l'échantillon de substrat initial (Figure 6.2). L'augmentation la plus forte

est observée dans le sol stérilisé (NP/S). Dans les traitements "plantés", cette quantité relative de Mn diminue. Les diminutions de la quantité de Mn liée à ce compartiment sont croissantes dans l'ordre des traitements suivant : P/MT, P/S, P/IM2 et P/IM1.

Enfin, la quantité de Mn lié au compartiment des MO diminue dans tous les traitements par rapport à l'échantillon initial. La diminution est plus importante dans le cas des traitements "plantés" que dans les "non plantés". La baisse la plus faible correspond au traitement où le sol est préalablement stérilisé et non planté (NP/S).

Pour le manganèse comme pour les autres éléments un effet rhizosphère des plantes est constaté, qui augmente (1) les quantités de Mn hydrosoluble avec des effets variables de la présence de microorganismes, (2) les quantités d'éléments acidosolubles qui sont fortement stimulées par l'inoculation des communautés bactériennes IM1 et IM2, (3) les quantités liées aux compartiments échangeables en présence de microflore (autochtone ou ré-inoculée). En revanche, on note une forte diminution de Mn dans le compartiment *Fe-ox2* des oxydes bien cristallisés sous l'effet de la plante accentué par la présence de microorganismes.

Une partie importante de Mn en absence de plante se redistribue dans le compartiment *Fe-ox2* qu'il y ait ou non stérilisation préalable du sol. Ce transfert s'effectuerait au détriment de la phase Mn-ox. En revanche en présence de plante c'est le compartiment "acidosoluble" qui s'enrichit considérablement.

Le cobalt

La quantité de cobalt évolue dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux d'une manière présentant des similitudes avec le manganèse (Figure 6.2e). La principale différence se situe dans le compartiment *Fe-ox1* où la quantité de cobalt augmente pour tous les traitements sans qu'il y ait de différence significative entre ces traitements, à l'exception du traitement P/IM2 où l'augmentation est plus faible que dans les autres traitements.

Il faut souligner l'augmentation relativement importante des quantités de Co dans les phases "hydrosolubles", "échangeables" et "acidosolubles" sous l'effet de la rhizosphère associée ou non aux communautés bactériennes du sol que le sol ait été stérilisé ou non sauf pour la fraction échangeable du sol stérilisé mais planté en maïs. Une diminution relative des quantités de Co est observée dans la phase *Mn-ox* des traitements plantés qui est plus importante suite à une stérilisation et ré-inoculation avec les communautés IM1 et IM2. Par contre la quantité de Co augmente de façon très importante dans ce compartiment pour les

traitements en absence de plantes (NP/MT et NP/S). Le phénomène est le même dans le compartiment *Fe-ox2*, où la quantité relative de Co diminue fortement en présence de plante.

6.2.3 Evolution du pH et du Eh des supports de culture

Le pH et le Eh des échantillons de sols rhizosphériques des pots plantés et des échantillons de sol des pots non plantés ont été mesurés après 8 semaines de culture. En ce qui concerne les pH, les résultats présentés dans le Tableau 6.2 n'indiquent aucune différence significative entre le début et la fin des cultures, et ce quel que soit le traitement appliqué (planté, non planté, présence de la microflore totale, stérilisation puis ré-inoculation de communautés bactériennes isolées pour leur capacité à réduire et dissoudre Fe et Mn des oxydes).

Tableau 6.2. Evolution du pH et du Eh (mV) dans les colonnes de substrats (sol + sable) en fonction des traitements. Les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer séparément pour les pH et pour les Eh

Sols non plantés				
	<i>pH initial</i>	<i>pH final</i>	<i>Eh initial</i>	<i>Eh final</i>
			<i>(mV)</i>	
NP/MT	5,8 ± 0,3 (a)	5,9 ± 0,3 (a)	302 ± 4 (a)	294 ± 2 (b)
NP/S	5,8 ± 0,3 (a)	5,9 ± 0,3 (a)	303 ± 3 (a)	299 ± 2 (a)
Sols plantés				
	<i>pH initial</i>	<i>pH final</i>	<i>Eh initial</i>	<i>Eh final</i>
			<i>(mV)</i>	
P/MT	5,8 ± 0,3 (a)	5,9 ± 0,3 (a)	302 ± 3 (a)	278 ± 3 (c)
P/S	5,8 ± 0,3 (a)	5,9 ± 0,3 (a)	304 ± 3 (a)	297 ± 3 (b)
P/IM1	5,8 ± 0,3 (a)	5,9 ± 0,3 (a)	304 ± 2 (a)	277 ± 2 (c)
P/IM2	5,8 ± 0,3 (a)	5,9 ± 0,3 (a)	301 ± 4 (a)	279 ± 3 (c)

Les valeurs du Eh évoluent significativement dans les dispositifs avec culture de plante alors que ces évolutions sont moins marquées ou pas significatives (Tableau 6.2) dans les systèmes non plantés. En effet, alors que la baisse du Eh est faible dans les traitements non

plantés en présence de la microflore totale (traitement NP/MT, -8 ± 6 mV) et dans le traitement planté stérile (P/ST, -7 ± 6 mV), elle est beaucoup plus prononcée en présence de la plante associée à une microflore (-22 ± 7 à -27 ± 4 mV pour les traitements P/MT, P/IM1 et P/IM2). Cette diminution peu marquée des valeurs du Eh peut être indicatrice d'une activité microbienne rhizosphérique. Ces différences de Eh peuvent être aussi contrôlées par la présence de fer réduit échangeable ou acidosoluble libéré dans le milieu.

6.2.4 Dénombrements bactériens

Tableau 6.3. Nombre de bactéries rhizosphériques cultivables (déterminé par la méthode MPN) par gramme de sol sec en fin de culture. Entre parenthèses : les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test *t* de Student, risque de 5%).

Traitement		Types de communautés	Nombre de bactéries / g de sol sec
Sol rhizosphérique	P/MT	Fe-réductrices ⁽³⁾	$3,7.10^4 \pm 8,5.10^3$ (b)
		Mn-réductrices ⁽¹⁾	$1,9.10^4 \pm 4,2.10^3$ (c)
	P/IM1	Fe-réductrices ⁽¹⁾	$5,9.10^4 \pm 3,7.10^4$ (b)
	P/IM2	Mn-réductrices ⁽¹⁾	$1,8.10^5 \pm 2,5.10^5$ (bc)
	P/S	Fe-réductrices ⁽⁴⁾	$0,0 \pm 0,0$ (a)
		Mn-réductrices ⁽²⁾	$0,0 \pm 0,0$ (a)
Microflore totale aérobie ⁽⁵⁾		$0,0 \pm 0,0$ (a)	
Microflore totale anaérobie ⁽³⁾		$0,0 \pm 0,0$ (a)	
Sol non planté	NP/MT	Fe-réductrices ⁽¹⁾	$3,49.10^4 \pm 6,3.10^3$ (b)
		Mn-réductrices ⁽²⁾	$1,79.10^4 \pm 1,0.10^3$ (c)
	NP/S	Fe-réductrices ⁽³⁾	$0,0 \pm 0,0$ (a)
		Mn-réductrices ⁽³⁾	$0,0 \pm 0,0$ (a)
		Microflore totale aérobie ⁽³⁾	$0,0 \pm 0,0$ (a)
		Microflore totale anaérobie ⁽³⁾	$0,0 \pm 0,0$ (a)

Des contrôles microbiologiques en fin d'expérience ont bien montré l'absence de microorganismes cultivables dans les traitements effectués sur des sols stérilisés.

⁽³⁾ Dénombrement sur milieu Br en anaérobiose

⁽⁴⁾ Test en boîtes de Pétri sur milieu Br en anaérobiose

⁽⁵⁾ Test en boîtes de Pétri sur milieu Rh

Après 8 semaines de culture du maïs sur le substrat composé de 90% de sable et de 10% d'échantillon de terre OUE 4.2, diverses communautés microbiennes ferri- et mangani-réductrices ont été dénombrées dans l'ensemble des traitements avec microorganismes. Les résultats figurent dans le Tableau 6.3. Lorsque la totalité de la microflore du sol est utilisée dans les expériences, les bactéries ferri-réductrices sont significativement plus nombreuses en fin de culture que les mangani-réductrices. Par contre la stérilisation et ré-inoculation avec les communautés IM1 et IM2 n'a pas d'effet significatif sur le nombre de bactéries dénombrables. Le nombre de bactéries ferri-réductrices de la communauté IM1 n'est pas significativement différent du nombre de celles observées dans les pots ayant conservé leur microflore totale.

Enfin, la stérilisation et ré-inoculation avec la communauté IM2 n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de bactéries dénombrables, même si une légère tendance à l'augmentation est perceptible. Enfin, le nombre de bactéries ferri- et mangani-réductrices cultivables dans les pots non plantés (sol non rhizosphérique) n'est pas significativement différent du nombre de bactéries du même type du sol rhizosphérique.

6.3 Discussion-Conclusion

Les résultats de cette expérience ont mis en évidence une influence très significativement favorable de la microflore du sol ou de communautés bactériennes isolées de la rhizosphère pour leur capacité à réduire et dissoudre les oxydes de fer et de manganèse sur la croissance du maïs. Ces communautés microbiennes globales ou bactériennes spécifiques ont un effet stimulant sur la mobilisation et l'absorption des métaux Fe, Mn, Ni et Co par la plante. De tels effets des bactéries isolées de la rhizosphère ou de microflores rhizosphériques globales avaient déjà été observés dans des expériences étudiant l'altération de phosphates ou de silicates et le transfert de certains éléments (P, K) à la plante (Berthelin & Leyval, 1982 ; Laheurte & Berthelin, 1988). Dans les conditions expérimentales adoptées pour ces travaux, la mobilisation et l'absorption des métaux ne sont pas seulement dues à un effet indirect lié à l'augmentation de la croissance mais il y a bien une mobilisation supplémentaire des éléments minéraux sous l'effet des communautés microbiennes (MT) et bactériennes présentes (IM1 et IM2) et donc sur l'altération des oxyhydroxydes de fer et de manganèse et sur la mobilité des éléments qui leur sont associés. En effet, la stimulation de croissance est aussi accompagnée non seulement d'une augmentation de la minéralo-masse

des végétaux mais aussi de la teneur. La rhizosphère et ses microorganismes ont aussi un effet marqué sur les changements (diminution) du potentiel redox.

L'absence totale de microflore au sein du substrat de culture (traitement P/S) n'est pas favorable à une bonne croissance de la plante. De plus, la présence d'une communauté spécifique de type ferri-réductrice principalement (IM1) ou plutôt mangani-réductrice (IM2) est moins favorable à la croissance de la plante que la microflore "totale" du sol (P/MT). La faible croissance des plantes en milieu stérile est couplée à une plus faible concentration en métaux dans les parties aériennes de ces plantes par rapport à celles cultivées en présence d'une microflore (Tableau 6.1), y compris en Ni qui est présent en quantités considérées comme supérieures au seuil toxique de 12 µg/g fixé par L'Huillier (1994). Le fer, élément essentiel à la croissance des plantes, et le chrome sont présents en concentrations équivalentes dans les parties aériennes des plantes cultivées en présence de la microflore totale du sol ou en présence des communautés IM1 ou IM2 uniquement. Mn, Ni et Co sont présents en plus faibles concentrations en présence des communautés IM1 et IM2 uniquement par rapport à une culture en présence de la microflore totale.

En fait, les microorganismes modifient le facteur de transfert des éléments à la plante. Ce facteur F_t correspond à la concentration de l'élément prélevé par la plante par rapport à sa concentration dans le sol (Deneux *et al.*, 2003) :

$$F_t = \frac{C_{\text{plante}}}{C_{\text{sol}}}$$

Les facteurs de transfert sont les plus faibles en absence de microorganismes (traitement P/S) pour Fe, Mn, Ni et Co et sont égaux respectivement à 0,0014, 0,4309, 0,0315 et 0,0861. Mn est ainsi l'élément le plus transféré à la plante par rapport à sa concentration dans le sol. La présence de microorganismes augmente les facteurs de transferts qui sont alors égaux à 0,002, 0,749, 0,049 et 0,244 respectivement pour Fe, Mn, Ni et Co en présence de la microflore totale du sol (traitement P/MT). La stérilisation du support de culture suivie d'une réinoculation par la communauté bactérienne IM1 (traitement P/IM1) entraîne une modification du facteur de transfert des éléments identique à celle faisant suite à une réinoculation avec la communauté IM2 (traitement P/IM2) pour tous les éléments. Ces réinoculations ont un effet équivalent à celui du traitement avec présence de la microflore totale du sol sur le F_t du fer. Pour Mn, Ni et Co, ces réinoculations entraînent une augmentation du F_t plus faible qu'avec la présence de la microflore totale, avec des valeurs

respectives de 0,546, 0,042 et 0,144. Les microorganismes ont donc un effet sur les F_t qui dépend de l'élément.

Les différences de croissance entre traitements peuvent impliquer ces différences de teneurs en éléments minéraux en traces, mais peuvent sans doute impliquer d'autres phénomènes, comme la biodisponibilité et l'absorption d'autres éléments non dosés ici comme K, Ca, Mg et peut être aussi par des effets de type hormonaux qui impliqueraient des communautés de la microflore totale du sol, et éventuellement les communautés IM1 et IM2 qui dans ce cas paraissent moins efficaces. Les contrôles des teneurs en P des parties aériennes montrent des teneurs constantes de 10 à 12 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS pour l'ensemble des traitements, qui suggèrent que cet élément est peu impliqué dans les différences de croissance observées.

La présence ou non de plante, ainsi que la présence ou non d'une microflore plus ou moins spécifique n'a eu aucune influence sur le pH du substrat de culture (sol rhizosphérique expérimental), alors qu'une acidification du sol rhizosphérique a souvent été observée (Bertrand & Hinsinger 2000). L'effet tampon de la solution nutritive ajustée à pH 6,2 a pu limiter l'acidification du substrat, mais la production de protons et d'acides a pu être aussi limitée. Enfin la réduction du fer et du manganèse consommatrice de protons peut aussi intervenir.

En ce qui concerne l'évolution du potentiel redox, les résultats (Tableau 6.2) ont montré une diminution significative de sa valeur pour tous les traitements sauf en absence de plante et de microflore (sol seul stérilisé) (NP/S). Il est à noter que les valeurs des Eh ne peuvent être considérées comme estimation précise du potentiel redox dans le cas présent, car elles sont mesurées à partir des solutions de sol diluées (rapport sol/solution de 1/2,5). Les résultats ne sont considérés ici que pour comparer les traitements entre eux. La diminution du Eh est équivalente pour les traitements NP/MT et P/S, et plus faible pour ces traitements que pour les traitements "plantés-inoculés" P/MT, P/IM1 et P/IM2. La présence de la microflore totale (complexe) du sol et/ou de la plante contribue donc à une diminution équivalente du Eh alors que les processus impliqués peuvent être différents. La plante peut provoquer seule une diminution du Eh par déficit d'oxygène dans la zone racinaire suite à son transfert vers les parties aériennes (Dommergues & Mangenot 1970). Le maïs est une plante de stratégie II produisant des phytosidérophores (Bertrand & Hinsinger 2000, Marschner 1986). Par ailleurs la littérature n'a jamais signalé une activité réductasique dans la rhizosphère du maïs. Les microorganismes peuvent également contribuer à la diminution des valeurs du potentiel redox

suite à leur consommation de l'oxygène et/ou la réduction du fer lors des phénomènes de respiration anaérobie (Schröder *et al.* 2003) ou de fermentations (Berthelin 1982, Bousserhine *et al.* 1999). Les résultats de cette expérience montre en outre que l'association de ces deux paramètres (rhizosphère et communauté bactérienne rhizosphérique) permet une décroissance encore plus marquée du potentiel redox. La teneur, la diversité et la biodisponibilité des matières organiques apportées par les racines a pu permettre une plus grande activité mangani- et ferri-réductrice des bactéries mais ne semble pas avoir favorisé le développement de bactéries dénombrables par les milieux choisis. En effet, la rhizosphère n'a eu aucun effet significatif sur le nombre de bactéries ferri-et mangani-réductrices par rapport à un sol non rhizosphérique (Tableau 6.2).

La répartition des éléments métalliques dans les différents compartiments minéraux et organo-minéraux est elle aussi influencée par la présence et le type de communautés microbiennes, totales ou plus spécifiques, présentes ou introduites dans les systèmes de culture. Comme montré dans le chapitre 4, deux groupes d'éléments sont à distinguer : Fe, Ni et Cr d'une part, Mn et Co d'autre part. Ces groupes correspondent à la répartition initiale des éléments dans les différentes phases minérales du sol : Fe, Ni et Cr sont majoritairement liés aux oxydes de fer et Mn et Co aux oxydes très facilement réductibles du type des oxydes de Mn (Quantin *et al.* 2002). Les tableaux 6.4 à 6.8, qui représentent les redistributions de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différents compartiments géochimiques par rapport à un échantillon de sol non traité (appelé "sol initial") en gramme d'élément redistribué pour 100g d'élément total, mettent en évidence l'influence des traitements appliqués sur les mobilisations d'éléments.

Les résultats soulignent une altération des oxydes de fer et de manganèse qui se traduit par une diminution des quantités de Fe difficilement réductible (*Fe-ox2*) dans tous les traitements expérimentaux (Tableau 6.4), ainsi qu'une diminution des quantités de manganèse dans le compartiment *Mn-ox* pour tous les traitements (Tableau 6.5). Cette altération des oxydes de fer et de manganèse correspond (1) à une dissolution de Fe et à sa redistribution dans les compartiments géochimiques où il sera plus disponible (compartiments *Fe-ox1*, *Mn-ox*, *Acido*, *Ech* et *Hydro*) et (2) à une dissolution de Mn et à sa redistribution vers des compartiments géochimiques où il sera soit plus disponible (compartiments *Hydro*, *Acido*, *Ech*) soit moins disponible (*Fe-ox1*, voire *Fe-ox2* dans les traitements non plantés). Il y a aussi lieu de noter que le compartiment lié aux matières organiques (*MO*) perd du fer, du manganèse, du chrome, du nickel et du cobalt (Tableaux 6.4 à 6.8) sous l'influence de la

rhizosphère du maïs associé ou non à des communautés microbiennes. Le tableau 6.4 indique aussi que le départ de fer depuis les oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*) est plus important en présence de plante, et que la quasi-totalité de ce fer est redistribué vers le compartiment des oxydes de fer peu cristallisés (*Fe-ox1*) sauf dans le cas d'une stérilisation du substrat de culture suivie d'une réinoculation par les communautés microbiennes IM1 et IM2 où une part relativement importante est exportée vers la phase acidosoluble. En ce qui concerne Ni et Cr (Tableaux 6.6 et 6.7) les tendances sont similaires. En présence de plante, la stérilisation du substrat de culture et sa réinoculation par les communautés microbiennes IM1 et IM2 entraînent un départ de ces éléments moins important que dans le cas d'une stérilisation totale ou qu'en présence de la microflore totale du sol, mais une exportation plus importante vers les phases les plus disponibles comme la phase acidosoluble.

Le tableau 6.5 montre que par rapport au sol non traité, la mobilisation et le transfert de Mn se fait principalement depuis les oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) de manière équivalente entre les différents traitements sauf en présence des communautés IM1 et IM2 où la perte en Mn du compartiment *Mn-ox* est nettement plus prononcée et atteint le double. La présence de la plante au sein des systèmes favorise une mobilisation et un transfert de Mn également depuis la phase *Fe-ox2*, alors qu'en absence de plante c'est un apport de Mn qui se produit dans ce compartiment. Ceci correspond à une immobilisation plus forte pour une partie du manganèse. Ces résultats soulignent bien que les interactions "matières organiques – microorganismes – minéraux" favorisent l'évolution vers des formes plus disponibles par des processus abiotiques mais surtout biotiques, faisant, dans ce dernier cas, intervenir l'activité racinaire et l'activité des microorganismes associés (ferri- et mangani-réduction, biodégradation des MO). L'effet rhizosphère améliore nettement cette mobilité et ce transfert vers des formes biodisponibles et enfin des "associations" ou "communautés bactériennes" isolées pour leur capacité à réduire et dissoudre les oxydes de fer et de manganèse ont un effet particulièrement stimulant.

Un bilan d'altération qui cumule les redistributions des éléments vers les phases plus disponibles (transfert aux plantes, phases *Hydro*, *Acido*, *Ech*) (Tableaux 6.9 à 6.13) souligne l'effet rhizosphérique lié à la plante et à la présence de microorganismes associés. Ainsi, par rapport à l'échantillon initial, l'augmentation la plus faible de la quantité d'éléments (Fe, Mn, Ni, Cr, Co) de cette fraction disponible par colonne de substrat de culture correspond aux colonnes "non plantées" (NP), sans qu'il y ait de différence significative entre les colonnes préalablement stérilisées et les colonnes ayant conservées leur microflore totale (NP/MT et NP/S).

Pour les colonnes "plantées" (P), aucune différence significative n'a été observée entre les colonnes "stériles", c'est-à-dire avec plante seule, et les colonnes avec la microflore totale du substrat de culture conservée, sauf en ce qui concerne le fer : la quantité de fer dans les phases les plus labiles est plus importante en absence (P/S) qu'en présence de la microflore totale (P/MT). Pour tous les éléments, la stérilisation puis la ré-inoculation par les communautés IM1 et IM2 a favorisé de façon très significative l'augmentation de la quantité d'éléments dans les phases les plus disponibles par rapport aux colonnes plantées ayant conservé leur microflore totale. Ces communautés bactériennes ne présentant pas un plus grand nombre de bactéries cultivables ferri- et mangani-réductrices que la microflore totale apportée par le sol (Tableau 6.3), ont manifesté une activité d'altération bien plus forte. Ce résultat suggère que ces communautés ont pu coloniser facilement le sol préalablement stérilisé et exprimer une activité réductrice plus marquée. Une étude plus précise de ces communautés s'impose pour mieux définir les populations présentes, leur dynamique et leur activité.

Tableau 6.4 Evolution de la quantité de Fe dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de fer redistribué pour 100g de fer total présent dans le substrat, par rapport à l'échantillon initial (non traité) (Indices de redistribution I_r).

	P/MT	P/S	P/IM1	P/IM2	NP/MT	NP/S
Hydro	+ 5,3.10 ⁻³	+ 6,6.10 ⁻³	+ 7,1.10 ⁻³	+ 2,9.10 ⁻³	+ 2,0.10 ⁻⁵	+ 2,0.10 ⁻⁵
Acido	+ 2,9.10 ⁻¹	+ 4,0.10 ⁻¹	+ 1,2	+ 1,2	+ 1,0.10 ⁻¹	+ 8,6.10 ⁻²
Ech	+ 8,7.10 ⁻³	+ 1,3.10 ⁻²	+ 2,3.10 ⁻²	+ 1,8.10 ⁻²	+ 1,2.10 ⁻²	+ 1,6.10 ⁻²
Mn-ox	+ 2,6.10 ⁻¹	+ 3,5.10 ⁻¹	+ 1,5.10 ⁻¹	+ 1,0.10 ⁻¹	+ 1,5.10 ⁻¹	+ 1,2.10 ⁻²
Fe-ox1	+ 8,2	+ 9,23	+ 6,9	+ 4,1	+ 4,0	+ 3,6
Fe-ox2	- 8,5	- 9,8	- 8,1	- 5,2	- 4,1	- 3,8
MO	- 2,1.10 ⁻¹	- 2,1.10 ⁻¹	- 2,1.10 ⁻¹	- 2,1.10 ⁻¹	- 1,8.10 ⁻¹	- 4,7.10 ⁻³

Tableau 6.5 Evolution de la quantité de Mn dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Mn redistribué pour 100g de Mn total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (non traité) (Indices de redistribution I_i).

	P/MT	P/S	P/IM1	P/IM2	NP/MT	NP/S
Hydro	+ 4,7.10 ⁻¹	+ 9,3.10 ⁻¹	+ 7,3.10 ⁻²	+ 1,8	- 9,4.10 ⁻²	+ 4,7.10 ⁻¹
Acido	+ 11,7	+ 21,2	+ 37,8	+ 34,4	+ 1,1	+ 1,16
Ech	+ 9,0	+ 3,8.10 ⁻²	+ 5,0	+ 7,9	+ 2,1	+ 1,8
Mn-ox	- 28,7	- 24,5	- 42,7	- 43,2	- 28,7	- 34,3
Fe-ox1	+ 8,5	+ 5,8	+ 5,5	+ 3,4	+ 7,9	+ 8,0
Fe-ox2	- 1,0	- 3,5	- 6,2	- 4,3	+ 17,6	+ 22,9
MO	- 8,0.10 ⁻²	- 5,3.10 ⁻²	- 5,0.10 ⁻²	- 4,7.10 ⁻²	- 2,0.10 ⁻²	- 7,9.10 ⁻³

Tableau 6.6 Evolution de la quantité de Ni dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Ni redistribué pour 100g de Ni total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (non traité) (Indices de redistribution I_i).

	P/MT	P/S	P/IM1	P/IM2	NP/MT	NP/S
Hydro	+ 2,9.10 ⁻²	+ 1,1.10 ⁻¹	+ 6,0.10 ⁻²	+ 1,0.10 ⁻¹	- 5,0.10 ⁻⁴	+ 5,2.10 ⁻³
Acido	+ 9,9.10 ⁻¹	+ 1,3	+ 2,4	+ 2,4	+ 2,7.10 ⁻¹	+ 2,7.10 ⁻¹
Ech	+ 8,8.10 ⁻¹	+ 1,0.10 ⁻²	+ 4,1.10 ⁻¹	+ 5,5.10 ⁻¹	+ 2,6.10 ⁻¹	+ 1,1.10 ⁻¹
Mn-ox	+ 7,0.10 ⁻¹	+ 2,0	+ 9,6.10 ⁻¹	+ 3,7.10 ⁻¹	+ 1,2	+ 1,2
Fe-ox1	+ 7,5	+ 9,1	+ 6,5	+ 3,9	nd	nd
Fe-ox2	- 9,3	- 11,8	- 9,5	- 6,4	- 2,4.10 ⁻²	- 5,6.10 ⁻¹
MO	- 8,5.10 ⁻¹	- 8,9.10 ⁻¹	- 8,8.10 ⁻¹	- 9,3.10 ⁻¹	- 4,3.10 ⁻¹	+ 2,5.10 ⁻¹

Tableau 6.7 Evolution de la quantité de Cr dans les compartiments organo-minéraux, en gramme de Cr redistribué pour 100g de Cr total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (non traité) (Indices de redistribution I_i).

	P/MT	P/S	P/IM1	P/IM2	NP/MT	NP/S
Hydro	+ 4,0.10 ⁻³	+ 1,6.10 ⁻²	+ 1,8.10 ⁻²	+ 1,0.10 ⁻²	+ 3,0.10 ⁻⁴	- 3,0.10 ⁻⁴
Acido	+ 2,1.10 ⁻¹	+ 3,6.10 ⁻¹	+ 9,4.10 ⁻¹	+ 9,9.10 ⁻¹	+ 1,5.10 ⁻¹	+ 1,1.10 ⁻¹
Ech	+ 9,1.10 ⁻³	+ 0,0	+ 9,5.10 ⁻³	+ 3,2.10 ⁻³	+ 0,0	+ 0,0
Mn-ox	+ 2,4.10 ⁻¹	+ 2,8.10 ⁻¹	+ 1,7.10 ⁻¹	+ 1,3.10 ⁻¹	+ 2,3.10 ⁻¹	+ 1,6.10 ⁻¹
Fe-ox1	+ 6,3	+ 7,5	+ 4,7	+ 2,5	nd	nd
Fe-ox2	- 5,9	- 7,3	- 5,1	- 2,8	+ 1,7	+ 1,5
MO	- 7,7.10 ⁻¹	- 8,2.10 ⁻¹	- 8,2.10 ⁻¹	- 8,4.10 ⁻¹	- 4,7.10 ⁻¹	- 1,4.10 ⁻¹

Tableau 6.9 Evolution des quantités d'éléments (Fe, Mn, Ni, Cr et Co) disponibles ou considérés comme facilement disponibles ($\Sigma(\text{Plante} + \text{Hydro} + \text{Acido} + \text{Ech})$) sous l'effet de la rhizosphère et des microorganismes (Indices de disponibilité I_d).

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
Ech i	0,08 ± 0,01	5,88 ± 0,22	1,26 ± 0,02	0,002 ± 0,001	0,28 ± 0,07
P/MT	51,33 ± 9,21	43,11 ± 8,40	8,42 ± 1,79	1,39 ± 0,36	3,95 ± 0,81
P/S	70,81 ± 11,06	44,59 ± 6,47	6,99 ± 1,06	2,36 ± 0,65	4,93 ± 0,92
P/IM1	211,27 ± 61,88	82,44 ± 9,58	11,96 ± 1,37	6,08 ± 1,72	9,27 ± 1,32
P/IM2	198,05 ± 67,91	83,52 ± 11,10	12,88 ± 2,15	6,30 ± 2,16	10,66 ± 2,01
NP/MT	19,58 ± 1,43	10,72 ± 2,76	3,24 ± 0,92	0,93 ± 0,08	1,55 ± 0,48
NP/S	17,17 ± 2,98	11,30 ± 0,76	2,69 ± 0,18	0,67 ± 0,12	1,70 ± 0,21

PARTIE III

Rôle de l'état hydrique
du sol

7

INFLUENCE DE L'ETAT HYDRIQUE DU SOL SUR LA MOBILISATION DES ELEMENTS EN TRACES EN PRESENCE OU ABSENCE DE PLANTES

7.1 Introduction

L'engorgement temporaire ou permanent des sols provoque des changements plus ou moins prononcés des conditions physico-chimiques et biologiques, comme la baisse du potentiel redox, la réduction des nitrates, du fer et du manganèse, du sulfate. Ces modifications correspondent à des évolutions de la structure et de l'activité des populations bactériennes (Berthelin 1982). Le développement des systèmes racinaires au sein du sol crée un environnement particulier (sol rhizosphérique) différent du reste du sol (sol non rhizosphérique) suite aux prélèvements d'eau et de nutriments, à la libération de composés organiques et minéraux (exsudats), à la modification de la dynamique et de l'activité des communautés microbiennes, aux changements des conditions physico-chimiques (pH, Eh). La manifestation simultanée de ces deux paramètres (état hydrique et présence de racines) peut avoir des conséquences particulières : l'effet de la rhizosphère dans un sol hydromorphe peut conduire à des phénomènes qui peuvent se manifester par la consommation d'O₂ et le dégagement de CO₂ associés à l'activité microbienne rhizosphérique et par la diffusion d'O₂ par suite de son transport des parties supérieures de la plante vers les racines (Dommergues & Mangenot 1970, Lynch 1990). Si l'effet net de ces deux paramètres se traduit par une perte d'O₂, il y a aggravation de l'anoxie ; si au contraire l'effet net se traduit par un gain d'O₂, le potentiel redox peut s'élever localement et l'anoxie perdre de son intensité.

Nous sommes donc amenés à considérer que l'effet simultané de l'engorgement et de la rhizosphère peut avoir un impact important sur la mobilisation des éléments minéraux Fe et Mn des oxyhydroxydes et des métaux qui leurs sont associés.

Pour étudier l'impact de différents régimes hydriques en présence de plantes (effet rhizosphère) ou non, sur la mobilisation des éléments en traces des sols, un dispositif a été mis en place, permettant de faire varier le niveau de saturation en eau du sol ainsi que la durée

d'engorgement. Ce dispositif est décrit dans le chapitre 3.4.4. Trois modalités d'engorgement ont été étudiées sur 41 jours de culture (Figure 7.1) sur un substrat de culture composé de 10% de sol OUE 4.1 et 90% de sable :

- humidité H constante à 80% HE pendant 41 jours
- 21 jours d'humidité constante à 80% HE, suivis de 4 périodes de 2 jours chacune d'engorgement, les périodes d'engorgement étant séparées les unes des autres par 4 jours de ressuyage
- 33 jours d'humidité constante à 80% HE suivis de 8 jours d'engorgement

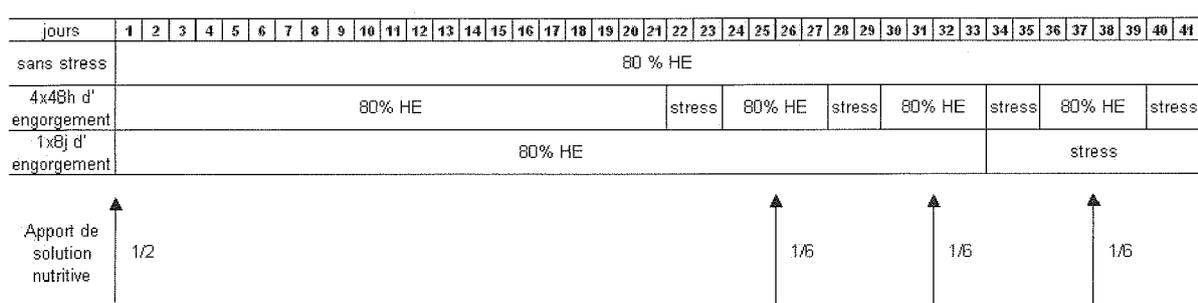


Figure 7.1 Plan et calendrier de l'expérience avec variations de l'état hydrique du sol et présence ou non de plante (maïs). Les périodes de stress correspondent à un engorgement des colonnes.

L'effet rhizosphérique est distingué en effectuant les différents traitements engorgés dans des colonnes de mélange sol-sable plantées ou non en maïs. Pour chaque traitement (sans stress hydrique, avec stress hydrique de 4×2 jours d'engorgement, avec stress hydrique de 1×8 jours d'engorgement) 4 essais plantés et 3 essais non plantés ont été réalisés.

7.2 Résultats

7.2.1 Croissance et minéralo-masse du maïs

La teneur en eau des plantes ne varie pas en fonction du régime hydrique des supports culture (sable + sol OUE 4.1, voir chapitre 3.3.8), et est égale en moyenne à 89% de la masse totale de végétal frais. En revanche les variations de la teneur en eau du sol ont une influence sur la masse des plantes. Le poids total maximum correspond au traitement "4×2 jours d'engorgement" (Tableau 7.1) avec 3,4 g de matière sèche. Les deux autres traitements expérimentaux assurent des productions de biomasses très voisines. La différence de masse totale entre les différents traitements est principalement due à la masse des parties aériennes qui

est nettement plus élevée dans les traitements à phases d'engorgement courtes (4 périodes d'engorgement de 2 jours). Les masses des racines sont peu différentes d'un traitement à l'autre.

Ces masses totales de matières sèches sont relativement faibles par rapport à celle observées pour des plantes cultivées sur un support composé à 100% de sable et qui peuvent atteindre 15 g de MS (Chapitre 4). Des toxicités d'éléments métalliques sont sans doute à considérer pour expliquer ces déficits de croissance.

Tableau 7.1 Masse des plantes séchées (g) en fonction des traitements après 6 semaines de culture en colonne. Les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test *t* de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer séparément pour les parties aériennes, les racines et la masse totale.

<i>Traitements</i>		<i>Masse des plantes séchées</i> (g)
<i>H constante 80% HE</i>	Parties aériennes	2,09 ± 0,24 (a)
	Racines	0,70 ± 0,01 (a)
	<i>Total</i>	2,79 ± 0,25 (a)
<i>4 × 2 jours d'engorgement</i>	Parties aériennes	2,63 ± 0,56 (b)
	Racines	0,77 ± 0,03 (b)
	<i>Total</i>	3,40 ± 0,59 (b)
<i>1 × 8 jours d'engorgement</i>	Parties aériennes	2,01 ± 0,30 (a)
	Racines	0,73 ± 0,02 (ab)
	<i>Total</i>	2,74 ± 0,32 (a)

Le Tableau 7.2 représente la minéralo-masse et la concentration en métaux des parties aériennes du maïs après 41 jours de culture. Les résultats mettent en évidence une influence du régime hydrique du support de culture sur la concentration en métaux dans les parties aériennes de la plante.

La teneur en fer est en effet significativement la plus faible quand l'humidité du sol est constante, et augmente de façon très significative avec l'application de périodes d'engorgement. Cette augmentation est d'autant plus élevée que les périodes d'engorgement sont longues. La teneur en fer dans les parties aériennes passe ainsi de 47 $\mu\text{g Fe.g}^{-1}$ de matière sèche (MS) dans le traitement "H constante 80% HE" à 216 $\mu\text{g Fe.g}^{-1}$ MS dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" et 346 $\mu\text{g Fe.g}^{-1}$ MS dans le traitement "1×8 jours d'engorgement".

Le régime hydrique du support de culture a également une influence significative sur la teneur en Cr dans les parties aériennes du maïs. Celle-ci augmente avec l'apparition de périodes

d'engorgement du milieu, sans que la durée de l'engorgement ait d'impact. La teneur en Cr va de $5 \mu\text{g Cr.g}^{-1}$ de matière sèche (MS) dans le traitement "H constante 80% HE" à $26 \mu\text{g Cr.g}^{-1}$ MS dans le traitement "1×8 jours d'engorgement".

