



**HAL**  
open science

# Fonctionnement et qualité des sols soumis à des perturbations physiques et chimiques d'origines anthropiques: réponses du sol, de la flore et de la microflore bactérienne tellurique

Raphaël Gros

► **To cite this version:**

Raphaël Gros. Fonctionnement et qualité des sols soumis à des perturbations physiques et chimiques d'origines anthropiques: réponses du sol, de la flore et de la microflore bactérienne tellurique. *Ecologie, Environnement*. Université de Savoie, 2002. Français. NNT : . tel-00006161

**HAL Id: tel-00006161**

**<https://theses.hal.science/tel-00006161>**

Submitted on 27 May 2004

**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.



**Centre Interdisciplinaire Scientifique de la Montagne**  
**- Université de Savoie -**

**THESE**

Présentée en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de Savoie

Spécialité : Biologie des populations et des écosystèmes

---

**Fonctionnement et qualité des sols soumis à des perturbations  
physiques et chimiques d'origine anthropique : réponses du sol, de  
la flore et de la microflore bactérienne tellurique.**

---

par

**Raphaël GROS**

Soutenue publiquement le 19 décembre 2002 devant le jury composé de :

<b>Lucile JOCTEUR MONROZIER</b> , Chargé de recherche, CNRS-UCB Lyon1	Présidente
<b>Yves PERRODIN</b> , Directeur de recherche, ENTPE/Polden INSAVALOR	Rapporteur
<b>Michel ROBERT</b> , Directeur de recherche, INRA-Versailles	Rapporteur
<b>Pierre FAIVRE</b> , Professeur Université de Savoie	Directeur de Thèse
<b>Dominique FONTVIELLE</b> , Professeur Université de Savoie	Examineur
<b>Cécile GRAND</b> , ADEME-Angers	Examineur
<b>Robert L. BRADLEY</b> , Professeur Université de Sherbrooke	Invité



## Remerciements

*Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Science du Sol de l'Université de Savoie, grâce au soutien financier de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME).*

*Je remercie Pierre FAIVRE, mon directeur de thèse, de m'avoir accordé sa confiance pour réaliser ce travail de recherche. Il a su m'aider tout au long de ces 3 ans à construire la réflexion et à franchir les caps difficiles.*

*J'exprime ma reconnaissance à Lucile JOCTEUR-MONROZIER (CNRS, Lyon1), co-directrice de cette thèse, pour sa collaboration essentielle dans ce travail, ainsi que ces nombreux et pertinents conseils dans des disciplines variées tels que la pédologie, les sciences de l'environnement et l'écologie microbienne.*

*Mes remerciements s'adressent à Yves PERRODIN (ENTPE, Lyon) et Michel ROBERT (INRA-Versailles, MATE) pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci à Dominique FONTVIELLE (Professeur à l'Université de Savoie), Cécile GRAND (ADEME, Angers) et Robert BRADLEY (professeur à l'Université de Sherbrooke, Quebec) pour avoir également accepté d'être membres du Jury.*

*Je veux également remercier Franck POLY, pour sa collaboration efficace depuis mon DEA jusqu'à la fin de cette thèse.*

*Je remercie messieurs François BARTOLI (CNRS, Nancy) et Jean Luc CHOTTE (IRD, Dakar) pour leurs réflexions et leur participation à l'écriture de l'un des articles présenté dans ce travail.*

*Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et fait partagé leurs compétences pour la réalisation de ce travail : Anne GOBBEY (ADEME, Angers), Laurent Château (ADEME, Angers), Louis TROSSET, Jérôme POULENARD, Saidou SALL et Bernard CLEMENT.*

*Je remercie la commune de St Martin de Belleville (73), Pierre JOSSERAND (SETAM), Delphine et Daniel THIROIN (Société Blé des Cîmes) pour leurs participations financières et techniques dans la réalisation de ce projet.*

*Merci à toutes les personnes du département de biologie de l'Université de Savoie et du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université Lyon 1, pour leur gentillesse et leur bonne humeur.*

*Un grand merci également à tous ceux qui ont partagé avec moi ces trois années : thésards, étudiants, amis... qu'ils soient savoyards, francs-comtois ou exportés dans le reste de la France, voir en dehors de nos frontières.*

*Merci à tous mes proches, ma famille, pour m'avoir encouragé tout au long de ce travail.*

*Je réserve cette dernière ligne pour Marie, je dirai simplement merci pour ton amour...*

# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>5</b>
------------------------------	----------

<b>Première partie : La qualité des sols et le fonctionnement des écosystèmes terrestres</b>
--

<b>Chapitre I - La qualité des sols : Définitions du concept et facteurs</b>	<b>10</b>
--	-----------

<b>I.1. Introduction</b>	<b>10</b>
--------------------------	-----------

<b>I.2. Rôle de la qualité du sol dans le fonctionnement des écosystèmes</b>	<b>13</b>
--	-----------

<b>I.3. Santé et qualité des sols</b>	<b>14</b>
---------------------------------------	-----------

<b>I.4. Le concept de qualité des sols</b>	<b>15</b>
--	-----------

<b>Chapitre II - Evaluation de la qualité des sols</b>	<b>18</b>
--	-----------

<b>II.1. Approche fonctionnelle et indicateurs</b>	<b>18</b>
--	-----------

<b>II.2. Indices mathématiques de la qualité des sols</b>	<b>21</b>
---	-----------

<b>II.3. Les formes d'hétérogénéité et leur importance dans l'évaluation de la qualité des sols.</b>	<b>23</b>
--	-----------

II.3.1. Hétérogénéité spatiale	23
--------------------------------	----

II.3.2. Hétérogénéité temporelle	24
----------------------------------	----

II.3.3. Hétérogénéité fonctionnelle	26
-------------------------------------	----

<b>II.4. La qualité physique, chimique et biologique des sols</b>	<b>28</b>
---	-----------

II.4.1. La qualité chimique	28
-----------------------------	----

II.4.2. La qualité physique	32
-----------------------------	----

II.4.3. La qualité biologique	32
-------------------------------	----

<b>Deuxième partie : Modifications des relations sol-microorganismes-plantes au cours du processus de restauration de prairies alpines dégradées.</b>
---

**Introduction : problématique, contexte et objectifs des travaux** \_\_\_\_\_ **39**

**Chapitre I - Organisation physique et activités bactériennes de sols alpins  
naturels, dégradés puis reconstitués** \_\_\_\_\_ **48**

**I.1. Abstract** \_\_\_\_\_ **51**

**I.2. Introduction** \_\_\_\_\_ **51**

**I.3. Material and methods** \_\_\_\_\_ **53**

I.3.1. Field situations \_\_\_\_\_ 53

I.3.2. Soil sampling strategy \_\_\_\_\_ 55

I.3.4. Soil analysis \_\_\_\_\_ 56

I.3.5. Microbial analysis \_\_\_\_\_ 57

I.3.6. Statistical analysis \_\_\_\_\_ 59

**I.4. Results** \_\_\_\_\_ **59**

I.4.1. Soil texture \_\_\_\_\_ 59

I.4.2. Soil structure \_\_\_\_\_ 62

I.4.3. Soil chemistry (total carbon and nitrogen contents, CEC) \_\_\_\_\_ 64

I.4.4. Microbial activities \_\_\_\_\_ 64

**I.5. Discussion** \_\_\_\_\_ **67**

**I.6. References** \_\_\_\_\_ **72**

**Chapitre II - Réponses des communautés bactériennes à des modifications de la  
structure physique d'un écosystème prairial alpin : influence de la localisation  
des bactéries** \_\_\_\_\_ **78**

**II.1. Abstract** \_\_\_\_\_ **82**

**II.2. Introduction** \_\_\_\_\_ **83**

**II.3. Material and Methods** \_\_\_\_\_ **85**

II.3.1. Field sites and soil sampling \_\_\_\_\_ 85

II.3.2. Soil fractionation \_\_\_\_\_ 86

II.3.3. Rhizosphere and non rhizosphere soil collection and root biomass measurement \_\_\_\_\_ 87

II.3.4. Soil texture and C and N content \_\_\_\_\_ 87

II.3.5. Extraction and purification of DNA from soil and fraction samples \_\_\_\_\_ 88

II.3.6. Automated intergenic spacer analysis (A-RISA): global soil microbial community \_\_\_\_\_ 89

II.3.7. PCR-RFLP on the *nifH* gene pool: the community of nitrogen-fixing bacteria \_\_\_\_\_ 89

II.3.8. Statistical analysis \_\_\_\_\_ 90

**II.4. Results** \_\_\_\_\_ **90**

II.4.1. Multivariate analysis of bulk soils and microenvironments \_\_\_\_\_ 90

II.4.2. Bacterial community structure analysis from F<sub>2000-250</sub> and F<sub>50-2</sub> aggregate-size fractions \_\_\_\_\_ 93

II.4.3. Bacterial community structure analysis from rhizosphere soil \_\_\_\_\_ 96

<b>II.5. Discussion</b>	<b>100</b>
<b>II.6. References</b>	<b>106</b>
<b>Conclusions</b>	<b>112</b>

<p><b>Troisième partie : Réponses du sol, de la flore et de la microflore bactérienne à des perturbations chimiques complexes</b></p>
---

<b>Introduction : problématique, contexte et objectifs des travaux</b>	<b>116</b>
--	------------

**Chapitre I - Perturbations des propriétés physico-chimiques d'un sol lessivé soumis à l'épandage d'effluents de déchets d'incinération** **129**

<b>I.1. Summary</b>	<b>132</b>
<b>I.2. Introduction</b>	<b>132</b>
<b>I.3. Materials and methods</b>	<b>134</b>
I.3.1. Soil, leachates and field experiment	134
I.3.3. Aggregate stability test	137
I.3.4. Grain size distribution in presence of MSWI-leachates	138
<b>I.4. Results</b>	<b>139</b>
I.4.1. Field impact assessments	139
I.4.2. Aggregates stability test	142
I.4.3. Effects of leachates on grain size distribution	145
<b>I.5. Discussion</b>	<b>146</b>
<b>I.6. Conclusion</b>	<b>150</b>
<b>I.7. References</b>	<b>151</b>

**Chapitre II - Réponses à court terme des communautés bactériennes telluriques : empreintes génétiques et activité potentielles** **156**

<b>II.1. Abstract</b>	<b>159</b>
<b>II.2. Introduction</b>	<b>159</b>
<b>II.3. Materials and methods</b>	<b>161</b>
II.3.1. Soil and experimental design	161
II.3.2. Chemical analysis	162
II.3.3. Microbial activities	163
<b>II.4. Results</b>	<b>165</b>
II.4.1. Immobilization of MSWI ash leachate components in soil columns	165
II.4.2. Microbial activities on day 30	166
II.4.3. Structure of soil bacterial communities on day 30	169

<b>II.5. Discussion</b>	<b>172</b>
<b>II.6. References</b>	<b>174</b>

**Chapitre III - Réponses des plantes et des communautés bactériennes des perturbations chimiques complexes** **177**

<b>III.1. Abstract</b>	<b>180</b>
<b>III.2. Introduction</b>	<b>180</b>
<b>III.3. Materials and methods</b>	<b>182</b>
III.3.1. Experimental design	182
III.3.2. Soil contamination measurements	184
III.3.3. Plant biomasses and carbon nitrogen contents	184
III.3.4. Microbial community structure by Automated – Ribosomal Intergenic Spacer Analysis	184
<b>III.4. Results and discussion</b>	<b>185</b>
III.4.1. Soil contamination	185
III.4.2. Effects of leachates on vegetation	186
III.4.3. Effects of leachates on soil microbial community structure	190
<b>III.5. Conclusion</b>	<b>194</b>
<b>III.6. References</b>	<b>195</b>

**Chapitre IV - Elaboration d'une batterie de tests de phytotoxicité: Essais de laboratoire.** **200**

<b>IV.1. Résumé</b>	<b>200</b>
<b>IV.2. Introduction</b>	<b>201</b>
<b>IV.3. Matériel et méthodes</b>	<b>201</b>
IV.3.1. Préparation des cultures expérimentales	201
IV.3.2. Paramètres mesurés	202
IV.3.3. Analyses statistiques	203
<b>IV.4. Résultats et discussion</b>	<b>203</b>
IV.4.1. Biomasses foliaires et racinaires	203
IV.4.2. Croissance des racines	207
IV.4.3. Biosynthèse de la proline	208
<b>IV.5. Conclusion</b>	<b>210</b>
<b>Synthèse et conclusions</b>	<b>211</b>



**Conclusions générales et perspectives** \_\_\_\_\_ **214**

**Références bibliographiques** \_\_\_\_\_ **227**

---

## **Introduction générale**

---

## Introduction générale

*«On boit l'eau, on respire l'air mais on ne mange pas le sol. Il ne nous nourrit qu'indirectement.»*

Winfried Blum,

Le sol est une ressource fondamentale qui supporte la croissance des plantes et assure ainsi la production primaire dont dépend directement la population humaine. Le sol est un milieu vivant et fragile, qui abrite d'intenses échanges et transformations biologiques et physico-chimiques. Il est à ce titre une interface biologique et géochimique déterminante dans le maintien du fonctionnement des écosystèmes (Robert, 1996). Le sol, bien que pouvant être restauré et plus ou moins reconstitué, reste une ressource non renouvelable en raison de la longue période nécessaire aux processus de sa formation. Cette propriété le rend particulièrement sensible aux agressions anthropiques. Ainsi, sa dynamique peut être accélérée ou modifiée par les activités humaines qui utilisent de manière non raisonnée les multiples fonctions du sol. Les pratiques agricoles, les opérations de génie civil, la gestion de déchets, la déforestation, les pollutions accidentelles organiques et chimiques, sont autant d'activités qui conduisent à une modification durable de ces propriétés et dégradent sa qualité.

Si les préoccupations sur la qualité des sols sont très anciennes, la prise de conscience internationale de l'importance d'une préservation et d'une gestion durable de cette ressource, suivie des mesures concrètes de sa protection, est elle très récente, à l'instar des deux autres principales ressources terrestres : l'eau et l'air. La déclaration de Winfried Blum, secrétaire général de l'Union International des Sciences du Sol (IUSS), exprime particulièrement bien les raisons de cet oubli. Les premières propositions de convention sur l'utilisation durable des sols ont été adoptées rapidement après le Sommet de la Terre (Rio de Janeiro, juin 1992) et sont entrées en vigueur en décembre 1996. Cependant, l'efficacité des mesures de protections qui pourront être adoptées à l'avenir par les différents états signataires des conventions, dépend largement des méthodes des diagnostics fiables de l'évaluation du fonctionnement et des modifications de la qualité du sol. Cette dernière est un concept qui a été développé pour caractériser l'utilité et la santé des sols. Sa définition donne lieu à de nombreuses interprétations qui répondent toujours aux préoccupations sociales et scientifiques actuelles (Doran et al., 1994).

La qualité d'un sol qui est définie simplement comme étant sa capacité à fonctionner, dépend de multiples facteurs intrinsèques au sol, à l'écosystème ou d'origines anthropiques. Les notions de fertilité, de productivité, de durabilité des ressources, et de qualité environnementale sont les principales bases des définitions actuelles de la qualité des sols. L'évaluation de cette qualité peut être réalisée par de simples observations ou des mesures qualitatives très complexes (Mausbach and Tugel, 1997). Les indicateurs correspondent à des propriétés physiques, chimiques et biologiques, mais également à des processus et des flux de matière ou d'énergie qui peuvent être mesurés pour surveiller les changements dans le fonctionnement du sol (USDA, 1996). Ils doivent permettre d'appréhender les fonctions essentielles du sol et d'évaluer la qualité biologique, physique ou chimique des sols. Les relations intimes que le sol crée avec les écosystèmes terrestres lui confère une grande importance dans la régulation des processus écologiques. Il est donc logique de considérer la "santé des sols" comme une division essentielle de la "santé d'un écosystème". Les sols sont par définition des systèmes fortement hétérogènes sur des échelles de temps et d'espace. Les indicateurs de la qualité du sol doivent donc intégrer les fonctions du sol vis à vis de l'écosystème, les facteurs d'évolution temporelle et de différenciation spatiale des sols.

La qualité des sols est un enjeu d'importance dans la conservation du fonctionnement et de la dynamique des écosystèmes. Sa définition et sa détermination peut aussi servir de base aux stratégies d'évaluation du risque environnemental liée à certaines pratiques humaines. La compréhension du fonctionnement des sols et la définition de pratiques appropriées de leur gestion nécessitent des connaissances approfondies des processus fonctionnels opérant dans l'ensemble de l'écosystème, c'est à dire non seulement dans le sol mais également à la surface de celui ci. Par conséquent, l'intégration des processus biologiques, physiques et chimiques, et de leurs interactions, dans un modèle général du fonctionnement des écosystèmes terrestres, apparaît absolument indispensable pour définir correctement la qualité des sols. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes limités à l'étude des relations entre la structuration physique du milieu (propriétés édaphiques, structure de la végétation) et la structuration biologique (fonctionnement bactérien et dynamique végétal). Au-delà des recherches relatives aux indicateurs, nous développons un axe de recherche comparatif, focalisé sur le fonctionnement biologique de sols dégradés par différentes activités anthropiques et localisées dans différents contextes bio-géographiques.