Par contre l'engorgement du support de culture semble n'avoir qu'un effet limité sur l'absorption de Mn par la plante. La teneur en Mn dans les parties aériennes du maïs est la plus faible pour le traitement "4×2 jours d'engorgement" ($306 \mu\text{g Mn.g}^{-1}$ MS) et est équivalente dans les traitements "H constante 80% HE" ($447 \mu\text{g Mn.g}^{-1}$ MS) et "1×8 jours d'engorgement" ($452 \mu\text{g Mn.g}^{-1}$ MS). De courtes périodes d'engorgement répétées n'apparaissent pas favorables à l'absorption de Mn par la plante.

Tableau 7.2 Teneurs en éléments métalliques et minéralo-masse des parties aériennes du maïs après 41 jours de culture. Les résultats représentés avec des lettres différentes sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Les lettres sont à considérer éléments par éléments, et séparément pour la minéralo-masse et les concentrations.

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
$\mu\text{g} / \text{g}$ matière sèche (parties aériennes)					
<i>H constante 80% HE</i>	47 ± 22 (a)	447 ± 159 (a)	25 ± 4 (a)	5 ± 5 (a)	27 ± 12 (a)
<i>4×2 jours d'engorgement</i>	216 ± 150 (b)	306 ± 186 (b)	31 ± 9 (a)	21 ± 20 (b)	21 ± 15 (a)
<i>1×8 jours d'engorgement</i>	346 ± 125 (c)	452 ± 219 (a)	30 ± 8 (a)	26 ± 20 (b)	32 ± 20 (a)
$\mu\text{g} / \text{plante}$ (parties aériennes)					
<i>H constante 80% HE</i>	131 ± 61 (a)	1247 ± 444 (a)	70 ± 11 (a)	14 ± 14 (a)	74 ± 33 (a)
<i>4×2 jours d'engorgement</i>	734 ± 510 (b)	1040 ± 632 (b)	105 ± 31 (a)	71 ± 68 (b)	71 ± 51 (a)
<i>1×8 jours d'engorgement</i>	948 ± 342 (c)	1238 ± 600 (a)	82 ± 22 (a)	71 ± 55 (b)	88 ± 55 (a)

Enfin, les teneurs en Ni et Co ne semblent pas être influencées par le régime hydrique du support de culture et restent constantes quelles que soient les traitements appliqués : 25 à $31 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$ MS et 21 à $32 \mu\text{g Co.g}^{-1}$ MS. Ces teneurs sont supérieures aux seuils de toxicité définis (Chapitre 2) et peuvent donc être à l'origine de la faible croissance du maïs observée (Tableau 7.1).

7.2.2 Evolution du pH et du Eh au cours de la culture

7.2.2.1 Evolution du pH et Eh du sol dans les traitements à humidité constante 80% HE

Les pH mesurés sur les eaux d'extraction des fractions hydrosolubles ne montrent pas de différences entre le sol planté et non planté, et le début et la fin des cultures (Tableau 7.3). La valeur du pH est constante, de 5,8 à 5,9.

Tableau 7.3 Evolution du pH des sols plantés ou non sans engorgement (80% HE)

Sols non plantés		Sols plantés	
<i>pH initial</i>	<i>pH final</i>	<i>pH initial</i>	<i>pH final</i>
5,8 ± 0,3	5,9 ± 0,3	5,8 ± 0,3	5,9 ± 0,3

Les potentiels d'oxydo-réduction n'ont pas été mesurés pour ce traitement en raison des conditions d'obtention des solutions.

7.2.2.2 Evolution du pH et Eh du sol dans les traitements soumis à "4 × 2 jours d'engorgement"

Le pH et le Eh ont été mesurés sur la solution de ressuyage initiale (ressuyage à t=0 jours ayant permis de ramener l'humidité du support de culture à 80% HE) ainsi que sur chacune des quatre solutions de ressuyage faisant suite aux quatre périodes de 2 jours d'engorgement.

Les résultats montrent que la culture de maïs avec des courtes périodes d'engorgement successives de 2 jours tous les 4 jours à compter de la troisième semaine de culture entraîne des valeurs de pH moins élevées en présence qu'en absence de plante (Figure 7.2). Ce pH plus élevé peut être due à la réduction des nitrates et la production d'ammoniac qui contrebalance l'acidification couramment observée dans la rhizosphère par la libération de protons, la respiration racinaire et la synthèse d'acides organiques.

Le potentiel redox a fortement baissé (de plus de +300 mV à +150-160 mV) entre le début des cultures et le premier ressuyage (3 semaines de culture) puis s'est stabilisé autour d'une valeur de +170 mV. Les engorgements successifs suivants n'ont pas entraîné de baisse plus prononcée du Eh. Les quatre jours d'aération entre chaque ressuyage pourraient suffire

pour empêcher ce phénomène. La présence d'une masse racinaire au sein du sol ne modifie pas significativement le potentiel redox des solutions d'engorgement par rapport au sol nu soumis au même régime hydrique. En fait, c'est sans doute l'activité bactérienne qui, en se manifestant dans et hors la rhizosphère, entraîne cette diminution.

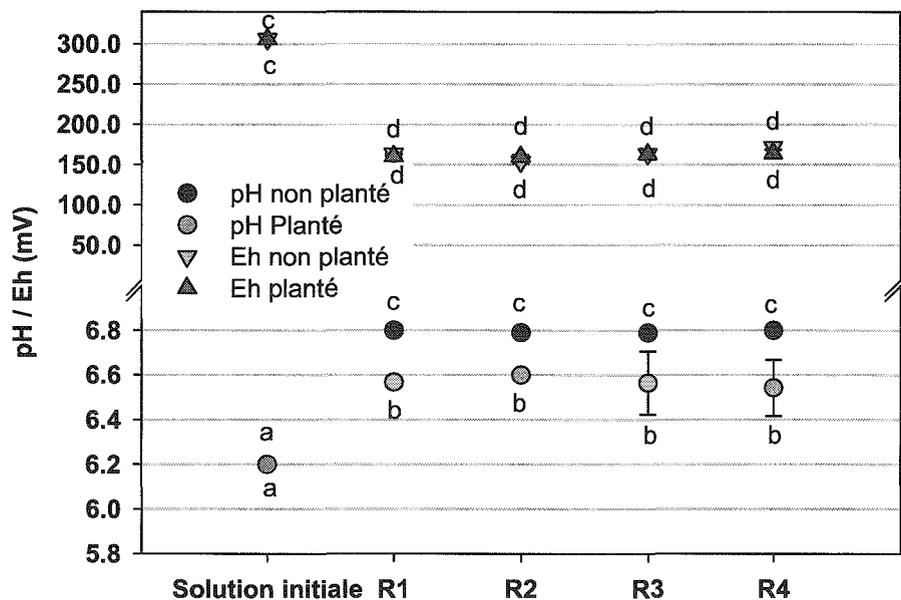


Figure 7.2 Evolution du pH et du Eh (mV) des solutions des eaux gravitaires dans les traitements "4×2j d'engorgement". La solution initiale correspond à la solution ayant servi à l'engorgement avant mise à 80% HE des substrats (début de culture). R1, R2, R3 et R4 correspondent aux solutions de ressuyage après chaque période d'engorgement.

7.2.2.3 Evolution du pH et Eh dans les sols plantés et non plantés soumis à 1×8 jours d'engorgement

Le pH et le Eh ont été mesurés sur la solution de ressuyage faisant suite à la période de huit jours d'engorgement (du 34 au 41^e jour).

De même que dans le traitement précédent, le pH des solutions d'engorgement augmente au cours des cultures, mais sans qu'il y ait de différence significative entre les échantillons plantés et non plantés (Tableau 7.4).

Le potentiel redox décroît plus fortement suite à un engorgement de 8 jours du sol que suite à une série d'engorgements de plus courte durée (Tableau 7.3).

Tableau 7.4 Evolution du pH et Eh dans les sols plantés et non plantés soumis à 1×8 jours d'engorgement

<i>Sols non plantés</i>				<i>Sols plantés</i>			
pH		Eh		pH		Eh	
<i>initial</i>	<i>final</i>	<i>initial</i>	<i>final</i>	<i>initial</i>	<i>final</i>	<i>initial</i>	<i>final</i>
5,8 ± 0,3	6,8 ± 0,2	307 ± 1	57 ± 17	5,8 ± 0,3	6,6 ± 0,5	304 ± 2	60 ± 76

Ceci conduit à considérer la réduction et l'élimination du nitrate, la production de NH_4^+ supplémentaire à celui des solutions nutritives par minéralisation anaérobies des matières organiques azotées. La baisse plus prononcée du Eh peut être liée au développement de processus anaérobies plus marqués, comme la consommation de l'oxygène, la réduction de NO_3^- , Mn^{4+} et Fe^{3+} .

7.2.3 Evolution de la concentration en anions minéraux

Les concentrations en anions minéraux (NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} et F^-) ont été mesurées après 41 jours de culture suite à une extraction à l'eau pour le traitement "H constante 80% HE" ou directement sur les solutions de ressuyage pour les traitements "4×2 jours d'engorgement" et "1×8 jours d'engorgement", ainsi que sur chacune des quatre solutions de ressuyage faisant suite aux quatre périodes de 2 jours d'engorgement. Les données à t_0 correspondent aux calculs théoriques de teneurs suite à l'addition de la solution nutritive.

Tableau 7.5 Evolution de la teneur en anions minéraux (NO_3^- , Cl^- et SO_4^{2-}) présents au début (t_0) et à la fin (t_{41}) de la culture de maïs. Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g anion.g}^{-1}$ sol sec.

		NO_3^-		Cl^-		SO_4^{2-}	
		T_0	T_{41}	T_0	T_{41}	T_0	T_{41}
<i>H constante 80% HE</i>	planté	393	112	0,55	0,61	41	45
	non planté	393	110	0,55	0,68	41	45
<i>4×2 jours d'engorgement</i>	planté	393	14	0,56	0,73	41	57
	non planté	393	3	0,55	0,73	41	57
<i>1×8 jours d'engorgement</i>	planté	393	12	0,55	1,03	41	44
	non planté	393	4	0,55	1,04	41	44

Le tableau 7.4 représente les résultats des mesures des concentrations en NO_3^- , Cl^- et SO_4^{2-} solubilisés entre le premier et le dernier jour de culture. F^- et PO_4^{3-} n'ont pas été détectés

et ne sont donc pas représentés dans le tableau. Pour le traitement "4×2 jours d'engorgement", les quantités d'anions présents en solution au cours des 4 ressuyages ont été prises en compte et additionnées.

Les résultats du Tableau 7.5 montrent un effet de l'état hydrique du substrat de culture sur les concentrations en nitrates solubilisées.

Les teneurs en nitrates diminuent mais relativement moins dans le traitement avec colonne de culture à humidité constante (80% HE) et passent de 393 à 112 $\mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec. Ces teneurs baissent fortement jusqu'à 3 $\mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec sous l'influence de périodes plus ou moins longues d'engorgement. La durée de l'engorgement (1×8 jours ou 4×2 jours) n'influence pas cette diminution de la teneur en nitrates contrairement à la présence de la plante. Celle-ci induit une baisse moins importante des teneurs en nitrates que dans le sol seul sans plante. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une réduction des nitrates déjà proposée pour expliquer les augmentations de pH observées lors de périodes d'engorgement de 4×2 jours (Figure 7.2) et 1×8 jours (Tableau 7.4) et qui sont moins importantes en présence de la plante. Les conditions anoxiques, développées lors de périodes d'engorgement, permettraient la réduction des nitrates et la production d'ammonium. Le pH pourrait être influencé par consommation et absorption de protons pour ré-équilibrer la solution suite à un excès d'ammonium (Ruiz & Arvieu 1990). Des dosages colorimétriques d'ammonium NH_4^+ ont été réalisés en fin de culture pour vérifier cette hypothèse. La solution nutritive a apporté au total 135 $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec. Après 41 jours de culture, la teneur en NH_4^+ atteint 157 $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec dans le traitement maintenu à humidité constante (80% HE), 318 $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" et 308 $\mu\text{g NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec dans le traitement "1×8 jours d'engorgement". La réduction des nitrates d'une part en oxyde d'azote ou N_2 et en ammonium, et d'autre part la production de NH_4^+ par minéralisation des matières organiques avec un ralentissement ou une diminution de la nitrification semblent donc être impliquées dans l'augmentation du pH et mettent en évidence l'apparition de conditions anoxiques.

La concentration en chlorures Cl^- solubilisés augmente légèrement au cours de la culture. Cette augmentation est plus importante avec l'apparition de périodes d'engorgement, et plus cette période est longue, plus la concentration en Cl^- augmente. Celle-ci passe ainsi de 0,55 $\mu\text{g Cl}^- \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec à t_0 à 1,03 $\mu\text{g Cl}^- \cdot \text{g}^{-1}$ sol sec dans le traitement "1×8 jours d'engorgement". Les MO du sol peuvent être considérées comme la source principale de cet anion.

Les sulfates sont apportés par la solution nutritive et sont donc très abondants dès le début des cultures. Leur concentration augmente au cours de celle-ci, avec un maximum pour le

traitement "4×2 jours d'engorgement". Une origine organique de ces sulfates libérés par minéralisation des MO peut être envisagée.

7.2.4 Réduction et solubilisation du fer et du manganèse

La Figure 7.3 représente les quantités totales de Fe et Mn solubilisés et réduits (recueillis dans les phases hydrosolubles) pendant la culture du maïs par rapport à la quantité totale de ces deux éléments dans le sol.

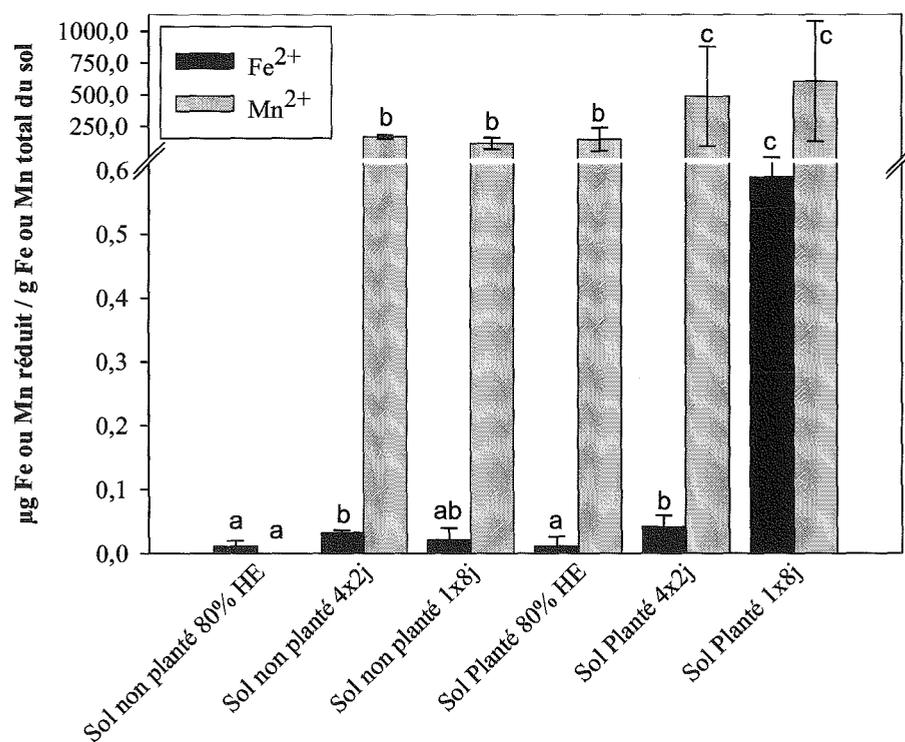


Figure 7.3. Fe^{2+} et Mn^{2+} solubilisés dans les diverses conditions expérimentales (sols plantés et non plantés soumis à différentes conditions hydriques)

Les résultats présentés sur la Figure 7.3 permettent de souligner deux effets : un effet de l'engorgement des sols qui entraîne dans tous les traitements plantés et non plantés une augmentation très significative des quantités de Mn réduit et solubilisé, et dans une moindre mesure de Fe, et un effet lié à la présence de plante et donc de la rhizosphère qui se manifeste de diverses façons selon le régime hydrique des colonnes de sol.

L'effet de l'engorgement des sols en absence de plante se traduit d'abord par une augmentation des quantités de Fe^{2+} dans le traitement "4×2 jours d'engorgement", dans lequel

sa concentration est presque 3 fois supérieure à celle observée dans le cas du traitement à humidité constante (80% HE) pour atteindre $0,032 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fe}_{\text{tot}}$. Cette augmentation est moins visible dans le traitement "1×8 jours d'engorgement" où la quantité de Fe^{2+} n'est que 2 fois supérieure à celle observée dans le cas du traitement à humidité constante.

Le phénomène est le même pour Mn dont la concentration passe de $0 \mu\text{g Mn}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Mn}_{\text{tot}}$ dans les colonnes maintenues à 80% HE à 122 ou 166 $\mu\text{g Mn}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Mn}_{\text{tot}}$ dans les traitements subissant des périodes d'engorgement plus ou moins prolongées en absence de plante.

En présence de plante, les phénomènes décrits ci-dessus sont amplifiés. La quantité de fer réduit et solubilisé augmente de façon significative avec l'apparition de périodes d'engorgement, et cette augmentation est d'autant plus grande que l'engorgement est long : dans le traitement "1×8 jour d'engorgement" la quantité de Fe^{2+} atteint $0,59 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Fe}_{\text{tot}}$ et est 53 fois plus abondante que dans le traitement à humidité constante (80% HE) et 14 fois plus abondante que dans le traitement "4×2 jours d'engorgement". Mn^{2+} suit la même évolution mais sans que la différence entre les deux modes d'engorgement ne soit significative. Dans ces deux traitements, la quantité de Mn^{2+} est 3 à 4 fois supérieure à celle observée dans le traitement "planté" à humidité constante (80% HE).

L'effet rhizosphère est dépendant du régime hydrique du sol. La plante a un effet stimulant sur la réduction et dissolution de Mn quel que soit le régime hydrique, mais cet effet est d'autant plus important que la période d'engorgement est longue : dans le traitement à humidité constante, la quantité de Mn^{2+} passe de $0 \mu\text{g Mn}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Mn}_{\text{tot}}$ en absence de plante à $145 \mu\text{g Mn}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Mn}_{\text{tot}}$ dans la rhizosphère des colonnes plantées. Dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" la quantité de Mn^{2+} atteint $484 \mu\text{g Mn}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Mn}_{\text{tot}}$ dans la rhizosphère et est 3 fois plus élevée que dans le traitement non planté. Dans le traitement "1×8 jour d'engorgement" elle atteint $474 \mu\text{g Mn}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{Mn}_{\text{tot}}$ dans la rhizosphère et est 10 fois plus élevée que dans le traitement non planté. En ce qui concerne le fer, la rhizosphère n'a d'influence sur sa réduction et solubilisation que dans le traitement "1×8 jour d'engorgement" où la concentration dans la rhizosphère est très variable mais peut être 28 fois plus élevée que celle du traitement non planté. La mobilisation du fer nécessite donc des conditions d'anoxie plus prolongées que le manganèse pour être réduit et solubilisé.

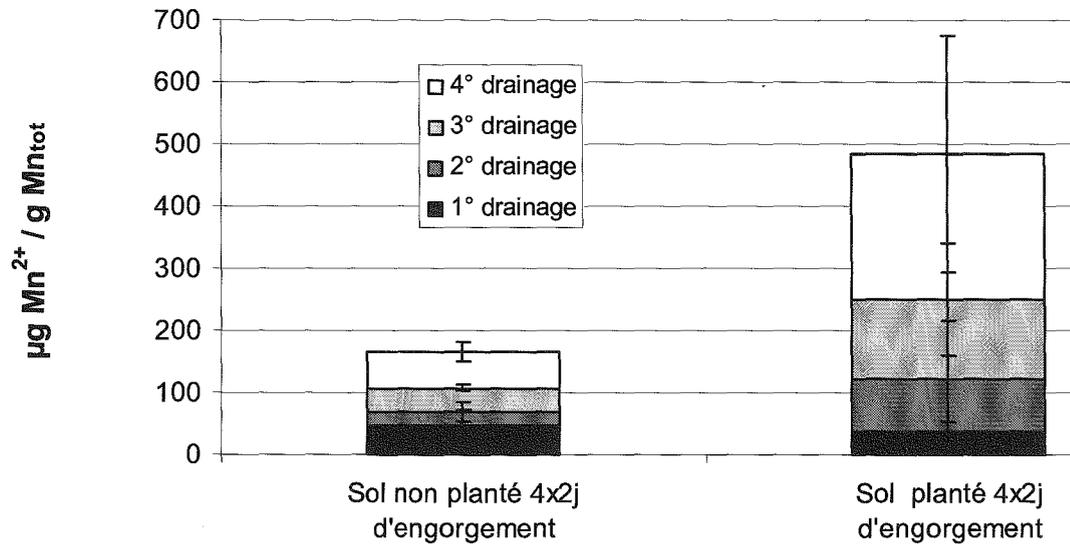


Figure 7.4 Réduction et solubilisation de Mn au cours des différentes phases d'engorgement-drainage dans le cas du traitement "4 × 2 jours d'engorgement".

Dans le cas du traitement planté ayant subi quatre périodes successives d'engorgement, la quantité de manganèse réduit hydrosoluble augmente au cours des drainages successifs (Figure 7.4) alors que chaque période d'engorgement est précédée d'une phase de drainage (ré-oxygénation) et qu'une diminution plus marquée des valeurs du Eh n'est pas observée. La dégradation des matières organiques pourrait entraîner des conditions anaérobies ou bien les périodes de drainage ne sont pas suffisantes pour que des conditions aérobies ne se remettent en place. La biodégradation des MO pourrait aussi être favorisée par les ré-oxygénations du sol et libérerait des molécules plus disponibles pour les activités mangani-réductrices et/ou les complexations de Mn.

7.2.5 Evolution du carbone organique

Sur l'échantillon initial non incubé, la quantité de carbone organique dissous (COD) est égale à 0,21 mg.g⁻¹ de carbone total. Dans tous les traitements avec ou sans plante une augmentation du COD (Figure 7.5) est observée.

En absence de plante, le COD est plus abondant dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" que dans le traitement à humidité constante (80% HE) et enfin que dans le traitement "1×8 jours d'engorgement". La seule source de COD est constituée par les matières organiques du sol dont la biodégradation contribue à libérer des matières organiques hydrosolubles. La minéralisation du carbone organique est généralement plus élevée en conditions aérobies qu'en conditions anaérobies et l'anaérobiose favorise souvent la libération

de composés hydrosolubles (Stemmler & Berthelin 2003). Toutefois dans ces conditions expérimentales l'anaérobiose est peu marquée et de courtes périodes d'engorgement-drainage (2 jours-4 jours) des colonnes de sol favoriseraient la formation et libération de composés organiques hydrosolubles. Par contre de plus longues périodes d'anaérobiose (8 jours) limiteraient cette production de COD et/ou favoriseraient leur minéralisation.

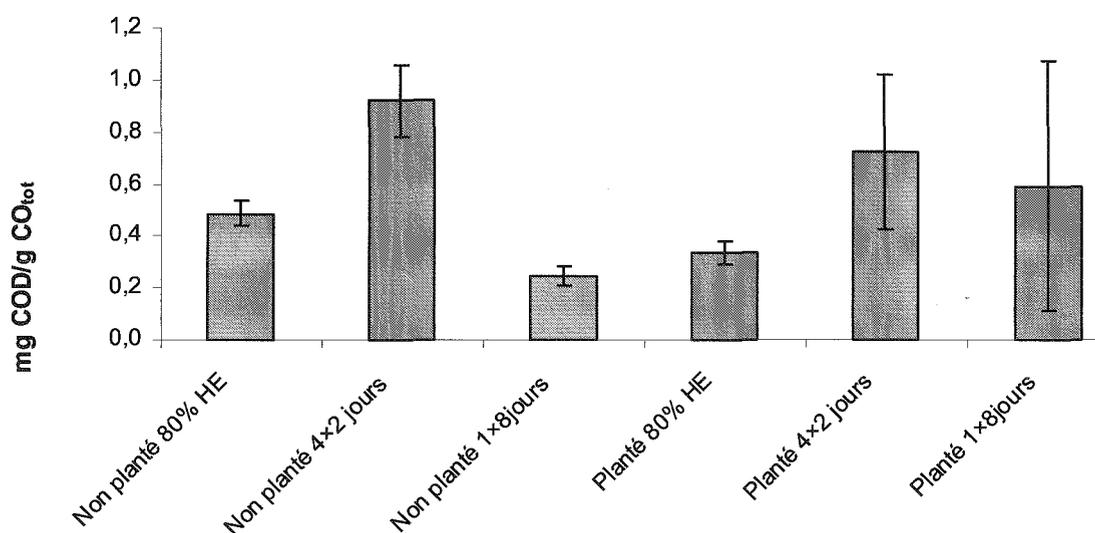


Figure 7.5 Quantité de carbone organique dissout (COD) dans les divers traitements en fin de culture

En présence de la plante, la tendance est la même pour ces différents traitements sans que la différence soit significative entre les deux types d'engorgement du sol. Les exsudats racinaires seraient plus facilement dégradés et favoriseraient la biodégradation des MO du sol.

Cette hypothèse correspond bien au fait que la quantité de COD libérée dans les traitements à humidité constante (80% HE) est plus importante sans plante qu'avec plante, alors que la rhizosphère devrait enrichir en carbone organique soluble les colonnes de supports de culture. L'activité microbienne minéralisatrice globale pourrait être importante dans la rhizosphère car stimulée par les exsudats et conduirait à une minéralisation plus importante du carbone organique qui se traduit par une plus faible production de COD.

7.2.6 Altération des phases minérales et répartition des éléments métalliques dans les différents compartiments géochimiques

Après 41 jours de culture, des extractions séquentielles des éléments liés aux différents compartiments organiques et minéraux ont été réalisés sur les échantillons de sol ayant subi les différents traitements. Les résultats sont présentés dans les Tableaux 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 et 7.10 sous forme d'indices de redistribution I_r . Ils expriment l'évolution de la quantité d'un élément donné dans chaque compartiment géochimique par rapport à l'échantillon initial, en mg d'élément redistribué pour 100g de l'élément présent dans le substrat. Ils mettent en évidence deux effets majeurs sur la répartition des éléments : un effet de l'état hydrique du support de culture et un effet "rhizosphère".

7.2.6.1 Le fer

Effet de l'état hydrique

L'état hydrique n'a pas d'effet sur la modification de la quantité de fer dans les compartiments des éléments hydrosolubles (compartiment *Hydro*) et liés aux oxydes très facilement réductibles (compartiment Mn-ox). Cette quantité augmente dans tous les traitements par rapport la répartition du fer dans le sol initial, mais de façon équivalente entre les traitements.

En revanche un effet est observé sur la quantité de fer lié au compartiment des éléments échangeables (compartiment Ech) qui augmente par rapport au sol initial dans tous les traitements mais plus fortement dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" en présence ou non de la plante, où cette quantité atteint 0,02% du fer total du sol.

Dans le compartiment des éléments acidosolubles (compartiment *Acido*) (Figure 7.6) le traitement "1×8 jours d'engorgement" entraîne une augmentation du fer dans ce compartiment plus importante en présence de la plante que dans les autres traitements. L'effet est inverse dans le compartiment des éléments liés aux oxydes de fer faiblement cristallisés (compartiment *Fe-ox1*). La quantité de fer liée à ce compartiment augmente de façon équivalente dans tous les traitements sauf dans le cas du traitement "1×8 jours d'engorgement" où cette augmentation est la plus faible.

Pour le compartiment des éléments liés aux oxydes de fer bien cristallisés (compartiment *Fe-ox2*) les quantités de fer diminuer dans tous les traitements par rapport au sol initial. Cette diminution est la plus faible dans le traitement "1×8 jours d'engorgement".

Les quantités de fer liées au compartiment des matières organiques (compartiment MO) augmentent dans tous les traitements, mais est plus importante en absence qu'en présence de plante.

Tableau 7.6 Altération minérale et transfert de Fe vers les différents compartiments géochimiques, en gramme de Fe redistribué pour 100g de fer total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_r).

	80% HE		4×2 jours d'engorgement		1×8 jours d'engorgement	
	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante
Hydro	+ 0,006	+ 0,005	+ 0,006	+ 0,005	+ 0,006	+ 0,005
Ech	+ 0,009	+ 0,009	+ 0,011	+ 0,015	+ 0,007	+ 0,008
Acido	+ 0,45	+ 0,27	+ 0,47	+ 0,33	+ 0,63	+ 0,31
Mn-ox	+ 0,17	+ 0,21	+ 0,17	+ 0,21	+ 0,13	+ 0,18
Fe-ox1	+ 8,63	+ 12,13	+ 8,63	+ 12,73	+ 7,43	+ 9,93
Fe-ox2	- 10,30	- 13,70	- 10,30	- 14,74	- 9,00	- 11,60
MO	+ 0,93	+ 0,83	+ 0,83	+ 1,03	+ 0,63	+ 1,03

Effet de la rhizosphère

L'effet de la rhizosphère se traduit différemment en fonction du régime hydrique. Des interactions se manifestent entre ces deux paramètres.

La quantité de fer présente dans la phase Hydro est légèrement plus élevée dans les sols plantés que dans les sols non plantés, indépendamment de l'état hydrique.

La rhizosphère n'a d'effet sur la quantité de fer échangeable (*Ech*) que lors de périodes d'engorgement du support de culture et se traduit par une augmentation moins importante des quantités de Fe dans ce compartiment que dans les traitements non plantés par rapport au sol initial.

Les quantités de fer acidosolubles (*Acido*) augmentent dans tous les traitements par rapport au sol initial. Cette augmentation est plus importante dans les sols plantés que dans les traitements non plantés avec un maximum pour le traitement "1×8 jours d'engorgement".

Les quantités de fer liées aux compartiments des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) et des oxydes de fer faiblement cristallisés (*Fe-ox1*) augmentent dans tous les traitements par rapport au sol initial. Cette augmentation est plus importante dans les colonnes non plantées que dans les colonnes plantées. Cet effet n'est pas influencé par l'état hydrique du support de culture.

Tous les traitements conduisent à une diminution des quantités de fer liées aux compartiments des oxydes de fer bien cristallisés ($Fe-ox_2$). Cette diminution est plus importante hors rhizosphère (traitements non plantés), sans que le régime hydrique n'ait d'influence sur l'importance de la différence entre la rhizosphère et le sol non planté.

L'effet "rhizosphère" sur la quantité de fer contenue dans le compartiment des matières organiques (MO) n'est observable que quand le "sol" est soumis à des périodes d'engorgement. Dans le traitement où l'humidité est maintenue constante (80% HE), la quantité de fer du compartiment MO augmente par rapport au sol initial mais de façon équivalente dans le sol planté et non planté. Des engorgements du support de culture ont pour conséquence une augmentation plus faible du fer lié aux MO dans les systèmes plantés mais une augmentation plus forte dans les systèmes non plantés. La différence entre les systèmes plantés et non plantés est plus grande dans le traitement à une période d'engorgement de 8 jours que dans le traitement à quatre périodes d'engorgement de 2 jours. Un couplage apparaît donc entre les effets de la rhizosphère et du régime hydrique du support de culture.

7.2.6.2 Le manganèse

Effet de l'état hydrique

La quantité de Mn dans le compartiment *Hydro* augmente dans tous les traitements par rapport à l'échantillon initial, mais cette augmentation est maximale dans le traitement maintenu à humidité constante.

L'effet de l'état hydrique sur les quantités de Mn dans le compartiment *Ech* est couplé à un effet "rhizosphère". En absence de plante, la quantité de Mn de ce compartiment augmente dans tous les traitements mais cette augmentation est maximale dans celui à "1×8 jours d'engorgement". En présence de plante, la quantité de Mn augmente par rapport au sol initial dans le traitement à humidité constante (80% HE) mais diminue de manière équivalente dans les deux autres traitements.

Le compartiment *Acido* voit sa quantité de Mn augmenter dans tous les traitements, avec une augmentation plus importante dans le traitement "1×8 jours d'engorgement" mais moins importante dans le traitement "4×2 jours d'engorgement".

La quantité de Mn dans le compartiment *Mn-ox* diminue dans tous les traitements. Cette diminution est plus importante dans les sols plantés que non plantés (effet "rhizosphère" stimulant) et est maximale dans le traitement planté "1×8 jours d'engorgement".

Les compartiments *Fe-ox1* et *Fe-ox2* voient leur quantité de Mn augmenter dans tous les traitements. Dans le compartiment *Fe-ox1*, en présence de la plante, l'augmentation est maximale dans le traitement maintenu à humidité constante (80%HE), et en absence de la plante cette augmentation est maximale dans le traitement maintenu à humidité constante ainsi que dans le traitement "1×8 jours d'engorgement". Dans le compartiment *Fe-ox2*, l'augmentation est maximale dans le traitement "4×2 jours d'engorgement".

Dans les compartiments des *MO*, la quantité de Mn augmente quel que soit le traitement mais l'importance de l'augmentation dépend de la présence ou non de plante. Ainsi, en présence de plante l'augmentation de la quantité de Mn dans ce compartiment est de plus en plus faible avec la présence de périodes d'engorgement dans le support de culture et est minimale dans le traitement "4×2 jours d'engorgement". En absence de plante, l'évolution est inversée et l'augmentation est maximale dans le traitement "4×2 jours d'engorgement".

Tableau 7.7 Altération minérale et transfert de Mn vers les différents compartiments géochimiques, en gramme de Mn redistribué pour 100g de Mn total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_i).

	80% HE		4×2 jours d'engorgement		1×8 jours d'engorgement	
	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante
Hydro	+ 1,80	+ 0,16	+ 0,33	+ 0,12	+ 0,41	+ 0,08
Ech	+ 1,43	+ 0,13	+ 0,23	- 1,57	+ 6,73	- 1,47
Acido	+ 19,00	+ 8,50	+ 12,00	+ 6,90	+ 27,00	+ 11,00
Mn-ox	- 43,66	- 36,66	- 42,66	- 37,66	- 56,66	- 35,67
Fe-ox1	+ 6,15	+ 9,15	+ 3,85	+ 5,65	+ 3,25	+ 10,35
Fe-ox2	+ 13,93	+ 17,83	+ 24,63	+ 25,93	+ 18,53	+ 15,13
MO	+ 0,85	+ 0,95	+ 0,65	+ 1,15	+ 0,55	+ 1,15

Effet de la rhizosphère

L'effet de la rhizosphère sur la répartition du manganèse dans les différents compartiments biogéochimiques dépend du compartiment et dans certains cas du régime hydrique du support de culture.

La rhizosphère a un effet positif sur la quantité de Mn dans les compartiments *Hydro*, *Ech* et *Acido*. Celle-ci augmente en présence de la plante par rapport au sol initial et aux traitements non plantés. Cette différence entre les quantités de Mn dans ces compartiments avec

ou sans plante se traduit même par une diminution de la quantité de Mn du compartiment *Ech* en absence de la plante dans les traitements à périodes d'engorgement ("4×2 jours d'engorgement" et "1×8 jours d'engorgement").

L'effet de la rhizosphère est également positif sur la quantité de Mn liée au compartiment *Mn-ox*, où elle diminue plus fortement en présence qu'en absence de la plante.

Dans les compartiments *Fe-ox1* et *MO* l'effet de la rhizosphère est négatif, dans le sens où l'augmentation de Mn observée dans ces compartiments est plus faible en présence qu'en absence de plante.

Enfin, l'effet de la plante sur le Mn contenu dans le compartiment *Fe-ox2* dépend du régime hydrique des supports de culture. Ainsi, l'effet est négatif quand le support est maintenu constamment à 80% HE, aucun effet n'est observé dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" et l'effet est positif dans le traitement "1×8 jours d'engorgement".

7.2.6.3 Le nickel

Effet du régime hydrique

Le régime hydrique du substrat de culture n'a pas d'influence sur la quantité de Ni présente dans le compartiment des *MO*. Pour un type de traitement donné (planté ou non planté) celle-ci reste constante et ne varie pas avec les traitements hydriques.

La présence de périodes d'engorgement du substrat de culture a un effet négatif sur la quantité de Ni contenu dans les compartiments *Hydro* et *Fe-ox1*. Les quantités de Ni dans ces compartiments augmentent quel que soit le traitement par rapport au sol initial mais cette augmentation est moins importante avec la présence de périodes d'engorgement et est minimale dans le traitement "1×8 jours d'engorgement".

Dans les autres compartiments, l'effet du régime hydrique dépend de la présence ou non de plante. Dans le compartiment *Ech*, la présence de périodes d'engorgement a un effet positif sur la quantité de Ni dans le compartiment en présence de plante et plus l'engorgement est long ("1×8 jours d'engorgement"), plus l'effet est marqué. A l'inverse, en absence de plante, une bonne aération du milieu (humidité constante de 80% HE) est plus favorable que des engorgements et permet une augmentation plus forte de la quantité de Ni. En ce qui concerne le compartiments *Mn-ox* en absence de plante, la quantité de Ni y augmente quand on passe du traitement à humidité du support de culture constante (80% HE) au traitement "4×2 jours d'engorgement" puis "1×8 jours d'engorgement", donc avec l'augmentation de la durée des périodes d'engorgement. En présence de la plante un effet du traitement hydrique est visible

dans le traitement "1×8 jours d'engorgement" pour lequel l'augmentation de Ni est la plus faible.

Enfin, dans le compartiment *Fe-ox2* l'effet du régime hydrique n'est visible qu'en absence de plante. Alors que la quantité de Ni augmente dans tous les traitements, ce paramètre a pour effet une augmentation plus faible de la concentration en Ni avec l'augmentation de la durée des périodes d'engorgement en présence de la plante.

Tableau 7.8 Altération minérale et transfert de Ni vers les différents compartiments géochimiques, en gramme de Ni redistribué pour 100g de Ni total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_r).

	80% HE		4×2 jours d'engorgement		1×8 jours d'engorgement	
	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante
Hydro	+ 0,15	+ 0,01	+ 0,01	+ 3,7.10 ⁻³	+ 5,22.10 ⁻³	- 1,20.10 ⁻³
Ech	+ 0,48	+ 0,34	+ 0,74	- 1,36.10 ⁻²	+ 0,84	- 0,13
Acido	+ 1,65	+ 1,23	+ 1,40	+ 1,46	+ 1,45	+ 1,41
Mn-ox	+ 0,54	+ 0,77	+ 0,53	+ 1,04	+ 0,03	+ 0,83
Fe-ox1	+ 8,11	+ 10,25	+ 7,71	+ 11,16	+ 6,49	+ 9,91
Fe-ox2	- 11,31	- 13,29	- 10,92	- 14,53	- 8,94	- 12,92
MO	+ 0,65	+ 0,74	+ 0,75	+ 0,92	+ 0,40	+ 0,84

Effet de la rhizosphère

De même que pour les éléments précédents (Fe et Mn), la présence de la plante n'a pas les mêmes effets sur tous les compartiments.

Sur les compartiments *Mn-ox*, *Fe-ox1*, *Fe-ox2* et *MO* la plante a effet négatif qui se traduit par une augmentation de Ni par rapport au sol initial plus faible dans les compartiments *Mn-ox*, *Fe-ox1* et *MO* en présence de la plante qu'en son absence et une diminution par rapport au sol initial dans le compartiment *Fe-ox2* dans les colonnes plantées.

L'effet "rhizosphère" est positif dans le compartiment *Ech* qui se traduit par une augmentation de Ni dans ce compartiment par rapport au sol initial plus forte avec que sans la plante. La présence de la plante va même jusqu'à permettre une augmentation de la quantité de Ni du compartiment dans les deux traitements avec périodes d'engorgement alors que sans plante cette quantité diminue dans ces deux traitements.

La quantité de Ni présente dans le compartiment *Acido* n'est influencée par la présence de la plante que dans le traitement maintenu à humidité constante (80% HE) et se traduit par une augmentation plus forte, par rapport au sol initial, de la quantité de Ni dans la rhizosphère. Dans les deux autres traitements aucun effet n'est visible.

7.2.6.4 Le chrome

Effet de l'état hydrique

L'état hydrique du support de culture ne semble pas avoir d'effet sur les quantités de Cr contenues dans les compartiments *Acido*, *Mn-ox*, *Fe-ox1* et *MO*. Pour un traitement donné (planté ou non planté) la quantité de Cr reste la même quel que soit l'état hydrique appliqué.

Le compartiment *Hydro* voit sa quantité de Cr diminuer avec l'apparition et l'augmentation de la durée des périodes d'engorgement. L'effet y est donc négatif.

Tableau 7.9 Altération minérale et transfert de Cr vers les différents compartiments géochimiques, en gramme de Cr redistribué pour 100g de Cr total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_i).

	80% HE		4×2 jours d'engorgement		1×8 jours d'engorgement	
	<i>avec plante</i>	<i>sans plante</i>	<i>avec plante</i>	<i>sans plante</i>	<i>avec plante</i>	<i>sans plante</i>
Hydro	+ 1,14.10 ⁻³	+ 2,2.10 ⁻⁴	+ 3,95.10 ⁻⁵	+ 1,97.10 ⁻⁴	+ 1,14.10 ⁻⁵	+ 9,68.10 ⁻⁵
Ech	+ 0,00	+ 0,00	+ 0,00	+ 2,44.10 ⁻³	+ 7,28.10 ⁻³	+ 0,00
Acido	+ 0,36	+ 0,27	+ 0,40	+ 0,33	+ 0,41	+ 0,33
Mn-ox	+ 0,17	+ 0,19	+ 0,20	+ 0,19	+ 0,14	+ 0,19
Fe-ox1	+ 7,95	+ 11,30	+ 9,63	+ 10,47	+ 7,26	+ 10,01
Fe-ox2	- 8,75	- 12,21	- 10,64	- 11,50	- 7,89	- 11,11
MO	+ 0,31	+ 0,47	+ 0,44	+ 0,55	+ 0,10	+ 0,62

L'apparition et l'augmentation de la durée des périodes d'engorgement a par contre un effet favorable sur la quantité de Cr des compartiments *Ech* et *Fe-ox2*. Dans le compartiment *Ech*, l'augmentation de la quantité de Cr par rapport au sol initial est la plus élevée dans le traitement "4×2 jours d'engorgement" en absence de plante et dans le traitement "1×8 jours d'engorgement" en présence de la plante. Dans le compartiment *Fe-ox2*, l'effet se traduit par une diminution (par rapport au sol initial) de la quantité de Cr plus importante dans le

traitement "4×2 jours d'engorgement" que dans les deux autres traitements. L'effet du régime hydrique est donc couplé à un effet rhizosphère.

Effet de la rhizosphère

Aucun effet de la rhizosphère n'est observé sur la quantité de Cr lié au compartiment *Mn-ox*. Ces quantités sont équivalentes que le support soit planté ou non, pour un état hydrique donné.

Par contre la présence du maïs a un effet positif sur la quantité de Cr contenue dans les compartiments *Hydro* et *Acido*. Par rapport au sol initial, cette quantité augmente dans tous les traitements mais cette augmentation est plus importante en présence qu'en absence de plante.

Par contre son effet est négatif sur les quantités de Cr liées aux compartiments *Fe-ox1*, *Fe-ox2* et *MO*. L'effet se traduit par une augmentation (par rapport au sol initial) plus faible en présence qu'en absence de plante dans les compartiments *Fe-ox1* et *MO*, et à une diminution plus faible dans le compartiment *Fe-ox2*.

7.2.6.5 Le cobalt

Effet de l'état hydrique

L'état hydrique du "sol" ne semble pas avoir d'effet significatif sur la quantité de Co contenue dans les compartiments *Fe-ox2* et *MO*. Cette quantité augmente par rapport au sol initial dans tous les traitements mais de façon équivalente quel que soit l'état hydrique du support de culture.

Un effet de l'état hydrique est observable sur les compartiments *Hydro* et *Fe-ox1* qui se traduit par une augmentation (par rapport au sol initial) de la quantité de Co dans ces compartiments qui est plus faible en présence de périodes d'engorgement qu'en conditions bien drainées (support de culture maintenu à 80% HE).

Dans les autres compartiments, l'effet du régime hydrique est très variable. Dans le compartiment *Ech* en présence de plante, la présence et l'augmentation des durées des périodes d'engorgement permet une augmentation plus importante (par rapport au sol initial) du Co lié à ce compartiment, alors que sans plante ces engorgements ont pour conséquence une diminution par rapport au sol initial et au traitement à humidité constante de quantités de Co. Dans le compartiment *Acido*, la quantité de Cr est maximale pour le traitement "1×8 jours d'engorgement" et minimale pour le traitement "4×2 jours d'engorgement". Enfin, dans le compartiment *Mn-Ox*, l'effet de l'état hydrique dépend de la présence ou non de plante. En

absence de plante, la quantité de Co y diminue (par rapport à l'échantillon initial) plus faiblement quand on passe du traitement à humidité constante (80% HE) au traitement "4×2 jours d'engorgement" puis au traitement "1×8 jours d'engorgement". Par contre, en présence de la plante, la présence et l'augmentation des durées des périodes d'engorgement a pour conséquence une diminution de plus en plus importante du Co dans ce compartiment.

Tableau 7.10 Altération minérale et transfert de Co vers les différents compartiments géochimiques, en gramme de Co redistribué pour 100g de Co total présent dans le substrat par rapport à l'échantillon initial (Indices de redistribution I_i).

	80% HE		4×2 jours d'engorgement		1×8 jours d'engorgement	
	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante	avec plante	sans plante
Hydro	+ 0,81	+ 1,38.10 ⁻²	+ 0,09	+ 1,27.10 ⁻²	+ 0,09	+ 9,46.10 ⁻³
Ech	+ 0,54	+ 0,17	+ 0,18	- 0,61	+ 4,33	- 0,63
Acido	+ 14,60	+ 7,29	+ 9,94	+ 6,42	+ 20,10	+ 9,68
Mn-ox	- 23,60	- 20,90	- 23,50	- 19,50	- 36,30	- 17,30
Fe-ox1	+ 10,60	+ 10,60	+ 7,95	+ 7,40	+ 9,74	+ 9,52
Fe-ox2	- 4,04	+ 2,02	+ 4,56	+ 5,37	+ 1,30	- 2,13
MO	+ 0,97	+ 0,77	+ 0,74	+ 0,88	+ 0,72	+ 0,84

Effet de la rhizosphère

De même que l'état hydrique du support de culture, la rhizosphère ne semble pas avoir d'effet significatif sur la quantité de Co dans les compartiments *Fe-ox2* et *MO*. Elle n'a pas non plus d'effet significatif sur la quantité de Cr du compartiment *Fe-ox1*.

Par contre l'effet de la rhizosphère est significativement positif sur la quantité de Co contenue dans les compartiments *Hydro*, *Ech*, *Acido* et *Mn-ox*. Cet effet se traduit par une augmentation (par rapport au sol initial) des quantités de Cr en présence de plante plus importante qu'en absence de plante dans les compartiments *Hydro*, *Ech* et *Acido*, et à une diminution plus importante de Co dans le compartiment *Mn-ox*.

7.3 Discussion - Conclusion

La répartition des éléments métalliques (Fe, Mn, Ni, Cr et Co) dans les différents compartiments géochimiques et les végétaux est influencée par les deux paramètres majeurs que sont l'état hydrique du support de culture et la présence de la plante par son effet "rhizosphère". Ces paramètres physique et biologique présentent de fortes interactions.

Comme montré dans les chapitres précédents, deux groupes d'éléments sont à distinguer du point de vue de leur appartenance aux différents compartiments : Fe, Ni et Cr d'une part, Mn et Co d'autre part. Ces groupes correspondent à la répartition initiale des éléments dans les différentes phases minérales du sol : Fe, Ni et Cr sont majoritairement liés aux oxydes de fer et Mn et Co aux oxydes très facilement réductibles du type des oxydes de Mn (Quantin *et al.* 2002). Le compartiment des éléments liés aux MO apparaît aussi comme pouvant jouer un rôle majeur, en particulier pour le fer. Les tableaux 7.6 à 7.10, qui représentent les redistributions de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différentes phases organo-minérales par rapport à un échantillon de sol non traité (appelé "sol initial") en gramme d'élément redistribué pour 100g d'élément total, mettent en évidence l'influence des traitements appliqués sur les mobilisations d'éléments.

Deux types d'altération et redistribution sont observables en fonctions des éléments considérés, avec d'un côté l'altération des oxydes de fer, et d'un autre celle des oxydes de manganèse.

Altération des oxydes de fer

Les résultats indiquent tout d'abord que, dans tous les traitements appliqués, une altération des oxy-hydroxydes de fer se produit et se traduit par une diminution des quantités de fer (Tableau 7.6), nickel (Tableau 7.8) et chrome (Tableau 7.9) dans le compartiment des oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*). Ces éléments dissous depuis les oxydes de fer sont redistribués dans des compartiments où ils seront plus disponibles, c'est-à-dire les compartiments des éléments hydrosolubles (*Hydro*), acidosolubles (*Acido*), très facilement réductibles (*Mn-ox*), des oxydes de fer peu cristallisés (*Fe-ox1*) et des matières organiques (*MO*).

Cette altération et redistribution des éléments est contrôlée d'un côté par la présence de la plante, et de l'autre par l'état hydrique du support de culture.

La présence de la plante a pour effet de diminuer la quantité de Fe, Ni et Cr mobilisée depuis les oxydes de fer bien cristallisés par rapport au traitement non planté quel que soit le régime hydrique appliqué. Ainsi, dans le traitement maintenu à humidité constante de 80% HE, pour 100g de fer présent, 10,3 sont dissous depuis les oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*) en présence de la plante alors que 13,7 sont dissous en absence de la plante. L'état hydrique influence ce phénomène uniquement lors de la présence d'une période d'engorgement de 8 jours au cours de la culture (traitement "1×8 jours d'engorgement") et se traduit par une diminution des quantités de Fe, Ni et Cr exportées depuis les oxydes de fer bien cristallisés par rapport aux autres traitements hydriques, avec seulement 9g de fer exportés depuis les oxydes bien cristallisés dans la rhizosphère et 11,6 dans le traitement non planté.

Mais bien que les quantités d'éléments exportés depuis les oxydes de fer bien cristallisés soient moindres dans la rhizosphère, les compartiments acidosoluble *Acido* et échangeable *Ech* sont plus enrichis en ces mêmes éléments dans la rhizosphère que dans les traitements non plantés. De plus, bien que le compartiments des éléments hydrosolubles (*Hydro*) s'enrichisse moins en ces éléments en présence de la plante, on observe de très grandes quantités de ces éléments absorbées par la plante et qui sont donc considérées comme disponibles. Les plus faibles quantités de Fe, Ni et Cr hydrosolubles observées en présence de la plante ne sont donc que les quantités résiduelles en solution après absorption par la plante. Cet enrichissement des compartiments les plus disponibles apparaît nettement dans les résultats présentés dans le Tableau 7.11 qui représente la quantité d'éléments (Fe, Mn, Ni, Cr et Co) jugés les plus disponibles, c'est-à-dire contenus dans les plantes et dans les compartiments hydrosoluble, échangeable et acidosoluble. On remarque aussi un enrichissement des compartiments *Fe-ox1* et *MO*. À part pour Cr, un effet de la rhizosphère est systématiquement remarqué, avec une quantité d'éléments les plus disponibles plus élevée dans la rhizosphère que dans les traitements non plantés. Ainsi, dans le traitement dont l'humidité est maintenue en permanence à 80% HE la présence de la plante permet une augmentation de 23 g de fer facilement disponible par colonne de plus qu'en absence de plante.

En ce qui concerne l'état hydrique des supports de culture, celui-ci n'a aucune influence significative sur la disponibilité de Fe, Ni et Cr en absence de plante. Par contre, en présence de la plante, la présence et l'augmentation de la durée des périodes d'engorgement permet une disponibilité plus grande de ces éléments (sauf Ni), avec une quantité de fer disponible de 59 mg par colonne dans le traitement à humidité constante (80% HE) contre 82 mg par colonne dans le traitement "1×8 jours d'engorgement". Un couplage entre les paramètres hydrique et rhizosphérique semble donc se produire sur les compartiments les plus disponibles qui

conditionne l'expression de l'influence du facteur hydrique. Ce facteur hydrique joue également sur l'importance de l'effet "rhizosphère", nettement visible dans le cas du fer (Tableau 7.11). Dans le traitement à humidité constante de 80% HE, la présence de la plante permet une disponibilité du fer supplémentaire de 23 mg par colonne par rapport au traitement non planté, et cette augmentation passe à 41 mg de fer par colonne dans le traitement à 4 périodes d'engorgement au cours des 41 jours de culture.

Altération des oxydes de manganèse

L'altération des oxydes de manganèse n'est pas influencée de la même manière que celle des oxydes de fer par la rhizosphère. D'une manière générale, Mn et Co sont dissous depuis le compartiment des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*), considéré dans les sols de Ouénarou comme correspondant aux oxydes de manganèse (Quantin *et al.* 2002). Ces éléments sont ensuite redistribués soit vers des compartiments plus disponibles composés des compartiments *Hydro*, *Ech*, *MO* et *Acido*, soit vers des compartiments plus stables que sont les oxydes de fer mal ou bien cristallisés (Tableaux 7.9 pour Mn et 7.12 pour Co).

La dissolution de ces deux éléments dans le compartiment *Mn-ox* est plus importante dans la rhizosphère que dans le support non planté, avec par exemple, pour 100g de Mn présent dans le traitement maintenu à humidité constante, 44 g de Mn qui se dissolvent dans la rhizosphère contre 37 g dans le support non planté. De plus, la présence de la plante permet une redistribution plus importante des éléments vers des compartiments plus disponibles. Ainsi, dans le traitement à "1×8 jours d'engorgement" en absence de plante le manganèse dissous depuis le compartiment *Mn-ox* se redistribue à 30% vers des compartiments plus disponibles (*Hydro*, *Ech*, *Acido*) et 70% vers des compartiments plus stables (*Fe-ox1* et *Fe-ox2*). Par contre, en présence de la plante, 60% sont redistribués vers les compartiments plus disponibles et seulement 40% vers les compartiments plus stables. Cette plus grande disponibilité de Mn et Co est visible dans le Tableau 7.11.

L'altération des oxydes de manganèse est en outre favorisée par la présence et l'augmentation de la durée des périodes d'engorgement mais uniquement en présence de la plante (Tableau 7.7). En effet, dans le traitement maintenu à humidité constante tout au long de la culture du maïs, pour 100g de Mn présent, 44g sont dissous depuis le compartiment *Mn-ox* en présence de plante, et cette quantité passe à 57g dans le traitement à une période de huit jours d'engorgement au cours de la culture. Cet effet du régime hydrique n'est pas visible pour le traitement à 4 périodes courtes d'engorgement, ni en absence de plante.

L'altération des oxy-hydroxydes de fer et de manganèse se traduit donc par une dissolution des éléments métalliques depuis ces oxydes et leur redistribution vers des compartiments biogéochimiques plus ou moins disponibles. La présence de la plante (et donc de la racine) influence de manière différente l'altération des oxydes de fer et celle des oxydes de manganèse, en défavorisant la première et favorisant la seconde. Mais cet effet rhizosphère permet dans les deux cas une plus grande disponibilité des éléments métalliques par rapport aux traitements non plantés. L'état hydrique du support de culture ne semble avoir d'effet sur l'altération des oxydes de fer et de manganèse qu'avec une période de 8 jours d'engorgement au cours de la culture et atténue l'altération des oxydes de fer et accentue celle des oxydes de manganèse, tout en intensifiant l'effet rhizosphère sur la disponibilité des éléments. La présence de cette période d'engorgement accroît donc l'effet de la rhizosphère pour une disponibilité plus grande encore du fer, manganèse, chrome et cobalt. Cet effet n'est toutefois pas constaté pour le nickel. Les quatre périodes d'engorgement de 2 jours au cours de la culture ne semblent pas avoir d'effet significatif sur les phénomènes d'altération.

Tableau 7.11 Evolution de la quantité de métaux dans les plantes et les compartiments où les éléments sont les plus disponibles (Σ (hydrosoluble Hydro, acidosoluble Acido et échangeable Ech)), en mg d'élément par colonne (Indices de disponibilité I_d). Ech i : échantillon initial.

		<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Ni</i>	<i>Cr</i>	<i>Co</i>
Ech i		0,05 (a)	35 (a)	8 (a)	0 (a)	1 (a)
80% HE	Planté	59 (b)	328 (b)	59 (b)	9 (b)	32 (b)
	Non planté	36 (c)	148 (c)	47 (c)	7 (b)	16 (c)
4×2 jours d'engorgement	Planté	63 (b)	203 (d)	56 (b)	12 (c)	22 (b)
	Non planté	44 (c)	104 (e)	44 (c)	9 (b)	13 (c)
1×8 jours d'engorgement	Planté	82 (d)	479 (f)	60 (b)	12 (c)	50 (d)
	Non planté	41 (c)	155 (c)	39 (c)	8 (b)	19 (c)

Evolution des paramètres physico-chimiques et biologiques

La "disponibilisation" plus grande des métaux en présence d'une phase d'engorgement de 8 jours au cours de la culture ne se traduit par une biodisponibilité (absorption des éléments par la plante) plus élevée que dans le cas du fer. La biodisponibilité des autres éléments ne semble pas être influencée par le régime hydrique, et les concentrations en Ni et Co dans les parties aériennes du maïs sont toxiques quel que soit le traitement hydrique appliqué. La croissance plus élevée de la plante dans le cas de la présence de quatre périodes d'engorgement de deux jours au cours de la culture ne s'explique donc pas par les concentrations et minéralo-masses de ces éléments, et doit trouver son origine ailleurs, comme par exemple dans la concentration en éléments minéraux du type N, P ou K, non dosés dans cette étude.

Les études des variations des conditions de pH et d'oxydo-réduction du milieu ont mis en évidence la présence de conditions réductrices dans les deux traitements avec périodes d'engorgement : réduction des nitrates et production d'ammonium, réduction du fer et du manganèse. L'augmentation du pH et la baisse du Eh est équivalente entre ces deux traitements et ces paramètres ne peuvent donc pas expliquer la différence d'impact de ces deux traitements sur l'altération des oxydes de Fe et Mn et la disponibilisation des métaux. En absence de période d'engorgement, le pH ne semble pas être modifié entre le début et la fin de la culture

La plante semble avoir un impact sur le pH mais sur le Eh. Sa présence atténue l'augmentation de pH observée quel que soit le régime hydrique appliqué. Un rôle de la plante sur la réduction des nitrates peut être envisagé.

La réduction du fer est très légèrement favorisée en absence de plante avec la présence de périodes d'engorgements au cours de la culture, mais sans qu'il y ait de différence significative entre les types d'engorgement, et la présence de plante ne favorise la réduction du fer que de façon très aléatoire dans le traitement avec une période d'engorgement de 8 jours.

La réduction du manganèse, avec ou sans plante, est favorisée par la présence de périodes d'engorgement mais encore une fois la durée et le nombre de ces périodes d'engorgement n'a pas d'influence significative. L'effet de la rhizosphère est très marqué avec une plus grande réduction en présence de plante.

La présence de conditions réductrices en présence ou en absence de plante est donc confirmée. Les conditions sont suffisamment réductrices pour une bonne réduction de Mn mais moins pour le fer. Toutefois, ces conditions réductrices n'expliquent pas la différence observée dans l'altération des oxydes en présence de quatre périodes d'engorgement de deux jours ou

d'une seule période d'engorgement de 8 jours, ni l'effet rhizosphère. La dynamique des matières organiques pourrait alors intervenir. La rhizosphère, riche en matières organiques diverses, est riche en acides organiques complexants. Les racines du maïs sont en outre connues pour leur libération de phytosidérophores, molécules chélatantes spécifiques du fer capables de le solubiliser depuis les minéraux du sol (Watteau et Berthelin 1992, 1994). Des périodes d'engorgement du support de culture plus longues pourraient favoriser la mobilité des matières organiques et donc augmenter leur contact avec les oxydes. De plus, une période d'anoxie plus longue peut être à l'origine d'une biodégradation des MO différentes et libérer des molécules différentes que dans le cas du traitement à quatre périodes d'engorgement de deux jours. Le dosage du carbone organique dissous au cours de la culture en absence de plante montre une solubilisation minimale dans le traitement avec une période d'engorgement, et en présence de plante la solubilisation du carbone organique est équivalente dans les deux traitements avec phases d'engorgement. Cette similitude de quantités de COD peut toutefois masquer une différence de qualité des MO produites.

Tableau 7.12 Facteurs de transfert

	Fe	Mn	Ni	Cr	Co
	µg / g matière sèche (parties aériennes)				
<i>H constante</i>	$1,23 \cdot 10^{-3}$				
<i>80% HE</i>	$\pm 5,75 \cdot 10^{-4}$	$0,73 \pm 0,26$	$0,026 \pm 0,004$	$0,005 \pm 0,005$	$0,28 \pm 0,12$
<i>4×2 jours</i>	$5,9 \cdot 10^{-3}$				
<i>d'engorgement</i>	$\pm 4,1 \cdot 10^{-3}$	$0,45 \pm 0,27$	$0,038 \pm 0,011$	$0,024 \pm 0,022$	$0,19 \pm 0,14$
<i>1×8 jours</i>	$7,56 \cdot 10^{-3}$				
<i>d'engorgement</i>	$\pm 2,7 \cdot 10^{-3}$	$0,51 \pm 0,25$	$0,029 \pm 0,008$	$0,024 \pm 0,018$	$0,24 \pm 0,15$

8

INFLUENCE DE L'ETAT HYDRIQUE ET D'APPORTS D'EXSUDATS RHIZOSPHERIQUES MODELES SUR LA REDUCTION ET MOBILISATION D'ELEMENTS MAJEURS ET EN TRACES

8.1 Introduction

Les résultats des chapitres précédents ont bien montré l'influence de la rhizosphère, des microorganismes qui lui sont associés et de phases d'engorgement du milieu sur l'altération d'oxy-hydroxydes de fer et de manganèse, la mobilité et biodisponibilité des éléments concernés (Fe, Mn, Ni, Cr, Co). Cet effet "rhizosphère" apparaît, dans les conditions expérimentales adoptées, avec cultures en pots ou en colonnes sur modèles de sol (mélanges de sol et de sable), avoir des effets plus marqués que ceux des microorganismes autochtones dégradant les seules matières organiques du sol.

Pour préciser l'influence de l'état hydrique du sol (teneur en eau, potentiel hydrique) et d'apports d'exsudats sur les phénomènes d'altération microbienne d'oxy-hydroxydes porteurs d'éléments en traces, des expériences ont été menées dans des dispositifs simplifiés de laboratoire. Elles ont été conduites dans des dispositifs en cuve renfermant 15g d'échantillon de sol de Ouénarou 4.1 placés à 75, 100, 150 et 200% de l'humidité équivalente (HE). Les apports d'exsudats racinaires sont simulés par l'introduction, dans la moitié des traitements, d'un mélange de composés représentant une exsudation racinaire modèle (milieu dit "rhizosphérique" Rh, décrit dans le Chapitre 3.3.6.1). Pour l'autre partie des traitements expérimentaux, les matières organiques présentes ne correspondent qu'à celles des échantillons de sol. Les incubations dans les flacons sérum se font sous atmosphère à teneur initiale de 2% O₂, à 28°C et à l'obscurité. Cette teneur en oxygène a été choisie après des expériences décrites en Annexe 1 et en considérant que la rhizosphère, en raison de l'activité microbienne qui s'y développe, peut présenter de telles teneurs (Dommergues & Mangenot, 1970). Les microorganismes sont ceux du sol. Les conditions expérimentales détaillées et les méthodes sont décrites dans le chapitre 3.4.5.

Les traitements expérimentaux correspondent donc à quatre teneurs en eau (75, 100, 150 et 200% HE) et deux milieux nutritionnels (matières organiques du sol MOS et milieu dit "rhizosphérique" Rh correspondant à des apports de 240 μg de carbone organique par gramme de sol sec). Les analyses ont porté sur 1 flacon par traitement et par temps de mesure. Seules les mesures de la minéralisation du carbone ont été réalisées 3 réplicats par traitement.

8.2 Résultats

8.2.1 Evolution du pH et du Eh

Le pH des sols augmente constamment d'une valeur initiale de 5,0 ou 5,5 respectivement pour les incubations avec ou sans milieu Rh ajouté jusqu'à des valeurs comprises entre 5,6 et 6,6 du premier jour d'incubation (J1) au trentième et dernier jour (J30) (Figure 8.1). En absence de solution Rh, plus les échantillons de sol ont une forte humidité, plus le pH en fin d'incubation est élevé. Cette augmentation du pH peut s'expliquer par les phénomènes de réduction des nitrates dans le cas présent et du fer qui consomment des protons, mais aussi par la production d'ammonium au cours de la dégradation des MO comme constaté par ailleurs par Stemmler & Berthelin (2003). La biodégradation des acides organiques pourrait également être impliquée mais ces processus se produiraient plus volontiers avec le milieu Rh.

Dans les milieux Rh, les évolutions sont identiques mais sans différence marquée entre les traitements de 75% à 200% HE. La présence de la solution "rhizosphérique" efface ces différences dues aux variations d'humidité du sol et que l'on note dans les dispositifs ne renfermant que les MO du sol (MOS).

Les mesures du Eh montrent que plus les milieux sont saturés en eau, plus ils présentent des phénomènes de réduction marqués dans le cas des dispositifs d'incubation avec les seules MOS. Un véritable gradient est observable de 75 à 200% HE. Dans les milieux à faible teneur en eau, l'activité microbienne consomme rapidement l' O_2 et conduit à une baisse initiale relativement marquée du Eh. Puis ces valeurs se stabilisent ou décroissent peu. Pour les milieux saturés en eau et en particulier à 200% HE une décroissance d'abord lente puis qui s'accélère pour atteindre -100mV est observée. Avec les apports de milieu Rh, quelle que soit la teneur en eau des sols, une diminution plus rapide et plus importante du Eh est observée avec toutefois des valeurs minimum plus faibles pour les sols saturés en eau. Le

développement rapide de ces conditions réductrices est dû à la forte activité microbienne consommatrice des composés organiques et d'oxygène que favorise l'apport de milieu Rh.

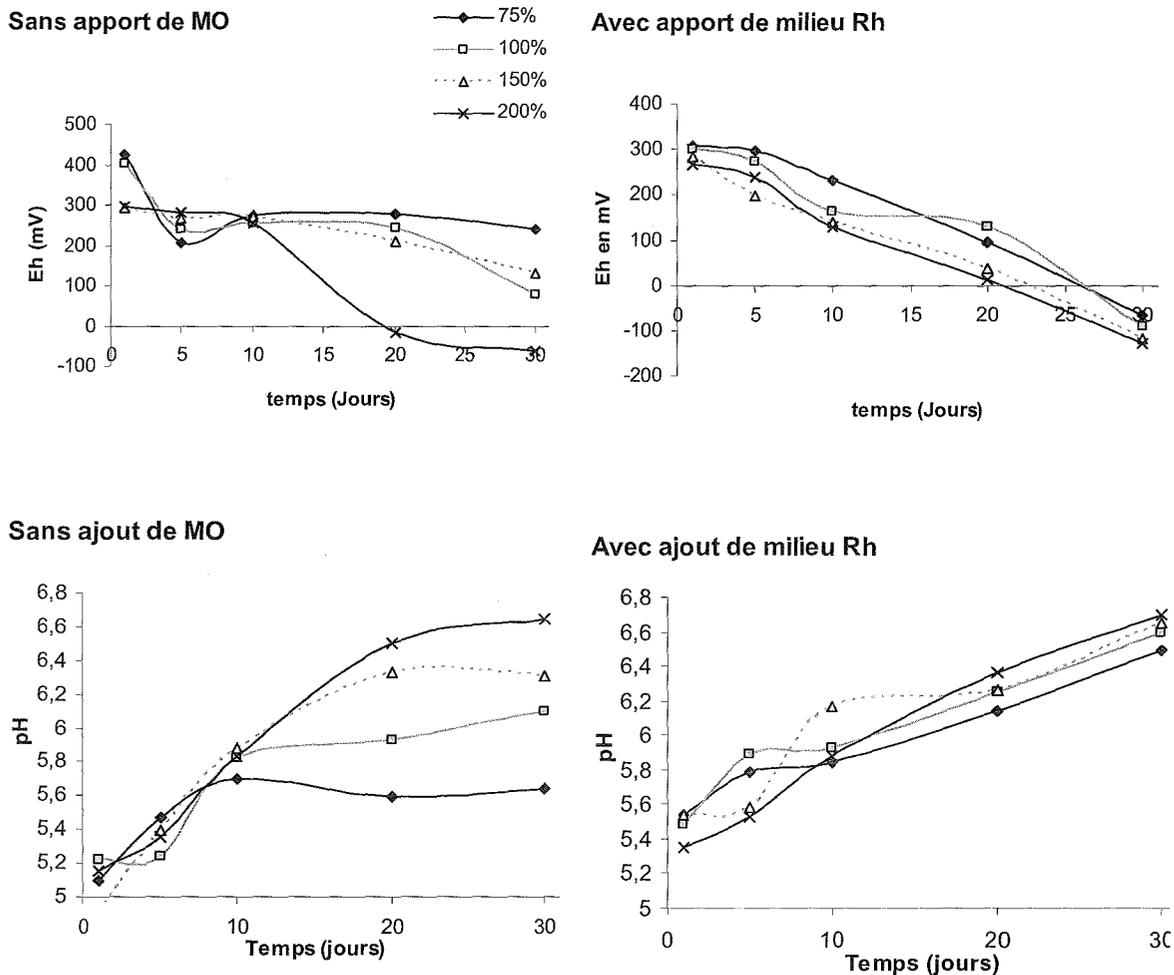


Figure 8.1 Evolution du pH (en haut) et du Eh (mV, en bas) des solutions de sol en fonction du temps pour différentes humidités (75, 100, 150 et 200% HE) avec ou sans apport de milieu Rh.

Lorsque l'on compare les valeurs de pH et Eh avec le diagramme de Pourbaix des différentes espèces chimiques du fer et du manganèse, on constate que les conditions qui se développent au cours des incubations sont toujours favorables à l'existence d'espèces réduites de Mn et qu'elles le sont plus rarement pour la présence de fer ferreux (Figure 8.2).

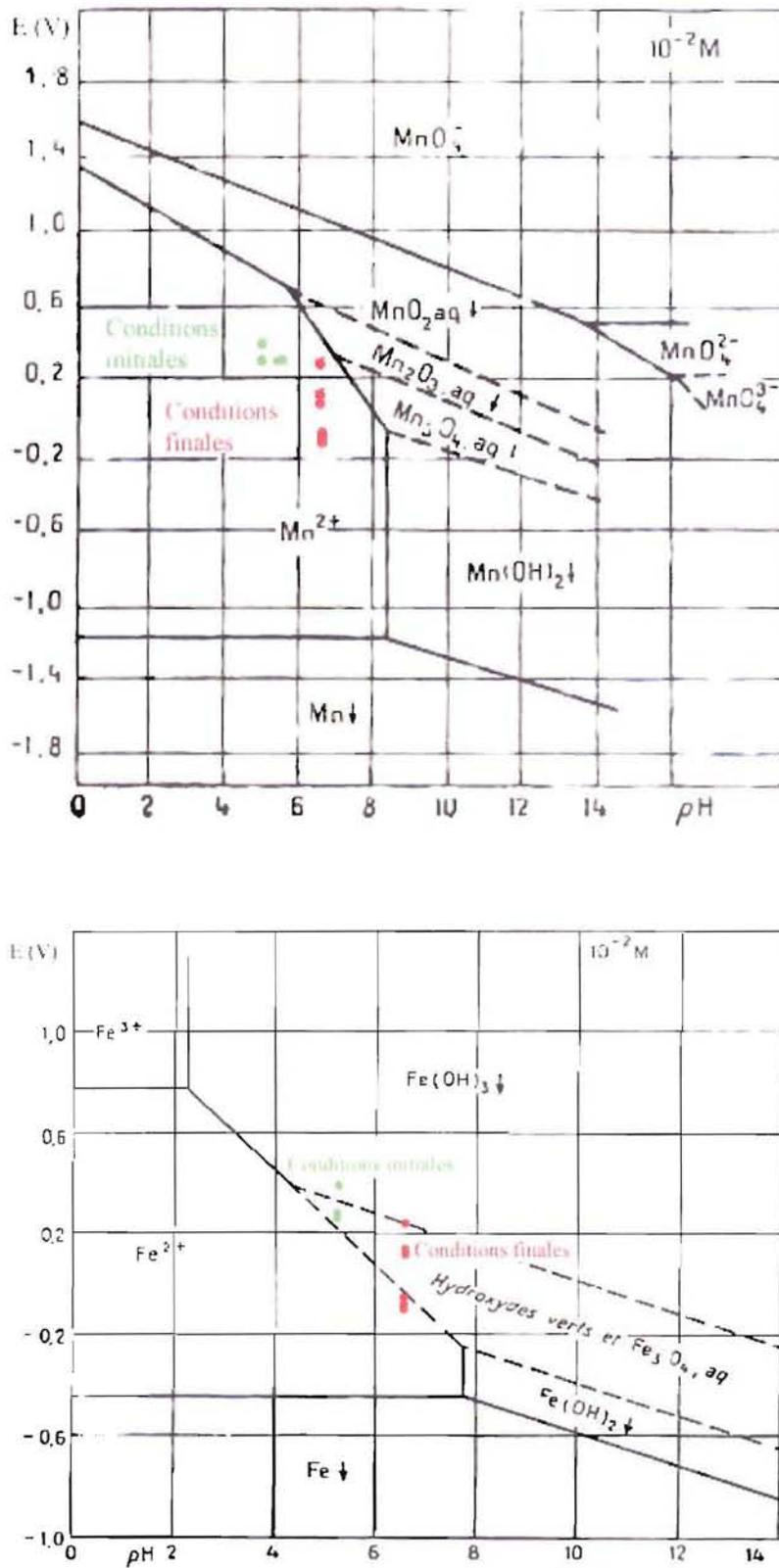


Figure 8.2 Evolution des conditions de Eh et pH des solutions de sol entre le début et la fin des incubations, vue sur le diagramme de Pourbaix du manganèse (en haut) et du fer (en bas)

8.2.2 Biodégradation et minéralisation des MO des sols

Pour tous les traitements expérimentaux, l'indice de minéralisation (CO_2 dégagé par rapport au C organique total) de la matière organique (MO) est relativement important. En fin d'incubation, il varie de 25‰ pour les sols à plus fortes teneurs en eau (150 et 200% HE incubé sans apport de MO) à 50‰ de CO_{tot} pour les sols à faible teneur en eau (75% HE incubé avec apport de milieu Rh) (Figure 8.3). Ces valeurs indiquent une activité bactérienne importante. Ce sont toujours, pour un même milieu, les sols à faibles teneurs en eau qui présentent la plus forte minéralisation. Par ailleurs, plus le sol est saturé en eau, plus le temps de latence de minéralisation est élevé et plus l'indice de minéralisation est faible. La bonne aération des milieux non saturés en eau permet une forte minéralisation des MO dès le début de l'incubation. En milieu saturé en eau ($\geq 150\%$ HE) l'aération du sol est insuffisante pour stimuler de façon efficace l'activité minéralisatrice. La diffusion de l'oxygène y est en effet nettement ralentie (7 mg.L^{-1} à 35°C). L'ajout d'exsudats "rhizosphériques" modèles entraîne une minéralisation du C_{org} plus importante quelle que soit la teneur en eau. Ces apports sont constitués par des composés organiques facilement métabolisable par les microorganismes. On constate aussi que sans apport supplémentaire de MO, les MOS sont minéralisées de façon très voisine pour 75 et 100% HE et ce, très rapidement. Pour ces deux humidités les différences sont marquées dans la phase initiale de minéralisation. Par contre avec l'apport de milieu Rh la distinction se fait entre 75 et 100% HE.