## Objectifs

L'objectif général de cette thèse est d'étudier le fonctionnement d'un écosystème terrestre (prairie) soumis à des perturbations anthropiques intenses, par l'analyse des comportements du sol, de la flore et de la microflore bactérienne, et de la dynamique de leurs interactions.

Pour cela, il est nécessaire de :

- Comprendre et décrire le fonctionnement de l'écosystème dans son état initial.
- Identifier les indicateurs physiques, chimiques et biologiques du sol les plus pertinents pour chaque situation et déterminer les méthodes et techniques d'analyse les plus précises.
- Evaluer les modifications de ces paramètres sur des échelles d'espace et de temps.
- Evaluer les relations entre le fonctionnement physique du sol et la dynamique biologique de l'écosystème

La finalité de ce travail est définir une méthodologie et des paramètres pertinents, utilisables pour l'évaluation de la qualité des sols, permettant de décrire le fonctionnement des sols vis à vis de perturbations physiques et chimiques, et contribuant à l'étude du fonctionnement et de la dynamique des écosystèmes terrestres.

## Choix des situations étudiés

Nous avons sélectionné deux types de perturbations anthropiques de nature différente et qui présentent un impact économique, écologique et/ou sociale important. L'une correspond à la **dégradation physique** d'une prairie alpine, imposée par la construction d'une piste de ski (Alpes de nord). Cette dégradation est suivie d'une succession écologique caractérisant les étapes de la réhabilitation de l'écosystème. Ces pistes de ski offrent la possibilité de travailler sur un modèle de dégradation strictement physique du milieu et particulièrement sévère puisque l'écosystème est totalement bouleversé. Ce modèle permet aussi de considérer les processus de restauration de la qualité de sols. L'autre perturbation est définie par une **contamination chimique** complexe d'une friche industrielle située en Normandie. La contamination est engendrée par l'épandage d'effluents produits à partir de déchets d'incinération. Le but est de définir l'**écocompatibilité** de ces déchets. Le contexte

géographique de cette deuxième situation permet de s'affranchir des conditions écologiques extrêmes imposées par l'altitude et d'étudier la qualité d'un sol de forte occurrence en Europe occidentale (luvisol). Dans les deux cas, il s'agit donc d'une **modification ponctuelle** de la qualité du sol dont les conséquences sont particulièrement différentes de celles rencontrées dans les anthrosols, caractérisés par des modifications chroniques de leurs propriétés. Dans ce travail nous étudions les effets de ces deux perturbations ponctuelles sur le fonctionnement des sols et sur les processus mis en jeu dans le retour à un nouvel équilibre.

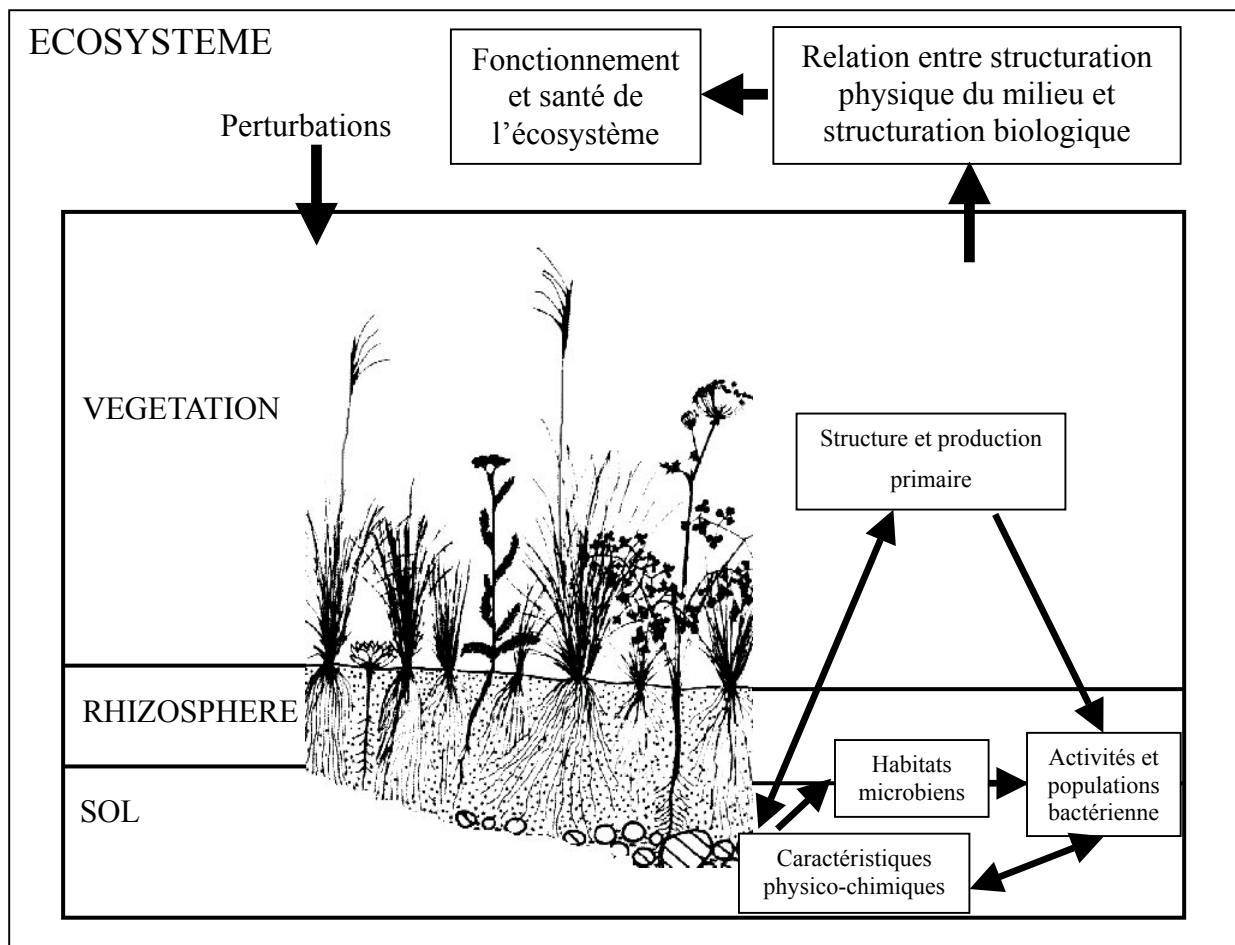
## Plan de thèse

Le document de thèse est présenté en trois parties :

**La première partie** établit le point sur les définitions du concept de la qualité des sols (Chapitre I) et sur les indicateurs permettant l'évaluation de cette qualité (Chapitre II).

**La deuxième partie** décrit les conséquences *in situ* du terrassement de pistes de ski sur la structure physique d'un écosystème prairial alpin et sur le fonctionnement microbien du sol associé à cet écosystème. Elle analyse le rôle de la "végétalisation" de ces milieux dégradés dans la réhabilitation de la qualité des sols et du fonctionnement des écosystèmes "recrées". Cette partie se divise en deux chapitres : le premier présente la réponse des propriétés physico-chimiques du sol et des activités microbiennes à la perturbation et aux étapes de la réhabilitation, le deuxième rapporte les modifications au cours du temps de la structure des communautés bactériennes en relation avec les changements de leurs habitats.

**La troisième partie** traite des réponses du sol, de la flore et de la microflore bactérienne face à des perturbations chimiques complexes. Elle se divise en quatre chapitres décrivant successivement le comportement *in situ* du sol envisagé comme une matrice poreuse (Chapitre I), les perturbations à court terme des activités bactériennes du cycle de l'azote et de la structure des communautés bactériennes globales et d'une communauté fonctionnelle (les fixateurs d'azote) (Chapitre II), les modifications *in situ* des relations plantes-microorganismes (Chapitre III), et la réponse physiologique de quelques plantes tests dans des conditions contrôlées de laboratoire (Chapitre IV).



**Figure 1** : Les compartiments et leurs relations abordés à l'interface sol-microorganismes plantes dans ce travail

---

## **Première partie**

La qualité des sols et le fonctionnement des écosystèmes  
terrestres

---



Cette première partie est constituée d'une présentation générale de la place du sol et de sa qualité dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres, des différentes approches, indices et facteurs déterminant la qualité des sols et des indicateurs utilisés ou susceptibles de l'être dans les protocoles d'évaluation de la qualité des sols dégradés.

## **Chapitre I**

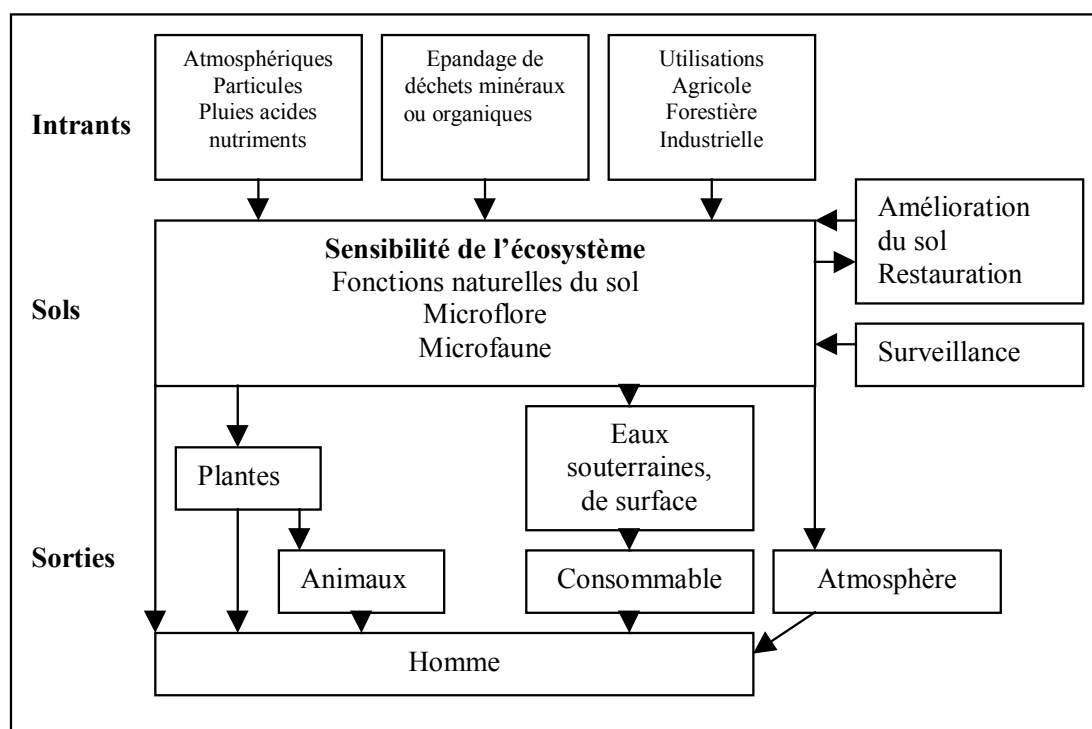
### **La qualité des sols : Définitions et facteurs déterminants**

---

#### **I.1. Introduction**

Le sol est un milieu vivant très structuré (Gobat *et al.*, 1998). La vie du sol est liée aux échanges entre le monde minéral, organique et vivant. Le sol est un milieu poreux constitué d'un ensemble de 5 fractions différentes : les minéraux solides, la matière organique, la fraction vivante, la phase gazeuse, et la phase liquide (Morel, 1989). Des transferts de matière et d'énergie ont lieu en permanence, non seulement entre ces divers compartiments, mais aussi entre chacun d'eux et le milieu extérieur : échanges gazeux, échanges de température, chutes de pluie, évaporation, drainage, apports de résidus animaux et végétaux... Ainsi, Le sol est, par son fonctionnement et son organisation, un véritable système écologique dynamique (di Castri, 1970 ; Lavelle, 1987). Il est le milieu commun à l'ensemble des écosystèmes terrestres (forestiers, prairiaux, agricoles...) et participe activement à leur fonctionnement.

Dans un sol qui fonctionne correctement, les échanges sont abondants et aisés. Les problèmes actuels concernant l'utilisation des sols (pollutions diverses, perte de structure, érosion, désertification...) traduisent le plus souvent des dysfonctionnements du système dans son intégralité et leur résolution nécessite de ce fait une approche écologique. O'Neill *et al.* (1986) considèrent que le bon fonctionnement d'un écosystème est caractérisé par l'intégrité des cycles des éléments et des flux d'énergie, par sa stabilité, et par la résilience des perturbations ou des stress. Les relations intimes que le sol crée avec les écosystèmes terrestres lui confère une grande importance dans la régulation des processus écologiques. Il est donc logique de considérer la "santé des sols" (soil health) comme une division essentielle de la "santé des écosystèmes" (ecosystem health) (Rapport *et al.*, 1997 ; Van Bruggen et Semenov, 1999). La Figure I.1. schématise la position du sol dans l'écosystème terrestre et son rôle dans les problèmes d'environnement.



**Figure I.1.** : Schéma général montrant la place centrale du sol dans les problèmes d'environnement (Mathieu, 1996).

De très nombreuses activités humaines (agricoles, urbaines, industrielles...) utilisent le sol directement comme milieu récepteur (épandages de résidus agricoles, construction de routes...), ou l'affectent indirectement par exemple lors de transferts de contaminants aux abords d'une route ou par des pollutions atmosphériques. Le sol se trouve ainsi fortement exposé aux agressions anthropiques. Certaines de ces activités sont parfois non raisonnées et provoquent des détériorations pouvant être irréversibles. Les perturbations de ce milieu fragile peuvent alors affecter le fonctionnement des écosystèmes terrestres dans leur totalité. La constatation d'une dégradation permanente des sols a motivé une réflexion internationale sur la définition du concept de qualité des sols et sur les actions scientifiques concourant à la gestion durable de ce système écologique. Ce concept a été développé pour caractériser la valeur et le bon fonctionnement des sols. Les notions de fertilité, de productivité, de durabilité des ressources, et de qualité environnementale sont les principales bases des définitions actuelles de la qualité des sols. Le concept de qualité des sols est une notion subjective et très dynamique. Sa définition donne lieu à de nombreuses interprétations qui répondent toujours aux préoccupations sociales et scientifiques actuelles. En ce sens, les critères de qualité des sols peuvent évoluer selon les sociétés, de même que le niveau de qualité d'un sol défini peut évoluer dans le temps, sous l'influence de pratiques humaines ou de changements environnementaux.

L'évaluation de la qualité d'un sol nécessite l'utilisation **d'indicateurs biologiques, physiques et/ou chimiques pertinents**. Elle oblige également de prendre en compte l'utilisation actuelle du sol et la définition précise du type de perturbation susceptible de modifier la qualité du sol (naturelle ou anthropique, chimique ou physique...). Ces indicateurs doivent permettre d'évaluer la qualité ponctuelle d'un sol mais également l'évolution de cette qualité dans le temps. La difficulté d'appréhender et de définir la qualité des sols réside dans la grande variabilité temporelle et spatiale de l'objet. Le sol est un système dynamique dont les propriétés intrinsèques évoluent constamment, plus ou moins rapidement, au court du temps. Les propriétés d'un sol donné varient également avec la profondeur ("zonation" horizontale). Les horizons formés peuvent être différents par leur teneur en matière organique, leur couleur, leur texture, leur structure, leur pH, leur capacité d'échange cationique (CEC), leur capacité de rétention de l'eau, et par beaucoup d'autres paramètres physico-chimiques. Ces différences résultent de l'influence du climat, de l'action des plantes et de la transformation de la roche mère dans diverses positions topographiques. Ce constat nous permet de remarquer que la variabilité spatiale s'applique non seulement à l'échelle du profil

de sol mais également à l'échelle de l'écosystème, du paysage et de l'unité géographique. Les propriétés qui serviront à caractériser la qualité des sols devront donc intégrer cette variabilité.

## **I.2. Rôle de la qualité du sol dans le fonctionnement des écosystèmes**

Le sol est un milieu vivant beaucoup plus complexe que l'air ou l'eau ; son rôle est essentiel dans la production de biomasse et dans le cycle biogéochimique des éléments, et ces caractéristiques fonctionnelles peuvent être altérées par les dégradations et les pollutions anthropiques. Les conséquences peuvent alors affecter les autres composantes des écosystèmes terrestres (plantes, animaux, hommes), mais également des écosystèmes aquatiques. L'eau est en effet un facteur important de la formation et du fonctionnement des sols. Ceux-ci vont en retour déterminer la qualité des eaux de surface et des nappes phréatiques. Ce paragraphe introduit le concept de "santé des écosystèmes" et sa relation avec la santé des sols. Son objectif est de prendre conscience de l'enjeu environnemental majeur de la santé des sols dans les problèmes de fonctionnement des écosystèmes.