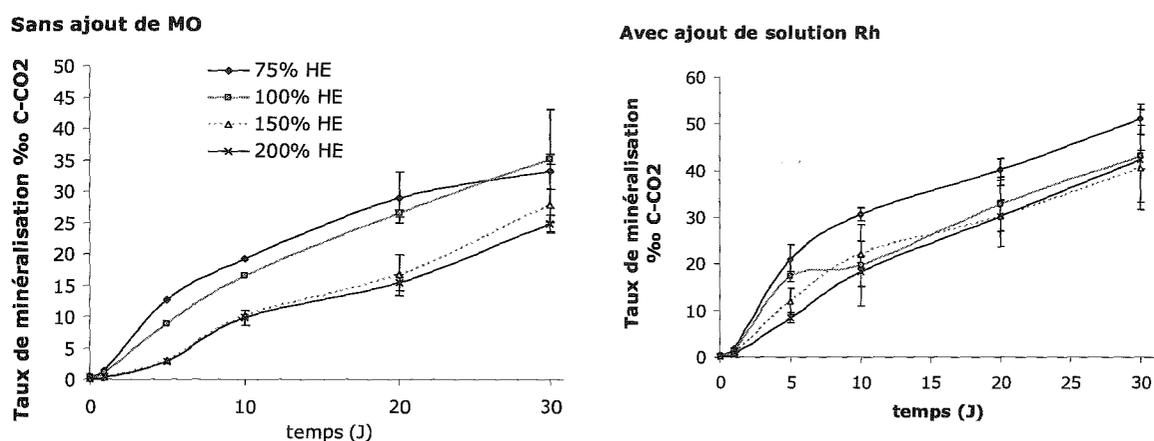
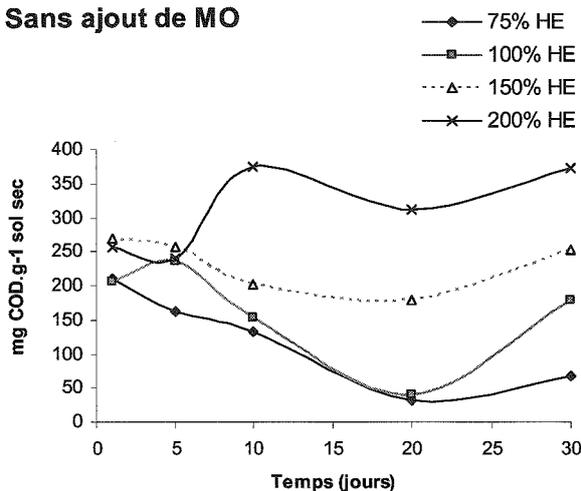


Figure 8.3 Minéralisation cumulée des matières organiques en présence de la MO autochtone du sol (à gauche) ou suite à des apports d'exsudats "rhizosphériques" modèles (à droite), exprimée en ‰ du carbone organique total initial (Indices de minéralisation, $\text{C-CO}_2/\text{CO}_{10d}$).

La dégradation des MO du sol est également suivie par l'évolution de la quantité de carbone organique dissous (COD) dans les solutions d'incubation (Figure 8.4). D'une manière générale, la quantité de COD est plus importante dans les sols non saturés en eau (75% HE) que dans les sols saturés en eau (200% HE). Une diminution de la quantité de COD est observée dans les solutions au cours de l'incubation, sauf dans le cas de l'échantillon à 200% HE incubé en absence d'apport d'exsudats rhizosphériques où la quantité de COD augmente (Figure 8.4). Ceci peut correspondre à la minéralisation des MO sauf quand la biodégradation est ralentie en conditions d'engorgement total des sols sans apport de composés facilement accessibles et biodégradables.

La teneur en COD décroît d'autant plus (dans les traitements sans apport de MO supplémentaires à celles du sol) que la teneur en eau du sol est plus faible. La phase de diminution de la teneur est suivie d'une phase d'augmentation correspondant à un ralentissement de la minéralisation (Figure 8.3) et/ou à une production plus importante de COD. Dans les traitements avec apport de milieu Rh, on observe une forte diminution de 0 à 10 jours suivie d'une augmentation sensible de la teneur. Une différence significative entre les sols à 75 et 100% HE (forte diminution du COD) et les sols à 150 et 200% HE (plus faible diminution du COD) est également observée. Cette faible augmentation pourrait correspondre à la phase de ralentissement de la minéralisation.

Sans ajout de MO



Avec ajout de solution Rh

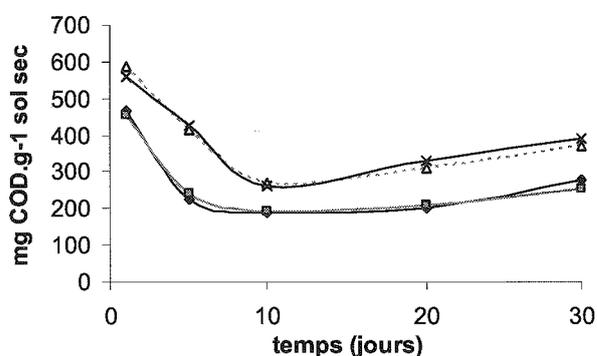
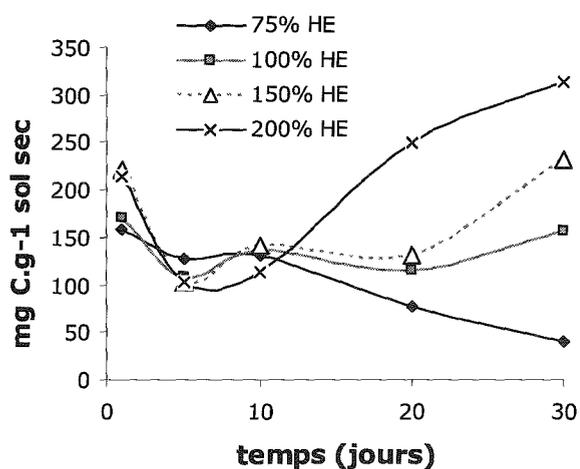


Figure 8.4 Evolution de la teneur en COD dans les solutions de sol en présence de la seule MO autochtone du sol (à gauche) ou suite à des apports d'exsudats "rhizosphériques" modèles (à droite), exprimée en mg Corg par litre d'extrait de sol.

Les polysaccharides totaux (PST) sont plus abondants dans les solutions d'incubation dans les traitements avec apport d'exsudats modèles (Figure 8.5), ce qui s'explique par l'apport

de sucres dans le milieu Rh. De plus, ces polysaccharides sont plus abondants dans les sols saturés en eau qu'en condition non saturée, avec ou sans apport d'exsudats "rhizosphériques". Après une diminution des teneurs dans les cinq premiers jours de l'incubation, la quantité de PST se stabilise ou augmente légèrement sauf pour le traitement 75% HE incubé sans apport de MO supplémentaires. En condition de sol saturé en eau, une production de polysaccharides est observée qui peut être due à un effet de stress sur les bactéries. Les teneurs en carbone organique l de ces PST représentent pratiquement les mêmes valeurs que celles du COD, en particulier dans les incubations avec les seules MO du sol. Ceci suggère que les COD sont constitués par ces polysaccharides.

Sans ajout de MO



Avec ajout de solution Rh

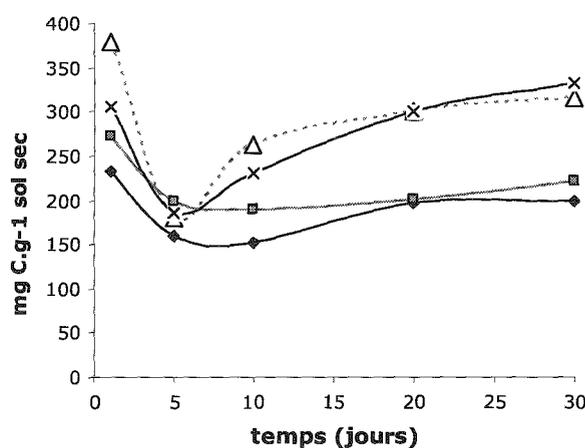
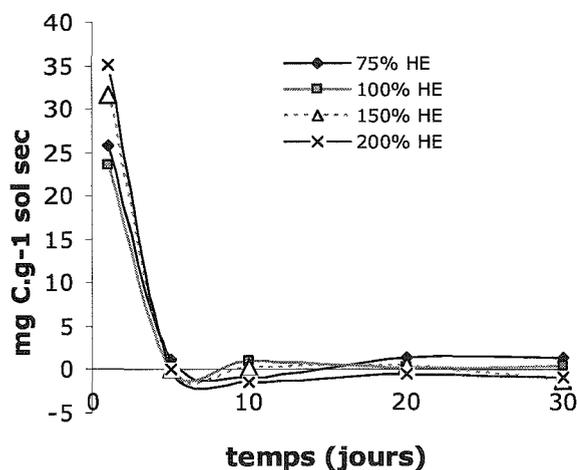


Figure 8.5 Evolution de la quantité de polysaccharides totaux en solution dans les traitements avec la seule MO du sol (à gauche) ou suite à des apports d'exsudats "rhizosphériques" modèles (à droite), exprimée en mg C par litre d'extrait de sol.

Les quantités de sucres réducteurs (SR) sont beaucoup plus faibles que celles des PST. Elles diminuent fortement dès les premiers jours de l'incubation jusqu'à devenir nulles à 5 jours, et ce quel que soit la teneur en eau du sol et le type et la quantité de MO présentes et apportées (Figure 8.6). Les milieux non saturés en eau montrent des quantités de SR plus faibles après un jour d'incubation que les milieux saturés. Les résultats confirment des activités de biodégradation-minéralisation plus importantes en conditions aérobies et la biodégradation rapide des sucres simples dans les sols.

Sans ajout de MO



Avec ajout de solution Rh

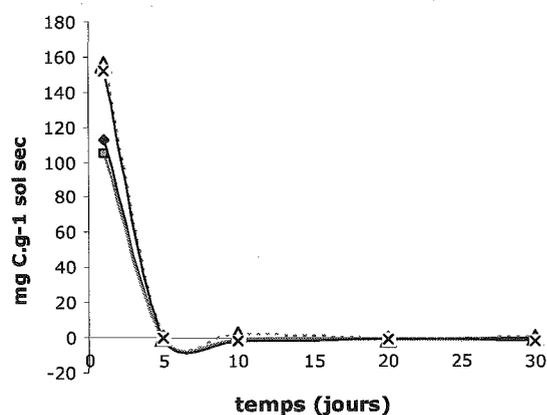
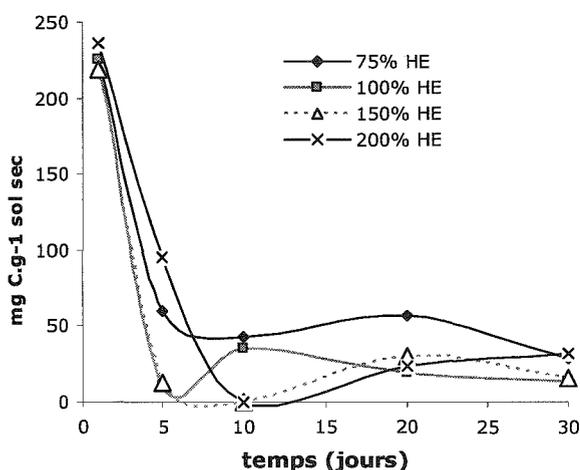


Figure 8.6 Evolution de la teneur en sucres réducteurs en solution dans les traitements avec la MO autochtone du sol (à gauche) ou suite à des apports d'exsudats "rhizosphériques" modèles (à droite), exprimée en mg C par litre d'extrait de sol.

La quantité de composés phénoliques (CPH) en solution après 1 jour d'incubation est la même qu'il y ait ou non apport d'exsudats rhizosphériques modèles (Figure 8.7), ce qui indique que ces composés sont issus de la seule MO du sol et ne sont pas apportés par la solution Rh ou produits de façon significative par les activités microbiennes. Leur quantité diminue fortement en 5 ou 10 jours d'incubation. Cette biodégradation paraît plus sensible aux teneurs en eau du sol dans les traitements sans apport d'exsudats rhizosphériques. La quantité résiduelle en fin d'incubation est équivalente avec ou sans apport de solution Rh.

Sans ajout de MO



Avec ajout de solution Rh

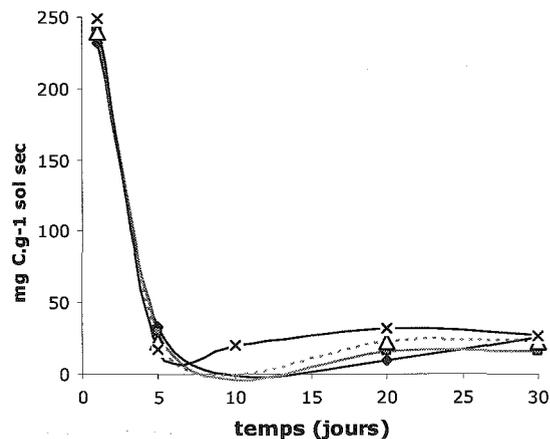


Figure 8.7 Evolution de la teneur en phénols totaux en solution dans les traitements avec la seule MO autochtone du sol (à gauche) ou suite à des apports d'exsudats "rhizosphériques" modèles (à droite), (en mg C par litre d'extrait de sol).

8.2.3 Evolution de la quantité d'anions minéraux en solution

Seuls les anions minéraux présents dans les incubations en présence de sol seul ont été quantifiés en début et en fin d'incubation (Tableau 8.1). Les résultats montrent que les nitrates sont soit consommés comme nutriments soit comme accepteurs d'électrons dans ce cas sans doute, plus particulièrement pour les traitements à 150 et 200% HE.

Pour les sulfates leur forte augmentation au cours de l'incubation suggère une minéralisation importante du soufre organique. L'oxydation de sulfures ne semble pas devoir être impliquée car non observés dans les études minéralogiques. La plus faible minéralisation à 200% HE correspondrait à un état réducteur plus prononcé comme l'indique les valeurs du Eh (Figure 8.1) et une moindre minéralisation des matières organiques.

Tableau 8.1 Anions minéraux en solution (SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , F^- , PO_4^{2-}), $\mu g \text{ anion.g}^{-1} \text{ sol sec}$, dans les incubations avec la MOS seule entre le début (t_1) et la fin (t_{30}) des incubations.

	SO_4^{2-}		NO_3^-		Cl^-		F^-		PO_4^{2-}	
	$\mu g.g^{-1} \text{ sol sec}$									
	t_1	t_{30}	t_1	t_{30}	t_1	t_{30}	t_1	t_{30}	t_1	t_{30}
75% HE	14	89	6	1	11	13	0	0	0	0
100% HE	12	123	6	1	8	14	0	0	0	0
150% HE	11	141	5	0	10	14	0	0	0	0
200% HE	12	56	4	0	10	24	0	0	0	0

8.2.4 Solubilisation de Fe, Mn, Ni, Cr et Co

En fonction d'une part, de la teneur en eau des échantillons incubés et d'autre part des conditions énergétiques et nutritionnelles, différents types de dissolution des éléments sont distingués dans le milieu. Avec la seule présence des matières organiques du sol (MOS) comme source de carbone et d'énergie, après un jour d'incubation la présence dans l'ordre décroissant de Mn, Ni, Fe, Co et Cr est notée en solution avec une relativement forte solubilisation de Mn et Ni (Figure 8.8). Au cours de l'incubation le comportement de Mn évolue en fonction de l'état hydrique. Il reste relativement stable en solution pour 75% HE. En revanche au cours du temps sa solubilisation devient plus importante pour respectivement

100, 150 et 200% HE. La solubilisation de Mn progresse régulièrement d'environ 2.10^{-6} g.L⁻¹ à 16.10^{-6} g.L⁻¹ pour une humidité de 200% HE.

Ce "gradient" croissant de la solubilisation de Mn de 75 à 200% HE n'est pas observé pour Fe. Le fer est toujours solubilisé au cours des incubations mais sa solubilisation est plus importante pour 75% HE. Une mobilisation s'établit dans l'ordre inverse de Mn et décroît de 75 à 200% HE. Ni et Cr présentent des courbes de solubilisation qui ont des allures voisines. Elles sont aussi voisines de celle observées pour le fer sauf semble-t-il pour 200% HE où les similitudes ne sont pas marquées entre Ni et Cr. En revanche, Co aurait un comportement voisin de celui de Mn.

Ces résultats suggèrent que Mn est mobilisé en conditions réductrices et en accord avec les valeurs de pH et Eh notées sur le diagramme de Pourbaix (Figure 8.2) sur lequel sont placés les valeurs de Eh/pH des milieux. Dans cet horizon de surface de OUE 4.1, les échantillons initiaux contiennent respectivement pour les formes échangeables (*Ech*), liées au compartiments des matières organiques (*MO*) et très facilement réductibles (*Mn-ox*) : 1,52 ; 730,00 ; 248,00 µg.g⁻¹ de sol pour Fe et 115,00 ; 2,00 ; 3032,00 µg.g⁻¹ de sol pour Mn. Ces différences de spéciation dans la phase solide pourraient expliquer au moins en partie la solubilisation initiale de Mn lié au compartiment des éléments échangeables, puis la mobilisation de Fe liée à la dégradation des MO qui diminue avec l'augmentation de la saturation en eau. Enfin la mobilisation de Mn, qui croit avec l'hydromorphie et la réduction, se ferait aux dépens du compartiment lié aux oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*). Avec l'apport d'exsudats racinaires modèles, on observe à un jour d'incubation une relativement forte solubilisation de Fe qui peut être due à la présence de composés acides complexants (acides tartrique, citrique, fumarique, succinique, malique) dans le milieu apporté. Ces solubilisations après un jour d'incubation sont plus modestes pour Mn, Ni, Co et Cr. Un effet "exsudats" pour la mobilisation des éléments est ainsi distingué. Pour Fe, à 75 et 100% HE une solubilisation à 5 jours d'incubation est notée, suivie d'une diminution de la teneur pouvant correspondre à la biodégradation des agents complexants. Pour 150 et 200% HE une légère immobilisation est observée.

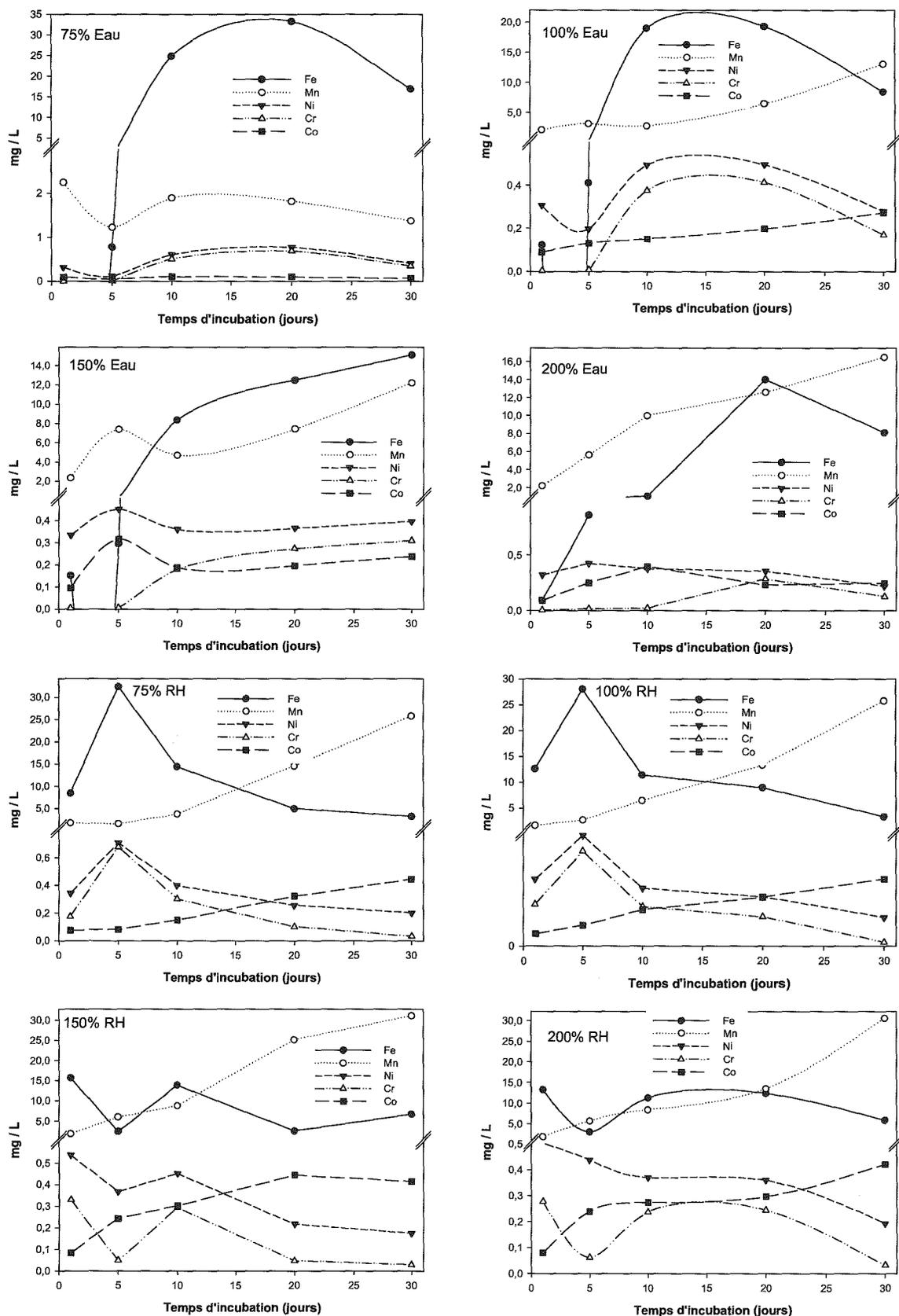


Figure 8.8 Solubilisation des métaux totaux dans les dispositifs d'incubation en présence de la MO autochtone du sol (% Eau) ou suite à des apports de solution "rhizosphérique" (%RH), exprimée en mg de métaux par litre de solution d'extraction (mg.L^{-1}).

Le comportement de Cr mais aussi de Ni suivent celui du fer. En revanche, dans tous les traitements, Mn est solubilisé de façon croissante des conditions d'humidité de 75% HE à celles correspondant aux sols engorgés (150 et 200% HE). Co suit ces variations de Mn. La solubilisation de Mn atteint des valeurs relativement élevées. Ces solubilisations sont aussi à rapprocher des valeurs de Eh et pH qui correspondent aux domaines de Mn réduit alors que ce n'est pas le cas pour le fer. Les valeurs du pH et du Eh sont toujours insuffisantes ou à la limite de l'existence de Fe^{2+} en solution.

8.2.5 Etude de la structure cristalline par spectroscopie infrarouge à Transformé de Fourier (IRTF)

Les spectres IRTF ont été retravaillés à l'aide du logiciel OPUS 3.0 de manière à ramener les spectres sur la même ligne de base tout au long de la gamme de nombres d'onde. De plus, pour pouvoir comparer les spectres deux à deux semi-quantitativement, les pics ont été ré-ajustés en intensité par rapport au pic Si-O à 1017 cm^{-1} , supposé invariant. Pour plus de lisibilité, les spectres ont été lissés, notamment entre 1800 et 1300 cm^{-1} . Les spectres non lissés sont proposés en Annexes 2.

La Figure 8.9 représente les spectres IRTF après 1 jour d'incubation sans ajout de MO. Les pics les plus visibles correspondent aux 4 pics principaux de la goethite, le pic de silice Si-O à 1017 cm^{-1} servant à l'ajustement des spectres entre eux, et une zone entre 1700 et 1533 cm^{-1} correspondant à de l'eau libre dont la présence témoigne d'une insuffisance de la dessiccation des échantillons de sol.

La bonne superposition des spectres après 1 jour d'incubation met en évidence la précision et la répétitivité de l'analyse, suggérant une significativité relativement importante des moindres modifications du spectre après les incubations.

Les deux spectres de la goethite δOH et γOH sont légèrement décalés vers la gauche par rapport aux données de la littérature, et se situent respectivement à 912 et 800 cm^{-1} au lieu de 892 et 795 cm^{-1} . Ce décalage est l'expression d'une substitution du fer par un autre cation dans le réseau cristallin (Cornell & Schwertmann 1996). Compte tenu de la chimie de l'échantillon de sol (Chapitre 3.2.1), il pourrait s'agir de Ni et/ou Cr.

Incubations sans ajout de MO
Spectres IR après 1 jour d'incubation

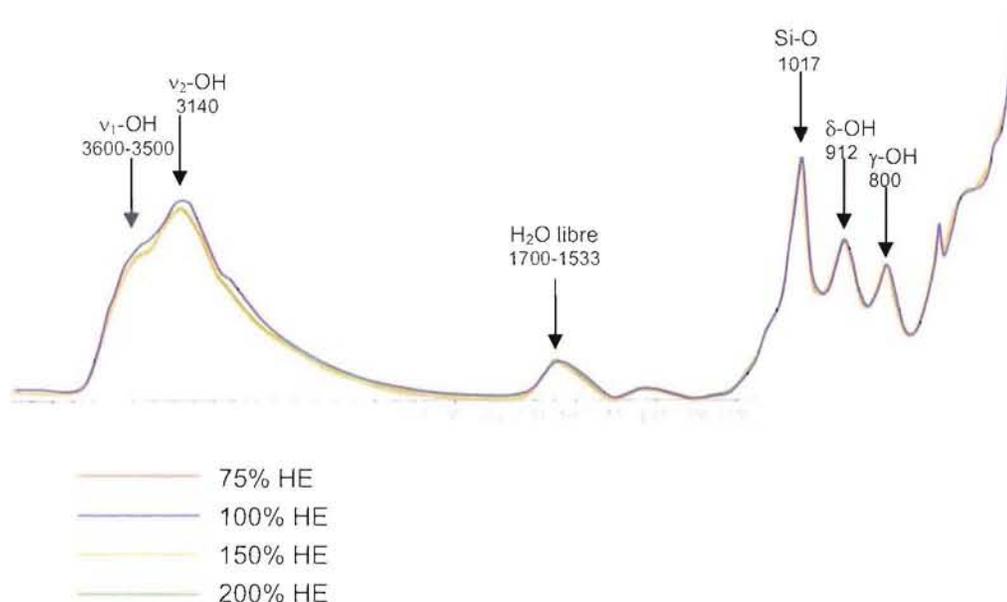


Figure 8.9 Spectres IRTF des échantillons de sol après 1 jour d'incubation sans ajout de MO.

Les spectres IRTF ont été comparés deux à deux pour les échantillons de sol après 1 jour (T1) et 30 jours (T30) d'incubation pour les échantillons incubés sans ajout de MO et avec ajout de solution Rh, à 75 et 200% HE (Figures 8.10 à 8.13).

Après 30 jours d'incubation à 75% HE sans apport de MO (Figure 8.10), une légère décroissance de l'intensité des pics δOH et γOH est constatée. Aucune variation n'est constatée pour les pics v₁OH et v₂OH. A 200% HE (Figure 8.11), la même décroissance de l'intensité des pics δOH et γOH est constatée avec en plus une décroissance du pic v₂OH. Le pic v₁OH n'est plus visible.

Après une incubation en présence de la solution Rh, l'évolution des spectres n'est pas la même qu'en absence de solution Rh. Une très légère augmentation de l'absorbance au niveau des pics δOH et γOH est observée en fin d'incubation à 75 et 200% HE, et une diminution de l'absorbance au niveau du pic v₁OH à 200% HE (Figures 8.12 et 8.13).

La faible diminution de l'intensité des pics caractéristiques de la goethite pourrait être l'expression d'une deshydroxylation du minéral (Ruan *et al.* 2001). Cette deshydroxylation dépend du traitement appliqué à l'échantillon de sol. Les liaisons de vibrations dans et hors plan d'empilement des anions sont systématiquement affectées, alors que les vibrations

d'élongation des groupements hydroxyles de surface ne le sont qu'à 200% HE. La disparition du pic $\nu_1\text{-OH}$ à 200% HE sans ajout de MO pourrait être liée à la présence de phosphates ou éventuellement d'autres anions sur la surface de l'oxyde (Cornell & Schwertmann 2002). Toutefois, les variations observées sur les spectres IRTF après incubation sont de très faible importance, et des analyses complémentaires sont à prévoir pour pouvoir conclure.

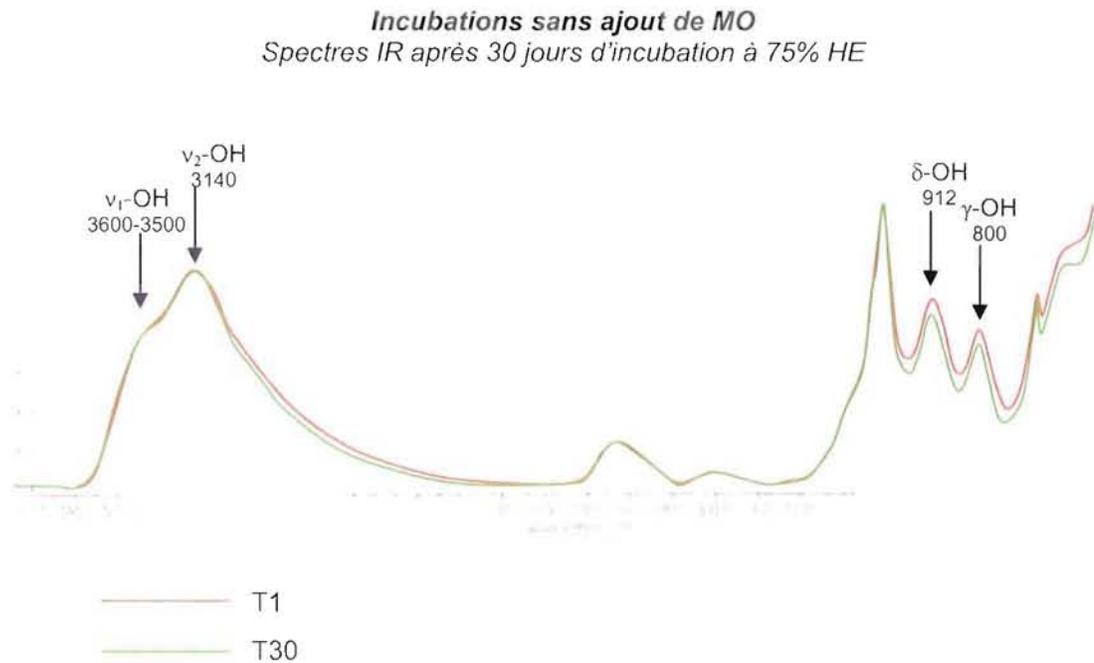


Figure 8.10 Spectres IRTF des échantillons de sol après 1 jour et 30 jours d'incubation sans ajout de MO à 75%HE

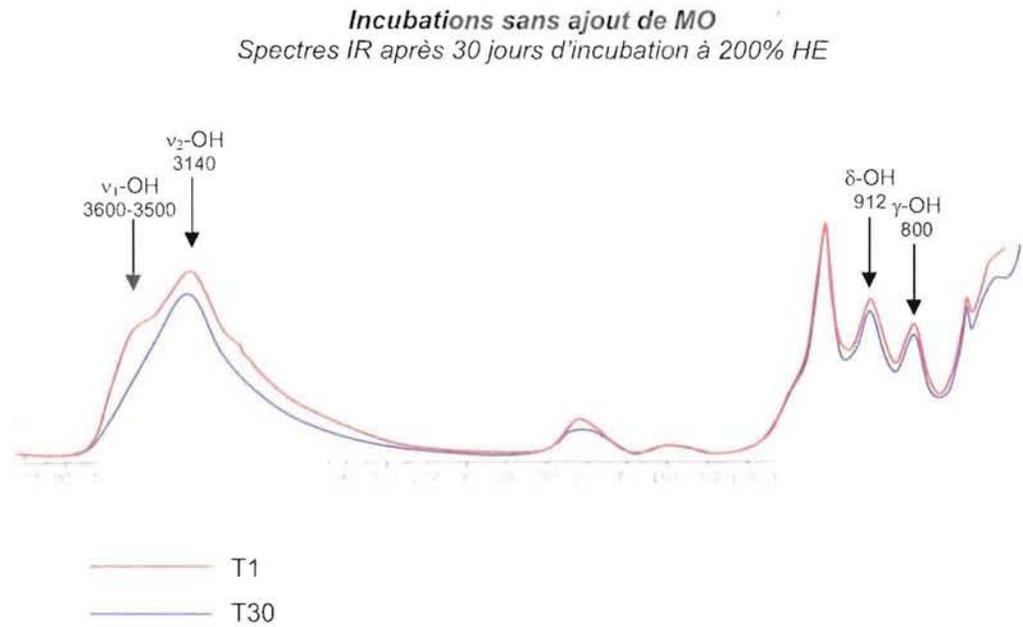


Figure 8.11 Spectres IRTF des échantillons de sol après 1 jour et 30 jours d'incubation sans ajout de MO à 200% HE

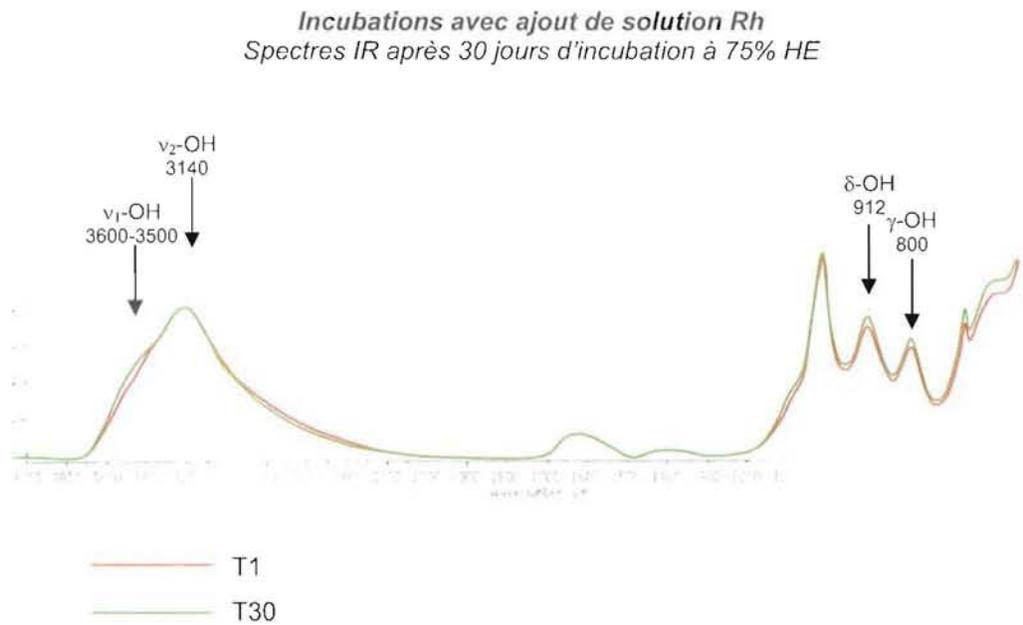


Figure 8.12 Spectres IRTF des échantillons de sol après 1 jour et 30 jours d'incubation avec ajout de solution Rh à 75% HE

Incubations avec ajout de solution Rh
Spectres IR après 30 jours d'incubation à 200% HE

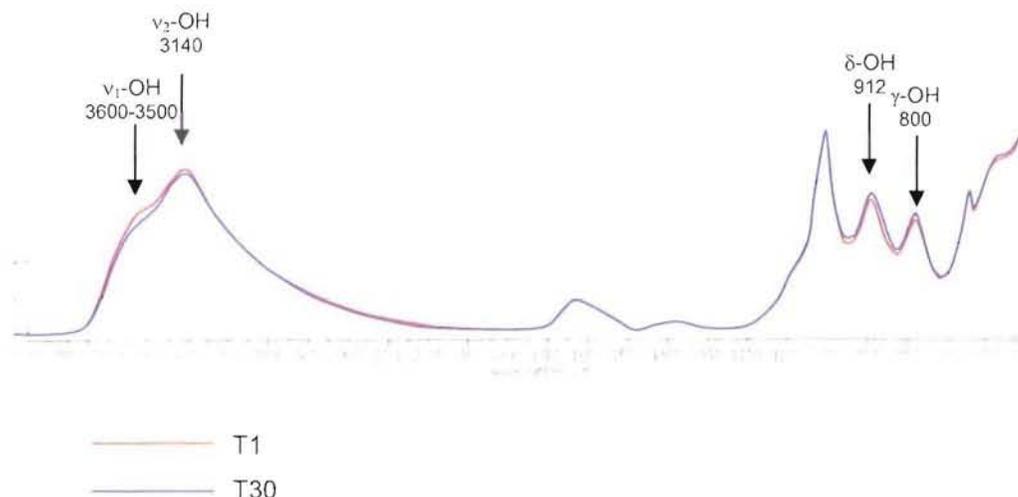


Figure 8.13 Spectres IRTF des échantillons de sol après 1 jour et 30 jours d'incubation avec ajout de solution Rh à 200% HE

8.3 Discussion - Conclusion

L'apport de matières organiques (MO) sous la forme d'exsudats racinaires modèles du maïs et l'application de différents états hydriques du sol entraînent des phénomènes de minéralisation microbienne des MO et de dissolution microbienne des métaux (Fe, Mn, Ni, Cr et Co) qui présentent des dynamiques très dépendantes de ces paramètres.