Les deux concepts d'"écosystème" et de "santé" sont très ambigus. Le concept d'écosystème souffre du manque de limites concrètes et définitives. Le concept de santé souffre quant à lui de jugements de valeur implicites qui intègrent les intérêts de l'homme dans les schémas d'évaluation de l'état d'un système fonctionnel (Rapport *et al.*, 1997). La dynamique complexe qui caractérise la plupart des écosystèmes (variabilité spatiale et temporelle) est une difficulté supplémentaire qui contribue à l'ambiguïté du problème. L'évaluation de la santé des écosystèmes doit tenir compte de trois considérations majeures (Rapport *et al.*, 1985). Premièrement, l'écosystème doit être affranchi de tous signes de dysfonctionnement. Ces syndromes peuvent par exemple inclure pour un écosystème terrestre, une perte des nutriments du sol, une diminution de la diversité spécifique accompagnée ou non d'une modification de la composition des communautés au profit d'espèces opportunistes, une réduction de la productivité de l'écosystème (Rapport *et al.*, 1985). Deuxièmement, les multiples interactions et transferts de flux (matière et énergie) qui définissent un écosystème doivent s'auto-réguler, et donc fonctionner sans l'intervention de l'homme. Troisièmement, l'écosystème ne doit pas être perturbé par les sous systèmes le

composant (atmosphères, eau, sol). Le sol joue un rôle essentiel dans le cycle des éléments via les processus d'altération des roches et les processus de décomposition de la matière organique. Il est une matrice dans laquelle les plantes puisent leurs nutriments et conditionnent en retour sa formation et l'évolution de ses propriétés abiotiques et biotiques. Le sol peut ainsi être considéré comme une véritable interface dans l'environnement (Robert, 1996) et comme une composante majeure de la santé des écosystèmes. Ceci dans la mesure où les perturbations affectant les propriétés édaphiques influencent nettement les conditions définies par Rapport (1985) et précisées plus haut. La santé des écosystèmes, basée sur leur aptitude à fonctionner naturellement, est donc fortement dépendante de la santé des sols. Il est dès lors essentiel de considérer les facteurs qui influencent l'évolution et la transformation des sols, dans les processus de fonctionnement des écosystèmes.

### **I.3. Santé et qualité des sols**

Les termes "santé" et "qualité" des sols sont fréquemment utilisés pour définir le même concept (Singer et Warkentin, 1996). L'utilisation du concept de santé des sols est préférée au concept de qualité par les agriculteurs américains. Une enquête conduite par Romig *et al.* (1995) sur la perception de la santé des sols par des agriculteurs des grandes plaines agricoles du centre des Etats Unis, a permis de lister 97 propriétés édaphiques qui sont pour les agriculteurs du Wisconsin celles qui définissent le mieux la santé des sols. Les propriétés les plus fréquemment mentionnées sont les propriétés physiques et biologiques de l'horizon de surface (parmi lesquelles la matière organique, l'érosion, la structure, le pH, l'azote, le système racinaire, les lombrics...). En plus de ces propriétés, les agriculteurs ont fréquemment utilisé la santé des plantes, des animaux et des êtres humains, et les propriétés de l'eau pour apprécier la santé de leurs sols. Bien qu'un sol ne puisse pas être considéré en mauvaise santé s'il n'est pas apte naturellement à supporter une agriculture intensive, la santé des sols fait tout de même partie intégrante du concept d'agriculture durable (Reganold *et al.*, 1990). D'après Carter *et al.* (1997), la santé d'un sol peut être considérée comme l'état de ce sol à un instant donné, équivalent à la dynamique des propriétés édaphiques susceptibles d'évoluer à court terme. A l'opposé, la qualité du sol peut être considérée, toujours d'après les mêmes auteurs, comme l'utilité du sol dans une fonction particulière et dans une échelle de

temps beaucoup plus longue, équivalente à la qualité intrinsèque c'est à dire fonctionnelle du sol. Les exemples des propriétés dynamiques du sol citées par Carter *et al.* (1997) sont les teneurs en matière organique, le nombre et la diversité des organismes, ainsi que les constituants et les produits microbiens.

La santé d'un sol peut être évaluée en comparant son état actuel avec une série de points de référence ou des valeurs étalons qui reflètent la qualité globale des sols (Snakin *et al.*, 1996 ; Boehn et Anderson, 1997 ; Seybold, 1997). Seybold *et al.* (1997) suggèrent trois points de référence : le sol initial, le sol intensivement exploité et les états altérés. Cependant ils ne précisent en aucun cas le niveau de référence pour déterminer d'un sol qu'il est en bonne santé. Or il est très difficile, voir impossible, de déterminer l'état initial d'un sol, pour le simple fait que la plupart des sols confrontés aux problèmes de leur santé sont des sols déjà dégradés depuis de nombreuses années. Par conséquent, les solutions appropriées pourraient être d'après Singer et Ewing (2001), l'utilisation de critères standards basés sur des rendements maximum dans les agrosystèmes, et l'utilisation de critères étalons précédant des pressions anthropiques pour les écosystèmes "naturels".

#### **I.4. Le concept de qualité des sols**

Les préoccupations sur la qualité des sols ne sont pas récentes. Historiquement, elles sont assimilées à la gestion de la fertilité. Les premières pratiques de conservation de la productivité des sols datent de l'empire romain (Mazoyer et Roudart, 1997). La préservation des sols agricoles n'a cessé d'augmenter au cours des siècles. Au début des années 1930 aux Etats Unis, un indice de productivité des terres est développé et permet aux agriculteurs de choisir des pratiques culturales qui garantissent une productivité maximum tout en minimisant l'érosion et les impacts environnementaux (Huddleston, 1984). Néanmoins, les réflexions communes sur une définition scientifique de la qualité des sols et les actions concrètes de gestion durable ne sont investies que depuis une dizaine d'années.

Les définitions les plus pratiques de la qualité des sols ont trait à **leurs fonctions**. La définition généralement utilisée par les agronomes met l'accent sur la productivité du sol. Un sol en "bonne santé" produit des récoltes abondantes et de grande qualité. Depuis une dizaine d'années toutefois, l'agriculture est envisagée selon une optique différente. Elle n'est plus considérée comme une activité en circuit fermé, mais plutôt comme un élément qui s'insère dans un système écologique beaucoup plus vaste et qui interagit avec les autres éléments du système. Ce constat a permis de donner à la qualité des sols une nouvelle définition qui dépasse la productivité et qui tisse des liens avec l'environnement dans son ensemble.

Karlen *et al.* (1992) définis la qualité du sol comme « *l'aptitude du sol à servir de milieu naturel pour la croissance des plantes nécessaires à la vie des animaux et des hommes* ». Leur définition est basée sur le rôle de la qualité du sol dans le maintien de la productivité à long terme et dans la préservation de l'environnement.

Le National Research Council canadien (NRC) avait également reconnu l'importance d'inclure des perspectives environnementales dans le concept de qualité des sols.

Le NRC statua en 1993 « *la qualité des sols est la capacité d'un sol à favoriser la croissance des plantes, à protéger les bassins hydrographiques en régulant les infiltrations et en divisant les précipitations, et à prévenir la pollution des eaux et de l'air en amortissant les polluants potentiels tels que les produits chimiques agricoles ou industriels ou les déchets organiques* ».

En 1994, le comité S-581 "*Ad Hoc Committee on Soil Quality*" fut créée par la Société Américaine des Sciences du Sol (SSSA). Les membres de ce comité avaient alors pour mission de promouvoir une réflexion importante sur la définition du concept de qualité des sols. Ces larges débats ont permis d'adopter une définition qui peut être considérée comme une extension logique du concept d'écosystème et qui est susceptible d'évoluer avec le temps (Allan *et al.*, 1995; Doran *et al.*, 1994; Karlen *et al.*, 1997).

La SSSA proposa que la qualité du sol soit définie comme étant « *la capacité du sol à fonctionner dans un écosystème donné (naturel ou géré) et pour une utilisation donnée, à supporter une production végétale et animale, à contribuer à un environnement de qualité et favoriser la qualité des plantes, des animaux et des humains* » (Karlen *et al.*, 1997).

De toute évidence, **cette définition est trop générale** pour servir de base scientifique à la mise en place de procédures opérationnelles. Sojka et Upchurch (1999) estiment que la qualité des sols doit être abordée en distinguant les considérations environnementales et les types d'aménagements pour un sol particulier et pour une utilisation explicite de ce sol. Ils précisent que ces considérations doivent inclure un certain nombre de valeurs sociales, économiques ou biologiques. D'après Mausbach et Tugel (1997) le concept doit intégrer les composantes physiques, chimiques et biologiques du sol, et l'évolution de ce sol liée à l'évolution du paysage auquel il appartient.

Karlen *et al.* (1997) simplifient la définition de la SSSA en citant « *la qualité du sol est sa capacité à fonctionner* ». De nombreux auteurs (i.e. Chaussod, 1996, Doran *et al.*, 1998; Blum, 2000) et les membres de la SSSA s'accordent à penser que les termes "qualité des sols" et "santé des sols" sont identiques et interchangeables.

Il apparaît dès lors essentiel de compléter le concept de qualité d'un sol par la **notion de résilience**. Seybold *et al.* (1999) définit la résilience comme la capacité d'un système en équilibre à retrouver un nouvel équilibre peu éloigné du précédent. La littérature montre une volonté des scientifiques européens d'associer le concept de qualité des sols à la notion plus précise de qualité environnementale des sols et de fixer les limites de cette nouvelle définition sur des perturbations mesurables (Sims *et al.*, 1997; Bouma, 1997). Holden et Firestone (1997) définissent la qualité dans une perspective environnementale comme étant « *Le degré dans lequel les propriétés physiques, chimiques et biologique d'un sol serve à atténuer une pollution environnementale* ».

Cette notion de résilience est un point très important pour définir avec pertinence la qualité des sols. En effet, le sol est un système évolutif qui nécessite l'intégration d'un concept dynamique dans la définition de sa qualité. Les définitions précédentes sont beaucoup trop statiques et ne font pas références au potentiel de récupération des propriétés initiales des sols. De plus, la définition donnée par Holden et Firestone (1997) est incomplète car principalement axée sur le rôle du sol dans la protection des risques environnementaux. Ainsi, il peut être plus correct de définir la qualité d'un sol comme étant sa capacité à assumer ses fonctions de productivité, à contribuer à la protection de la santé des écosystèmes et de la qualité de l'eau contre les agressions anthropiques, et à retrouver après une perturbation un fonctionnement physique, chimique et/ou biologique identique ou proche du fonctionnement initial dans un temps court à l'échelle humaine.



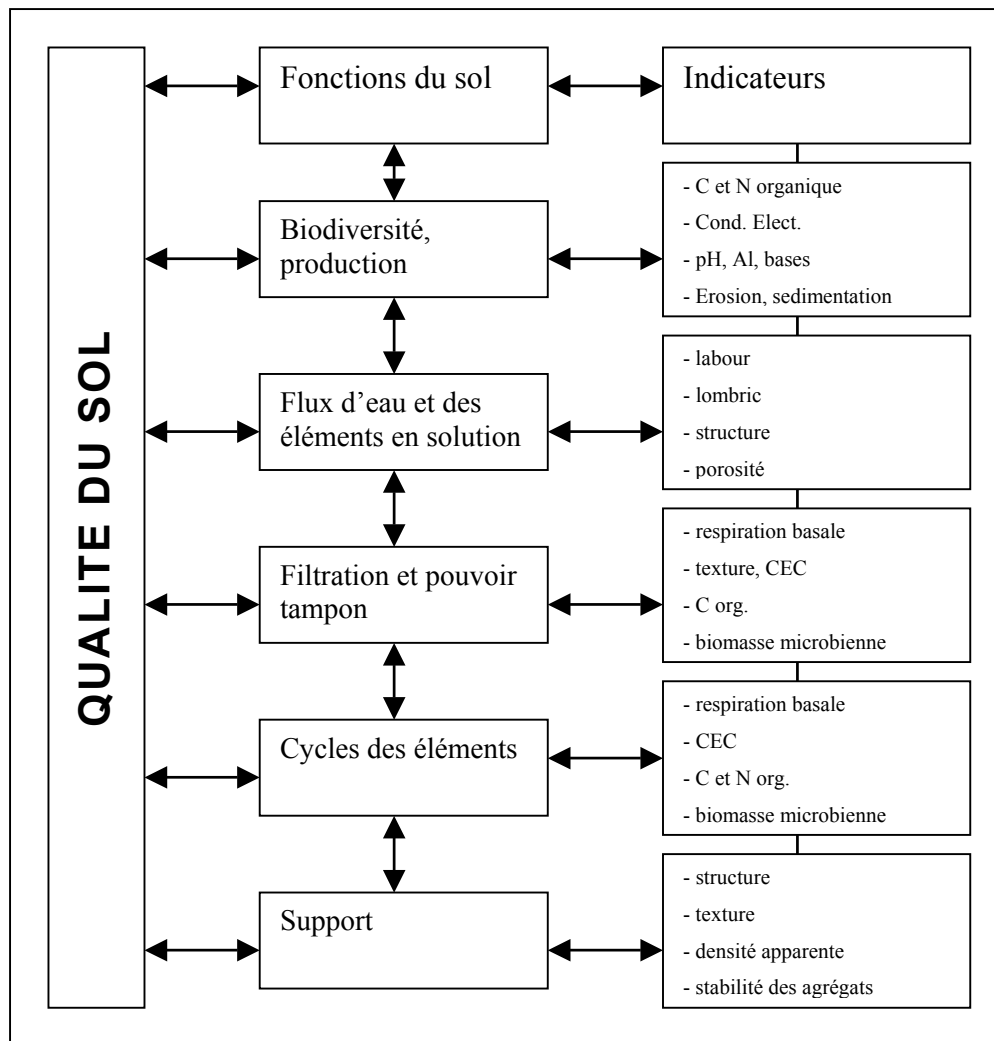
## Chapitre II

### Evaluation de la qualité des sols

---

#### II.1. Approche fonctionnelle et indicateurs

Quelle que soit la définition conceptuelle de la qualité des sols, il apparaît évident que cette qualité dépend de multiples facteurs. Il faut distinguer ceux intrinsèques aux sols (facteurs chimiques, physiques et biologiques), et ceux d'origines externes (climat). L'évaluation de la qualité des sols peut être réalisée par de simples observations ou des mesures qualitatives très complexes (Mausbach et Tugel, 1997). Les indicateurs de la qualité des sols sont des propriétés physiques, chimiques et biologiques, des processus et des caractéristiques qui peuvent être mesurées pour surveiller les changements du sol (USDA, 1996). Ces indicateurs doivent permettre d'appréhender les fonctions essentielles du sol et d'évaluer la qualité biologique, physique ou chimique des sols. La Figure II.1. illustre le concept de qualité des sols utilisant des indicateurs en relation avec les fonctions du sol.



**Figure II.1.** : représentation graphique du concept de qualité des sols utilisant des indicateurs en relation avec les fonctions du sol (Mausbach et Tugel, 1997).

Les fonctions essentielles du sol sont d'après Karlen *et al.* (1997) :

- Soutenir une activité, une diversité et une productivité biologique,
- réguler et fractionner les flux d'énergies et d'eau,
- filtrer, réguler, dégrader, immobiliser et détoxifier les éléments organiques et inorganiques produits par les dépôts atmosphériques, industriels et municipaux,
- approvisionner et permettre le cycle des nutriments et des autres éléments, et
- fournir un support aux structures socio-économiques et une protection pour les trésors archéologiques associés avec les habitations humaines.

L'appréciation de la qualité des sols et de son évolution, sous l'effet de changements globaux ou d'actions anthropiques directes, exige la définition d'indicateurs pertinents et la mise au point de techniques fiables de quantification. Ces indicateurs sont des propriétés mesurables des sols ou des plantes qui informent du bon fonctionnement du sol (Pankhurst *et al.*, 1997).

Karlen *et al.* (1997) et la USDA (United State Department of Agriculture) (1996) expliquent que la sélection de ces indicateurs doit être basée sur différentes modalités que sont :

- Le mode d'utilisation du terrain,
- La relation entre un indicateur et la fonction du sol étudié,
- La facilité et la fiabilité des mesures,
- La variabilité du temps et de la surface d'échantillonnage,
- La sensibilité de la mesure aux changements de climat et d'usage du sol,
- La possibilité de réaliser un échantillonnage et une analyse de routine,
- L'habilité requise pour utiliser les méthodes et analyser les résultats.

De nombreux auteurs ont développé des indicateurs de la santé des sols en mesurant divers paramètres pédologiques en rapport avec les différentes utilisations du sol (Sommerfeldt et Chang, 1985; Ovreas et Torsvick, 1998; Wander et Bollero, 1999; Hess *et al.*, 2000), la productivité (Staben *et al.*, 1997), la qualité environnementale (Atlas *et al.*, 1991; Doran et Zeiss, 2000) ou le dysfonctionnement des plantes (Muller, 1995; Ginnochio, 2000).

Doran *et al.* (1996) présentent une liste de propriétés influençant les fonctions écologiques et qualité des sols. Ils citèrent par exemple, la densité apparente, la perméabilité, la capacité de rétention d'un sol, les teneurs totales en carbone et azote organiques, la conductivité, le pH, la biodisponibilité des éléments nutritifs pour les plantes, les mesures de biomasse et d'activité microbienne, etc. Le tableau II.1. dresse une liste non exhaustive d'indicateurs physiques, chimiques et biologiques, d'après les travaux de Doran et Safley (1997), Karlen *et al.* (1997), Doran et Zeiss, (2000). Cette liste présente également la valeur écologique des indicateurs.

Indicateurs de l'état du sol	Relations entre l'état du sol et sa fonction ; mesures prioritaires	Valeur écologiquement significative ; Comparaison pour l'évaluation
<b>Physiques</b>		
Texture	Rétention et transport de l'eau et des éléments chimiques ; Modélisation de l'utilisation, de l'érosion et de la variabilité des sols	% sables, limons et argile ; Sites les moins érodés ou la position topographique
Profondeur du sol, enracinement	Estimation de la productivité potentielle et de l'érosion ; Normalisation de la variabilité des paysages	cm ou m ; Sites non cultivés ou différents localisation dans le paysage
Infiltration et densité apparente (Da)	Potentiel de solubilité, de productivité et d'érosivité ; ajustement des mesures en bases volumétrique	min par 2,5 cm d'eau, Mg/cm <sup>3</sup> ; Position topographique
Capacité de rétention	En relation avec les flux hydrique, le transport et l'érosivité ; Eau utile, Da, texture, Mo	% (Mg/cm <sup>3</sup> ), cm d'eau disponible pour 30 cm ; Intensité des précipitations
<b>Chimiques</b>		
Matière organique (C et N org. Totale)	Fertilité, stabilité du sol, érosion ; Utilisé dans le processus de modélisation et de normalisation des sites	kg C et N / ha 30 cm ; Sol non cultivé ou contrôle initial
pH	Activités biologiques et chimiques ; Essentiel dans les processus de modélisation	Comparaison entre des limites max et min d'activités microbiennes et végétales dS/m ;
Conductivité électrique	Activités microbiennes et végétales ; Essentiel dans les processus de modélisation	Comparaison entre des limites max et min d'activités microbiennes et végétales
N, P et K extractibles	Nutriments phyto-disponibles et potentiels de perte d'azote ; Productivité et indicateurs de la qualité environnementale	kg / ha 30 cm ; Niveau de suffisance saisonnière pour la croissance des plantes
<b>Biologiques</b>		
Biomasse, C et N microbiens	Potentiel de catalyse microbienne du C et du N ; Modélisation du danger des apports en Mo	kg C et N / ha 30 cm ; Relatif au C et N total ou à la production de CO <sub>2</sub>
N potentiellement minéralisable	Productivité et apport en N ; Modélisation	kg N / ha 30 cm d <sup>-1</sup> ; Relatif aux teneurs en C et N total
Respiration, teneur en eau, température	Mesure des activités bactériennes ; Estimation des activités en lien avec la biomasse	kg C / ha 30 cm d <sup>-1</sup> ; Relatif à la biomasse microbienne

**Tableau II.1.** : Proposition d'indicateurs physiques, chimiques et biologiques des fonctions et de la qualité des sols (d'après Doran et Safley, 1997; Karlen *et al.*, 1997; Doran et Zeiss, 2000).

## II.2. Indices mathématiques de la qualité des sols

Le développement d'indices mathématiques, qualitatifs et quantitatifs, est une méthode privilégiée des scientifiques pour intégrer l'ensemble des informations analytiques recueillies (Doran et Parkin, 1994 ; Larson et Pierce, 1994 ; Wagenet et Huston, 1997 ; Seybold *et al.*, 1997 ; Singer et Ewing, 2000). Ils doivent permettre de surveiller et de prévoir les modifications de la qualité des sols consécutive à une activité humaine perturbante. Toutefois les classifications et les indices actuels restent imparfaits et donc à améliorer.

L'US Department of agriculture (USDA) proposa en 1973, un indice qualitatif prenant la forme d'une classification : la Land Capability Classification (LCC). La LCC s'appuie sur la description de paramètres pédologiques (pente, texture, perméabilité, capacité de rétention hydrique, risque d'érosion...) et définit 8 classes d'aptitudes à la production agricole. Les sols sont répartis dans les classes selon : (1) leur aptitude à garantir une bonne production végétale dans des conditions normales d'exploitation (classes I à IV), (2) leur aptitude à garantir une production végétale agricole spécialisée en utilisant des conditions très intensives d'exploitation (classes V à VII), ou (3) les sols qui ne bénéficient pas d'un apport compensant les exportations végétales (classe VIII) (Klingebiel and Montgomery, 1973). La LCC n'est pas toujours adaptée à certaines productions végétales. C'est le cas des cultures très productives du café en Colombie ou de la vigne en Californie sur des sols classés VII ou VIII, en raison des pentes et donc leur sensibilité à l'érosion. Ainsi, malgré des sols classés défavorablement les agronomes avisés peuvent tirer profit de ceux-ci.

L'augmentation des paramètres utilisés pour définir la qualité d'un sol a nécessité le développement d'indices quantitatifs (numériques). La formulation mathématique plus ou moins complexe des paramètres mesurables permet ainsi d'obtenir un coefficient de qualité des sols. Larson et Pierce (1991) (rapporté par Seybold *et al.*, 1997) ont par exemple suggéré l'utilisation d'une fonction mathématique (Q) dont les termes sont des paramètres mesurables de la qualité des sols ( $q_i$ ). Ils ont ainsi défini la fonction  $Q = f(q_1, \dots, q_n)$  et proposé de prendre en compte les changements de la qualité des sols dans le temps par la fonction  $dQ/dt$ . L'indice de qualité des sols (SQI : Soil Quality Index) développé par Parr *et al.* (1992) est défini par l'équation :  $SQI = f(SP, P, E, H, ER, BD, FQ, MI)$ . L'indice est alors fonction des propriétés du sol (SP), de son potentiel de productivité (P), des facteurs environnementaux (E), de la santé humaine et animale (H), de l'érodabilité du sol (ER), de sa biodiversité (B), de la qualité des produits alimentaires qu'il fournit (BD), et des méthodes de gestion qui lui sont appliquées (MI). Singer et Ewing (2000) précisent que ces indices quantitatifs ont deux avantages sur le système qualitatif : (1) ils sont facilement utilisables par des systèmes d'information géographique (SIG) et d'autres systèmes d'exploitations analytiques, (2) ils constituent un barème de référence pour l'évaluation de la qualité des sols. Cependant, la détermination d'indicateurs spécifiques et mesurables pour chaque variable, ainsi que les interactions entre ces **variables restent floues**. De plus, la méthode mathématique utilisée, ainsi que les valeurs qui en seraient issues et qui permettraient de définir une bonne qualité du sol, **ne sont pas spécifiées**.

### **II.3. Les formes d'hétérogénéité et leur importance dans l'évaluation de la qualité des sols.**

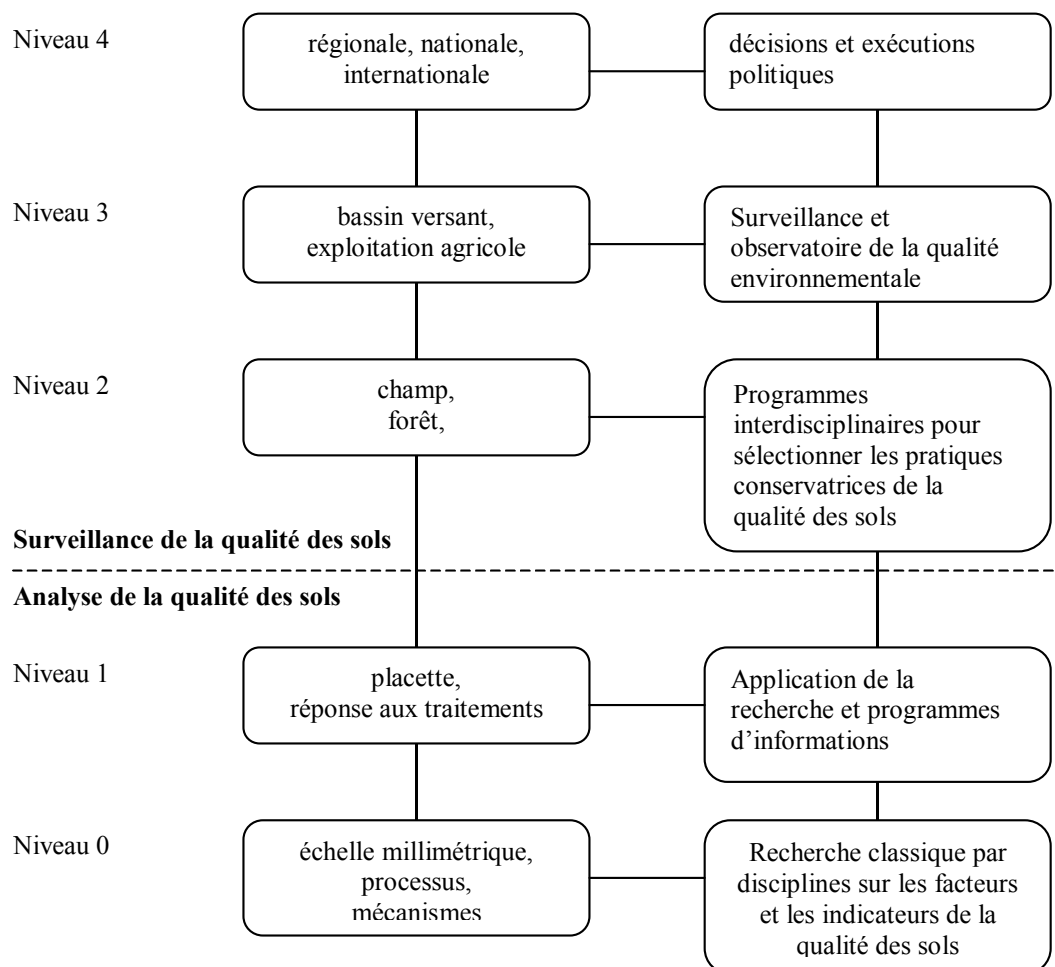
L'hétérogénéité est une caractéristique classique de la structure des écosystèmes. Elle est générée par les interactions multiples entre les différents facteurs qui les composent. Dans les sols, cette hétérogénéité est exprimée par des distributions spatiales et temporelles des facteurs biotiques et abiotiques, et au travers de l'implication de ces facteurs dans différents compartiments fonctionnels. Les difficultés de l'étude des processus pédologiques est également liée à la variété des facteurs mis en jeu. Chaque processus résulte de multiples interactions entre une grande diversité de composants qui se réalisent à différentes échelles de temps et d'espace. Il est donc nécessaire de connaître les formes de cette hétérogénéité pour intégrer la variabilité des sols dans les schémas d'évaluation de leur qualité. Nous proposons dans ce paragraphe de définir chacune des deux formes d'hétérogénéité et d'expliquer leurs intérêts dans l'étude de la qualité des sols.

#### **II.3.1. Hétérogénéité spatiale**

La variabilité spatiale des sols intervient à différentes échelles plus ou moins larges. A l'échelle du continent ou de la région, les unités cartographiques des cartes pédologiques révèlent les effets des facteurs de formation des sols (climat, topographie, roche mère, végétation) sur la distribution des sols. A l'échelle de la parcelle, la topographie, le matériau d'origine, le drainage local sont les principaux facteurs à l'origine d'une succession verticale des horizons constituant les profils pédologiques (Duchaufour, 1977). Les micro-reliefs peuvent être considérés comme une petite échelle de distribution des propriétés édaphiques. Enfin, pour des horizons spécifiques, les différentes classes de tailles d'agrégats (des petits aux micro-agrégats) constituent les macro-agrégats et à ce titre révèlent les propriétés structurales de l'horizon. Ces tailles d'agrégats, du plus petit au plus gros, définissent les échelles micro- et millimétriques.

L'évaluation de la qualité du sol dépend de l'échelle d'observation et donc du choix des indicateurs pertinents à chacune de ces échelles. Karlen *et al.* (1997) proposent que la qualité des sols soit évaluée en tenant compte de chacune de chacune des échelles, de l'échelle

millimétrique à l'échelle internationale (Figure II.2.). Ils estiment que les échelles les plus fines déterminent les propriétés qui conditionnent la qualité du sol, tandis que les échelles les plus larges permettent une surveillance interdisciplinaire des changements de la qualité du sol.



**Figure II.2.** : Echelles spatiales d'évaluation de la qualité des sols (D'après Karlen et al., 1997)

### II.3.2. Hétérogénéité temporelle

Aucune propriété du sol n'est permanente, mais les taux et les fréquences de leur évolution varie en fonction de leur nature. Les caractéristiques édaphiques varient également avec l'évolution du fonctionnement de l'écosystème. Les transformations physiques et chimiques des sols se réalisent sur des échelles de temps plus ou moins longues. Le temps de formation d'un profil peut s'étendre de plusieurs millions d'années, pour les sols les plus

développés tel que les oxisol, à moins de 100 ans, qui est le temps nécessaire à la formation d'un horizon A (Birkeland, 1984). Les processus biologiques sont eux aussi très variables dans le temps et en fonction des organismes. Les successions végétales peuvent se dérouler entre 1 année et 1000 ans pour certaines communautés. La multiplication des cellules bactériennes peut s'effectuer dans des temps allant d'une journée à une heure pour les bactéries les plus actives.

Carter *et al.* (1997) distinguent les propriétés "dynamiques" qui sont les plus sujettes aux conséquences des activités anthropiques et qui sont fortement influencées par certaines pratiques agricoles, des propriétés "statiques" qui ne sont pas affectées par des modifications rapides ou des perturbations humaines. Ils précisent que les propriétés dynamiques sont par exemple : la taille, la composition, la distribution et l'activité des communautés bactériennes telluriques ; la composition minérale de la solution du sol, le pH, la concentration en nutriments et la garniture cationique d'un sol. La minéralogie, la texture et la profondeur d'un sol sont des indicateurs statiques de la qualité des sols. En effet, ces paramètres sont en perpétuelle évolution mais dans des échelles de temps très longues. Toutefois, la minéralogie des andosol, en équilibre précaire avec la matière organique, est extrêmement sensible aux moindres modifications du milieu. La dessiccation des horizons de surface, induite par exemple par la mise en culture de ces andosols, peut conduire à une évolution rapide (3 ans) des minéraux secondaire dominants (allophanes, complexes organino-alluminique) (Shoji *et al.*, 1993). La teneur en matière organique peut être considérée comme une variable dynamique, mais les propriétés chimiques de cette matière organique peuvent évoluer dans des périodes allant de 100 à 1500 ans (Balesdent *et Guillet*, 1982).

La prise en compte des deux types de propriétés (**dynamiques et statiques**) dans les schémas d'évaluation de la qualité d'un sol **est obligatoire dans la mesure ou chacune d'entre elle possède leur propre limite**. Les propriétés édaphiques qui évoluent rapidement sont problématiques parce qu'elles nécessitent de connaître des valeurs moyennes et de déterminer si les changements de ces moyennes indiquent une dégradation de la qualité des sols ou une évolution naturelle. Inversement, les propriétés qui évoluent lentement sont très peu sensibles aux modifications à court terme de la qualité des sols.



### II.3.3. Hétérogénéité fonctionnelle

La rhizosphère constitue un système biologique qui régule un certain nombre de processus pédologique et qui crée une importante hétérogénéité fonctionnelle et structurale. La rhizosphère est l'étroite zone volumique de sol soumise à l'influence des racines vivantes, se manifestant notamment par l'exsudation de substances polysaccharidiques stimulant l'activité microbienne (Hitner, 1994). Par opposition à la rhizosphère, le sol dit non rhizosphérique peut être défini étant peu influencé par le système racinaire. La rhizosphère est un système complexe dont l'équilibre est régi par une multitude de mécanismes biologiques et physico-chimiques, interagissant fortement les uns avec les autres.

Au niveau physique, l'effet de la rhizosphère se manifeste par une modification de la structure du sol, soit par agrégation (Haynes et Francis, 1993), soit par fragmentation (Materchera, 1992). C'est ainsi que, pour un sol limoneux, l'effet de la rhizosphère est plus marqué pour les céréales à forte croissance racinaire (Haynes et Francis, 1993) ou sous une prairie densément colonisée par les racines (Haynes and Swift, 1990).

Au niveau biologique, les apports importants en polysaccharides (sucre, acides aminés...) par les exsudats racinaires (Campbell and Greaves, 1990) fournissent une source d'énergie pour les bactéries et favorisent ainsi leurs activités. Les quantités et les formes chimiques de carbone exsudé par les racines des plantes, dépendent de l'espèce, du statut physiologique et de l'âge des racines et des conditions environnementales (température, pH, disponibilité en oxygène) (Newman, 1985; Lynch and Wipps, 1990; Neumann and Römheld, 2001). Ainsi, Marilley *et al.* (1998) ont montré que la diversité bactérienne diminue à proximité des racines. Grayston *et al.* (1998) ont confirmé l'effet stimulant mais sélectif de la rhizosphère de différentes graminées sur la croissance des bactéries, en particulier sur la prolifération des *pseudomonas*. Des travaux anciens avaient mis en évidence des différences qualitatives de stimulation de la rhizosphère de certains groupes bactériens : les bactéries gram -, qui sont pour la plupart des bactéries opportunistes, sont surtout stimulées par la rhizosphère, les bactéries gram + et spécialement les gram + sporulées, sont elles surtout présentes dans le sol non rhizosphérique (Macura, 1968). La rhizosphère des plantes et donc nécessairement le couvert végétal associé à cette rhizosphère sont des facteurs essentiels dans la création de l'hétérogénéité des sols.