Les MO autochtones du sol présentent des allures et des cinétiques de biodégradation et minéralisation qui soulignent l'importance de l'état hydrique. Les minéralisations les plus fortes sont observées dans les échantillons à 75 et 100% HE. Cette biodégradation est marquée par des évolutions du pH qui indiquent une alcalinisation d'autant plus forte que la saturation en eau du sol est élevée et correspondrait à une ammonification dominante dans les phases de minéralisation de l'azote. La minéralisation de l'azote conduirait à l'ammonification seule ou dominante dans les échantillons saturés en eau alors que la nitrification lui ferait suite dans les dispositifs incubés à 75 et 100% HE.

Le Eh est aussi un indicateur discriminant en fonction de l'état hydrique du milieu. Des valeurs négatives sont atteintes seulement dans les échantillons incubés à 200% HE. L'évolution des matières organiques montre une production de COD dans les sols les plus saturés, leur moindre production et/ou biodégradation plus rapide dans les sols à 100 et 75 % HE et peu d'évolution dans les sols à 150% HE. Ces variations du COD suivent celles des

polysaccharides totaux avec des teneurs très voisines en carbone organique et des rapports PST/COD proches de 1, indiquant que, dans ces conditions, le COD est essentiellement constitué de polysaccharides. Comme les sucres réducteurs sont très vite consommés de même que les phénols présents en faible teneur, on peut considérer que les composés organiques dominants sont vraiment des polysaccharides. Pour ces processus de minéralisation, biodégradation des MO et d'évolution du pH et Eh, un gradient marqué par les teneurs en eau (état hydrique du sol) est à souligner. La Figure 8.14 représente ainsi la quantité de carbone organique (CO) minéralisé après 30 jours d'incubation en fonction de l'humidité des échantillons de sol. Malgré l'importance des erreurs relatives, une tendance à la diminution des taux de minéralisations est observée avec l'augmentation du pourcentage d'humidité du sol. De même, un lien est établi entre l'humidité du sol et les pH et Eh en fin d'incubation (Figure 8.15), avec une augmentation des valeurs de pH et une diminution des valeurs de Eh avec l'augmentation de l'humidité.

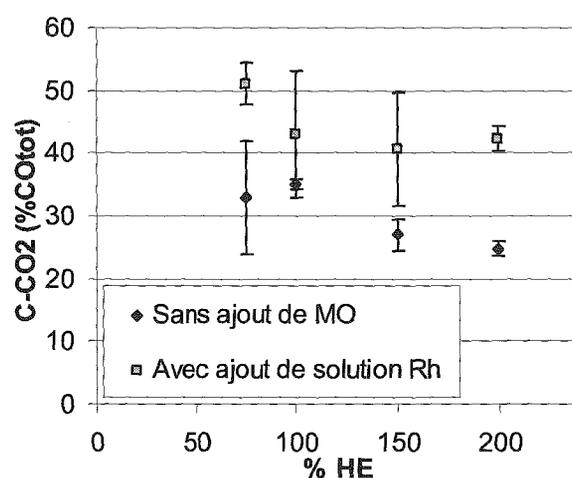


Figure 8.14 Evolution de la quantité de carbone minéralisé en fin d'incubation en fonction de la teneur en eau des échantillons de sol

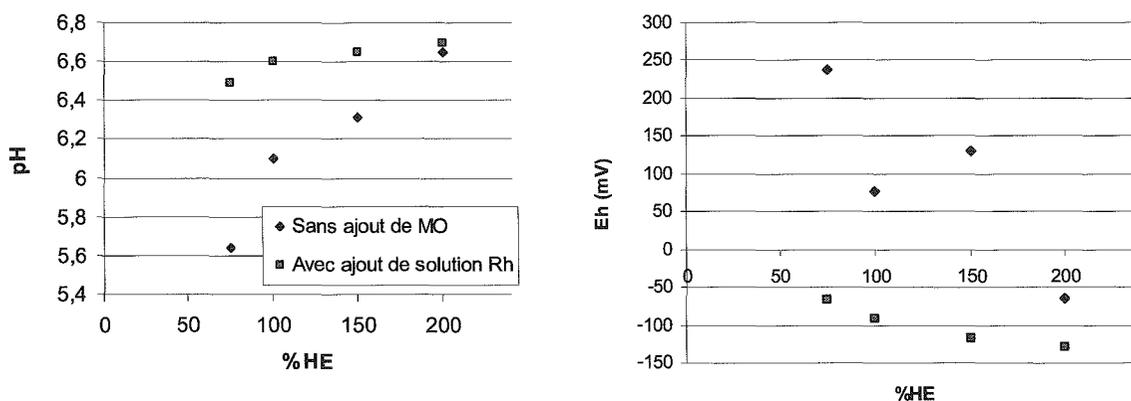


Figure 8.15 Evolution du pH et du Eh en fin d'incubation en fonction de la teneur en eau des échantillons de sol

En parallèle des biodégradations-minéralisations des MO, se manifestent des phénomènes de dissolution des métaux sous la dépendance de l'état hydrique et donc de la dynamique des MO.

Curieusement avec ces échantillons de sol, et dans les conditions adoptées, le fer est plus fortement mobilisé dans les dispositifs à 75 et 100% HE que dans ceux à 150 et 200% HE. Il est relativement peu présent sous forme Fe^{2+} et serait donc sous forme organo-métallique soluble, sauf en fin d'incubation en présence de la solution Rh. En effet, le rapport Fe^{2+}/Fe_{tot} en solution est compris entre 0,00 et 0,08 après un jour d'incubation, et atteint 0,11 (75 à 150% HE) à 0,41 (200% HE) en fin d'incubation en présence de la MOS seule, et 1 seulement en fin d'incubation avec ajout de la solution Rh.

Pour Mn c'est l'inverse. On note une plus forte mobilisation pour les échantillons à 150 et 200% HE que pour ceux à 75 et 100% HE. Sa solubilisation est aussi plus importante dans la phase initiale (1 jour d'incubation). On constate aussi que les conditions physico-chimiques du milieu (Eh-pH) correspondent plus à des formes réduites de Mn (Mn^{2+}) alors que ce n'est pas le cas pour le fer. La connaissance des modes et formes de mobilisation doit être améliorée en fonction d'une meilleure définition de l'état initial de ces éléments. Pour les formes les plus disponibles (échangeables *Ech*, très facilement réductibles *Mn-Ox*, associés aux matières organiques *MO*) le fer est essentiellement associé au compartiment de MO alcalinosolubles, c'est-à-dire des composés humiques et fulviques, alors que Mn est plutôt localisé dans le compartiment échangeable et associé à la phase réductible par hydroxylamine.

Ces différences de compartiments-sources peuvent sans doute expliquer ces différences de comportement. Les éléments en traces suivent soit le fer comme c'est le cas de

Ni et Cr, soit le manganèse comme c'est le cas de Co. Il serait particulièrement intéressant de déterminer la spéciation de ces éléments majeurs et en traces en solution.

Les spectres IRTF montrent très peu de variations en fonction des traitements appliqués aux échantillons de sol. Seule une faible deshydroxylation est observable. Les signes d'une éventuelle diminution de la cristallinité de la goëthite (élargissement des bandes, décroissance de la fréquence de vibration des groupements hydroxyles) ne sont pas détectés.

L'apport d'exsudats racinaires modèles modifie très significativement l'allure et les cinétiques des courbes d'évolution du pH et du Eh, et des courbes de minéralisation-biodégradation des matières organiques. Tout d'abord l'alcalinisation du milieu et le développement des conditions réductrices sont uniformisés par l'apport du milieu Rh. L'alcalinisation et la réduction sont générales et relativement voisines quelles que soient les conditions hydriques.

La minéralisation des MO est plus importante seulement dans le traitement 75% HE. Les différences ne sont marquées qu'en phase initiale et non pas en phase finale d'incubation. On constate une diminution générale du COD plus marquée dans le traitement où la minéralisation est la plus forte (75% HE). On remarque aussi une diminution forte pour 100% HE alors que la minéralisation ne montrait pas cette différence, sauf dans la phase initiale. Les polysaccharides totaux sont d'abord dégradés dans tous les traitements puis comme dans l'expérience sans ajout de solution Rh, produits et libérés dans le milieu pour les échantillons les plus saturés en eau. L'évolution des sucres réducteurs et des phénols totaux présente des allures semblables à celles des sols avec la seule MO autochtone. Les sucres réducteurs simples apportés dans le modèle "exsudats" sont donc très rapidement utilisés en moins de 5 jours.

Les composés phénoliques présents dans ces milieux recevant les "exsudats" ne sont que ceux des MO autochtones comme le suggèrent les mêmes valeurs quantitatives et allures des cinétiques d'évolution de ces composés.

La dynamique des éléments montre pour le fer une solubilisation initiale au cours des 5 premiers jours suivie d'une insolubilisation pour les traitements 75 et 100% HE, alors que l'on note peu de variations des teneurs entre la phase initiale et la fin de l'incubation pour les traitements à 150 et 200% HE. Il y aurait là un effet des apports d'exsudats modèles qui par la présence d'acides aliphatiques carboxyliques favorisent dans l'étape initiale d'incubation la solubilisation du fer sous forme de complexes solubles. Les complexes se dégradent ensuite plus rapidement dans les sols non saturés que dans les sols saturés en eau (Berthelin 1982).

Pour le manganèse on observe en revanche une dissolution pour toutes les conditions d'état hydrique adoptées mais avec une solubilisation qui va croissante de 75 à 200% HE.

Ces différences de comportement de Fe et Mn peuvent s'expliquer aussi comme noté précédemment pour les incubations avec les seules MO autochtones, par la nature respective des sources et leur disponibilité. Le comportement des éléments en traces suit respectivement celui de Mn pour Co et celui de Fe pour Ni et Cr, avec toutefois une légère divergence pour Ni et Cr pour 200% HE. Dans ces conditions expérimentales il apparaît que la définition de la spéciation des éléments en solution est une étape fondamentale à développer. Par ailleurs, la dynamique et l'activité des populations microbiennes impliquées est aussi à étudier précisément pour établir les relations entre biodégradation des MO et activité des bactéries ferri-réductrices et mangani-réductrices.

DISCUSSION GENERALE,
CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

9

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les oxydes et oxyhydroxydes de fer et de manganèse sont très souvent accumulateurs (puits) et porteurs (sources) d'éléments métalliques en traces, en particulier sur les sols développés sur différents types de roche-mère comme les péridotites, serpentinites, basaltes... Les phénomènes d'altération des phases porteuses peuvent libérer ces éléments en traces métalliques et contribuer à leur transfert et dispersion vers les eaux et les végétaux dans les écosystèmes continentaux. Pour bien définir les processus impliqués dans ces phénomènes, ce travail de recherche a engagé des études pour déterminer l'influence des interactions entre les racines, les microorganismes et l'état hydrique du sol sur la mobilisation et redistribution du fer, manganèse, nickel chrome et cobalt dans des sols ferrallitiques de la séquence de Ouénarou (Nouvelle-Calédonie). Ces sols, réputés riches en nickel, sont caractérisés par la prédominance minéralogique des oxydes de fer, avec environ 60% de fer sous forme d'oxyde (Fe_2O_3). Les oxydes de manganèse représentent une part nettement plus faible (environ 0,7% de MnO_2) mais sont beaucoup plus sensibles aux variations des conditions physico-chimiques et biologique du milieu que les oxyhydroxydes de fer. Ils sont, avec ces derniers, un compartiment de stockage et une source importante d'éléments métalliques majeurs et en traces, avec des teneurs en NiO , Cr_2O_3 et CoO qui atteignent respectivement 1,0 ; 1,6 ; 0,03 %. Ces métaux peuvent, s'ils subissent des changements d'état, entraîner des perturbations, voire des risques pour la qualité des eaux, des productions végétales et du fonctionnement des écosystèmes.

Intérêt des dispositifs expérimentaux adoptés

Les études menées dans ce travail visaient à déterminer l'influence des matières organiques, soit autochtones, soit rhizosphériques, des microorganismes associés ou non à la rhizosphère, et de l'état hydrique du sol, sur l'altération des oxyhydroxydes de fer et de manganèse et la mobilisation des métaux dans des conditions proches de celles rencontrées *in*

situ. Les dispositifs expérimentaux développés sont des systèmes simples, tels que des cultures de plantes en pots ou colonnes, ou des incubations de sols dans des dispositifs en cuves (batch).

Les plantes (maïs) ont été cultivées dans trois dispositifs différents en fonction du paramètre à étudier. L'influence de la rhizosphère a été observée à l'aide de dispositifs simples de culture en pot avec, en tant que témoins, des pots non plantés. Le rôle des microorganismes associés à la rhizosphère ou non, a pu être distingué grâce à des colonnes qui ont été maintenues en conditions axéniques par une membrane perméable aux gaz mais imperméable aux microorganismes (Biofolies®). Les supports de culture (mélange sol-sable) ont ainsi pu être stérilisés puis soit maintenus comme tels, soit ré-inoculés par des communautés bactériennes ferri- ou mangani-réductrices (IM1 ou IM2). Enfin, pour étudier l'influence de l'état hydrique du "sol", un dispositif en double colonne a été adapté, avec une alimentation en eau permettant d'engorger à la demande les colonnes de "sol" par imbibition ascendante, limitant ainsi la formation de poches d'air au sein de la colonne.

Les incubations en batch ont été conduites avec ou sans apport de solutions d'exsudats racinaires modèles sur des échantillons de sol placés dans des systèmes fermés et en conditions d'atmosphère et d'humidité contrôlées.

Pour les expériences avec culture de maïs, le substrat de culture composé d'un mélange de 10% de sol de Ouénarou (horizons 4.1, 4.2 ou 4.3) et de 90% de sable a pour effet de modifier les propriétés hydriques et minéralogiques originales du sol. Mais ce choix a été guidé par le souci d'obtenir un développement raisonnable de la masse racinaire du maïs. Les sols de Ouénarou sont en effet réputés phytotoxiques pour leur teneur élevée en nickel. Cette toxicité se caractérise notamment par une baisse de la croissance racinaire. Diluer dix fois le sol dans du sable nous a donc permis de maintenir une masse racinaire suffisante à l'expression de phénomènes rhizosphériques, et une quantité de métaux suffisante pour observer des altérations significatives des phases minérales et des modifications de répartitions des éléments dans les différents compartiments géochimiques.

Ces dispositifs, qui fonctionnent tous en système fermé avec un confinement des racines, ont l'inconvénient de ne pas refléter les véritables conditions *in situ*, et ne correspondent donc pas à de véritables agrosystèmes. Mais ils ont l'avantage d'être simples à manipuler, de faciliter les échantillonnages (sols et solutions) et de permettre de varier des paramètres comme la teneur en eau du sol, la présence de microorganismes et le type de matières organiques présentes. Ils ont aussi permis d'envisager le système "sol" dans sa

complexité, avec des minéraux pédogénétiques et des matières organiques complexes correspondant aux conditions naturelles, et non pas avec des minéraux de synthèse ou pur et des milieux nutritifs "artificiels". L'estimation du rôle des paramètres et la définition des processus sont ainsi plus réalistes.

Amélioration de la biodisponibilité des éléments métalliques par le système rhizosphérique

Les résultats de cette étude montrent que la plante, par ses systèmes racinaires associés aux microorganismes, mobilise et absorbe très efficacement des quantités importantes de fer, manganèse, nickel et chrome. Cette mobilisation n'intervient significativement pour le cobalt qu'avec des phases d'engorgement des supports de culture. Cette mobilisation se traduit pour le nickel par une concentration dans les parties aériennes des plantes qui dépasse le seuil de $12\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche, considéré par L'Huillier (1996) comme seuil de toxicité chez le maïs.

Les éléments métalliques sont donc devenus biodisponibles au cours de la culture du maïs. Cette biodisponibilité a été évaluée par un indice de disponibilité I_d , qui représente la somme des quantités de métaux absorbés par la plante et contenus dans les compartiments hydrosolubles, échangeables, et, le cas échéant, acidosolubles. Cet indice met en évidence la très faible biodisponibilité des éléments avant culture ($I_d = 0,23, 4,52, 0,79, 0,00$ et $0,24$ pour Fe, Mn, Ni, Cr et Co respectivement) et la faible biodisponibilité des éléments lors d'incubations en absence de plante ($I_d = 1,03, 1,87, 0,22, 0,00, 0,10$ pour Fe, Mn, Ni, Cr et Co respectivement) par rapport à une culture en présence de plante ($I_d = 2,85, 56,55, 9,30, 0,01, 1,18$ pour Fe, Mn, Ni, Cr et Co respectivement). La présence de la plante (en fait, des systèmes racinaires et des microorganismes associés) contribue donc à rendre biodisponibles des éléments qui ne l'étaient pas initialement. Outre la biodisponibilité du nickel observée *in situ*, celle d'autres métaux a été signalée par divers auteurs (Uren 1992, Marschner 1994). Becquer et al. (2003) ont par ailleurs noté une grande disponibilité du chrome sous végétation naturelle dans la toposéquence de Ouénarou en notant que Cr est majoritairement présent sous forme de goethites substituées en Cr et de chromite, mais également présent dans les solutions de sol. La fraction de Cr la plus disponible est présente sous forme échangeable Cr(VI) anionique, correspondant à la forme la plus toxique, adsorbé à la surface des oxydes de fer. Il apparaît que c'est l'apport de phosphore en tant que fertilisant qui augmente la solubilisation de Cr(VI) par échange ionique. A la différence d'autres métaux et d'autres conditions, l'effet des plantes est donc, pour ces phénomènes, indirect.

La biodisponibilité de Ni, et probablement celle de Cr, tous deux absorbés par le maïs en fortes quantités, et observée dans nos expériences peut être invoquée pour expliquer une baisse de croissance (exprimée en masse de matière sèche) de près de 50% des maïs cultivés sur un mélange sol/sable, par rapport à des plantes cultivées sur du sable pur. Par ailleurs aucune carence en Fe, Mn et K n'est en effet suspectable au vu des teneurs des végétaux.

Les microorganismes jouent un rôle important sur la mobilisation et biodisponibilité des métaux. Le coefficient de transfert F_t du sol à la plante est en effet amélioré par la présence de microorganismes. Ainsi, pour le fer, le facteur F_t est de 0,0014 en absence de microorganismes (colonnes de substrat totalement stérile) et de 0,0022 en présence de la microflore totale du sol. De plus, la croissance de la plante est presque deux fois plus importante en présence qu'en absence de microorganismes. L'effet des microorganismes sur la croissance végétale peut être dû à la mobilisation microbienne des éléments minéraux mais aussi à des effets de type hormonaux stimulant cette croissance. L'accroissement du facteur de transfert du sol à la plante n'est pas lié qu'à un effet des microorganismes sur la croissance puisque la teneur est aussi nettement accrue, mais impliquerait fortement des effets de dissolution-altération de minéraux.

Altération rhizosphérique et microbienne des oxyhydroxydes de fer et de manganèse

Comme le montrent les résultats expérimentaux, La biodisponibilité des éléments métalliques fait suite à l'altération des oxydes de fer et de manganèse par les racines et les microorganismes qui y sont associés.

L'utilisation de la méthode des extractions séquentielles des éléments permet d'observer l'évolution de la répartition des métaux des compartiments géochimiques les plus stables vers les compartiments où ils sont plus accessibles. Dans l'ordre de disponibilité décroissante on distingue les éléments liés aux compartiments hydrosoluble (*Hydro*), échangeable (*Ech*), acidosoluble (*Acido*), oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*), oxydes de fer peu cristallisés (*Fe-ox1*) et oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*). En parallèle de ces extractions séquentielles, les éléments liés au compartiment des matières organiques (*MO*) ont également été extraits. Il est à noter que le compartiment dit "hydrosoluble" ne prends en compte que les éléments présents dans cette phase au moment de l'extraction, et ne tient pas compte de la quantité d'élément qui a pu être absorbée par la plante et qui a transité par cette phase hydrosoluble.

Deux groupes d'éléments sont à distinguer en fonction de leur comportement et appartenance aux différents compartiments géochimiques. Fe, Ni et Cr sont principalement liés aux oxydes de fer peu (*Fe-ox1*) ou bien cristallisés (*Fe-ox2*) alors que Mn et Co sont principalement liés aux oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*). Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par Quantin *et al.* (2002) sur ces mêmes sols.

Dans tous les traitements expérimentaux, l'altération des oxyhydroxydes de fer et de manganèse se traduit par une mobilisation des éléments métalliques depuis ces oxyhydroxydes et leur redistribution vers des compartiments biogéochimiques plus ou moins disponibles ou accessibles.

Dans le cas des oxyhydroxydes de fer (Figure 9.1), l'altération se traduit par une diminution des quantités de Fe, Ni et Cr attribuées au compartiment des éléments liés aux oxydes de fer bien cristallisés (*Fe-ox2*). Ces éléments mobilisés depuis les oxyhydroxydes de fer sont redistribués dans des compartiments où ils sont plus facilement disponibles : les compartiments des éléments hydrosolubles, acidosolubles, échangeables, des matières organiques et des oxydes de fer peu cristallisés.

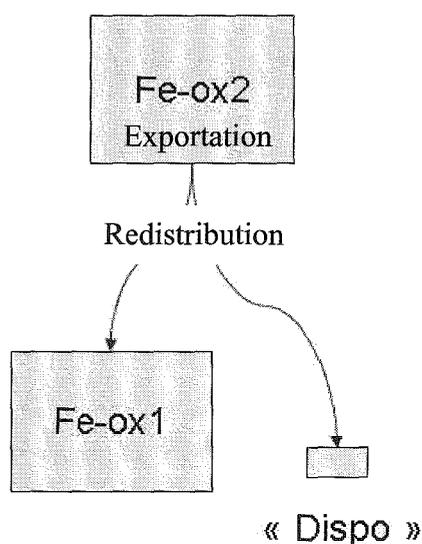


Figure 9.1 Représentation schématique du transfert de Fe, Ni et Cr vers les différents compartiments géochimiques du sol, en présence de la rhizosphère du maïs et sa microflore totale, à 80% HE

Dans le cas des oxydes de manganèse (Figure 9.2), l'altération se traduit par une mobilisation de Mn et Co depuis le compartiment des oxydes très facilement réductibles (*Mn-ox*) et une redistribution de ces éléments soit vers des compartiments plus disponibles comme celui des éléments hydrosolubles, échangeables, acidosolubles et lié aux matières organiques,

soit vers des compartiment plus stables comme les oxydes de fer peu ou bien cristallisés. Contrairement aux oxyhydroxydes de fer où l'altération se traduit par une "amorphisation" des oxydes et donc une plus grande accessibilité des éléments, une partie importante des oxydes de manganèse est dissoute avec un transfert de Mn vers des phases plus stables et moins accessibles que dans son compartiment initial, mais la plus grande partie transférée devient plus disponible. L'importance de ces transferts varie d'une expérience à l'autre, sans doute en relation avec le dispositif utilisé et notamment le rapport quantité de sol/masse racinaire. il est donc difficile de représenter schématiquement ces transferts.

L'importance des mobilisations et redistributions des éléments métalliques, depuis et vers les différents compartiments géochimiques, est sous la dépendance de différents paramètres étudiés au cours de ce travail et dont certains jouent un rôle très déterminant.

Influence de la rhizosphère du maïs sur l'altération des (oxyhydr)oxydes et la redistribution des métaux dans les différents compartiments géochimiques du sol

Par rapport aux sols non plantés, la présence de la plante entraîne une diminution des quantités de Fe, Ni et Cr mobilisées depuis les oxyhydroxydes de fer bien cristallisés. Par contre les compartiments les plus disponibles ou accessibles (hydrosolubles, échangeables, acidosolubles, auxquels il faut ajouter les quantités d'éléments prélevées par les plantes) sont relativement plus enrichis en Fe, Ni et Cr que dans les sols non plantés. Ce phénomène est mis en évidence par l'évolution des indices de disponibilité I_d qui sont plus élevés en présence de plantes. Ainsi les quantités de Fe, Ni et Cr considérées comme plus disponibles sont respectivement de 2,8 ; 9,3 ; 0,01 mg dans la rhizosphère alors qu'elles ne sont que de 1,0 ; 0,2 ; 0,0 mg dans le sol nu (Chapitre 4).

L'altération des oxydes de manganèse n'est pas influencée de la même manière que celle des oxydes de fer par la rhizosphère. La mobilisation de Mn et Co depuis le compartiment des oxydes facilement réductibles est plus importante en présence qu'en absence de la plante. La présence de la plante entraîne en outre une redistribution plus importante de Mn et Co vers des compartiments plus disponibles comme les phases hydrosolubles, échangeables et acidosolubles que dans les traitements non plantés. De ce fait un enrichissement plus faible des compartiments plus stables (oxydes de fer peu ou bien cristallisés) est alors observé.

La présence de la plante se traduit donc par un effet rhizosphère qui d'une part entraîne une altération relativement moins importante des oxydes de fer que des oxydes de manganèse (Figure 9.2), et d'autre part favorise pour ces deux groupes de métaux une évolution forte vers les phases plus disponibles. Cet effet rhizosphère conduit donc pour tous les métaux considérés à un accroissement des phases biodisponibles et facilement disponibles.

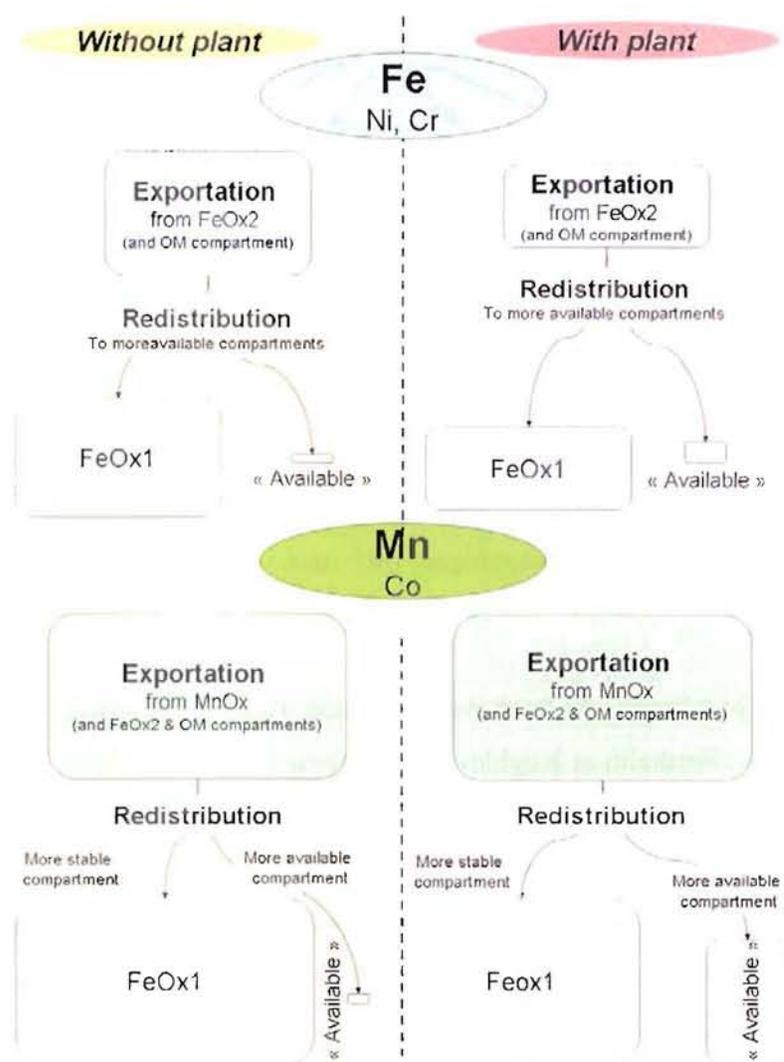


Figure 9.2 Représentation schématique du transfert de Fe, Ni, Cr, Mn et Co entre les différents compartiments géochimiques du sol, sous l'effet ou non de l'altération dans la rhizosphère du maïs (Paskiewicz & Berthelin 2006)

L'altération des oxydes de fer et de manganèse peut se faire selon deux voies principales : **réduction bactériennes** directe et **acidification et complexation** du fer et du manganèse par des métabolites : acides organiques, composés phénoliques, molécules chélatantes du type phytosidérophores (Figure 9.3, Dakora & Phillips 2002, Watteau & Berthelin 1994).

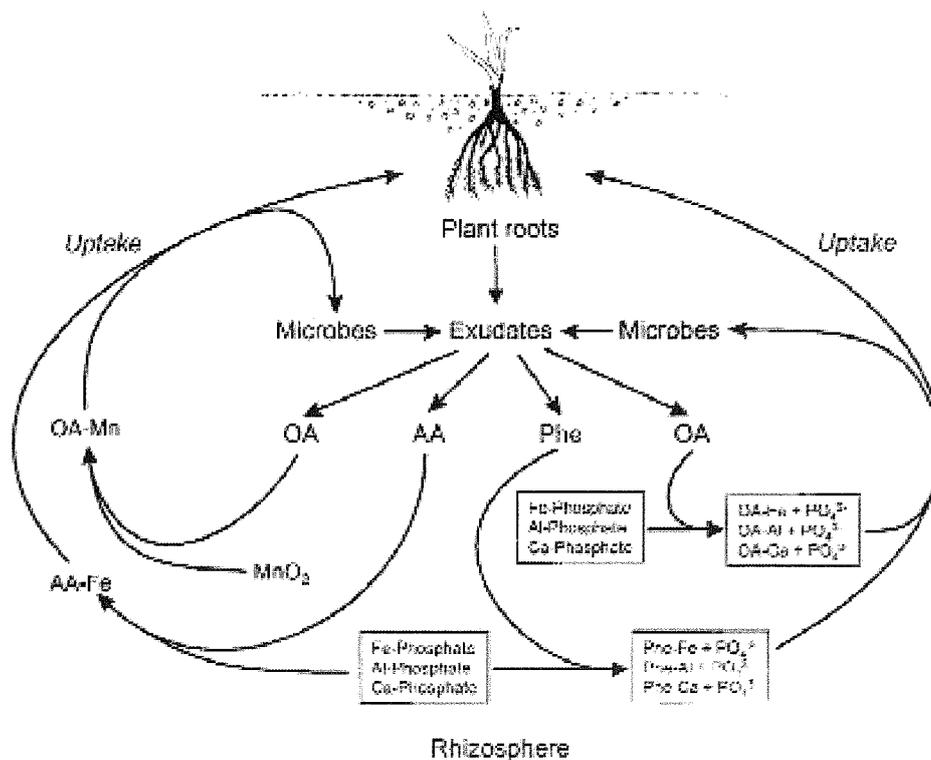


Figure 9.3 Effet des exsudats racinaires sur la biodisponibilité et le prélèvement des éléments par la plante et les microorganismes rhizosphériques. OA = Acides Organiques, AA = Acides Aminés (phytosidérophores inclus), Phe = Composés phénoliques (d'après Dakora & Phillips 2002)

La réduction bactérienne du fer et du manganèse n'ayant prioritairement lieu qu'en des conditions anoxiques (Berthelin et Kogblevi 1974, Munch & Ottow 1983), l'hypothèse de la complexation par les molécules organiques exsudées par le maïs ou produits par les microorganismes de la rhizosphère pourrait dans les conditions expérimentales adoptées être privilégiée. Cependant, de précédentes études (Paskiewicz *et al.*, en préparation, Annexe 1) ont montré qu'en présence de suffisamment de matières organiques métabolisables, l'activité microbienne minéralisatrice du carbone organique pouvait créer, suite à une rapide consommation de l'oxygène et comme proposé par Berthelin (1982), des conditions réductrices au moins au sein de microsites. La recherche de bactéries ferri- et mangani-réductrices et les isolements des communautés bactériennes IM1 et IM2 ont mis en évidence la présence et la capacité de bactéries de la rhizosphère à réduire ces deux éléments, dissoudre les oxydes et libérer des métaux. Même si dans nos dispositifs de culture en pot la baisse du potentiel d'oxydoréduction global observée n'est pas suffisante pour indiquer des conditions favorables à la réduction du fer ou du manganèse, une baisse de Eh localisée, non traduite à l'échelle du pot entier, n'est pas à exclure. Cette hypothèse peut être soutenue par les résultats

obtenus lors des incubations en batch avec ou sans ajout d'une solution rhizosphérique modèle. En milieu aéré (75% HE) ou saturé en eau (200% HE), les conditions de Eh et pH obtenues permettent la réduction du manganèse et sont à la limite des conditions favorables à la réduction du fer (Figure 8.2). La présence de fer réduit Fe^{2+} et de manganèse réduit Mn^{2+} a d'ailleurs été détectée dans la rhizosphère lors de plusieurs expériences. Une relativement plus faible mobilisation et exportation de Fe depuis les oxydes de fer bien cristallisés observée en présence de la plante pourrait ainsi être expliquée par des conditions trop aérées, incompatibles avec la réduction du fer. Ces conditions étant dues à l'absorption d'eau par la plante et l'aération créée par le passage des racines. Mais la présence des racines aurait aussi pour effet d'empêcher la reprécipitation du fer et donc son insolubilisation par complexation, et le rendrait et/ou maintiendrait plus disponible. En absence de la plante, le sol est maintenu plus humide (pas d'évapotranspiration, ni aération par les racines), le fer serait donc plus mobilisé par réduction bactérienne depuis les oxydes de fer, mais les conditions d'humidité (80% HE) sont toutefois trop faibles pour maintenir une bonne anoxie. Le fer reprécipite alors et devient moins mobile et disponible qu'en présence de la plante par manque de molécules complexantes.

Influence des microorganismes associés ou non à la rhizosphère du maïs sur la redistribution des métaux dans les différents compartiments géochimiques du sol en conditions globalement aérée (80% HE)

La répartition des éléments métalliques dans les différents compartiments géochimiques est influencée par la présence et le type de communautés microbiennes, totales ou plus spécifiques, présentes ou introduites dans les systèmes de culture. Mais cet effet est dépendant de la présence ou non de plante.

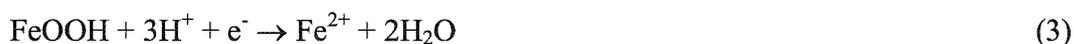
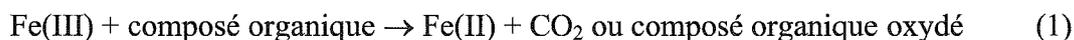
Ainsi, en absence de plante, à 80% de l'humidité équivalente dans les dispositifs de culture en colonne axénique, aucune différence significative n'est observée entre l'altération des oxyhydroxydes de fer et de manganèse en présence de la microflore totale du sol et en conditions totalement stériles (racines seules). Ces résultats sont en contradiction avec la majorité des études réalisées sur l'altération des oxydes de fer dans les sols, qui indiquent un rôle fondamental des microorganismes qui favorisent leur altération par réduction bactérienne (Berthelin 1982, Lovley 1991, Quantin *et al.* 2002). Ceci pourrait correspondre à l'absence de conditions favorables à l'altération bactérienne des oxydes. Les colonnes de sol sont en effet maintenues à 80% HE. La réduction bactérienne au sein de microsites réducteurs pourrait être

de trop faible importance pour se manifester à l'échelle de la colonne de sol. Les altérations observées en présence de la microflore totale du sol et en condition totalement stérile, seraient donc voisines et peut-être avant tout chimique ou physique. Une complexation et/ou réduction par les matières organiques autochtones du sol, de type acides organiques carboxyliques ou phénoliques, peuvent aussi être impliquées.