Le sol est composé de divers composants biotiques et abiotiques qui sont à l'origine d'une grande variabilité de structures. Les particules minérales sont organisées en agrégats de tailles, de forme et de stabilité variable. La cohésion entre les particules minérales est assurée par des liants organiques ou chimiques ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_n$ , oxyhydroxides, silice...). Selon Henin *et al.* (1958) la résistance des agrégats en relative à deux facteurs principaux: la teneur en argile et la mouillabilité en relation avec la matière organique. Tisdall and Oades (1982) ont défini trois catégories de ciments organiques en fonction de leur résistance au cours du temps : (1) les polysaccharides qui sont très rapidement dégradés par les bactéries et qui permettent la formation d'une macrostructure (Guckert, 1973 ; Cheshire *et al.*, 1974 ; Chenu *et al.*, 1998), (2) les matières organiques issues de racines ou de cellules bactériennes qui sont temporaires et (3) les composés organiques humifiés (acides humiques) associés à des cations métalliques qui sont sous cette forme particulièrement résistante aux attaques microbiennes. La structure des agrégats influence la disponibilité du carbone, la circulation des fluides (eau et gaz) dans le sol, la disponibilité des éléments nutritifs en solution. Tous ces facteurs interviennent dans la dynamique et la survie des végétaux et des bactéries. L'organisation structurale des sols, par des tailles et des stabilités d'agrégats variables, définit une mosaïque de microenvironnements fonctionnels qui diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques (Kilbertus, 1980; Hattori, 1988; Robert and Chenu, 1992, Ranjard *et al.*, 2000).

La matière organique des fractions granulométriques fines sous forme humifiée est plus résistante aux enzymes microbiennes (Gregorich *et al.*, 1989). De nombreux travaux ont montré des biomasses microbiennes (Jocteur Monrozier *et al.*, 1991; van Gestel *et al.*, 1996) et des activités enzymatiques (Kandeler *et al.*, 1999) plus importantes dans les petites fractions. Richaume *et al.* (1993) et Kabir *et al.* (1994) et plus récemment Ranjard *et al.* (2000) ont reporté une abondance importante des eubactéries dans les microagrégats (250-50  $\mu\text{m}$ ) et dans la fraction des argiles dispersables. L'hétérogénéité de la distribution des communautés bactériennes a été attribuée par Christensen (1992) aux teneurs en matière organique et en argile qui créent des habitats favorables (disponibilité en carbone et en nutriments, protection contre la prédation, teneur en eau...). Chotte *et al.* (2002) ont récemment isolé de la fraction argileuse d'un sol tropical, plus de 70 % des bactéries fixatrices d'azote. A l'opposé, ils ont démontré la présence d'un foyer d'activité de fixation important dans la fraction grossière (2000-50  $\mu\text{m}$ ) et ont conclu à une influence favorable des exsudats racinaires, particulièrement plus actif sur la macrostructure.

Chaque unité structurale, de la simple molécule organique ou de l'argile à l'agrégat stable, forme ainsi une entité fonctionnelle qui peut influencer les processus impliqués dans l'évolution de la qualité d'un sol. L'hétérogénéité fonctionnelle est, au même titre que l'hétérogénéité spatiale et temporelle, un facteur prédominant de l'évaluation de la qualité des sols.

## **II.4. La qualité physique, chimique et biologique des sols**

### **II.4.1. La qualité chimique**

Au plan chimique, le sol est avant tout la source d'ions indispensables pour les plantes. La présence d'ions en excès peut être à l'origine de phénomènes de toxicité. Au contraire, le déficit de ces ions entraîne une diminution de la fertilité du sol. La pollution des sols provenant de l'activité agricole, des épandages de boues de stations d'épurations et/ou du stockage des déchets industriels, devient aujourd'hui un problème préoccupant. Elle se traduit par des impacts négatifs sur le fonctionnement des écosystèmes, ainsi que par des risques de contaminations accompagnés d'une détérioration de la santé publique.

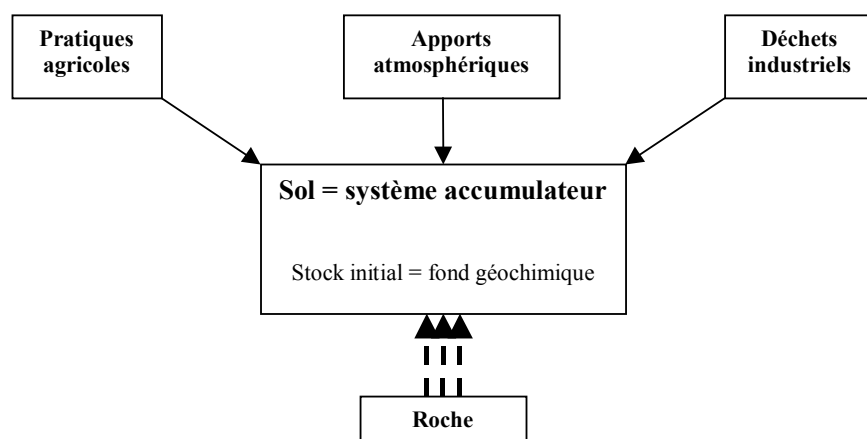
Il est d'abord important de rappeler que le sol fonctionne comme un système chimique ouvert. Cela signifie qu'en dehors de l'héritage pédologique, les éléments chimiques présents dans un sol peuvent être apportés et exportés. Les apports atmosphériques mais aussi les pratiques humaines contribuent à enrichir le sol au plan chimique. Une grande partie des éléments chimiques peut, soit être exportée du fait des récoltes, soit éliminée des sols par les eaux. Les propriétés chimiques d'un sol conditionnent la qualité biologique de celui-ci. Toutes perturbations de ces propriétés (naturelles ou anthropiques) peuvent engendrer une réduction de la qualité biologique d'un sol et par voie de conséquence induire un dysfonctionnement de l'écosystème terrestre.

Les sols cultivés sont beaucoup plus sollicités qu'autrefois au plan chimique. Le maintien à long terme de la qualité chimique des sols exige de mieux gérer les pratiques de fertilisation et d'amendement en fonction de l'utilisation du sol (Tessier *et al.*, 1996). L'industrie est également une source importante d'apport en éléments chimiques toxiques,

particulièrement en éléments traces métalliques (ETM) mais aussi en molécules organiques (HAP, huiles...) (Chassin *et al.*, 1996). Le sol est un système globalement accumulateur vis-à-vis des éléments traces. Les pollutions anthropiques passées et actuelles conduisent à l'accumulation de ces éléments polluants minéraux dans les sols. La construction d'une gestion durable des sols et des sites pollués nécessite la connaissance des différentes sources de pollutions.

Les termes "contamination" et "pollution" nécessitent d'être préalablement définis. Ils présentent une certaine nuance tout en étant couramment employés pour désigner une accumulation anormale d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée (Chassin *et al.*, 1996). En effet, selon ces auteurs le terme "contamination" désigne une augmentation des teneurs totales, suite à des apports anthropiques, sans émettre la notion d'un impact négatif sur le milieu. La pollution désigne en revanche, l'accumulation d'un composé en quantité telle qu'elle peut induire un danger pour les organismes vivants.

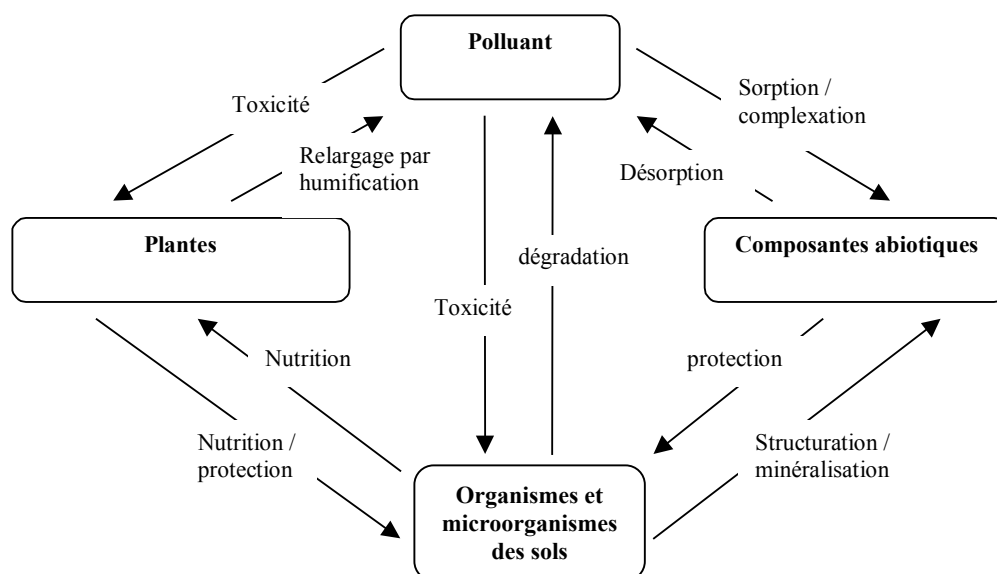
La figure II.3. présente de façon simplifiée l'origine des flux de polluants. Robert et Juste (1997) décrivent de façon explicite les origines des éléments traces présents dans les sols. Ils en concluent sur la récurrence de quatre principales sources de pollutions qui sont : (1) l'origine naturelle par apports des fonds géochimiques locaux, (2) les apports atmosphériques, (3) les apports par les pratiques agricoles (fumures organiques ou minérales), et (4) les apports par les pollutions industrielles.



**Figure II.3.** : Flux et stock des éléments traces vers le sol (Robert et Juste, 1997)

Les caractéristiques édaphiques de chaque sol sont différentes. Elles ne réagiront donc pas toutes de la même manière vis à vis de la présence d'une quantité définie d'un polluant donné. Les facteurs influençant la réaction du sol face à une pollution sont nombreux et variés. Ils déterminent la biodisponibilité des polluants vis à vis des organismes vivants dans le sol et nécessitent donc leur appréhension préalable.

La figure II.4. résume les mécanismes généraux interactifs entre le sol et un polluant d'après Hicks *et al.* (1990). Dans le cas simple d'une pollution par un seul polluant, ces mécanismes peuvent être résumés par quatre principales caractéristiques directement liées au polluant présent dans le sol : (1) son type et sa concentration, (2) sa biodisponibilité, (3) sa forme chimique, (4) certains mécanismes adaptatifs des micro-organismes et des plantes.



**Figure II.4.** : interactions entre les composantes d'un sol et un polluant (d'après Hicks *et al.*, 1990).

Ces quatre facteurs sont interdépendants. Un polluant est plus ou moins disponible suivant sa forme chimique qui est elle-même influencée par certains facteurs physico-chimiques du sol (pH, potentiel rédox...). Les paramètres structurant du sol (argiles, matière organiques...) sont très dépendants de l'activité microbienne qui assure les transferts de matière et d'énergie dans le sol (minéralisation de la matière organique). Ces produits de minéralisations sont impliqués dans les liaisons argilo-humiques qui sont des complexes stables et protecteurs pour les micro-organismes (Chenu, 1993). La production de ces ligands

par les bactéries est également un facteur susceptible d'influencer la mobilité de certains polluants.

La figure II.4. permet également de remarquer que les processus qui influencent la toxicité sont nombreux et divers, et rendent par conséquent l'évaluation de la qualité chimique des sols complexe mais essentielle pour considérer la santé des écosystèmes.

La disponibilité des éléments nutritifs dépend des processus physiques et chimiques, tel que l'altération ou la séquestration, et de certains paramètres tel que les teneurs en matière organique, la CEC, le pH. Plus précisément, les degrés de mobilité, d'activité et de biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols sont fonction de plusieurs paramètres du milieu tels que le pH, la température, le potentiel redox, la CEC, la compétition avec les autres métaux et la composition et la concentration de la solution du sol (Schmitt et Sticher, 1991). Par exemple, lorsque le pH du sol est acide ou basique, certains nutriments deviennent indisponibles pour les plantes et certains éléments toxiques sont au contraire plus disponibles. Singer et Ewing (200) proposent une liste des principales propriétés chimiques à intégrer dans l'évaluation de la qualité des sols (Tableau II.2.).

---

Taux de saturation en bases
Capacité d'échange cationique
Détermination des contaminants
Concentration des contaminants
Mobilité des contaminants
Disponibilité des contaminants
Conductivité électrique
Pourcentage de sodium échangeable (ESP)
Taux de recyclage des éléments
pH
Concentration des nutriments
Phyto-disponibilité des nutriments
Ratio d'absorption du sodium (SAR)

---

**Tableau II.2.** : Indicateurs chimiques de la qualité des sols proposés par Singer et Ewing (2000)

L'évaluation de la qualité du sol, basée sur les propriétés chimiques, requière au vue de cette synthèse, un protocole d'échantillonnage adapté, des méthodes d'analyses chimiques

appropriées à la nature de la perturbation, des méthodes de localisation et des formes des contaminants dans les sols, des connaissances sur les facteurs qui déterminent leurs comportements, et la prise en compte de leurs effets sur les composantes biologiques. La liste proposée par Singer et Ewing (2000) est une liste non exhaustive qui doit être adaptée en fonction du contexte et/ou du type de sol.

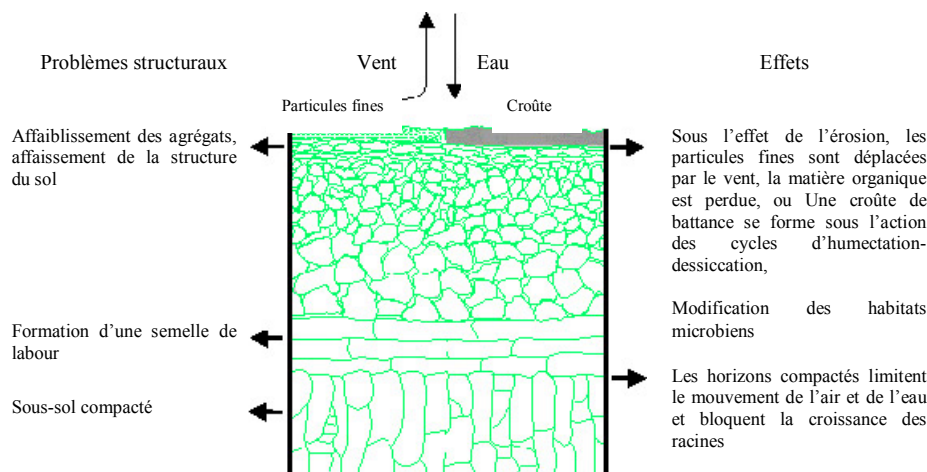
#### **II.4.2. La qualité physique**

La qualité physique d'un sol est étroitement liée à sa structure, c'est à dire à la façon dont les constituants minéraux et organiques sont assemblés les uns par rapport aux autres. On peut penser à la structure du sol en termes "d'architecture" et de "stabilité". Sa qualité dépend en grande partie de la taille, de la forme et de la disposition des pores (vides) et des particules solides (mottes de sable, de limon et d'argile). Dans le sol, la matière organique et certains ciments minéraux sont les principaux liants dans la formation de mottes ou d'agrégats par les particules de sable, de limon et d'argile (Henin, 1958 ; Tisdall and Oades, 1982). Dans un sol bien structuré, l'air, l'eau et les éléments nutritifs peuvent traverser les vides contenus dans les agrégats et entre ceux-ci. En outre, l'assemblage des particules solides et des pores résiste bien aux diverses agressions (travail cultural, moisson, impact des gouttes de pluie, etc.).

C'est en effet dans les différentes catégories de vides ménagés par cet assemblage que l'eau, les solutés et les gaz circulent ou sont stockés et que les êtres vivants peuvent se développer. La dégradation des propriétés physiques d'un sol peut entraîner une réduction importante de sa qualité. Une déstructuration affecte la pénétration des racines dans le sol (Tramblay-Bœuf, 1995). Bengough *et al.* (1997) ont montré qu'une augmentation de contrainte mécanique, que l'on peut observer lorsque l'on passe d'un sol poreux à un sol plus compact, induit une augmentation de la longueur racinaire. La modification des propriétés structurales des sols peut également diminuer la perméabilité et donc perturber la circulation des flux de gaz et d'eau, affecter la diffusion des solutés et modifier les mouvements des microorganismes (Duchaufour, 1997, Papendick et Campbell, 1981). La microflore bactérienne et la faune du sol sont également très sensible aux modifications de leurs habitats. Les perturbations de l'hétérogénéité physico-chimique et structurale des sols peuvent influencer certaines propriétés biotiques et abiotiques directement impliquées dans la survie de ces organismes (Ranjard *et al.*, 1999, Lavelle et Spain, 2001).

La structure du sol évolue lentement sous l'action de processus naturels tels que les cycles d'humectation-dessiccation et de gel-dégel (Kemper et Rosneau, 1984 ; Haynes et Swift, 1990), et de l'apport de matière organique (résidus végétaux et animaux). Cependant, la qualité structurale est une notion difficile à définir vu les liens étroits qui existent entre la structure et divers facteurs comme l'écoulement de l'eau et l'aération du sol. Pour qu'un sol ait une bonne structure, l'état et la stabilité de ses agrégats ne doivent pas limiter le potentiel de rendement d'une culture, les racines doivent pouvoir se développer et s'enfoncer dans le sol de façon optimale ; il doit aussi être suffisamment stable pour résister aux facteurs susceptibles de le dégrader.

L'affaiblissement des agrégats et le compactage du sol sont les formes de dégradation structurale les plus courantes des sols agricoles (Figure II.5.). Les sols qui possèdent des agrégats instables sont les plus vulnérables à une altération structurale rapide. Un sol instable peut sembler posséder une bonne structure, mais ses agrégats risquent de se décomposer facilement sous l'action de la pluie et/ou du travail cultural. La décomposition des agrégats à la surface des sols à texture fine peut entraîner la formation d'une croûte superficielle dure, qui peut empêcher la levée des semis et bloquer les pores de grande taille, limitant ainsi la pénétration de l'eau et de l'air dans le sol.



**Figure II.5. :** Problèmes structuraux d'un profil de sol cultivé et effets de la dégradation (d'après Concaret, 1967 ; Henin *et al.*, 1969 ; Soltner, 1981).



Le compactage résulte d'une compression des particules du sol, qui réduit l'espace interstitiel (et accroît la densité apparente du sol). Il peut avoir de nombreuses causes, la principale étant le passage répété de machinerie lourde sur un sol humide. Les sols à texture fine (argileux et limoneux) des climats humides sont les plus vulnérables au compactage (Faure, 1981). L'altération de la structure du sol augmente également les risques d'érosion (Le Bissonnais, 1996). Les fines particules issues de la décomposition des agrégats dans la couche superficielle risquent particulièrement d'être emportées par le vent et les eaux de ruissellement de surface. En outre, comme un sol compacté absorbe moins d'eau, le ruissellement de surface augmente et aggrave les effets de l'érosion. Un sol déjà dégradé est susceptible de se dégrader encore plus rapidement (Wander et Bollero, 1999).

Les mesures de la densité apparente, de la porosité, de la résistance de pénétration fournissent des indices courants de l'état de compacité d'un sol et renseignent sur les mouvements d'air, d'eau et sur les obstacles à l'enracinement. La stabilité des agrégats donne un indice révélateur de la sensibilité d'un sol aux dégradations structurales (Yoder, 1936 ; Henin, 1958 ; Emerson, 1967; Young, 1984; Le Bissonnais, 1996, Bartoli *et al.*, 1991 ; Seybold et Herrick, 2001). Elle est fréquemment utilisée pour évaluer les impacts de pollutions industrielles (Lieferring et McLay, 1996 ; Meenner *et al.*, 2001), d'une irrigation avec des eaux salines (Curtin *et al.*, 1994; Bond, 1998; Levy *et al.*, 1999; Mamedov *et al.*, 2001), ou pour évaluer les risques d'érosion des sols (Emerson, 1967 ; Le Bissonnais, 1996). Singer et Ewing (2000) proposent l'utilisation de la texture, du type de structure, de la densité apparente, de la profondeur d'enracinement, du potentiel hydrique, de la stabilité des agrégats, de la conductivité hydraulique et de la distribution des tailles de pores, pour évaluer avec pertinence la qualité des sols permettant une production végétale satisfaisante.

### **II.4.3. La qualité biologique**

Les organismes du sol sont responsables, directement ou indirectement, de nombreuses fonctions clés du fonctionnement du sol. Celles-ci incluent la décomposition des résidus animaux et végétaux, la transformation et le stockage des nutriments, les échanges gazeux et hydriques, la formation et la stabilisation de la structure du sol, la synthèse des composés humiques et la dégradation des molécules xénobiotiques (Dick, 1997 ; Paul, 2000).

La qualité biologique des sols fait référence à l'abondance, la diversité et l'activité des organismes vivants qui participe au fonctionnement du sol. La gestion des ressources biologiques des sols doit être considérée comme un élément essentiel de la subsistance de ce système écologique (Andrén et Balandreau, 1998; USDA, 1998). Elle ne pourra être parfaitement maîtrisée que dans la mesure où l'on disposera à la fois d'indices biologiques pertinents et de référentiels d'interprétations garantissant une bonne sécurité de diagnostic. McGrady-Steed *et al.* (1997) affirme qu'il est important de se préoccuper de la protection d'un patrimoine biologique dont la diversité permet non seulement d'assurer une certaine permanence fonctionnelle dans un environnement changeant. Par ailleurs, la conservation d'une certaine capacité évolutive est susceptible selon Borneman et Triplett (1997) de minimiser les conséquences négatives de nombreux stress anthropiques. Actuellement, la communauté scientifique s'interroge sur le rôle de la biodiversité dans la stabilité des écosystèmes. La relation entre résilience et biodiversité a été abordé par Elliot et Lynch (1994). Les travaux de Naeem *et al.* (1994) montrent que la diminution de la biodiversité d'un écosystème engendre la réduction de certains processus écologiques. Ils précisent que les écosystèmes les plus diversifiés sont aussi les plus productifs. Ces discussions sont appuyées par Copley (2000) qui estime que le fonctionnement des écosystèmes terrestres dépend fortement de leur biodiversité.

Les indicateurs biologiques peuvent être définis comme des organismes qui répondent à un stress par leur présence ou leur absence, par les modifications de certaines caractéristiques ou activités particulières, ou par une bioaccumulation de certains contaminants (Eijsackers, 1982). Les micro-organismes bactériens sont fréquemment utilisés comme indicateurs de la qualité biologique des sols. Ce sont également ceux que nous utiliserons dans ces travaux pour évaluer la fonctionnement biologique des sols dégradés. Par conséquent, seuls ces organismes font l'objet d'une revue dans ce paragraphe. Cette revue ne fait pas la synthèse exhaustive des techniques utilisées pour caractériser le fonctionnement bactérien des sols, mais rapportent les différentes approches susceptibles d'évaluer avec pertinence la qualité des sols.

Visser et Parkinson (1992) suggèrent de tester le fonctionnement bactérien des sols à 3 niveaux d'organisations : au niveau de la population, de la communauté et de l'écosystème. Chaque niveau d'organisation permet d'obtenir des informations pertinentes et différentes en

considérant la sensibilité de l'ensemble du fonctionnement bactérien aux changements des conditions environnementales.

Jusqu'à un passé relativement proche, les mesures utilisées pour évaluer le fonctionnement microbien des sols, visaient en priorité à définir les potentialités fertilisantes des sols et leur principal intérêt était basé sur leur facilité d'utilisation et d'application. Ainsi, les deux paramètres microbiologiques les plus communément mesurés pour évaluer la réponse des microorganismes à des changements de leur milieu, sont des mesures globales tels que la taille des populations bactériennes (dénombrement) et la mesure de la biomasse des sols. Les techniques de dénombrement s'avèrent imprécises du fait de leur trop grande sélectivité, les espèces cultivables recensées ne représentant qu'une très faible fraction de la communauté microbienne du sol (0,1 à 10 % selon Ward *et al.*, 1990). La biomasse bactérienne est un indicateur sensible d'une diminution à long terme des teneurs en matière organique résultante par exemple d'une intensification de certaines pratiques agricoles ou d'une perturbation d'un écosystème naturel (Weigand *et al.*, 1995). Cependant, le manque de résolution de cette mesure constitue son point faible, et la biomasse du sol nécessite d'être complétées par des méthodes plus informatives sur les processus touchés par une modification de la qualité du sol.

Les mesures d'activités globales (respiration, activités enzymatiques) complètent les mesures de dénombrement et de biomasse dans l'évaluation de la réponse des microorganismes à des changements affectants la taille de la communauté. Ainsi, Chaudri *et al.* (1998) montrent dans un autre contexte, que la contamination d'un sol par des métaux lourds provoque un impact persistant sur l'activité des microorganismes. Des mesures de respiration, de dénombrement et d'activités enzymatiques (phosphatase, sulfatase et dehydrogenase) effectuées par Pitchel et Hayes (1990) ont montré une inhibition de l'activité des microorganismes à la suite de l'application au sol de cendre d'incinération de charbon. Ces approches globales donnent une vision d'ensemble de l'impact sur le fonctionnement microbien du sol mais elles restent descriptives. Les modifications dans des groupes fonctionnels qui accomplissent des fonctions essentielles dans le sol, apportent des informations sur le fonctionnement à l'échelle de l'écosystème. Les exemples les plus couramment rencontrés concernent des groupes microbiens qui interviennent dans les différentes étapes du cycle de l'azote. Visser et Parkinson (1992) précisent que les mesures d'une ou de plusieurs activités composant le cycle de l'azote (dénitrification, nitrification ou fixation d'azote) permettent d'évaluer la fertilité et la qualité des sols agricoles. Les

différentes étapes du cycle de l'azote intègrent des déterminismes physiques, chimiques et biologiques qui contrôlent la fertilité des sols et donc considèrent la dynamique d'un sol dans son ensemble. Les activités bactériennes offrent aussi la possibilité d'appréhender les impacts de changements environnementaux sur le fonctionnement physiologique des cellules bactériennes.

Le développement de nouvelles techniques dans les domaines de la biologie moléculaire et cellulaire au cours de ces dix dernières années, permet aujourd'hui d'accéder précisément à la structure des communautés bactériennes et de mieux cerner les facteurs biotiques et abiotiques agissant sur le déterminisme de la structure de ces communautés. Les techniques destinées à caractériser la structure des communautés peuvent être regroupées en trois types d'approches :

- Etude de la structure des communautés par établissement d'empreintes chimiques.

Cette approche utilise l'analyse de la composition en acide gras des phospholipides extraits d'un sol pour déterminer la composition d'une communauté microbienne. La technique PFLA (Phospho Lipid Fatty acid Analysis) est basée sur la présence d'acide gras des phospholipides dans les membranes de toutes les cellules vivantes (Zelles *et al.*, 1992). Son principal avantage réside dans la rapide décomposition de ces molécules organiques qui en fait de bons indicateurs des variations rapides dans la structure de la communauté bactérienne.

- Etude de la structure des communautés par établissement d'empreintes métaboliques.

La diversité des substrats carbonés que la communauté microbienne d'un sol a la possibilité d'utiliser comme source d'énergie est directement liée avec la diversité des espèces présentes et actives dans la communauté. Le profil d'utilisation de ces substrats carbonés représente une empreinte métabolique qui peut servir de base pour la comparaison des communautés microbiennes issues de sols différents ou perturbés. La réponse et la diversité catabolique des microorganismes hétérotrophes du sol peut par exemple être évaluée par la technique CRP (Catabolic Response Profile) développée par Degens *et al.* (1997). Cette méthode physiologique utilise les différences de réponses respiratoires à court terme (quelques heures) des communautés microbiennes induites par l'ajout au sol de différents substrats organiques simples pour quantifier la diversité catabolique.

- Etude de la structure des communautés par établissement d'empreintes génétiques.

Les approches génotypiques considèrent le polymorphisme structural du génome des bactéries. Ces approches se basent sur le principe de la sélection naturelle qui favorise la multiplicité des génotypes en réponse aux processus d'adaptation aux changements des conditions de l'environnement. Dans un sol, l'hétérogénéité spatiale et temporelle peut promouvoir le polymorphisme génétique et l'existence de génotypes adaptés à des conditions d'habitat spécifique. En outre, une modification des caractéristiques des habitats microbiens ou un apport de composés exogènes peut entraîner une adaptation des communautés bactériennes qui se traduit par des changements dans la structure génétique de ces communautés. Le choix des techniques génotypiques est de plus en plus large. Retenons simplement que chacune d'entre elles répond à des objectifs systématiques, globaux, fonctionnels ou comparatifs. Poly (2000) et Ranjard *et al.* (2000c) font une revue exhaustive des techniques génétiques actuelles et de leurs champs d'application. Cependant, ces techniques ont aussi leurs limites, la plus sérieuse étant la phase d'extraction de l'ADN du sol de l'approche génétique. Cette étape technique doit fournir de l'ADN non dégradé tout en étant complète et non sélective. L'amplification préférentielle de certaines séquences nucléotidiques peut se réaliser au cours de la PCR (Polymérase Chain Reaction) (Reysenbach *et al.*, 1992) et introduire un biais dans l'image de l'empreinte génétique obtenue de la communauté bactérienne.

---

## **Deuxième partie**

Modifications des relations sol-microorganismes-plantes  
au cours du processus de restauration de prairies alpines  
dégradées.

---

## **Introduction : problématique, contexte et objectifs des travaux**

---

Dans cette partie, nous décrivons les conséquences du terrassement de pistes de ski sur la structure physique d'un écosystème prairial alpin et sur le fonctionnement biologique du sol. Nous analysons les effets de la végétalisation de ces milieux dégradés dans la réhabilitation de la qualité des sols et du fonctionnement des écosystèmes "recrées". L'originalité de ces travaux réside dans le choix d'un écosystème situé dans des conditions environnementales extrêmes, car à haute altitude, et soumis à une dégradation physique très importante. Cette étude a été réalisée en suivant les différentes étapes de la reconstruction du couvert végétal, accompagnée de l'évolution des propriétés structurales et bactériologiques des sols.

Ces travaux de recherches ont été menés dans le cadre du Programme National de Recherches Sols et Erosion ACI " Ecologie Quantitative Biogéochimie des sols" (PNSE). Ce programme, dont le titre est « Fonctionnement biologique des sols sous végétation herbacée naturelle pérenne : Comparaison avec le fonctionnement sous graminée introduite, pérenne ou annuel », à pour objectif de préciser le rôle de la rhizosphère des graminées pérennes et annuelles dans les activités microbiennes et la structuration des populations microbiennes des sols. Les informations que nous obtiendrons sur cette structuration à l'échelle des microorganismes, sur la régulation des contacts entre les microorganismes et leurs substrats et sur le rôle des graminées dans ces interactions, devraient permettre à l'issue du programme de comprendre certains mécanismes de stabilisation du carbone.

## Problématique

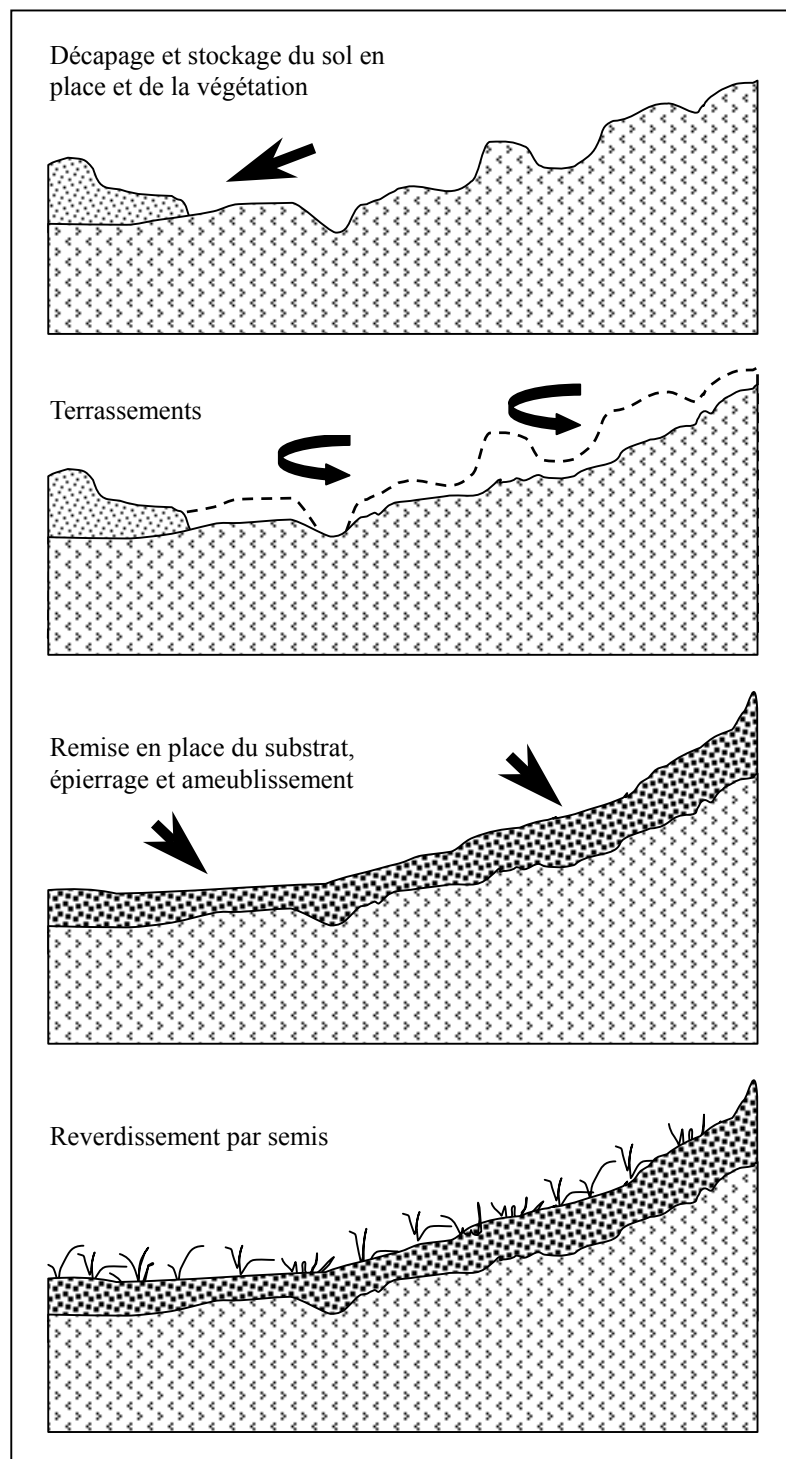
L'aménagement des domaines skiables conduit à des travaux de terrassement important pour la mise en place des remontées mécaniques et l'implantation des pistes de ski. Le terrassement d'une piste de ski facilite l'entretien de la couche neigeuse et répond à une demande émanant des skieurs qui sont soucieux de pratiquer leur activité avec aisance. Suite au remaniement de volumes considérables de matériaux, il résulte de vastes surfaces de terrain dénudé peu favorables à l'installation de la végétation spontanée et soumis au risque d'érosion. Ces aménagements dégradent considérablement le paysage des sites d'altitude et sont à l'origine de profondes perturbations du fonctionnement des écosystèmes terrestres.