En revanche, en présence de la plante, l'absence de microflore (support de culture stérile) permet une augmentation globale des quantités de fer dans les compartiments les plus disponibles (hydrosolubles, échangeables, acidosolubles, quantités absorbées par la plante) significativement plus élevée qu'en présence de la microflore totale du sol. Mais la présence de microorganismes permet une meilleure absorption des éléments par la plante. Cet effet n'est toutefois pas observé significativement pour Mn, Ni, Cr et Co.

En revanche, la ré-inoculation par les communautés bactériennes ferri- et mangani-réductrices IM1 et IM2 des colonnes de sol plantées et préalablement stérilisées s'est avérée dans tous les cas plus favorable à la mobilisation des éléments métalliques que la présence de la seule microflore totale du sol, sans toutefois favoriser une plus grande altération des oxydes de fer bien cristallisés. La présence de ces microflores spécifiques accroît la mobilisation des éléments et leur transfert vers des compartiments plus accessibles qu'en présence de la microflore totale du sol (Figure 9.4). Les éléments sont donc soit solubilisés sous une forme différentes en présence des communautés bactériennes IM1 et IM2, soit solubilisés par les mêmes types de processus mais maintenus en solution par d'autres mécanismes. Certaines bactéries seraient ainsi capables de synthétiser des "réductases ferriques" assimilatrices mais aussi des réductases ferriques dissimilatrices (Schröder *et al.* 2003) qui permettent de solubiliser le fer depuis des compartiments peu solubles comme les oxydes de fer, et de maintenir ce fer à l'état soluble, donc disponible.

Dans les mécanismes de réduction bactérienne, la production de métabolites, tel que proposé dans l'équation 1 (respiration anaérobie *sensu stricto*) et les équations 2 et 3 (réduction couplée à des fermentations) (Berthelin *et al.* 2006) pourrait être impliquée dans ces maintiens en solution de métaux.



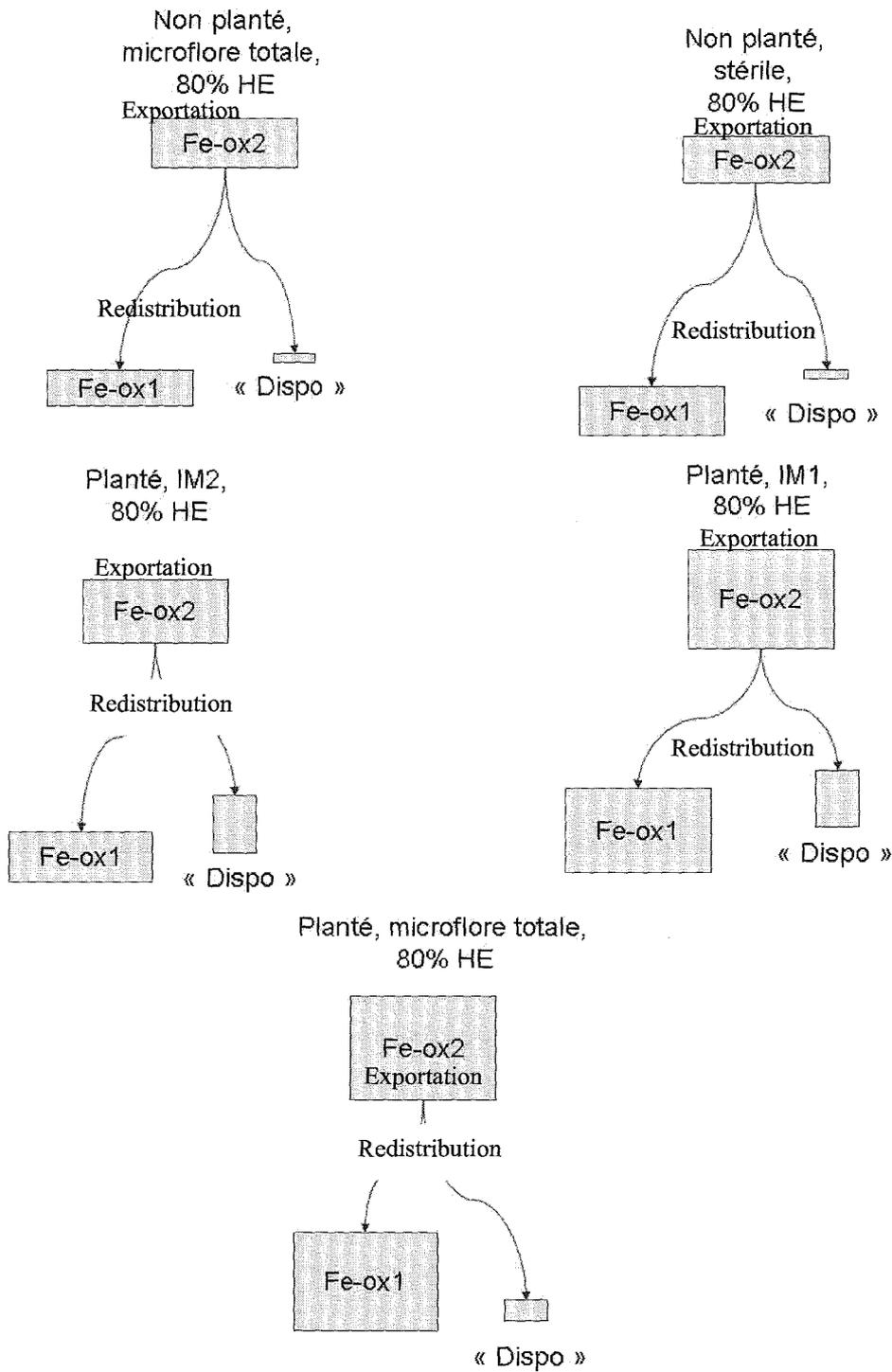


Figure 9.4 Représentation schématique du transfert de Fe, Ni et Cr entre les différents compartiments géochimiques du sol en fonction de la présence ou absence de microorganismes et de plante

D'autres paramètres peuvent influencer les phénomènes de réduction bactérienne du fer et du manganèse, comme la substitution en cations des oxyhydroxydes de fer. Bousserhine *et al.* (1999) ont en effet montré que la substitution des goethites en Cr et Al limitait ou inhibait la

réduction bactérienne de ces oxydes, le manganèse quant à lui n'ayant aucune influence. Les résultats montrent ici que malgré des substitutions en Cr, les goethites les goethites sont relativement bien réduites et altérées mais sans doute moins rapidement que si elles étaient pures. Ainsi, malgré cette substitution cationique, l'altération bactérienne des oxydes se manifeste efficacement. Un autre paramètre, le degré de cristallinité des oxydes (Munch & Ottow 1983), influence l'altération bactérienne des oxydes de fer est, les oxydes les mieux cristallisés offrant plus de résistance à l'altération bactérienne que les moins bien cristallisés. On constate à l'aide des extractions séquentielles que les oxydes de fer bien cristallisés subissent une forte altération (exportation de fer) et qu'il y a transfert de fer vers les oxydes de fer peu cristallisés. Les phénomènes d'altération peuvent donc concerner l'ensemble des phases minérales et le seul paramètre "cristallinité des oxydes" ne semble pas suffisant pour prédire l'altérabilité des phases minérales dans un système complexe.

Influence de l'état hydrique du sol sur la redistribution des métaux dans les différents compartiments géochimiques du sol

Dans les conditions expérimentales adoptées, l'état hydrique des supports de culture n'a aucune influence significative sur la disponibilité de Fe, Ni et Cr en absence de plante. En revanche, en présence de la plante, l'engorgement du sol entraîne une mobilisation et disponibilité d'autant plus grande de ces éléments (sauf Ni) que la période d'engorgement est longue. Ainsi on note une quantité de fer disponible (somme de la quantité de fer présente dans les compartiments "Plante", hydrosoluble, échangeable et acidosoluble) de 59 mg par colonne dans le traitement à humidité constante (80% HE) mais de 82 mg par colonne dans le traitement "1×8 jours d'engorgement". Un couplage entre les paramètres hydrique et rhizosphérique se manifeste donc pour favoriser l'accroissement des quantités de métaux dans les compartiments les plus disponibles. Ce facteur hydrique joue également un rôle majeur sur l'effet "rhizosphère", nettement plus marqué dans le cas du fer (Tableau 7.11, Figure 9.5). Dans le traitement à humidité constante (80% HE), la présence de la plante permet une disponibilité du fer supplémentaire de 23 mg par colonne par rapport au traitement non planté, et cette augmentation s'accroît pour atteindre 41 mg de fer par colonne dans le traitement à 4 périodes d'engorgement effectuées tous les six jours au cours des 41 jours de culture.

Ce résultat paraît en contradiction avec les observations de Becquer *et al.* (2003). Ils ont en effet constaté, sous végétation naturelle, une plus grande disponibilité de Cr en condition bien aérée, et une disponibilité plus limitée lors d'engorgement. La saturation en eau

du sol entraîne une diminution du potentiel redox et une réduction de Cr(VI) par les matières organiques et Fe^{2+} , voire par des bactéries (Ehrlich *et al.* 2001, 2002). La différence par rapport à nos résultats pourrait être due à l'impact de la fertilisation phosphatée apportée au maïs dans nos expériences et qui aurait pour effet de déplacer Cr vers la solution du sol.

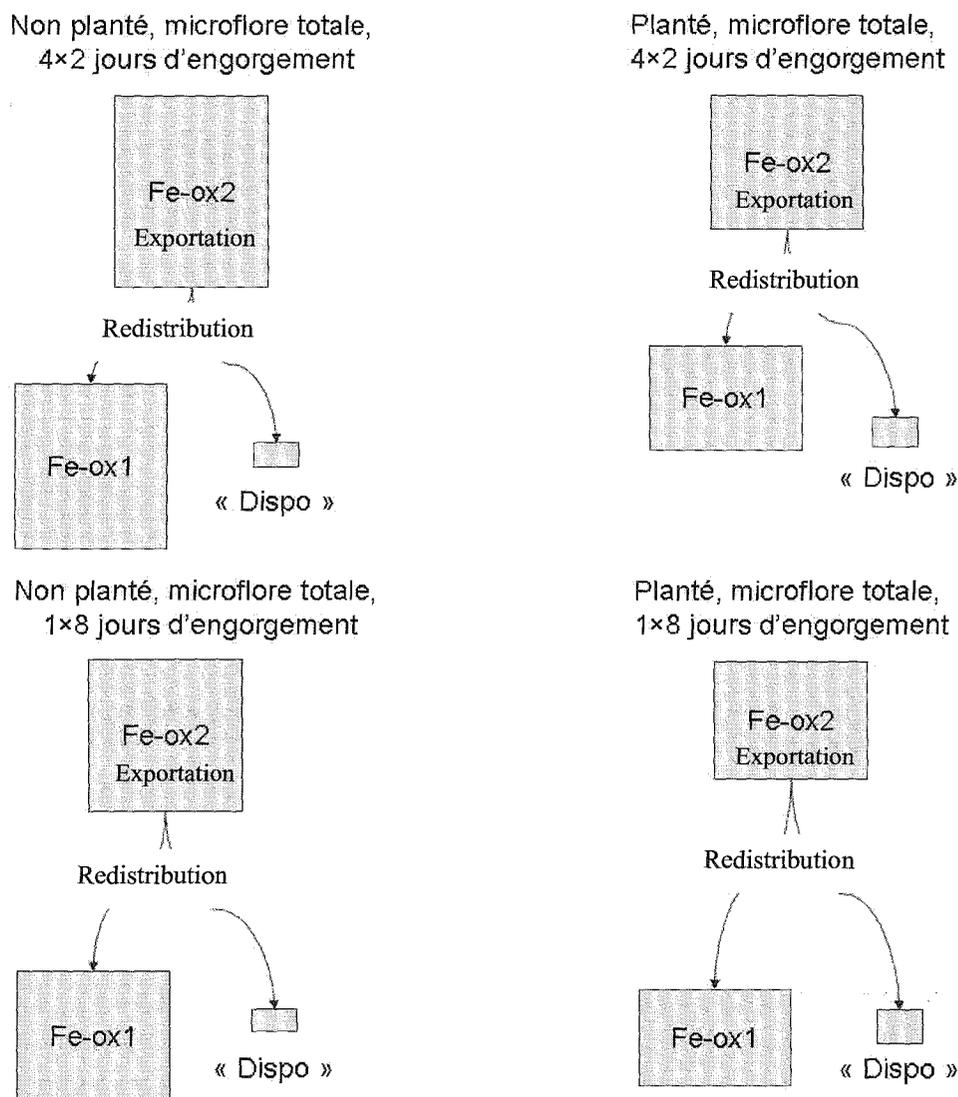


Figure 9.5 Représentation schématique du transfert de Fe, Ni et Cr vers les différents compartiments géochimiques du sol en fonction de la teneur en eau

En conclusion, la présence de microorganismes, de plantes et de phases d'engorgement dans les sols de la séquence de Ouénarou accroît la disponibilité du fer, manganèse, cobalt chrome et nickel. Il en résulte un risque d'exportation des éléments toxiques que sont le nickel

et le chrome vers la chaîne alimentaire via le prélèvement par la plante. Ce risque est accentué dans les sols de bas-fond en raison de l'engorgement de ces sols lors d'événements pluvieux marqués. Le risque est également important dans les sols cultivés qui reçoivent une fertilisation phosphatée, les phosphates déplaçant les éléments sorbés vers la solution du sol. Les matières organiques jouent un rôle fondamental dans la mobilisation des éléments et l'altération des oxydes de fer, en complexant les éléments, en servant de transporteur d'électrons, et en étant source d'énergie pour l'activité bactérienne ferri- et mangani-réductrice. Ce couplage entre les cycles du carbone et du fer et du manganèse est indispensable à la mobilisation et disponibilité des éléments.

Perspectives

Divers aspects, tant expérimentaux que mécanistiques, sont à prendre en compte et à développer.

Au niveau des dispositifs, le film Biofolies[®] utilisé pour maintenir des conditions axéniques dans les systèmes de culture s'est révélé utile mais a fortement perturbé les processus du fait de la condensation d'eau sur la paroi intérieure du film, limitant les échanges gazeux et le passage de l'énergie lumineuse. Une solution est donc à envisager, comme par exemple l'utilisation de chambres de grande taille totalement stériles ou de dispositifs assurant bien la stérilité et les échanges gazeux (Laheurte *et al.* 1990).

La quantification de la réduction du fer et du manganèse par colorimétrie nous a posé problème en raison de la quantité trop importante de matières organiques dissoutes. Le dosage du fer réduit par chromatographie ionique apporterait une plus grande précision. La prise en compte des formes du fer échangeable ou acidosolubles assurerait aussi une meilleure définition de la réduction. Il faut souligner que la spéciation des éléments, tant en solution que dans le solide, est à mieux définir.

Au cours de l'altération des oxydes de fer et de manganèse, de nouvelles phases minérales sont créées. La spectroscopie infrarouge à Transformé de Fourier n'a pas donné de résultats concluants. La diffraction des rayons X associée à des méthodes microscopiques permettrait de mieux identifier et caractériser les phases minérales présentes, et notamment de suivre leur degré de cristallinité.

Les mécanismes d'actions des plantes et des microorganismes sont à préciser. Pour cela, il est important (1) d'identifier les espèces bactériennes présentes dans des communautés

réductrices efficaces comme IM1 et IM2 et (2) de déterminer la nature des matières organiques produites par les plantes et consommées et produites par les microorganismes, comme les acides organiques (analyses par chromatographie ionique et HPLC), les sidérophores et phytosidérophores, les composés phénoliques...La quantification du carbone organique métabolisable permettrait une meilleure modélisation des processus impliqués. Des expériences destinées à préciser la dynamique et l'activité des bactéries et des paramètres comme l'importance du contact entre phase minérale ou organo-minérale et bactéries, apporteraient des informations utiles quant au mode d'action des microorganismes.

L'absence de mycorhizes au cours des cultures est une autre lacune de nos systèmes expérimentaux. Leur présence est à envisager pour une meilleure appréciation des phénomènes liés à la mobilisation-biodisponibilité des métaux. De nombreuses études ont en effet montré le rôle des champignons mycorhiziens sur la mobilisation des métaux (Jöner *et al.* 2000, Tonin *et al.* 2001) et l'altération des minéraux du sol (Leyval & Berthelin 1991, Gobran 1998).

Le suivi isotopique des éléments (i.e. le nickel, Echevarria 2006) permettrait d'évaluer plus précisément leur phytodisponibilité et leur mobilisation entre les différents compartiments géochimiques.

Enfin, il convient de vérifier les résultats obtenus dans les expériences en pots et batchs par des expériences *in situ* de culture de diverses espèces végétales, sur des sols non dilués dans du sable et des racines non confinées. La mise en place de systèmes de drainage permettrait la culture de plantes en condition de sol bien aérée et limiterait l'augmentation de la biodisponibilité des éléments métalliques, et donc les phénomènes de toxicité.

Annexes

Annexes 1

Iron reduction and dissolution from soils in non-waterlogged conditions: major role of bacterial activity coupling with soil organic matter biodegradation. Paskiewicz I., Stemmler S., Lawniczak S. & Berthelin J. (en préparation).

**Iron reduction and dissolution from soils in non-waterlogged conditions:
major role of bacterial activity coupling with soil organic matter
biodegradation**

Paskiewicz I., Stemmler S., Lawniczak S. and Berthelin J.*

LIMOS (Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matières Organiques dans les sols), UMR 7137 CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, Faculté des Sciences, Boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

*Corresponding author: Jacques.berthelin@limos.uhp-nancy.fr

Introduction

Soil water content and water regime affect not only availability of moisture to soil organisms (plants, fauna, microflora) but also dynamic and activities of the microbial communities. Different major microbial activities involved in the transformation and biogeochemical cycling of trace and major elements (e.g. carbon, nitrogen, sulfur mineralization, denitrification, biotransformation of mineral elements (Fe, Mn, Se...)). Different authors have already reported the influence of water content or water potential on microbial activities such as organic carbon mineralization, nitrification, denitrification (Dommergues and Mangenot, 1970; Paul and Clark, 1989...) or have tried to determine tolerance levels of microorganisms to water potential (e.g. Dommergues and Mangenot, 1970; Harris, 1981). Generally, global microbial activity in soil expressed by carbon and nitrogen mineralization processes is considered optimal around water holding capacity (WHC) i.e. a matrix potential around -0.01 Mpa. Water content controls also the extent of soil aeration by modifying the gas diffusion which is lower in water than in air i.e. in waterlogged vs well drained soil and determine the emergence or development of aerobic vs anaerobic processes. Bacterial anaerobic respiration processes are considered to occur step by step during periods of waterlogging (e.g. Turner and Patrick, 1968; Dommergues and Mangenot, 1970; Yoshida, 1976): after O_2 consumption by aerobic microorganisms, the well recognized sequence nitrate, manganese, iron, sulphate, carbon dioxide reduction simultaneously to fermentation processes will take place. But processes such as nitrate (denitrification), manganese, iron, sulphate reduction are observed in many soils and not only in hydromorphic environments suggesting the occurrence of anaerobic processes in relatively well aerated or well drained soils. Alexander (1977) had noticed that

denitrification can occur at low water content environments (75% WHC). Knowles (1981) has reported occurrence of denitrification in soils at 100% Water Holding Capacity (WHC) and having an initial percentage of 12% O₂ in the gas phase. Such results for denitrification have been confirmed by other studies (Garrido *et al.*, 2002). Bacterial reduction of iron was considered to take place in hydromorphic soils only in well defined waterlogged conditions (Reductisols, gley and pseudogley soils) but favourable environmental conditions can be obtained by anaerobic microflora playing a preparatory role.

The question here concerns the occurrence of anoxic conditions in non-waterlogged soils following O₂ consumption in the course of carbon mineralization and allowing the development of iron reducing bacterial activity. To answer this question different experiments were performed in batch devices at different O₂ contents in the gas phase and using soil samples of different origins at different moisture levels.

Materials and Methods

To determine the influence of three main physical and chemical parameters (initial oxygen content in the gas phase, moisture (water content), organic matter availability) on ferric iron reduction and dissolution, experiments were performed in batch devices using samples originating from humid tropical and temperate countries.

Reference site and soil samples

The first soil samples (designated as BRA) were originated from a Reductisol (Gleysol) located in a Ferralsol-Plinthosol-Gleysol sequence at Humaitá, in the southern part of the Upper Amazon Basin, Brazil. They were collected in transition zone of the water table, in the Bw1g horizon, 50 to 60 cm depth, which was seasonally flooded according to the rainy season. Soil samples of a "olive" brown colour (2,5 Y 5/4) was selected as representative of soil horizon where reduction reactions seem to occur (Fritsch *et al.*, 2001).

The second soil samples (designated as CAM) were originated from a Ferralsol-Reductisol (Gleysol) sequence located at Nsimi-Zoétélé, 120 km southeast of Yaoundé (Cameroon) in a humid tropical climate zone. They were collected in an horizon 50-60 cm depth, at the hillside/swamp boundary, in the transition zone where water-table oscillation occur during

rainy season, as indicated by ferric iron precipitation concretions (Stemmler and Berthelin, 2003, Braun & *al.*, 2005).

The third soil samples originated from a Reductisol (gleysol) of the forest of Fougères (Ille-et-Vilaine, France). They were collected at 60-70 cm depth where the formation of green rust fougérite was observed (Trollard & *al.*, 1996, 1997) and presented well defined hydromorphic characteristics (Berthelin *et al.*, 2005; Feder, 2001).

The soil samples were air-dried at room temperature, sieved (mesh size) at 2 mm and stored at 4°C in the dark. Their main characteristics are presented Table 1 and Table 2.

Experimental design

Experiments were performed in condition close to the natural one i.e. without addition of nutrients and sources of carbon and energy, excepted those present in soil samples. In one set of experiment water extractable soil organic matter was added to simulate input of organic matter leaching from soil surface or from rhizospheric exudates and deposits. 15 g of 0-2 mm soil samples were placed in 125 ml plasma bottles previously sterilized by autoclaving and hermetically closed. Soil was moistened at different water contents with sterilized deoxygenated water. To obtain well known initial oxygen contents in the incubation devices, oxygen was removed from the bottles by flushing with N₂, then well defined amounts of oxygen were introduced with a syringe through the rubber stopper. Abiotic control treatments were obtained by addition of sodium-merthiolate at the content of 1‰ in the water solutions used to moisten soil samples at different water contents. This compound inhibited all the microbial activity without affecting chemical and physico-chemical processes, excepted for Mg, Ca and K which were weakly displaced (solubilized) by ionic exchange as previously determined (Berthelin et Kogblevi, 1974 ; Stemmler, 2001).

The batch devices were then incubated at 28°C in the dark.

The influence of initial percentage of O₂ in the gas phase (O₂ content), of water content and of organic matter availability was studied in three set of experiments as described here after. To determine the influence of O₂ content, soil samples were moistened in the bottle at Water Holding Capacity (WHC) (determined by Bouyoucos method, 1936, and

described by Duchaufour, 1966). Two experiments were done: the first one at 0%, 2%, 5% and 10% initial O₂ percentage in the gas phase of the experimental device (bottle atmosphere) and the second at 1% and 20% O₂ content. Abiotic treatments (control) were performed for 0% and 20% O₂ concentration. In batch experiments, respectively eight and six experimental units were studied in biotic treatments and three in abiotic controls.

The influence of water content was studied at 2% O₂ content in the gas phase with soil samples at 75%, 100%, 150%, 200% and 400% WHC. The 2% initial O₂ content in the gas phase was selected in this set of experiment because in soil around the roots or close to the roots or in soil horizons where gas diffusion was decreasing by rain or irrigation, O₂ content can fall at 2% (Dommergues and Mangenot, 1970; Paul and Clark, 1989). Fifteen and five experimental units were studied in biotic and abiotic treatments respectively.

The influence of addition of water extractable organic matter (WEOM) considered as available organic matter was performed using soil organic matter extractable by autoclaving in water samples from the surface horizon with a 1/10 soil/solution ratio. The soil solution obtained after autoclaving was filtered at 0.2 µm and then added to the soil sample in batch device to simulate rhizospheric and leaching input during rain water infiltration. Soluble organic carbon added simulated an increase of 6% of initial organic carbon content. Controls either without organic matter addition or in abiotic conditions were also performed. Soils were moistened during this experiment at 100% WHC and atmospheric conditions corresponded to 2% O₂ concentration.

Analyses

Bacterial activities were followed by measurement of CO₂ release as a result of organic matter biodegradation and mineralization and by iron reduction and dissolution as ferrous (Fe²⁺) iron comparatively to abiotic treatments. CO₂ concentration was determined by infra-red spectroscopy (Binos 1004 Infra Red Gas Analyser, Rosemount (Allemagne); automaton "lab-made", Christian Mustin, assembled by SGAE, 9 av. Gabriel Peri, 38150 Roussillon). Gas sampling was done without opening the flask and using needle-syringe through rubber stoppers.

Fe²⁺ and total Fe in solution was measured in all the replicates at the end of incubation periode and after sampling in anaerobic glove bag under nitrogen atmosphere (I2RTM Glove Bag Instruments for Research and Industry, Glas-Col P.O. 2128 Terre-Haute, IN 47802-0128) to avoid Fe²⁺ oxidation. Analyses were done by colorimetric method based

on complexation of Fe^{2+} by 2,2'-bipyridine (Aquamerck Eisen-Test 8023, Merck KgaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Dortmund).

WEOM concentration was determined using Total Organic Carbon Analyser (DC 190, Dohrman, Rosemount, Germany).

Expression of results

The results were expressed in term of organic carbon mineralization index, Fe weathering index and yield between solubilization of Fe^{2+} and carbon mineralization.

The organic carbon mineralization index correspond to the C mineralized as CO_2 in ‰ of total organic carbon in the soil samples. Calculation was made in accordance with the formula (1).

$$\text{C mineralization rate (‰)} = \frac{42.86 \times \text{volume of the flask (mL)} \times \text{Mc} \times 100}{1000 \times 22400 \times \text{soil weight in flask (g)} \times \text{organic C content in soil sample (\%)}} \quad (1)$$

The Fe weathering index correspond to the quantities of reduced iron solubilized (in μg) related to the total reducible iron in soil sample (Fe_{DCB} , in g).

The yield of mineralization is the quantity of iron solubilized (in mg) reduced per g of organic carbon mineralised as CO_2 .

Results and discussion

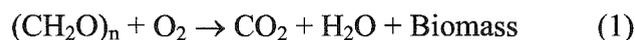
Influence of initial O_2 content on carbon mineralization and iron reduction

In experiment performed using BRA samples CO_2 release in abiotic assays was negligible and results were not presented. In biotic treatments the results presented in figure 1 showed that mineralization index (expressed in ‰ of total organic carbon) increased with increasing initial percentage of O_2 in the gas phase of the incubation device. Oxygen, as already known (Dommergues and Manganot; 1970, Paul and Clark, 1989) appears as an efficient electron acceptor promoting organic matter biodegradation and mineralization. At the end of incubation time (18 and 21 days), mineralization indexes were 6.6 ‰ without O_2 and 30.0‰ with an initial 20% O_2 content (Table 3). After a lag phase of one to two days

long, depending on O₂ content, two successive phases were observed. First, a rapid rate (6 to 11 days long) of mineralization occurred with, comparatively to the second phase, a faster increase of bacterial activity. Kinetics were depending on O₂ content and were increasing from 0% O₂ (a=0.55) to 20% O₂ (a=3.04). The higher the O₂ content was, the shorter the lag phase was and the faster was the first mineralization phase.

The second phase occurring after 6 to 11 days corresponded to a stationary phase for 0, 1 and 2 % O₂ content or a slowing down in the mineralization rate for 5 to 20 % O₂ content. Such stationary phase suggested nutrient and/or energetic sources (electron donor and acceptor) depletion or the production of end metabolic inhibitors. The slowing down of the mineralization rate indicated kinetics similar to these observed under initial anaerobic condition ("0% O₂" treatment, carbon mineralization rate 25.4 µg CO₂/day). This second phase could correspond to the development of anaerobic conditions.

Estimation of O₂ consumption was performed using the simplified equation (1):



The results presented in table 3 indicated that O₂ remained in the incubation device after 18 days of incubation in the treatments with 5% O₂ and more. In the devices with 1 and 2 % O₂, O₂ is totally consumed after 4 and 7 days respectively. This time could correspond approximatively to the change in kinetics of carbon mineralization and to the emergence and development of anaerobic phase as suggested by results presented in figure 1.

The figure 2 shows that at the end of incubation time (18 or 22 days) iron was solubilized mainly as Fe²⁺ (from 70 to 100% of total solubilized iron) in all the biotic assays. It occurred whatever was the O₂ initial concentration. In the abiotic assays, ferrous iron in solution and in soil extracts was not detectable, indicating the microbially-mediated iron-reduction (table 3). Iron reduction was large in 0, 1 and 2% O₂ content and was irregular and limited in well oxygenated treatments (5 to 20% O₂). So even when O₂ was always present in the gas phase (5, 10, 20% initial O₂ content), iron bacterial reduction was observed. Microsites without O₂ may occur before total removal of O₂ in the device atmosphere because of heterogeneity of soil structure and porosity.

The higher ratio and more efficient yield between carbon mineralization and iron reduction were observed in the decreasing order from the treatment without oxygen (135 mg Fe²⁺ per g of mineralised carbon in N₂ treatment (0% initial O₂ content) to 4.63 mg Fe²⁺ solubilized per g of mineralized C in 20% O₂ treatment (table 3). Anaerobic bacterial activity was starting sooner in absence of O₂. Oxygen consumption was not needed in such initial gas

phase conditions as it was necessary in oxygenated treatments during the preliminary phase of carbon mineralization before having reducing conditions.

Bacterial weathering index of iron i.e. part of Fe solubilized as Fe^{2+} by iron bacterial activity were also longer for 0, 1 or 2% O_2 initial content in the gas phase (respectively 394, 367, 287 μg of Fe^{2+} per g of reducible iron). However significant bacterial weathering index were observed for 5, 10 and 20% O_2 initial content: respectively 26, 9, 59 μg of Fe^{2+} per g of reducible iron. Results underlined also that bacterial iron reduction occurred in soil at WHC which were in a gas phase containing initially 20% O_2 and in the end 8.4% O_2 . This indicated again the occurrence of anaerobic microsites even when relatively large amounts of O_2 were remaining.

Influence of soil water content

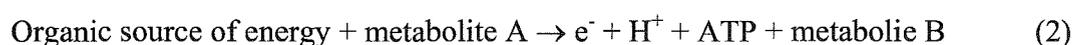
In this second set of experiments, the three soil samples BRA, CAM and FRA were used. As in the first set of experiments concerning the effect of initial O_2 content, 2 main phases of mineralization were observed: first an exponential then a stationary phase or a phase of slowing down the mineralization rates. During the first phase, the mineralization was faster but showed different rates according the soil samples and the soil moisture (Figure 3). In the first phase, the mineralization rates (figure 3) were higher in BRA samples than in CAM and FRA samples at 75% and 100% WHC. They indicated a higher biodegradability of the organic matter of the BRA soil. This difference in biodegradability was lower for waterlogged or flooded soils (i.e. 150 to 400% WHC). Mineralization rates and kinetics of the first phase of mineralization were higher in waterlogged conditions ($a = 1.06$ and 1.12 respectively at 200% and 400% WHC) than in soil incubated at 0% O_2 content and 100% WHC with $a = 0.54$). Mineralization rates were less affected by water sealing of soil surface than by total remove of O_2 .

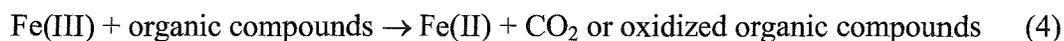
At the end of incubation, mineralization indexes were the highest for the soil samples at 100% WHC. This favourable value of water content optimal to organic carbon mineralization was much more marked in CAM and FRA soil samples than for BRA samples. In BRA samples which contains a little more organic carbon and clays, high mineralization index was also observed at 150% WHC. This indicated again a larger availability and biodegradability of organic matter. As already recognized (Paul and Clark, 1988) microbial activity in soil is optimal at WHC i.e. around -0.01 Mpa for soil texture ranging from 15 to 30% for sandyloam to 40-45 % for clays. It decreased as the soil

became either waterlogged near zero water potential or more drowgthy. The lower mineralization index and mineralization rates were observed in water saturated or waterlogged soils, when O₂ diffusion decreased and was low (200 and 400% WHC). At the difference from BRA samples strong decrease was also noted at 150% WHC for CAM and FRA samples which appeared more sensitive to water content.

The comparison with the previous experiments performed at different O₂ content indicated for BRA samples similar mineralization rates in the second phase of mineralization in the 150 to 400% WHC treatments and in the 0% O₂ content (mineralization α value = 0.4 to 0.6 for 150 to 400% WHC, and 0.54 for 0% O₂). This second phase corresponded to the development of anaerobic conditions.

In all the treatments performed at different percentage of WHC, iron reduction occurred as determined by release of soluble Fe²⁺ whatever was the moisture condition. It appeared of major interest to underline that iron reduction and dissolution as Fe²⁺ was higher in unsaturated, non-waterlogged (75 and 100% WHC), than in waterlogged (200 and 400% WHC) conditions (table 4 and figure 5). In the abiotic control ferrous and total iron in solution were not detectable. In well drained and well aerated conditions (75 to 100% WHC) microbial respiration consumed fastly O₂ in relation with organic matter biodegradation and oxygen availability. Oxygen was much more faslty used in soils at 75% and 100% WHC (table 4). In the experimental conditions in incubation performed, from 75% of the soil WHC to waterlogged and flooded conditions, the water content control availability of O₂ and as a consequence the organic matter biodegradation. Waterlogging and flooding limited O₂ transfer and diffusion, increasing lag phase of O₂ consumption and organic matter biodegradation and decreasing mineralization rates. CO₂ diffusion is also limited increasing the time of development of anaerobic sites. Low water content (75% and 100% WHC) promoted the diffusion and availability of O₂ which was fastly used as electron acceptor. This faster oxygen consumption and CO₂ production allowed the emergence of anoxic conditions or at least of anaerobic microsities. In such environment aero-anaerobic and anaerobic bacterial communities can grow. By anaerobic respiration or simultaneously to fermentation processes they reduced available ferric iron (Fe_d or Fe_{DCB}) as electron acceptor which was then solubilized as ferrous iron Fe²⁺. Simplified reactions (2) and (3) summarized these processes for fermentation and (4) for respiration.





Moreover, as presented in Figure 4 for BRA samples, ferrous (Fe^{2+}) iron in solution was lower than total iron in solution, for 75 and 100% WHC, suggested the occurrence of soluble iron form different than Fe^{2+} , and probably as organo-metallic complexes. At 150 to 400 % WHC total soluble Fe is equal to soluble Fe^{2+} suggested that in waterlogged-flooded conditions iron was solubilized and remained in solution as Fe^{2+} . The speciation of iron in solution seems to depend also on the water content and homogeneity vs. heterogeneity of redox conditions.

The ratio between amount of Fe^{2+} solubilized to amount of carbon mineralised indicated a high efficiency in the reduction and dissolution of ferric iron in BRA samples comparatively to CAM and FRA samples. In BRA samples both organic matter and iron availability i.e. OM biodegradability and iron reductibility by autochthonous bacterial communities seems better. The efficiency of iron reducing bacteria was higher in BRA samples than in CAM and FRA samples. Weathering index was higher in CAM and FRA samples due to lower content of reducible iron in this both soils.

Influence of water extractable organic matter content

Addition of water extractable organic matter (WEOM, 6% of total organic carbon) in BRA soil samples incubated at 100% WHC increased of 24% (but not significantly) the carbon mineralization index but promoted very significantly of 228% the iron reduction (table 5). Only a small part (9%) of the added water extractable organic matter was mineralized. The addition of water extractable organic matter had a beneficial effect on iron reduction. The yield mg Fe^{2+} solubilized per g of carbon mineralized as CO_2 was 0.42 without OM addition but was 109 with added WEOM (Table 5). Moreover, if the same amount of WEOM was added in waterlogged soil the effect on iron reduction was low (results not presented). This confirmed the major effect of organic matter mineralization to promote in non waterlogged or non water saturated soil conditions the development of reducing conditions allowing iron reducing bacterial activity.

The calculation of the ratio between the amount of added organic matter mineralised and the amount of Fe^{2+} released by this organic matter addition, indicated that 396 mg of Fe^{2+} was reduced and solubilized when one gram of organic carbon was mineralised.

Such results suggested a better bioavailability (or efficiency) of the added organic matter as electron donors and/or the stimulation of anaerobic respiration by humic substances acting as a shuttle in electron transfer.