Des mesures de réhabilitation de ces zones aménagées deviennent alors nécessaires pour assurer la pérennité des travaux mais aussi pour rétablir la qualité paysagère et environnementale de l'arc alpin. C'est en toute logique que le reverdissement s'est imposé comme la méthode de réhabilitation privilégiée des zones aménagées. L'objectif essentiel des travaux d'engazonnement de ces surfaces nues est de créer rapidement une couverture végétale optimale et durable. Ils doivent permettre d'insérer les pistes de ski dans l'environnement végétal et de diminuer considérablement les risques d'érosions superficielles des substrats produits par le terrassement (Cernusca, 1986), mais également de restaurer les qualités physico-chimiques et le fonctionnement biologique des sols et des écosystèmes sus-jacents. Cernusca (1986) estime que la réhabilitation des pistes de ski est un succès lorsque les surfaces revégétalisées deviennent comparables aux écosystèmes avoisinants en ce qui concerne la composition des espèces végétales, la densité de la couverture et de l'enracinement, les propriétés physico-chimiques et l'activité biologique des sols.

Les travaux de terrassement ont pour objectifs de niveler la topographie du terrain et de supprimer la présence de blocs rocheux nuisant au travail de la neige. Les techniques utilisées peuvent être différentes d'une station de ski à une autre, mais également pour différentes pistes au sein d'une même station (Dinger, 1997). Le plus fréquemment, les travaux consistent en un décapage du sol qui est ensuite stocké sous la forme d'andins. La topographie est nivelée par un rabotage des portions convexes nécessitant parfois l'utilisation d'explosifs. La roche ainsi que les blocs pierreux obtenus sont concassés et incorporés au sol décapé. Le



nouveau matériel est déposé sur la surface créée de manière à combler les creux et de recouvrir l'ensemble de la piste de ski d'une épaisseur minimum de 50 cm de matériel (Figure 1).



**Figure 1.** : Etapes techniques du terrassement des pistes de ski.

Le substrat est finalement ameubli sur une profondeur d'environ 10 cm. Ce travail est d'autant plus important que le terrain a été compacté par les travaux précédents. Le résultat du terrassement est une surface dénudée (Photographie 1) et un substrat brut dépourvu d'humus et fortement, voir très fortement, enrichi en éléments grossiers (Photographie 2). La structure initiale est complètement bouleversée entraînant probablement un dérèglement de l'équilibre hydrologique général.



**Photographie 1.** : Surface obtenue du terrassement d'une piste de ski



**Photographie 2.** : Profil de sol d'une piste de ski récemment terrassée

Compte tenu des contraintes de l'altitude (alternance fréquente de périodes de gel/dégel, précipitations météoriques importantes, forte pentes...), tant que la végétation n'est pas réinstallée, il subsiste un risque important de ravinement du substrat et d'érosion des sols nus. Cependant, la construction d'une piste de ski crée des conditions écologiques et édaphiques très sévères pour l'implantation des végétaux (compaction, ressources hydrique, baisse de fertilité...), auxquelles s'ajoute les conditions climatiques extrêmes de ces milieux d'altitudes. Ainsi l'axe principal des recherches fut longtemps la détermination des méthodes de végétalisation les mieux adaptées aux milieux d'altitude. Ces travaux ont conduit à choisir les espèces végétales les plus favorables à la dynamique de reconquête des espaces dégradés (Bussery, 1989; Bedecarrats et Dinger, 1994).

Les plantes utilisées dans la végétalisation des pistes de ski sont uniquement des herbacées (graminées, légumineuses, composées...). Les espèces sont choisies pour favoriser le retour des populations autochtones. Dans la pratique, seules sont utilisées à grande échelle les légumineuses (Lotier corniculé, Trèfle blanc, Trèfle hybride, Sainfoin...) et les graminées (Fléoles des prés, Fétuque rouge, Raygrass anglais, Agrostide stolonifère...) qui entre dans la composition d'un mélange de semis (SEATM, 1985). Elles seules sont susceptibles de répondre aux objectifs économiques et écologiques du reverdissement. Elles permettent d'obtenir une couverture rase et dense qui facilite le travail de la neige et qui limite l'érosion par l'action du pouvoir agrégeant de leur racines.

En effet, les graminées possèdent un système racinaire dense, traçant ou gazonnant, qui colonise les horizons superficiels du sol et joue un rôle important dans la cohésion des particules et dans la structuration physique du sol des écosystèmes prairiaux (Matarecha et al., 1994). Les exsudats racinaires, riches en polysaccharides, stabilisent les agrégats directement, ou indirectement en fournissant une source d'énergie pour les organismes rhizosphériques qui, à leur tour, sécrètent des polysaccharides agrégeants (Greenland *et al.*, 1961 ; Tisdall et Oades, 1979 ; Oades, 1989 ; van Noordwick *et al.*, 1993 ; Gouzou *et al.*, 1993 ; Amellal, 1996 ; Amellal *et al.*, 1998 ; Czarnes *et al.*, 2000). L'exsudation de polysaccharides par les graminées et de leurs microorganismes associés rendent les agrégats de la rhizosphère plus hydrophobes et plus stables que ceux du sol environnant, moins organique (Amellal *et al.*, 1998). Au niveau physique, l'effet rhizosphère se manifeste par une modification de la structure du sol, soit par agrégation (Haynes et Francis, 1993) soit par fragmentation (Matarechera *et al.*, 1994). La rhizosphère est aussi un environnement dans lequel les cycles de dessiccation et d'humectation sont particulièrement marqués du fait du prélèvement de l'eau du sol par les systèmes racinaires, ce qui induit un état de fragmentation du sol (Lafond et al., 1992). L'influence des plantes sur la formation et la stabilité des agrégats est également variable en fonction de l'espèce (Reid et Goss, 1981), mais est particulièrement importante pour les graminées (Haynes et Beare, 1997 ; Haynes et Swift, 1990).

## Objectifs et contexte de l'étude

L'appauvrissement en apports organiques "frais" lors du décapage de la végétation, la compaction, ainsi que les changements brutaux de régimes hydriques des sols entraînent des effets globaux de diminution de la densité des organismes du sol, microbiens, micro et macrofaune, tout comme certaines pratiques agronomiques. Cependant, ces effets de densité sont rarement expliqués en terme de changements de population (diversité, structure) ou d'activités. Les inter-relations entre la plante et le cortège microbien dans les premières phases de recolonisation et de re-structuration du milieu sont mal connues. Nous proposons donc d'aborder dans la deuxième partie de ce manuscrit, les effets d'une dégradation physique d'un écosystème prairial et de sa restauration en suivant l'organisation du sol, la structure de la végétation et le fonctionnement des populations microbiennes.

**Le premier objectif** est d'étudier les relations de la structure des communautés bactériennes telluriques et de l'activité microbienne avec l'organisation du sol et la dynamique du peuplement végétal. **Le deuxième objectif** est d'étudier le fonctionnement d'écosystèmes prairiaux évolutifs et d'estimer le rôle de la végétation et de la microflore bactérienne tellurique dans la restauration de la qualité des sols dégradés. Finalement, **l'ensemble des résultats** fournis par ces travaux a pour objectifs de compléter les concepts d'écologie de la restauration et d'apporter des réponses pratiques utiles à une gestion raisonnée de l'aménagement des écosystèmes prairiaux alpins dégradés.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi de travailler sur des sites du domaine skiable de la station de ValThorens (commune de Saint Martin de Belleville, Savoie, France). La société d'exploitation des remontés mécaniques de la station de ValThorens, aidée par la société "Blé des Cimes", emploie depuis une quinzaine d'années une méthode particulière de végétalisation de ses pistes de ski, évitant l'apport de matières organiques exogènes .

Une culture de blé (*Triticum aestivum*) est réalisée sur les surfaces dénudées l'année du terrassement et précède l'ensemencement de graminées pérennes. Elle permet vraisemblablement de préparer et d'augmenter le succès des étapes suivantes de la végétalisation par des herbacées pérennes sélectionnées. Le blé est une graminée annuelle qui arrive rarement à épiaison à ces altitudes. Il possède néanmoins une croissance plus rapide que les graminées pérennes et un système racinaire développé, très actif en matière de

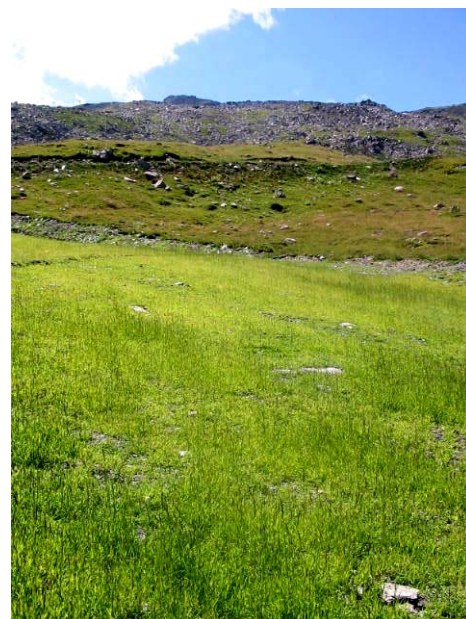
production d'exopolysaccharides, dont le rôle agrégatif fut démontré par les travaux de Amellal et al. (1996). L'année suivante, le semis d'un mélange d'espèces de graminées pérennes et de légumineuses accompagne un deuxième semis de blé. Le mélange se compose de graines de fléole de prés (*Phleum pratense*) (45 %), de fétuque rouge (45 %) (type gazonnant: *Festuca rubra* L. *commutata* Gaud et type traçant: *Festuca rubra* L. *rubra*), de lotier corniculé (*Lotus corniculatus*) (5 %) et de trèfle (*Trifolium repens*, *Trifolium badium*, *Trifolium pratense*) (5 %).

Il résulte de cette méthode de végétalisation, 4 stades remarquables de colonisation végétales (Faivre et al., 2001) (Figure 2) :

- L'année du terrassement (t0): la végétation est une culture monospécifique de blé (Photographie 3),
- L'année suivante (t1) : le blé est co-dominant avec la fléole des prés, la fétuque rouge est présente mais ne dépasse pas 5 % en terme de densité (Photographie 4),
- A partir de la 4<sup>ème</sup> (t4): la fléole des prés est dominante, la densité de la fétuque rouge augmente et les légumineuses sont également présentes (Photographie 5),
- A partir de la 7<sup>ème</sup> année (t7) : la fétuque rouge est dominante, les légumineuses sont installées et les espèces autochtones colonisent le milieu (Photographie 6).

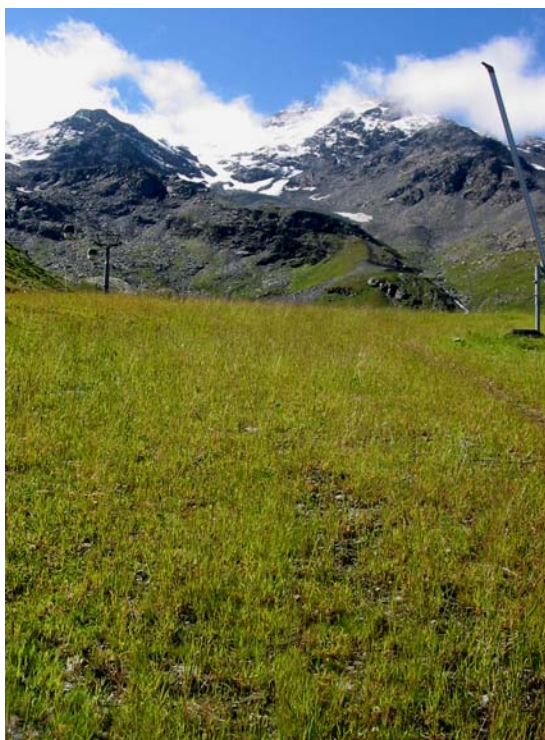


**Photographie 3.** : végétation monospécifique de blé (1 mois post terrassement)



**Photographie 4.** : Piste végétalisée de 1 an



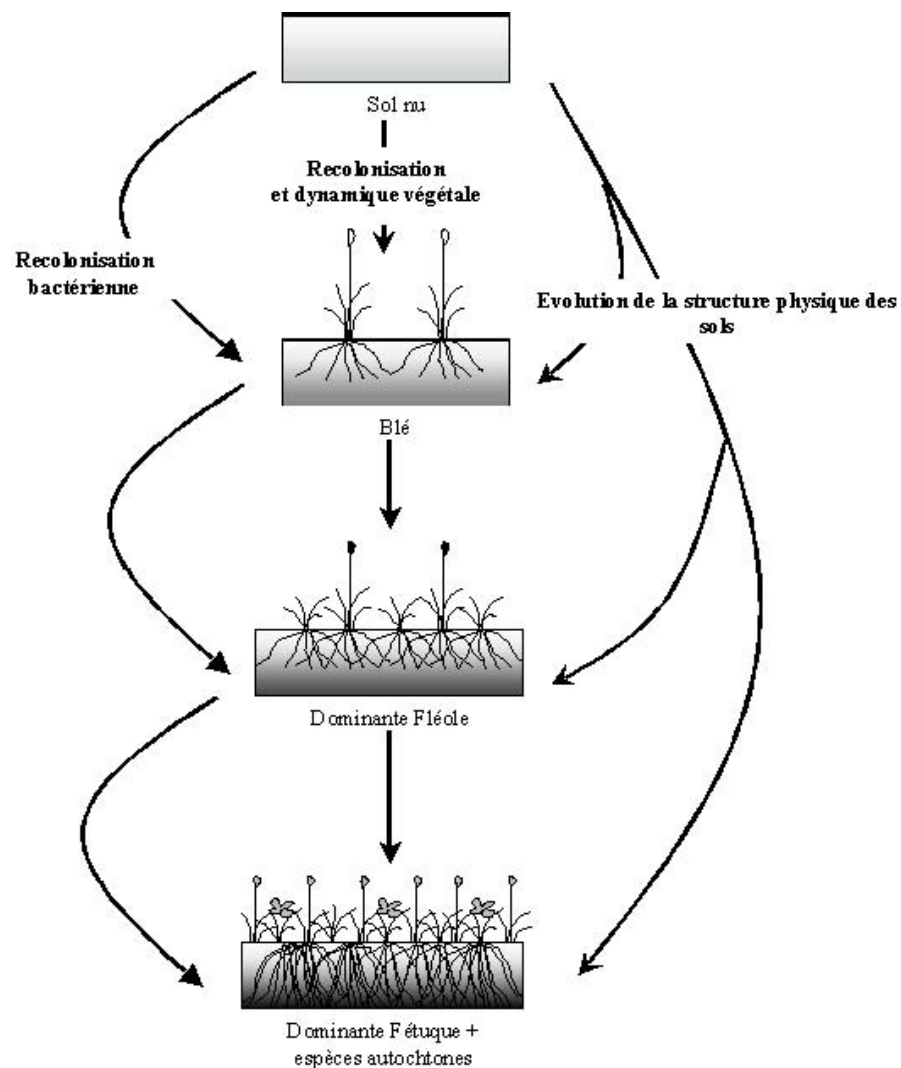


**Photographie 5.** : Piste végétalisée de 4 ans



**Photographie 6.** : Piste végétalisée de 13 ans

Six sites ont été choisis pour décrire le processus de restauration : (i) un site de référence sur une prairie graminéenne sub-alpine non perturbée et proche des pistes de ski, (ii) un site récemment terrassé dont le substrat est dépourvu de végétation, (iii) quatre sites correspondant chacun à une étape de la colonisation végétale décrite ci-dessus. Le premier des 4 sites restaurés a 1 mois, le deuxième a 1 an, le troisième a 4 ans et le quatrième a 13 ans. Tous ces sites ont été choisis à des altitudes proches, sur des substrats géologiques identiques et à des orientations et des pentes similaires.



**Figure 2 :** Schéma général des successions écologiques

## **Chapitre I**

### **Organisation physique et activités bactériennes de sols alpins naturels, dégradés puis reconstitués**

---

Ce premier chapitre est consacré à l'étude des effets de la construction d'une piste de ski et de la réhabilitation du sol qui la recouvre à différentes étapes, sur les relations entre la structuration physique du milieu (organisation du sol, structure de la végétation) et la structuration biologique (dynamique végétale et activités bactériennes). Les objectifs de ce travail sont multiples. Nous analysons les changements de certaines propriétés physico-chimiques des sols (textures, porosités, teneurs en eau, stabilité des agrégats, C et N...) afin de comprendre les mécanismes qui régissent la réhabilitation du fonctionnement d'un sol. La colonisation végétale est suivie à la fois par une étude phytosociologique et par une étude dynamique de la colonisation du milieu par les plantes (recouvrement, biomasses racinaires). L'étude de l'activité potentielle de fixation d'azote atmosphérique (activité essentielle du cycle de l'azote des écosystèmes prairiaux d'altitude) et l'analyse des modifications de la diversité catabolique microbienne permettront d'évaluer l'activité des bactéries hétérotrophes au cours du processus de restauration de ces sols alpins.