Bibliography

- Alexander M., 1977 – *Introduction to soil microbiology. Second Edition.* John Wiley & Sons Ed.
- Berthelin J. & Kogblevi A., 1974 - *Influence de l'engorgement sur l'altération microbienne des minéraux dans les sols.* Rev. Ecol. Sol, 11:499-509.
- Berthelin, J., G. Ona-Nguema, et al. -2006 - *Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rusts in soils.* Compte-Rendu de l'Académie des Sciences, Paris **In press**.
- Bouyoucos G.J., 1936 – *Directions for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method.* Soil Science, 42(3).
- Dommergues Y. and Mangenot F., 1970 – *Ecologie microbienne du sol,* Masson & Cie Editeurs.
- Feder, F. (2001). *Dynamique des processus d'oxydoréduction dans les sols hydromorphes. Monitoring in situ de la solution du sol et des phases solides ferrifères.* Thèse de Doctorat de l'Université de Aix-Marseille 3: 200.
- Fritsch E., Do Nascimento N. R., Herbillon A. J., Grimaldi M., Melfi A. J., Genin J. M., Abdelmoula M., Bourrié G. & Trolard F., *soumise – Release and sequestration of iron within a sequence of Cambisols, Plinthosols and Gleysols developed on Solimoés formation of the upper Amazon basin.*
- Garrido F., Henault C., Gaillard H., Perez S. & Germon J. C., 2002-*N₂O and NO emissions by agricultural soils with low hydraulic potentials.* Soil Biology and Biochemistry 34(5): 559-575.
- Harris, R. F. (1981). *Effect of water potential on microbial growth and activity.* Water Potential Relation in Soil Microbiology. J. P. e. al. Madison, Wisconsin, Soil Science Society of America.
- Paul, E. A. and F. E. Clark (1988). *Soil Biology and Biochemistry,* Academic Press, Inc.
- Stemmler S., 2001 – *Altération microbienne des minéraux dans les sols hydromorphes, incidence du couplage entre les cycles du carbone et du fer.* Thèse Doct. Univ. Henri Poincaré Nancy I.
- Stemmler, S. J. and J. Berthelin (2003). "Microbial activity as a major factor in the mobilization of iron in the humid tropics." *European Journal of Soil Science* 54(4): 725-733.
- Stemmler S.J., Loyaux-Lawniczak S. & Berthelin J., 2005. *Effet de la teneur en eau d'un sol sur la réduction bactérienne d'oxydes de fer.* C. R. Géosciences. In press.
- Trolard, F., M. Abdelmoula, et al. (1996). "Mise en évidence d'un constituant de type "Rouilles vertes" dans les sols hydromorphes. Proposition de l'existence d'un nouveau minéral : la "fougérite". *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences, Série IIa, Paris* 323: 1015-1022.
- Trolard, F., J.-M. R. Génin, et al. (1997). "Identification of a green rust mineral in a reductomorphic soil by Mössbauer and Raman spectroscopies." *Geochimica Cosmochimica Acta* 61(5): 1107-1111.
- Yoshida, T. (1976). *Microbial metabolism of loaded soils.* Soil Biochemistry. E. A. P. M. Laren, Marcel Dekker Inc. 3: 83-122.

Table 1. Soil samples analyses (0-2 mm fraction)

Sample	Sand	Silt	Clay	pH	C _{org}	N	C/N	Si	Al	Fe
	%			H ₂ O	g.kg ⁻¹			g.kg ⁻¹		
CAM	86	4	10	4.3	6.0	0.2	30	917	41	3
BRA	23	39	38	4.6	7.7	0.2	38	795	134	42
FRA	24	44	32	4.8	5.5	0.5	10	768	100	26.4

Table 2. Amounts of the reducible and total iron in the soil samples ($Fe_d = Fe_{DCB}$)

Sample	Fe _d	Fe _{tot}
	g.kg ⁻¹	
CAM	0.80	3.20
BRA	17.50	27.26
FRA	5.60	18.50

Table 3. Balance of organic carbon mineralization, O₂ consumption, and iron reduction (yield of iron reduction vs. carbon mineralization, and iron weathering index) after 18 day incubation of BRA samples at different O₂ contents in the gas phase.

Samples	Organic carbon	O ₂	Total iron	Fe ²⁺ iron	Yield	Fe Weathering
	mineralization	Consumption* or	μg Fe solubilized / g dry soil		mg Fe ²⁺ /g C **	index
	index ‰	remaining				μg/g
No incubated	-		0.04	0.03	-	2
Bio 0% O ₂	6.62	-	9.91	6.89	135	394
Bio 1% O ₂	8.07	4 days	7.97	6.42	103	367
Bio 2% O ₂	9.19	7 days	5.34	5.01	70.9	286
Bio 5% O ₂	16.24	12 days	0.57	0.46	3.71	26
Bio 10% O ₂	19.35	1.8% remained	0.16	0.16	1.09	9
Bio 20% O ₂	30.04	8.4% remained	1.86	1.04	4.63	59
Abio 0% O ₂	0.48	-	0.00	0.00	0.00	0
Abio 20% O ₂	0.85	14.4% remained	0.00	0.00	0.00	0

* time of O₂ consumption** mg Fe²⁺ solubilized per g of C mineralized

Table 4. Balance of organic carbon mineralization, O₂ consumption, and iron reduction (yield of iron reduction vs. carbon mineralization, and iron weathering index) after 18 day incubation of all samples at different moistures.

Samples	Organic carbon mineralization index (%)	O ₂ Consumption* or remaining	Total iron	Fe ²⁺ iron	Yield mg Fe ²⁺ /g C**	Fe Weathering index (µg/g)
			µg Fe solubilized/g dry soil			
BRA						
Bio 75% WHC	13.69	4-5 days	12.00	9.14	81.6	522
Bio 100% WHC	17.63	5 days	8.07	6.60	52.6	377
Bio 150% WHC	17.57	8-9 days	2.57	2.45	17.3	140
Bio 200% WHC	12.41	12-15 days	4.83	4.79	54.0	273
Bio 400% WHC	12.46	15 days	4.90	4.71	50.4	269
Abio 75% WHC	0.49	1.8% remained	0.00	0.00	0.00	0
Abio 400% WHC	0.59	1.9% remained	0.00	0.00	0.00	0
CAM						
Bio 75% WHC	11.55	n.d.	n.d.	1.06	15.2	1320
Bio 100% WHC	15.76	n.d.	n.d.	1.31	13.9	1640
Bio 150% WHC	10.13	n.d.	n.d.	0.64	10.5	800
Bio 200% WHC	10.00	n.d.	n.d.	0.64	10.7	800
Bio 400% WHC	7.75	n.d.	n.d.	0.576	12.4	720
FRA						
Bio 75% WHC	8.55	n.d.	n.d.	1.06	22.5	1105
Bio 100% WHC	13.91	n.d.	n.d.	1.44	18.8	1482
Bio 150% WHC	8.25	n.d.	n.d.	0.992	21.9	1026
Bio 200% WHC	8.59	n.d.	n.d.	0.960	20.3	1006
Bio 400% WHC	7.16	n.d.	n.d.	0.928	23.6	977

* time of O₂ consumption

** mg Fe²⁺ solubilized per g of C mineralized

Table 5. Balance of organic carbon mineralization, O₂ consumption, and iron reduction (yield of iron reduction vs. carbon mineralization, and iron weathering index) after 18 day incubation of BRA samples at different organic matter contents.

Samples	Organic carbon mineralization index (‰)	O ₂ Consumption * or remaining	Total iron	Fe ²⁺ iron	Yield mg Fe ²⁺ /g C**	Weathering index (µg/g)
			µg Fe / g dry soil			
No incubated	-	-	0.036	0,032	0.00	2
Bio + 0 mg C/g	22.15	2-4 days	7.04	6.95	0.432	397
Bio +46 mg C/g	27.4	1-2 days	25.3	22.9	109	1309
Abio + 0 mg C/g	0.44	1.8% remained	0.00	0.00	0.00	0
Abio +46 mg C/g	0.03	1.9% remained	0.00	0.00	0.00	0

* time of O₂ consumption

** mg Fe²⁺ solubilized per g of C mineralized

Figure 1. Cumulative organic matter mineralization for different initial O₂ contents in the gas phase (CO₂ evolved, mineralization index: C-CO₂ in ‰ of total organic carbon)

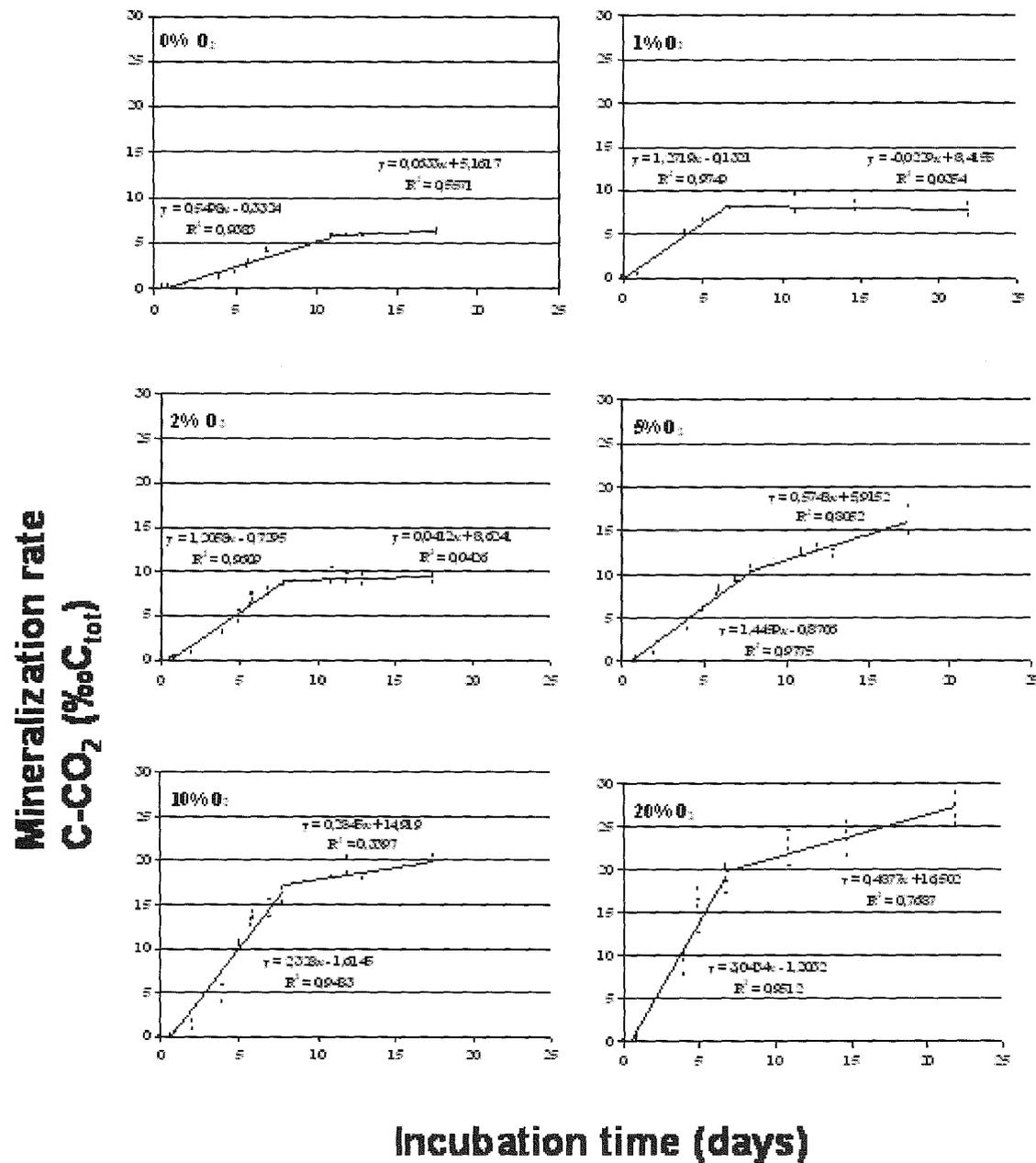


Figure 2. Influence of initial O_2 content in the gas phase on reducing bacterial activity and solubilization of ferrous iron mobilization after 18 days incubation (except for * after 22 days incubation)

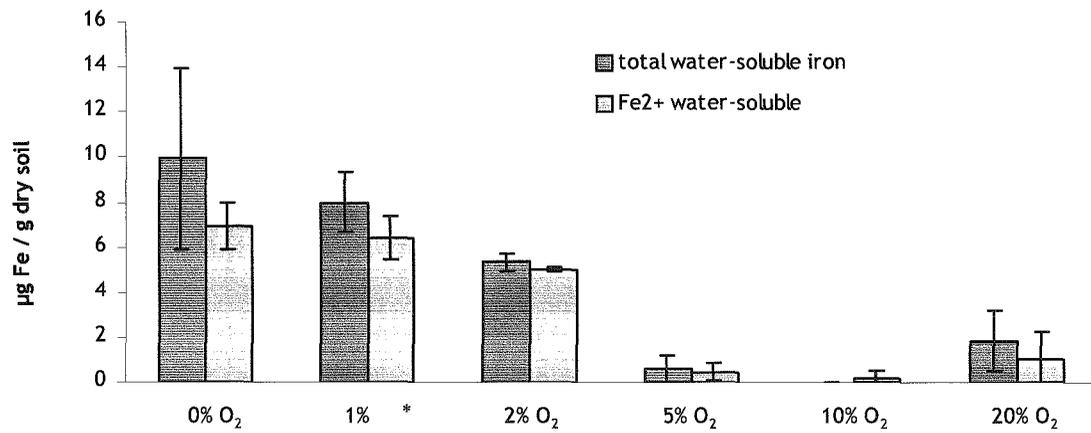


Figure 3. Influence of water content on cumulative mineralization of organic matter (CO₂ evolved)(mineralization index in C-CO₂ ‰ of total organic carbon)

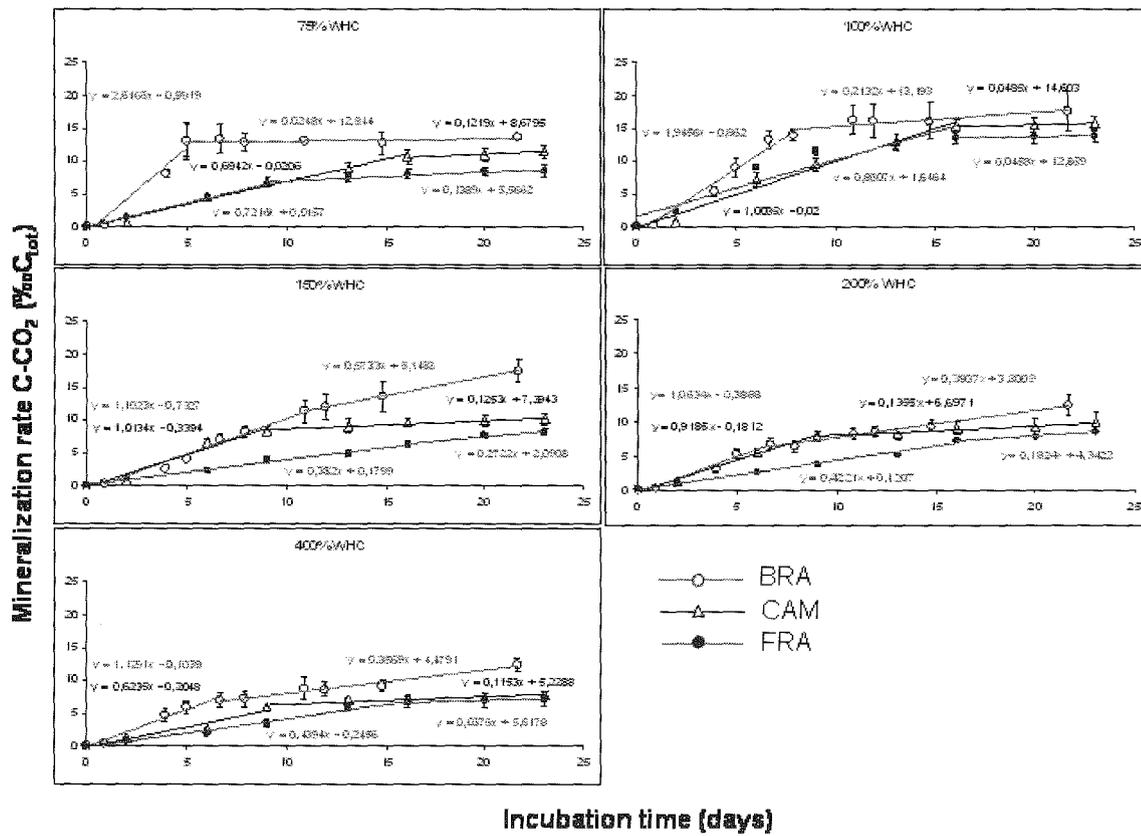


Figure 4. Influence of water content on reduction and dissolution of iron as Fe^{2+} after 21 days incubation for BRA samples.

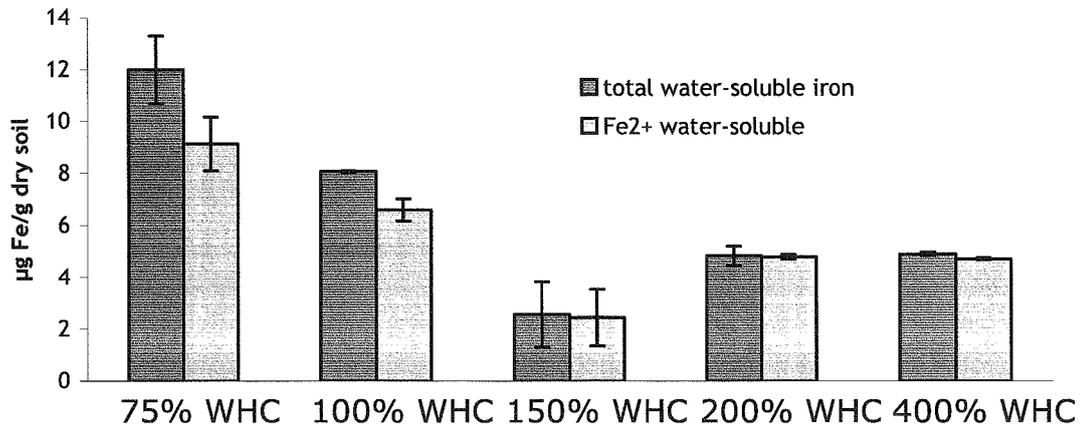


Figure 5. Influence of water content on reduction and dissolution of iron as Fe^{2+} for the samples of the three soils.

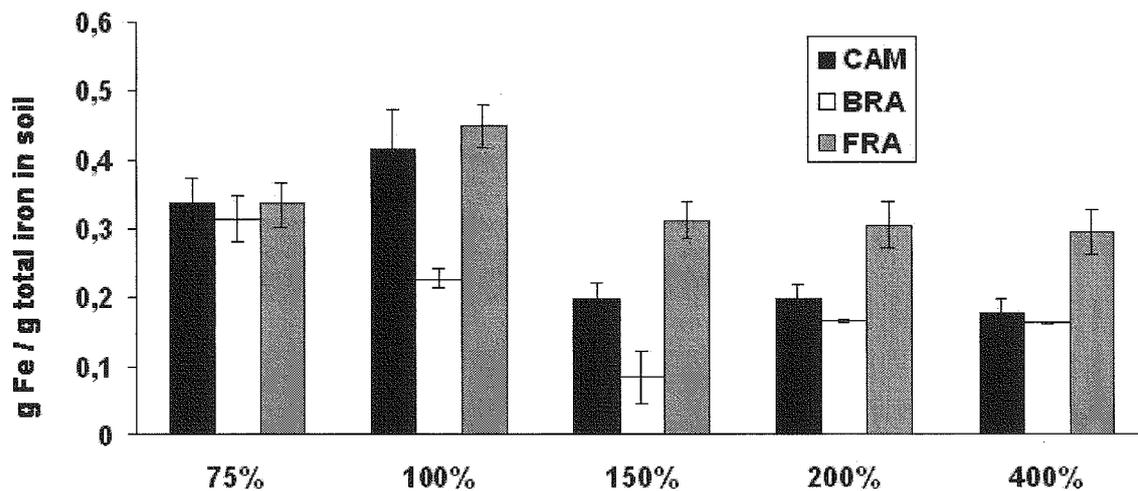


Figure 6. Cumulative organic matter mineralization after addition of WEOM (CO_2 evolved) (mineralization index in C-CO_2 % of total organic carbon).

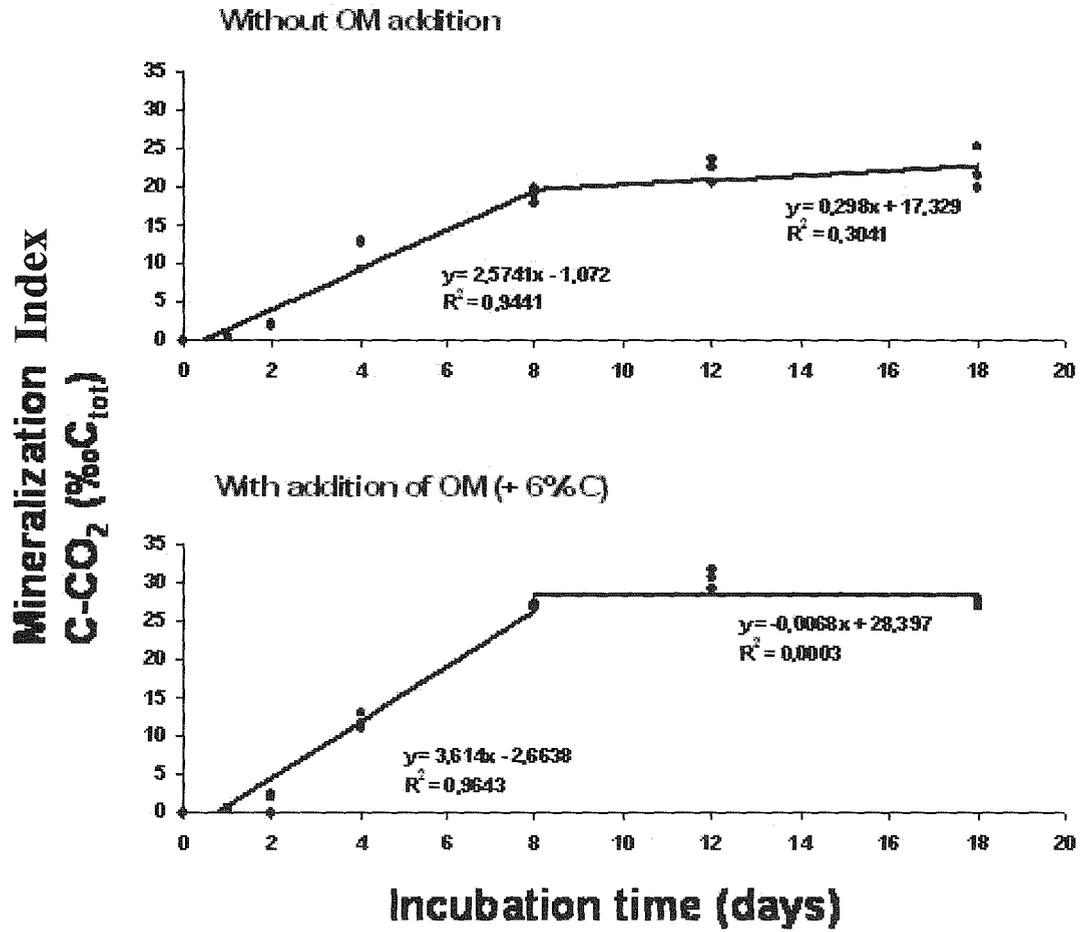
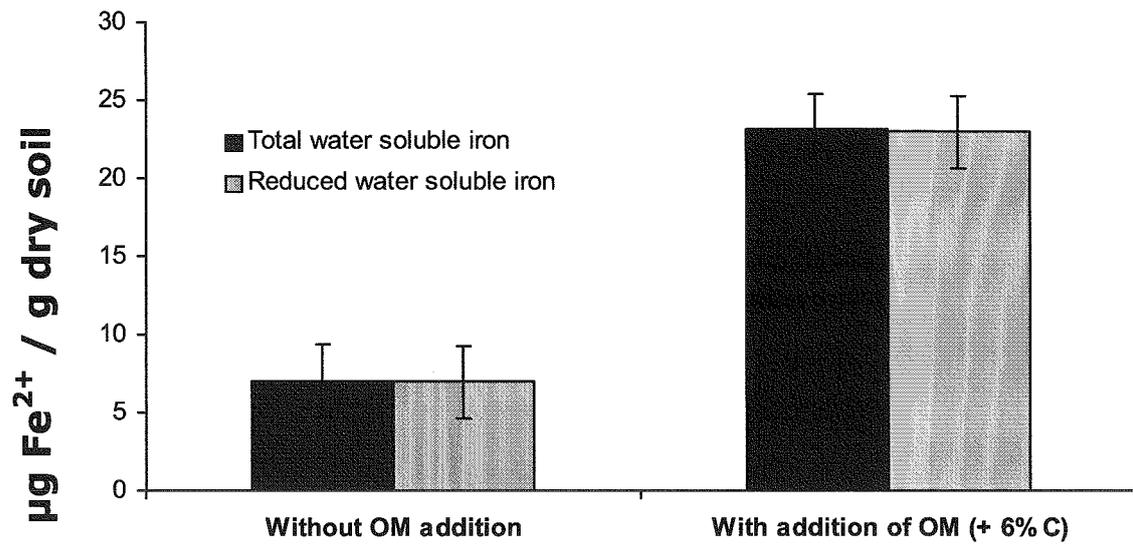


Figure 7. Influence of WEOM addition on iron reduction as Fe^{2+} .



Annexe 2

Compléments au Chapitre 7

Altération des phases minérales et répartition des éléments métalliques dans les différents compartiments géochimiques.

Répartition de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différents compartiments géochimiques des échantillons de sol plantés ou non de maïs, pour différents états hydriques, en pourcentage d'élément par rapport à la quantité totale de l'élément dans l'échantillon de sol.

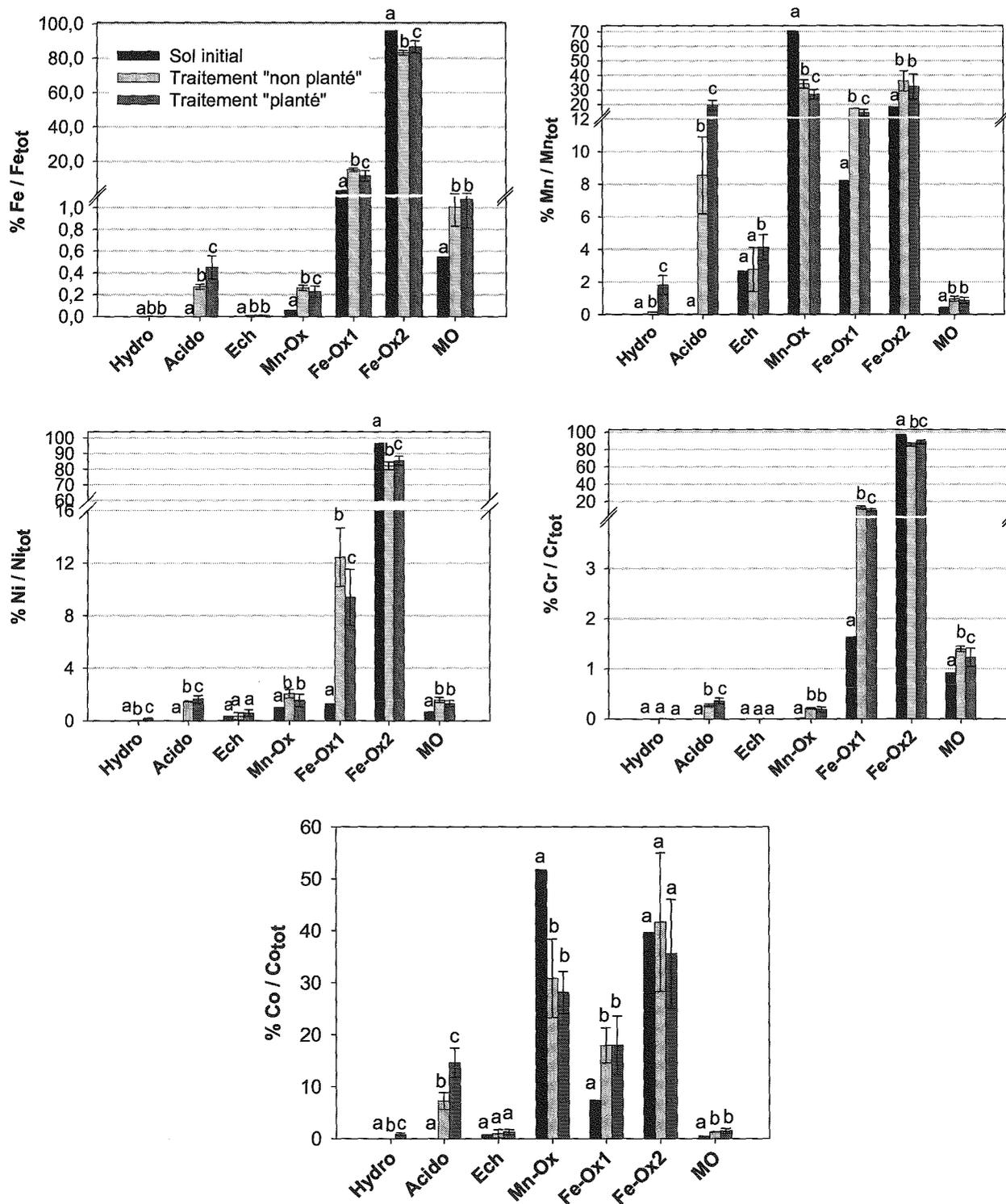


Figure 7.6 Répartition de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différents compartiments organo-minéraux et minéraux des échantillons de sol plantés ou non de maïs dans les colonnes à humidité du sol constante (80% HE) ; les résultats présentés avec des lettres différentes (a et b) sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Ces lettres sont à considérer élément par élément, et compartiment par compartiment.

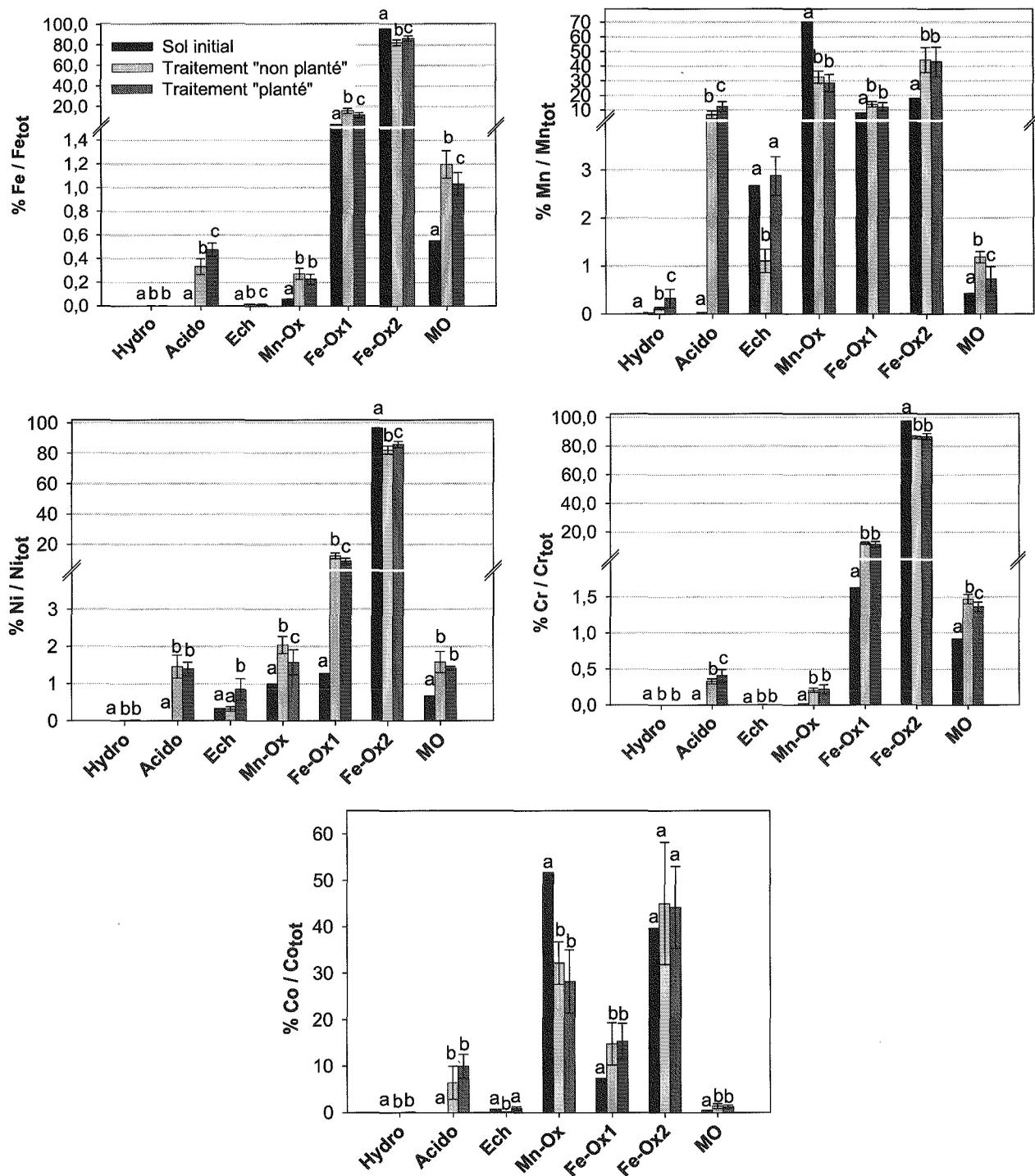


Figure 7.7 Répartition de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différents compartiments organo-minéraux et minéraux des échantillons de sol plantés ou non de maïs dans les colonnes subissant 4×2 jours d'engorgement ; les résultats présentés avec des lettres différentes (a et b) sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Ces lettres sont à considérer élément par élément, et compartiment par compartiment.

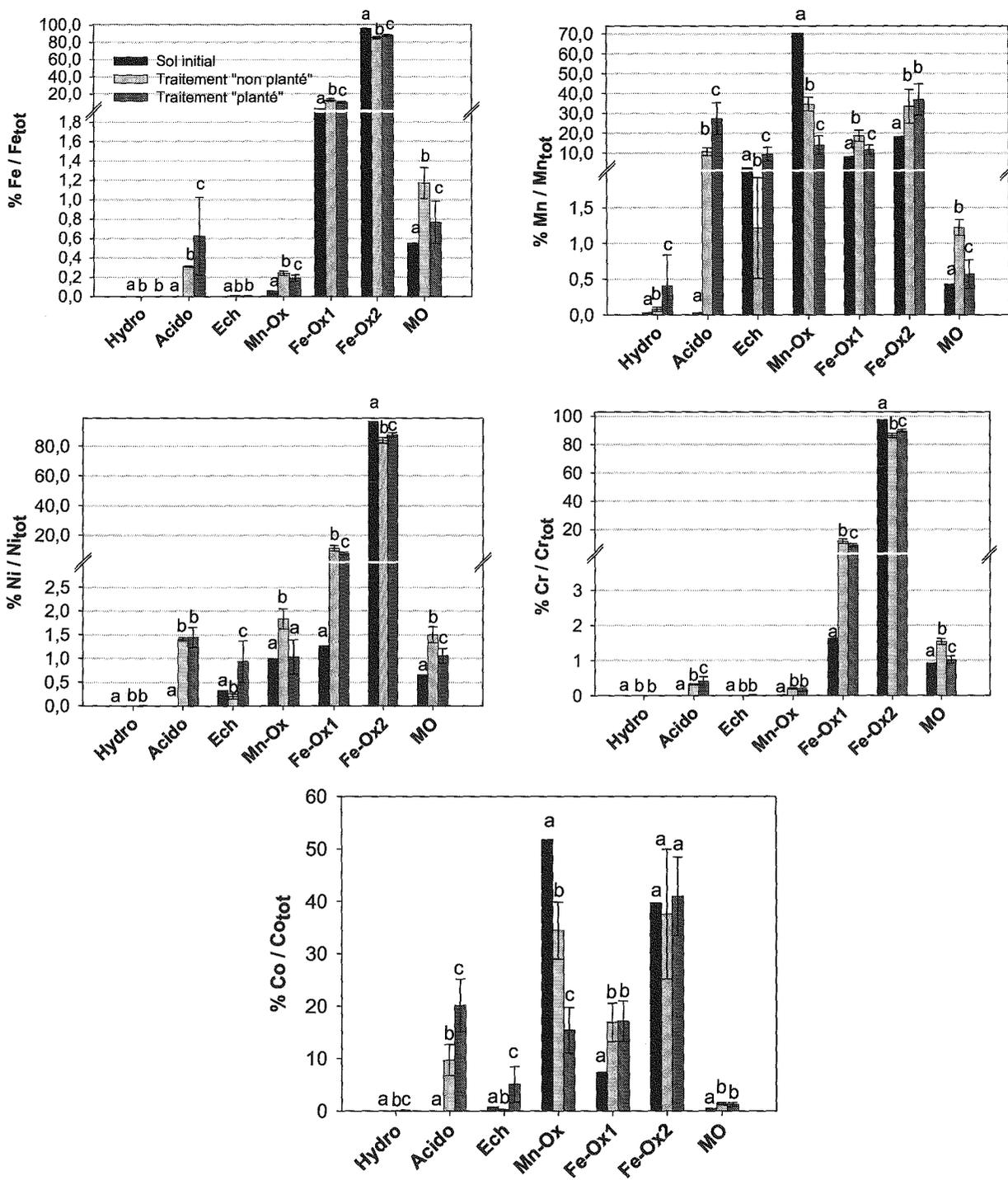


Figure 7.8 Répartition de Fe, Mn, Ni, Cr et Co dans les différents compartiments organo-minéraux et minéraux des échantillons de sol plantés ou non de maïs dans les colonnes subissant 1×8 jours d'engorgement ; les résultats présentés avec des lettres différentes (a et b) sont significativement différents (test t de Student, risque de 5%). Ces lettres sont à considérer élément par élément, et compartiment par compartiment.

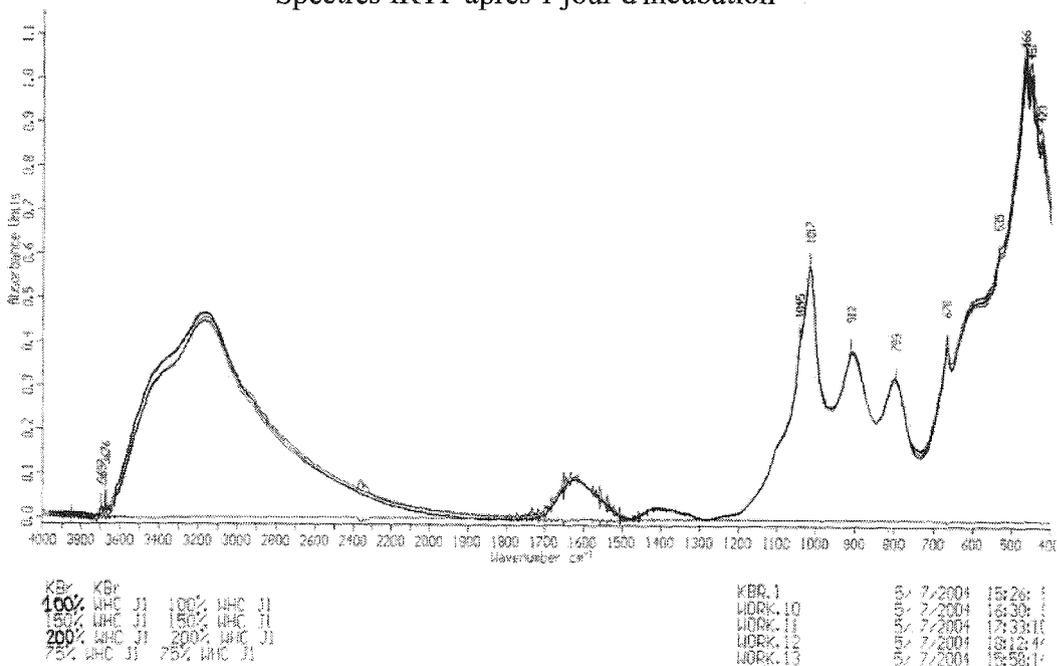
Annexe 3

Compléments au chapitre 8

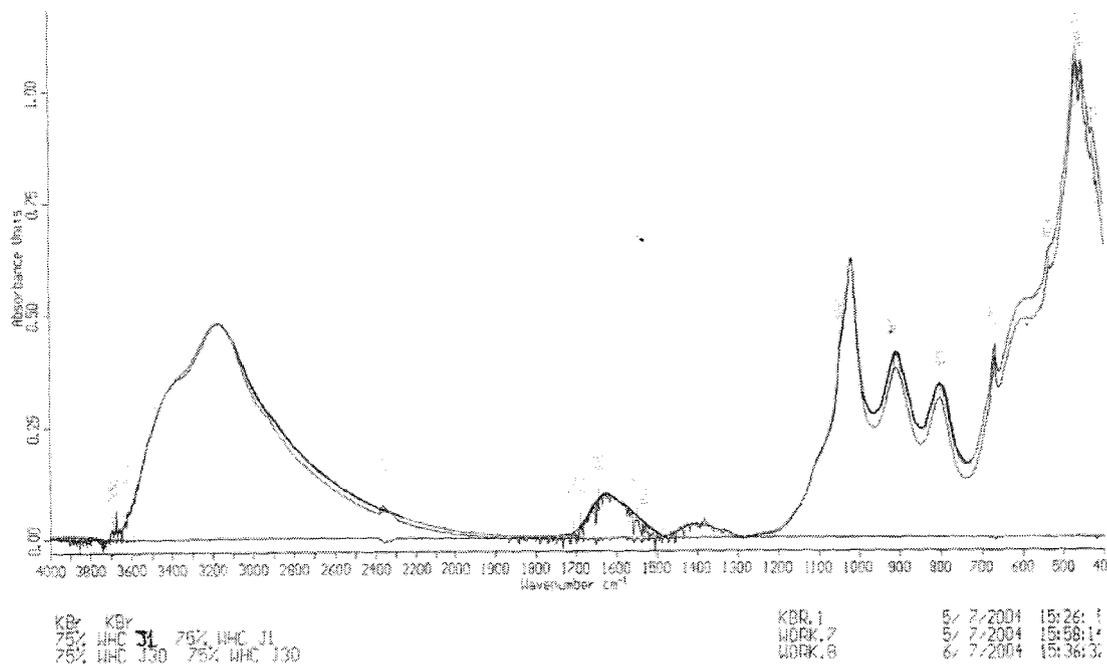
**Etude de la structure cristalline des oxyhydroxydes de fer par spectroscopie
infrarouge à transformé de Fourier (IRTF)**

Spectres IRTF originaux

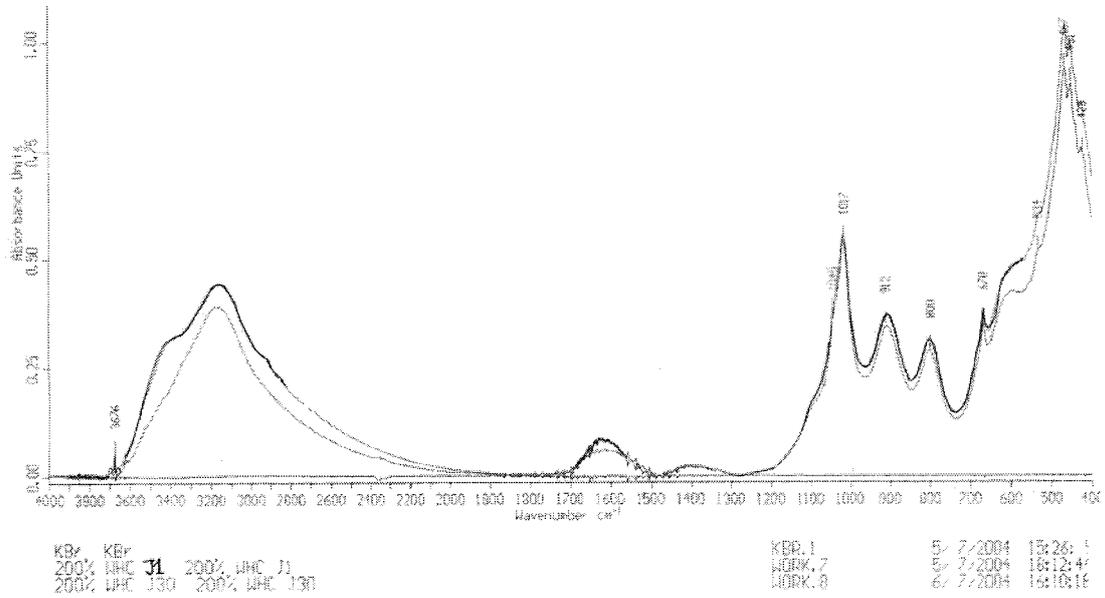
Incubations sans ajout de MO Spectres IRTF après 1 jour d'incubation



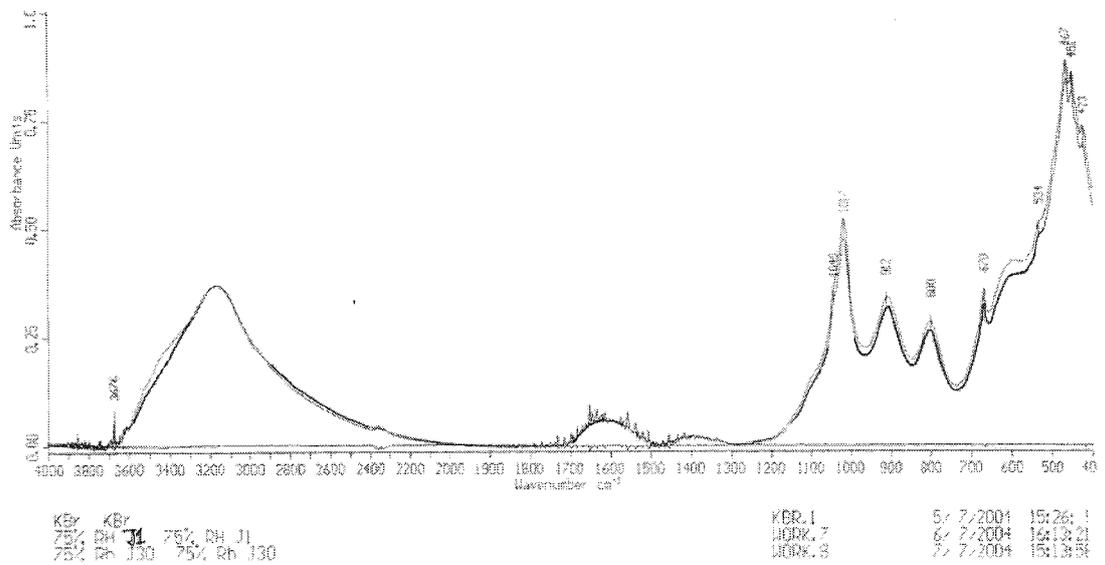
Incubations sans ajout de MO Spectres IRTF après 30 jours d'incubation à 75% HE



Incubations sans ajout de MO
Spectres IRTF après 30 jours d'incubation à 200% HE

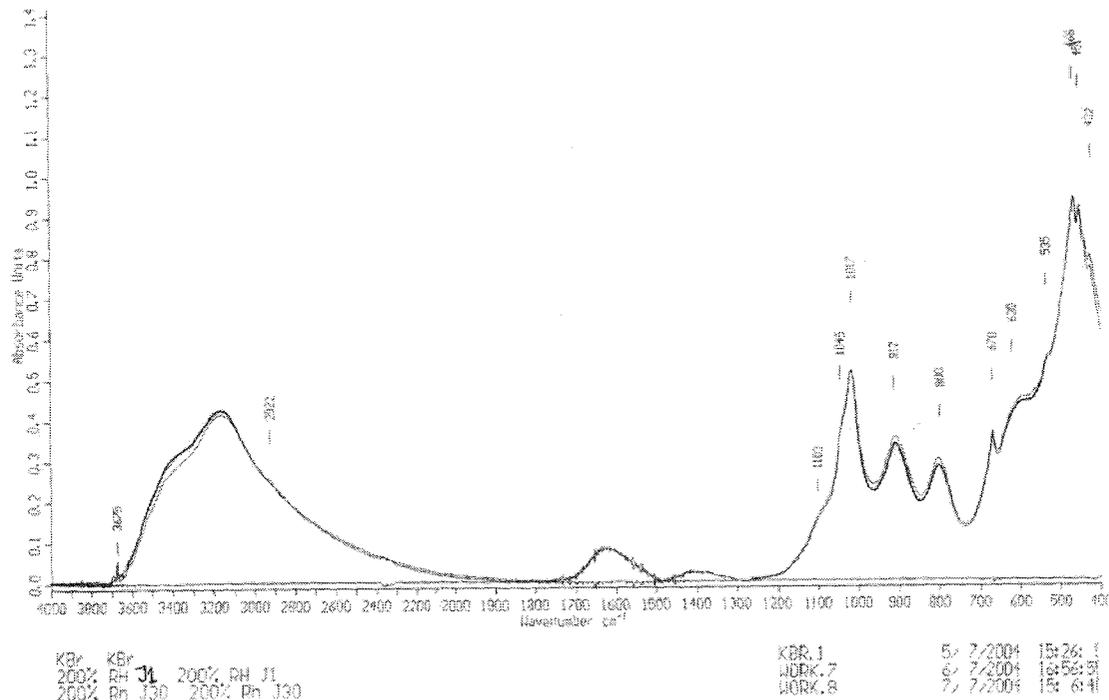


Incubations avec ajout de solution Rh
Spectres IRTF après 30 jours d'incubation à 75% HE



Incubations avec ajout de solution Rh

Spectres IRTF après 30 jours d'incubation à 200% HE



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Académie des sciences, 1998** – *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Rapport n°42, Editions Tec & Doc Lavoisier, 438p.
- Adriano D.C., 2001** - *Trace Elements in Terrestrial Environments - Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer Eds, New York, 880p.
- Ambikadevi V.R. & Lalithambika M., 2000** - *Effect of organic acids on ferric iron removal from iron-stained kaolinite*. Applied Clay Science, 16: 133-145.
- Anderson P.R. & Christensen T.H., 1988** - *Distribution coefficient of Cd, Co, Ni and Zn in soils*. Journal of Soil Science, 39: 15-22.
- Aubert G. & Boulaine J., 1967** - *La pédologie*, Que sais-je. Presses Universitaires de France, 127 pp.
- Barthes B., 1991** - *Caractérisation pédologique de parcelles du dispositif " Forêt naturelle " du C.T.F.T. à Paracou (Sinnamary, Guyane)*. B. B. Cayenne, CTFT.
- Basta N.T. & Tabatabai M.A., 1992**. *Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: II. Effect of pH*. Soil Science, 153: 195-204.
- Becquer T., Bourdon E. & L'Huillier L., Disponibilité du nickel dans les sols développés sur roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie**. Fonds Documentaires ORSTOM.
- Becquer T., Bourdon E. & Pétard J., 1995** - *Disponibilité du nickel le long d'une toposéquence de sols développés sur roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie*. Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, t. 321, Série IIa, 585-592.
- Becquer T., Bourdon E. & L'Huillier L., 1997** - *Mobilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques du sud de la Nouvelle-Calédonie*. Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères, 57-63.
- Becquer T., Quantin C., Sicot M. & Boudot J.P., 2003** - *Chromium availability in ultramafic soils from New Caledonia*. Science of The Total Environment, 301(1-3):251-261.

- Berthelin J. & Kogblevi A., 1974** - *Influence de l'engorgement sur l'altération microbienne des minéraux dans les sols*. Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol, 11: 499-509.
- Berthelin J., 1982** - *Processus microbiens intervenant dans les sols hydromorphes en régions tempérées. Incidences sur la pédogenèse*. Pédologie, 32: 313-328.
- Berthelin, J., 1983** - *Microbial weathering processes in natural environments*. In: Physical and Chemical Weathering in Geochemical Cycles, Lerman A. and Meybeck M. Eds, Kluwer Academic Press, London.
- Berthelin J., Guillet B., Rouiller J.H., Sadio S., Gueniot B. & Munier-Lamy C., 1990** - *A bag method to study the release, exchange, fixation and preconcentration of elements from minerals*. In: Nutrient cycling in terrestrial ecosystems - Field methods, application and interpretation. A. F. Harrison P. Ineson & O. W. Heal (Editor). Elsevier Applied Science, London, pp. 26-35.
- Berthelin J., Leyval C. & Toutain F., 1994** - *Rôle des organismes dans l'altération et l'humification*. In: Pédologie, tome II. Constituants et Propriétés du Sol, Bonneau M. et Souchier B., Eds. Masson, Paris.
- Berthelin J., Munier-Lamy C. & Leyval C., 1995** - *Effect of microorganisms on mobility of heavy metals in soils*. In: Environmental Impact of Soil Component Interactions vol.II : Metals, Other Inorganics, and Microbial Activities, Huang P.M., Berthelin J., Bollag J.M., McGill W.B. et Page A.L. Eds., Lewis Publishers, London.
- Berthelin, J., 1998** - *Les micro-organismes dans la transformation des minéraux : incidence sur la formation, le fonctionnement et l'évolution des sols*. In : Stengel P., Gelin S. Sol : Interface fragile, Inra, Paris, 83-89.
- Berthelin J., Ona-Nguema G., Stemmler S., Quantin C., Abdelmoula M. & Jorand F., 2006** - *Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rusts in soils*. Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris. Sous presse
- Bertrand I. & Hinsinger P., 2000** - *Dissolution of iron oxyhydroxyde in the rhizosphere of various crop species*. Journal of Plant Nutrition 23(11-12):1559-1577.
- Bourelle P.H. et Berthelin J., 1998** - *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Académie des sciences 42. Ed. Lavoisier, Paris.
- Bousserrhine N., Gasser U., Jeanroy E. & Berthelin J., 1996** - *Effect of aluminium substitution on ferri-reducing bacterial activity and dissolution of goethites*. Comptes

Rendus de l'Académie des Sciences - Sciences de la Terre et des Planètes, Paris, 326: 617-624.

- Bousserrhine N., Gasser U.G., Jeanroy E. & Berthelin J., 1999** - *Bacterial and chemical reductive dissolution of Mn-, Co-, Cr-, and Al-substituted goethites*. Geomicrobiology Journal, 16: 245-258.
- Braun V. & Braun M., 2002** - *Active transport of iron and siderophore antibiotics*. Current Opinion in Microbiology, 5: 194-201.
- Bromfield, S.H., 1954** - *Reduction of ferric compounds by soil bacteria*. Journal of General Microbiology, 11:1-6.
- Calvaruso C, Turpault M.P.& Frey-Klett P., 2006** - *Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: A budgeting analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 72(2):1258-1266.
- Cantet L., 2004** - *Prédiction de l'engorgement hydrique de surface par les cortèges floristiques en forêt tropicale humide (Guyane française)*. DEA Université H. Poincaré, Nancy I.
- Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C. & Moreno-Sanchez R., 2001** - *Interactions of chromium with microorganisms and plants*. FEMS Microbioloy Reviews, 25:335-347.
- Chaboud A., 1983** - *Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime*. Plant and Soil, 73: 395-402.
- Chang W.W.P., 2000** - *Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment and identification of proteins by mass spectrometry*. Plant Physiology, 122: 295-317.
- Charlot G., 1983** - *Les réactions chimiques en solution aqueuse et caractérisation des ions*. Masson Eds, Paris. 413 p.
- Cornell R.M. & Schwertmann U., 1996** - *The iron oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH Publishers Weinheim, 673p.
- Criquet S. 2002** - *Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter*. Journal of Microbiological Methods 50: 165-173.

- Crosa J.H. & Walsh C.T., 2002** - *Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66: 223-259.
- Dakora F. D. & Phillips D. A., 2002** - *Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments*. Plant and Soil 245: 35-47.
- Deneux-Mustin S., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Laplace J. & Leyval C., 2003** – *Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol*. Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris, 282p.
- DGEMP, 1997** - Rapport annuel "Energies et Matières premières".
- Dominik P., Pohl H.N., Bousserhine N., Berthelin J. & Kaupenjohann M., 2002** - *Limitations to the reductive dissolution of Al-substituted goethites by Clostridium butyricum*. Soil Biology & Biochemistry 34:1147-1155.
- Dommergues Y. & Mangenot F., 1970** - *Chapître III. Le facteur eau*. In: Ecologie microbienne du sol. Cie Masson & (Editor).
- Duchaufour P., 1970** - *Précis de Pédologie*, 3^o Edition., Paris, 481 pp.
- Echevarria G., Massoura S.T., Sterckeman T., Becquer T., Schwartz C. & Morel J.-L., 2006** - *Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils*. Environmental Toxicology and Chemistry, 25(3):643-651.
- Edwards S., 1998** - *Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and the Krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry*. Plant Physiology, 116: 1073-1081.
- Ehrlich, H. L., 2002** - *Geomicrobiology*, 4^o Edition. Marcel Dekker Publisher, New York. 800 p.
- Fredrickson J.K., Zachara J.M., Kukkadapu R.K., Gorby Y.A., Smith S.C. & Brown C.F., 2001** – *Biotransformation of Ni-substituted hydrous ferric oxide by an Fe(III)-reducing bacterium*. Environmental Science and Technology, 35:703-712.

- Frenzel P., Bosse U. & Janssen P.H., 1999** - *Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil*. *Soil Biology & Biochemistry*, 31:421-430.
- Gobat J.M., Aragno M. & Matthey W., 2003** – *Le sol vivant. Bases de pédologie - Biologie des sols*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (PPUR), Collection "Gérer l'environnement" n°14, 568 p.
- Gotoh S. & Patrick W.H.J., 1992** - *Transformations of iron in waterlogged soils as influenced by redox potential and pH*. *Soil Science Society of America Proc.*, 38: 66-71.
- Grabble A.R. & Siemer E.G., 1968** - *Soil Science Society of America Proc.*, 32(2): 180-186.
- Groleau-Renaud V.S., Plantureux, 1998** - *Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions*. *Plant and Soil* 201:231-239.
- Guerinot M.L., 1994** - *Microbial iron transport*. *Annual Review of Microbiology*, 48: 743-772.
- Herbillon A.J., 1994** – *Oxydes de fer, gibbsite, oxydes de manganèse et minéraux allophaniques*. In : *Pédologie. II. Constituants et propriétés du sol.*, Chapitre II, Bonneau M. et Souchier B., 2° Edition., Masson, Paris, 665p.
- Hiltner L., 1904** - *Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Landwirtschaft*. *Arb. Dtsch. Landwirt. Ges.*, 98: 59-78.
- Hines M.E., Bazylinski D.A., Tugel J.B. & Lyons W.B., 1991** - *Anaerobic microbial biochemistry in sediments from two basins in the Gulf of Maine: evidence for iron and manganese reduction*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 32:313-324.
- Hinsinger P., 2001** - *Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review*. *Plant and Soil*, 237: 173-195.
- Hitchcock A.S. & Chase A., 1971** - *Manual of the grasses of the United States*, Volume 2. Dover Publications, N.Y., pp. 790-796.
- Institut Agronomique Néo-Calédonien, 2003** - Rapport d'activité.

- Jaffré T., Veillon J.M., & Pintaud J.C., 1997** - *Comparaison de la diversité floristique des forêts denses humides sur roches ultramafiques et sur substrats différents en Nouvelle-Calédonie*. Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères. D. S. e. T. ORSTOM. Vol.III2: 163-170.
- Juste C., 1988** - *Apréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol*. Science du Sol, 26: 103-112.
- Krafczyk I., Trolldenier G. & Beringer H., 1984** - *Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms*. Soil Biology and Biochemistry, 16(4): 315-322.
- Laheurte F. & Berthelin J., 1988** - *Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labil phosphorous*. Plant and Soil, 105:11-17.
- Laheurte F., Leyval C. & Berthelin J., 1990** - *Roots exudates of maize, pine and beech seedlings influenced by mycorrhizal and bacterial inoculation*. Symbiosis 9: 11-116.
- Landeweert R., Hoffland E., Finlay R.D., Kuypers T.W. & van Breemen N., 2001** - *Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals*. Trends in Ecology & Evolution, 16(5): 248-254.
- Landsberg E.C., 1981** - *Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress of mono and dicotyledonous plant species*. Journal of Plant nutrition, 3: 579-591.
- Lerman A. & Meybeck M., 1988** - *Physical and chemical weathering in geochemical cycles*. Kluwer Academic Publishers, NATO ASI Series, Serie C : Mathematical and Physical Sciences, Vol. 251. 375p.
- Lespinat P.A. & Berlier Y., 1975** - *Les facteurs externes agissant sur l'excretion racinaire*. Société Botanique de France, Collection Rhizosphère: 21-30.
- Levy G. & Toutain F., 1994** - *Aération et phénomènes d'oxydo-réduction dans les sol*. In : Pédologie. II. Constituants et propriétés du sol., Chapitre XVII, Bonneau M. et Souchier B., 2° Edition., Masson, Paris, 665p.
- Leyval C. & Berthelin J., 1991** - *Weathering of a mica by roots and rhizospheric microorganisms of pine*. Soil Science Society of America Journal, 55: 1009-1016.

- Leyval C. & Jöner E.J., 2001** - *Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere*. In: Trace elements in the rhizosphere, CRC Press LLC, 8: 165-185.
- L'Huillier L., 1994** - *Biodisponibilité du nickel dans les sols ferralitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. Effets toxiques de Ni sur le développement et la physiologie du maïs*, Thèse de l'Université de Montpellier II., 249 p.
- L'Huillier L. & Edighoffer S., 1996** - *Extractability of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni rich ultramafic soils of New Caledonia*. Plant and Soil 186: 255-264.
- Li S., Lin B. & Zhou W., 2001** - *Soil organic sulfur mineralization in the presence of growing plants under aerobic or waterlogged conditions*. Soil Biology & Biochemistry, 33(6):721-727.
- Lovley D.R. & Blunt-Harris E.L., 1999** - *Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) reduction*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 4252-4254.
- Lovley D.R. & Coates J.D., 2000** - *Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance*. Current Opinion in Microbiology, 3: 252-256.
- Lovley D.R. & Phillips E.J.P., 1986** - *Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments*. Applied Environmental Microbiology, 51: 683-689.
- Lovley D.R. & Phillips E.J.P., 1988** - *Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese*. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1472-1480.
- Lovley D.R., 1991** - *Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction*. Microbiological Reviews, 55: 259-287.
- Lovley D.R., 1993** - *Dissimilatory metal reduction*. Annual Revue of Microbiology, 47: 263-290.
- Lovley D.R., Coates J.D., Blunt-Harris E.L., Phillips E.J.P. & Woodward J.C., 1996** - *Humic substances as electrons acceptors for microbial respiration*. Nature, 382: 445-448.

- Lovley D.R., Fraga J.L., Blunt-Harris E.L., Hayes L.A., Phillips E.J.P. & Coates J.D., 1998 - *Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction*. Acta Hydrochimica Hydrobiologia, 26: 152-157.
- Lovley D.R., Kashefi K., Vargas M., Tor J.M. & Blunt-Harris E.L., 2000 - *Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganism*. Chem. Geol., 169: 289-298.
- Lübben S. & Sauerbeck D., 1991 - *The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat*. Water, Air, and Soil Pollution, 57-58: 239-247.
- Lynch J.M., 1990 - *The rhizosphere*. Wiley-Interscience, 458p.
- Lynch J.M. & Whipps J.M., 1990 - *Substrate flow in the rhizosphere*. Plant Soil, 129: 1-10.
- Macedo J. & Bryant R.B., 1989 - *Preferential microbial reduction of hematite over goethite in a Brazilian oxisol*. Soil Science Society of America Journal, 53: 1114-1118.
- Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J., 2000 - *Brock. Biology of Microorganisms*, 9th edition, Prentice Hall, inc. Upper Saddle River, New Jersey, 991p.
- Marschner H., 1986 - *Mineral nutrition in higher plants*. Academic Press, London, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 674p.
- Massoura S., Echevarria G., Becquer T., Ghanbaja J., Leclerc-Cessac E. & Morel J.L., 2006 - *Nickel bearing phases and availability in natural and anthropogenic soils*. Geoderma (accepté).
- Matsumoto H., Okada K. & Takahashi E., 1979 - *Excretion products of maize roots from seedling to seed development stage*. Plant and Soil, 53: 17-26.
- McBride M.B., 1994 - *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press, 406p.
- Morel J.L., Bitton G., Schwartz C. & Schiavon M., 1996 - *Bioremediation of soils and waters contaminated by micropollutants : which role for plants ?* In : Ecotoxicology : response, biomarkers and risks assessment, Chapter 4, OECD Workshop. Zelikoff J.T. (ed). SOS Publications, Fair Haven, N.J. USA, 37-74.
- Morel J.L., 1997 - *Assessment of phytoavailability of trace éléments in soils*. Analisis Magazine, 25:70-72.
- Munch J. C. & Ottow J. C. G., 1983 - *Reductive transformation mechanism of ferric oxides in hydromorphic soils*. Environmental Biogeochemistry 35: 383-394.

- Neilands J.B., 1974** - *Iron and its role in microbial physiology*. Academic Press, London.
- Nevin K.P. & Lovley D.R., 2002** - *Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by Geothrix fermentans*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2294-2299.
- Newman D.K. & Kolter R., 2000** - *A role for excreted quinones in extracellular electron transfer*. Nature, 405: 95-97.
- Newman E.I., 1985** - *The rhizosphere: carbon sources and microbial populations*. In: *Ecological interactions in soil: plants, microbes and animals*. A. H. Fitter D. Atkinson, D. J. Read & M. B. Usher (Editor). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 107-121.
- Paar J.F., 1969** - Soils Fertility, 32(5): 411-415.
- Paskiewicz I. & Berthelin J., 2006** - *Influence of maize rhizosphere and associated microflora on weathering of Fe and Mn oxides and availability of trace elements in a New Caledonia Ferralsol*. Poster présenté au colloque international EGU, Vienne (Autriche), du 02 au 07 Avril 2006.
- Paul, E. A. and F. E. Clark, 1988** - *Soil Biology and Biochemistry*, Academic Press, Inc.
- Quantin C., 2001** - *Incidence de la biodégradation des matières organiques sur le devenir des métaux et des contaminants organiques dans un sol nickelifère et un sédiment de rivière*. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I., 160p.
- Quantin C., Becquer T., Rouiller J.H. & Berthelin J., 2001** - *Oxide weathering and trace metal release by bacterial reduction in a New Caledonia Ferralsol*. Biogeochemistry, 53:323-340.
- Quantin C., Becquer T., Rouiller J.H. & Berthelin J., 2002** - *Redistribution of metals in a New Caledonia Ferralsol after microbial weathering*. Soil Science Society of America Journal, 66: 1797-1804.
- Raiswell R., Canfield D.E. & Berner R.A., 1994** - *A comparison of iron extraction methods for the determination of degree of pyritisation and the recognition of iron-limited pyrite formation*. Chem. Geol., 111: 101-110.
- Richardson D.J., 2000** - *Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment*. Microbiology, 146: 551-571.

- Robert M. & Berthelin J., 1986** - *Role of biological and chemical factors in soil mineral weathering*. In: Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. Huang P. M. (Editor). SSSA Spec. Publ., pp. 453-495.
- Roden E.E. & Zachara J.M., 1996** - *Microbial reduction of crystalline iron (III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth*. Environmental Science and Technology, 30: 1618-1628.
- Rovira A.D., Foster R.C. & Martin J.K., 1979** - *Origine, nature and nomenclature of organic materials in the rhizosphere*. In: The soil root interface. Harley R. S. Russel & J. L. (Editor). Academic Press Inc., New York, pp. 1-4.
- Ruiz L. & Arvieu J.C., 1990** - *Measurement of pH gradients in the rhizosphere*. Symbiosis, 9: 71-75.
- Sadio S., 1982** - *Altération expérimentale de phyllosilicates-tests sous végétations forestières acidifiantes*. Thèse Docteur Ingénieur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I., 106p.
- Schröder I., Johnson E. & de Vries S., 2003** - *Microbial ferric iron reductases*. FEMS Microbiology Reviews, 27: 427-447.
- Schwertmann U. & Taylor R. M., 1979** - *Natural and synthetic poorly crystallized lepidocrocite*. Clay Minerals, 14(4):285-293.
- Schwertmann U. & Latham M., 1986** - *Properties of iron oxides in some New Caledonia oxisols*. Geoderma, 38:105-123.
- Sciences au Sud, le Journal de l'IRD, 2003** - *Nouvelle-Calédonie : Mine et environnement*. 20.
- Somogyi M., 1952** - *Notes on sugar determination*. Journal of Biological Chemistry, 195(1), 19-23.
- Stemmler S.J. & Berthelin J., 2003** - *Microbial activity as a major factor in the mobilization of iron in the humid tropics*. European Journal of Soil Science 54(4): 725-733.
- Straub K.L., Benz M. & Schink B., 2001** - *Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH*. FEMS Microbiology and Ecology, 34: 181-186.
- Takai Y. & Kamura T., 1966** - *The mechanism of reduction in waterlogged paddy soil*. Soil Science and Plant Nutrition, 11:304-313.
- Tardy Y., 1993** - *Pétrologie des Latérites et des Sols Tropicaux*. Masson, Paris.

- Tinker P.B., 1986** -*Trace elements in arable agriculture*. Hills bequest lecture of the Royal Agricultural Society of England, 9 October 1985. *Journal of Soil Science*, 37: 587-601.
- Turick C.E., Tisa L.S. & Caccavo F., 2002** - *Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a terminal acceptor by Shewanella algae BrY*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2436-2444.
- Uren N.C., 1992** - *Forms, reactions, and availability of nickel in soils*. *Advances in Agronomy*, 48: 141-203.
- Van Breemen N., Finlay R., Lundström U., Jongmans A.G., Giesler R. & Olsson M., 2000** - *Mycorrhizal weathering: a true case of mineral plant nutrition?* *Biogeochemistry*, 49: 53-67.
- Vargas M., Kashefi K., Blunt-Harris E.L. & Lovley D.R., 1998** - *Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early earth*. *Nature*, 395: 65-67.
- Visca P., Leoni L., Wilson M.J. & Lamont I.L., 2002** - *Iron transport and regulation, cell signaling and genomics: lessons from Escherichia coli and Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 45: 1177-1190.
- Watteau, F. and J. Berthelin, 1994** - *Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids*." *European Journal of Soil Science* 30(1): 1-9.
- Weiss J.V., Emerson D. & Megonigal J.P., 2004** – *Geochemical control of microbial Fe(III) reduction potential in wetlands: comparison of the rhizosphere to non-rhizosphere soil*. *FEMS Microbiology Ecology*, 48:89-100.
- Willaert G. & Verloo M., 1988** - *Biological effects of nickel species and their determination in plant and soil*. *Plant and Soil*, 107: 285-292.
- Yoshida T., 1976** - *Microbial metabolism of loaded soils*. In: *Soil Biochemistry*. Laren E.A. Paul & Mc (Editor). Marcel Dekker Inc., pp. 83-122.

Incidences d'interactions racines-microorganismes-état hydrique sur la mobilisation et redistribution de métaux dans un sol nickelifère.

Les Ferralsols Néo-Calédoniens sont naturellement riches en Cr, Co et Ni, concentrés principalement dans les oxyhydroxydes de Fe et Mn. Ils sont libérés lors de la dissolution des minéraux par réduction bactérienne du fer. Connaître les cycles biogéochimiques de Fe, Mn et éléments en traces associés est donc d'un intérêt fondamental dans les sols et la rhizosphère des plantes cultivées.

Le but de ce travail est de déterminer l'incidence de la rhizosphère, des microorganismes et de l'état hydrique du sol, sur l'altération des oxydes de Fe et de Mn et la mobilisation d'éléments en traces. Des dispositifs de cultures de maïs en pots ou colonnes axéniques et en cuves en conditions contrôlées ont été utilisés. Des communautés bactériennes ferri- et mangani-réductrices ont été isolées de la rhizosphère du maïs. L'altération des phases minérales des sols a été évaluée par le transfert aux plantes, la dissolution des éléments et leur redistribution vers les différents compartiments, du plus disponible (éléments hydrosolubles) au plus stable (oxydes de fer).

Les résultats mettent en évidence une altération des phases minérales qui se traduit par une mobilisation des éléments depuis les oxydes et leur redistribution vers des compartiments du sol soit plus disponibles soit plus stables. La présence de la plante, de communautés bactériennes ferri- et mangani-réductrices, ainsi que de périodes d'engorgement au cours de la culture, augmentent la disponibilité des éléments. L'activité rhizosphérique a un rôle déterminant. La biodégradation des matières organiques du sol intervient aussi pour favoriser l'apparition de conditions favorables à l'altération.

Mots clés : sols tropicaux, rhizosphère, état hydrique, oxydes de fer, oxydes de manganèse, bactéries ferri-réductrices, bactéries mangani-réductrices, altération biologique

Effects of interactions between roots, microorganisms and hydric conditions on metal mobilization and redistribution in a nickel-bearing soil.

In New Caledonia Ferralsols, nickel, chromium and cobalt are contained in iron and manganese (oxy-hydr)oxides and are released during weathering, particularly by iron reducing bacteria. So it is of major interest to know the biogeochemical cycle of Fe, Mn, and associated trace elements in soils and rhizosphere of crop plants.

The aim of this work is to define the effect of rhizosphere, microorganismes and hydric conditions on iron and manganese oxyhydroxides weathering, and mobilization of trace elements (Ni, Cr, Co). Experiments have been done using pot cultures of maize or axenic column, and batch devices in controlled conditions. Iron and manganese reducing bacterial communities have been isolated from maize rhizosphere. Weathering of mineral phases has been monitored by transfer elements to the plant, dissolution and redistribution of metals between the different geochemical compartments, from the most available (watersoluble elements) to the most stable (iron oxides).

Results show an improvement of bioavailability of Fe, Mn, Ni, Cr and Co, which were transfer to maize. Mineral phases weathering involve a mobilization of the metals from oxides and their redistribution to most stable or most available compartments. The presence of the plant, iron and manganese reducing communities, and waterlogged conditions during plant culture, increases the element bioavailability. Biodegradation of soil organic matter has an important influence on the occurrence of conditions favourable to the weathering.

Keywords : tropical soils, hydric conditions, iron oxides, manganese oxides, iron-reducing bacteria, manganese-reducing bacteria, biological weathering