Le principe de la mesure de fixation potentielle d'azote repose sur une propriété de la nitrogénase, qui est de pouvoir réduire l'acétylène en éthylène et ce de façon préférentielle par rapport à la réduction de  $N_2$  en  $NH_4^+$ . Une aliquote de sol contenant une source de carbone en quantité non limitante est placée dans une enceinte dont l'atmosphère contient environ 10% d'acétylène. La mesure de l'activité de la nitrogénase est évaluée par la quantité d'éthylène formé après incubation, puis dosée par chromatographie en phase gazeuse sur une aliquote de l'atmosphère de l'enceinte. Un marqueur interne, le propane, permet l'évaluation quantitative de l'éthylène. Cette technique est dénommée ARA (Acetylene Reduction Assay).

La réponse et la diversité catabolique des microorganismes hétérotrophes du sol est évaluée par la technique CRP (Catabolic Response Profile) développée par Degens *et al.* (1997). Cette méthode physiologique utilise les différences de réponses respiratoires à court terme (quelques heures) des communautés microbiennes induites par l'ajout au sol de différents substrats organiques simples (glucose, acides aminés...) pour quantifier la diversité catabolique. La CRP ne mesure pas la diversité spécifique ou génétique, mais la distribution de différentes fonctions catabolique exécutées par la communauté bactérienne hétérotrophe. La CRP découle de la SIR (Substrate Induced Respiration) qui permet de mesurer la respiration induite par un apport de glucose (Anderson et Domsch, 1985).

Ces deux techniques, l'ARA et la CRP, sont des mesures d'activités potentielles qui consistent à placer le sol dans des conditions optimales d'expression de l'activité, c'est à dire sans facteur limitant. De ce fait, ces mesures traduisent les effets affectant l'activité enzymatique (ARA) ou les populations responsables des ces activités (CRP), mais ne rendent pas compte des activités en conditions naturelles, ou intervient toujours un ou plusieurs facteurs limitant (humidité, température, aération...) (Poly, 2000).

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de **R. GROS**, L. JOCTEUR MONROZIER, F. BARTOLI, J.L. CHOTTE, L. TROSSET et P. FAIVRE. Cet article a été soumis à la revue Ecological Applications.

## **Soil organisation and microbial activities changes along the process of restoration in disturbed alpine grasslands**

GROS Raphaël<sup>a</sup>, JOCTEUR MONROZIER Lucile<sup>b\*</sup>, BARTOLI François<sup>b</sup>, CHOTTE Jean Luc<sup>c</sup>, TROSSET Louis<sup>a</sup> and FAIVRE Pierre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Sciences du Sol, CISM, Université de Savoie 73376 Le Bourget du Lac cedex, France.

<sup>b\*</sup> Corresponding author: Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, Bat. Gregoir Mendel, 16 rue Dubois Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel: 04.72.43.13.80.; e-mail: lucile.jocteur-monrozier@univ-lyon1.fr

<sup>c</sup> Laboratoire Sols et Environnement (ENSAIA)-INPL-INRA, BP 172, 54 501 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

<sup>d</sup> Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Sols Tropicaux, Centre IRD, BP 1386, Dakar, Sénégal

**Key words:** Alpine ecosystem; ski runs construction; soil quality; soil development; potential N<sub>2</sub> fixation; heterotrophic functional diversity.

**Running title:** Restoration of disturbed alpine grassland ecosystems

## I.1. Abstract

A rapid herbaceous cover establishment after soil modeling for ski runs is the first aim in revegetation and is fundamental in limiting soil erosion. In this paper we report the effects of ski runs construction and their following restoration steps on soil organization and soil bacterial functioning. Direct relations between soil structure, plant roots colonization and microbial activities were evidenced on the steps of a restoration process through oriented plant succession. Aggregates stability and porosity were measured to follow the modifications of soil structure and were correlated with relevant soil parameters such as total organic C content, fine earth (<2 mm) proportion, particles sizes distribution and soil moisture. Management of soil for ski runs generated a decrease of organic matter to 44% of the climacic soil content, a degradation of soil structure and an increase of the proportion of rock fragment *vs* fine earth. During the restoration process, total C content progressively increased in densely rooted soils. Our results concerning both nitrogenase activity and catabolic diversity highlighted the specific microbial pattern of a climacic grassland soil at high altitudes: low non-symbiotic nitrogen fixation activity and low heterotrophic bacterial diversity. Potential nitrogen fixation increased with age of restoration and was attributed to C input by plant root in soils and favorable soil moisture. In accordance with the positive relationships between catabolic evenness and ecosystem function, our data suggests that in early stage of ecosystem restoration (< 13-yrs old) the microbial population remain very unstable because dominate by opportunists micro-organisms.

## I.2. Introduction

Terrestrial ecosystems degradation caused by land use and land-management practices are of major concern (Shipper and Sparling, 2000 ; Staben et al., 1997 ; Sanchez-Maranon et al., 2002 ; Rosset et al., 2001). In European Alps, the development of ski run construction is one major anthropogenic factors responsible for subalpine grassland ecosystem degradation. For establishing ski runs, the native vegetation of perennial grassland is clear cut, the surface soil removed, stones crushed and the topography levelled with spare residual materials from

bumps and upland re-shaping (Urbanska, 1995). Such management result in physical perturbations of soil and in a severe deterioration of the ecosystem. Climatic conditions with low temperatures, likely acidic parent material influence also most of the biological activities (plant growth, organic matter decomposition, N cycle etc).

Many studies have showed the effect of structural deterioration caused by tillage operations on short and long term microbial functioning. Adu and Oades (1978) reported that tillage can promote aggregates breakdown and subsequently increase the accessibility of physically protected organic matter for microbial degradation (Tisdall et al., 1978; Ladd et al., 1993, Cambardella and Elliot, 1994). Consequences are a short-term change in nutrients dynamics such as nitrogen (Kristensen et al., 2000; Calderón et al., 2001) and a long term decrease in soil organic matter and soil microbial biomass (Elliot, 1986; Cihacek and Ulmer, 1995; Calderón et al., 2000). The effect of structural degradation by compaction by trucks traffic are less known. Compaction implies an increase in soil bulk density and in soil cohesion, and a decrease in air permeability. Šantrůčková et al. (1993) reported a decrease of microbial biomass on soil compacted by agricultural traffic. Bredland and Hansen (1996) showed that soil compaction impedes the decomposition of organic matter and N mineralization. They specified that the negative effect of compaction on N mineralization was stronger at higher soil moisture content.

New soil properties generated by modifications of soil structure determine the re-establishment of indigenous vegetation. Spontaneous revegetation of disturbed grassland occurs in a series of stages. The first stage of plant succession consists of the invasion of pioneer or opportunist species (Shipper et al., 2001). These plants are often annuals or biennials and tolerant for temperature extremes, soil disturbances and nutrient depleted soils (Bowman et al., 1993). They stabilise the soil structure, increase soil organic matter and nutrient pool, restore soil moisture and create characteristic habitats that favour the restoration of soil biological functions (Munshower, 1994). These annual plants prepare the soil for a later installation of perennial grasses that are more sensitive to disturbed conditions.. In mountain area with extreme climatic conditions, bare soil is susceptible to be hardly eroded. In order to rapidly decrease erosion, restore soil structure and soil biological functions a process of revegetation with foreign or native grasses can be engineered (Munshower, 1994; Muller et al., 1998; Urbanska and Fattorini, 2000).

Revegetation management promote aggregates stabilization and restore soil biological life in disturbed soils, particularly through the beneficial effects of plant roots. Jastrow et al. (1998) showed the direct role of roots and external fungi hyphae on the formation of macroaggregates in restored prairie. The rhizosphere contributes to the improvement of soil organic matter content and quality through the release of soil root material and root exudation, which stimulates microbial activity and biomass (Brimecombe et al., 2001). The interactions between soil particles (e.g. clays), exudates, roots, micro-organisms and water favor rhizosphere soil aggregation, which is well developed in densely rooted climacic grasslands and old pasture soils (Haynes and Swift, 1990).

Several studies have highlighted the effect of agricultural operations or land use change on the relationships between soil microbial activities and plant community succession (e.g. Jastrow et al., 1998; Garcia et al., 2002). The main objectives of the present study were i) to describe some key parameters of the process of soil restoration by grasses with a special attention paid to the impact of gramineae ii) to assess the direct or indirect relationships between the evolution of soil physico-chemical properties (e.g. structure, moisture content, C and N content) and microbial functioning during restoration. So, the range of soil conditions and microbial activities were studied by sampling soil from the field i) under undisturbed climacic grassland, ii) from bare new parent material before restoration and iii) from four plots under restoring vegetation chronosequence.

### **I.3. Material and methods**

#### **I.3.1. Field situations**

The sites are located at Val-Thorens (45°17'48" N, 6°34'50" E, 2300 a.s.l.) east of Chambéry (Savoie) in the French Alps. The mean air temperature is -6.0 °C in January, 10.0 °C in July (annual mean temperature for the period 1982-2002 was: 0.7 °C). Mean precipitation is 1318 mm per year. The studied sites are covered with snow during 6 to 7 months a year. Soil develops on acidic metamorphic bedrock (dark schist) and acidic glacial

deposit. Vegetation ecotype is dominated by sub-alpine pasture (*Nardion strictae*) and dwarf shrub (*Rhododendro-Vaccinion* and *Juniperion nanae*).

The initial disturbed site consisted of a bare soil (B) obtained by the settlement of a ski run the year of sampling. The native vegetation of perennial grassland was clear-cut. Surface soil was scraped from the bumps, the stones crushed to gravel and these materials used to fill depressions and hollows in the slopes to obtain a flat area. The whole surface of ski-run was covered with a top layer of the same material of 50cm thick at least. The works ski-run design was achieved by rolling the surface with bulldozer. New ski-runs were so installed since 20 years in the ski area at ValThorens. The year when the ski-run was established, a first sowing was processed with *Triticum aestivum* seeds, at a rate of 200 kg ha<sup>-1</sup> and with a mix of *Phleum pratense* (40%), *Festuca rubra* (40%), with leguminous such as *Trifolium* and *Lotus* (20%) seeds, at a rate of 50 kg ha<sup>-1</sup>. A further sowing was done in the same conditions the following spring.

Six field situations had been chosen to describe the process of restoration: (i) one reference site on the Undisturbed pasture (Up) area nearly the ski-runs, (ii) one recently scraped site on the ski-run area (B), and (iii) four sites in a chronosequence of vegetalised ski runs with oriented vegetation (*Triticum eastivum*: *T-V*<sub>1m</sub>, *Triticum eastivum* and *Phleum pratens*: *TP-V*<sub>1y</sub>, *Phleum pratense* and *Festuca rubra*: *PF-V*<sub>4y</sub>, *Festuca* sp: *F-V*<sub>13y</sub>). All studied sites were located at the altitude 2270-2350 a.s.l. and faced the NE and E.

Up soil type was a lithic dystrochrept (USDA, 1994). Distinct layers were observed: a granular loamy horizon A at 0-10 cm depth and a subangular blocky horizon B at 10-40 cm depth. Dominant plant species were described in Table I.1. It shows that 50% of plant cover consist of perennial gramineae with a great diversity of associate species.

**Table I.1.** : Characteristics of the sampling site

Site	Code	Age	Altitude	Plant cover (%)	Vegetation
Undisturbed Pasture (reference situation)	Up	Climacic	2350	95	<i>Festuca rubra</i> 20%, <i>Poa alpina</i> 15%, <i>Phleum alpinum</i> 15%, <i>Daucus carotus</i> 10%, <i>Trifolium badium</i> 5%, <i>Hieracium vulgatum</i> 5%, other species 30%.
Bare soil	B	0	2270	0	No planted
<i>Triticum</i> -Vegetated site	<i>T-V</i> <sub>1m</sub>	1 month	2270	15	<i>Triticum eastivum</i> 100%
<i>Triticum/Phleum</i> -Vegetated site	<i>TP-V</i> <sub>1y</sub>	1 year	2250	90	<i>Triticum eastivum</i> 50%, <i>Phleum pratense</i> 40%, <i>Festuca rubra</i> 5%, other species 5%
<i>Phleum/Festuca</i> -Vegetated site	<i>PF-V</i> <sub>4y</sub>	4 years	2350	60	<i>Phleum pratense</i> 60%, <i>Festuca rubra</i> 20%, <i>Trifolium badium</i> 5%, <i>Lotus corniculatus</i> 5%, other species 10%
<i>Festuca</i> -Vegetated site	<i>F-V</i> <sub>13y</sub>	13 years	2290	100	<i>Festuca rubra</i> 60%, <i>Festuca ovina</i> 10%, <i>Poa alpina</i> 10%, <i>Trifolium badium</i> 5%, <i>Lotus corniculatus</i> 5%, other autochthonous species 10%

### I.3.2. Soil sampling strategy

Within each studied site (undisturbed climacic soil, bare new parent material and soils of the restoring chronosequence), three representative sampling square plots of 1 m<sup>2</sup> were chosen on the basis of homogeneity of vegetation cover. In each plot, topsoil was sampled from the A1 layer (0-10 cm) as follows. Four cubic soil sample replicates of 10 cm side were taken off and poured in plastic bags whereas one undisturbed soil sample was carefully cored with a stainless cylinder of 100 cm<sup>3</sup> (5.6 cm diameter, 4.05 cm height) to physical assays. Samples were immediately wrapped in polythene bags and stored in the cold room (4°C), prior to use.

Three cubic cores sampled from the three plots were air dried, sieved (<2 mm) and pooled to determine soils texture, cation-exchange capacity (CEC), exchangeable cations, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, pH, total organic carbon and nitrogen content. A second set of three other cubic cores sampled from the three plots was pooled for root dry biomass measurements per unit of volume. Root dry weight biomass was measured after washing and drying roots contained within a volume of 10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup>. A third set of three other cubic cores sampled from the three plots was pooled, carefully sieved at 2 mm without drying for microbial analysis.

In each site, one of the fourthly undisturbed cubic soil sample of 10 cm side was also collected for the study of the rhizosphere at a small observation scale. Three replicates of 25 to 30 cm<sup>3</sup> undisturbed rhizospheric soil–root systems (roots at the center of the sampled volume) were so carefully sampled at 1 cm depth and analysed thereafter. This rhizosphere characterization included its particle size distribution (> 2 mm rock fragments, 2-0.2 mm coarse sand and < 0.2 mm fine soil fraction) and water-stable > 0.2 mm aggregates.

Finally, the three cylindrical cores were separately used for determinations of bulk density and volumetric water content at field capacity.

### **I.3.4. Soil analysis**

Prior analysis of soil texture, soil samples were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to destruct the organic cement. Soil texture was determined (i) by successive sievings at 20 mm, 2 mm and 50 µm (using distilled water with this sieving mesh) for determining proportions of coarse rock fragments (20-100 mm), fine rock fragments (gravels: 2-20 mm) and sand (0.2-2 mm) and (ii) by sedimentation (Robinson pipette method) of the < 50 mm fraction for determining proportions of coarse silt (20-50 µm), fine silt (2-20 µm) and clay (<2 µm).

Cation-exchange capacity (CEC) and exchangeable cations (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) were obtained at pH 7 in CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> extract, and measured by ICP-MS (CNRS laboratory, Solaize, France). Soil pH was measured with glass electrode on soil sub-samples added with pure water or 1M KCl (10/25 w/v) 1h before pH measurement (McLean, 1982). Carbon and nitrogen content were measured using a Carlo Erba CHN Analyser.

Volumetric soil moisture at field capacity and bulk density ( $\rho_b$  in g cm<sup>-3</sup>) were both determined on the 100 cm<sup>3</sup> cylindrical soil cores by successive weighing of the wet and of the 105°C-dried soil core (Blake & Hartge, 1986). Total porosity ( $\Phi_t$ ), expressed in percentage of soil core volume as pores, was computed, assuming a mean particle density,  $\rho_p$ , of 2.6 g cm<sup>-3</sup> ( $\Phi_t \% = 1 - (\rho_b / \rho_p)$ ). We used the concept of hierarchical dual porosity suggested by Brewer (1964): (i) micropores between particles and microaggregates belonging to the elementary fabric units, called capillary porosity in this paper, and (ii) macropores between these units of fabric, referred to as effective porosity. Because the core samples were collected just after raining, volumetric soil moisture at field capacity represents the so-called ‘immobile’ water which moves slowly through the network of micropores (e.g. van Genuchten and Wierenga,



1976; Chen et al., 1993) and which fills capillary porosity occurring within soil aggregates. Effective porosity where rapid water transport occurred before sampling was determined as the difference between total porosity and capillary porosity.

Aggregates water-stability (WSA) was determined following the procedure described by Bartoli et al. (1991) adapted from Kemper and Rosenau (1986) applied to our heterogeneous rhizospheric soils (three replicas of rhizospheric soil-root system per site). Each rhizospheric soil-root system was added to distilled water (230 to 300 ml) in a wet-sieving machine composed of nine varnished brass sieves (height 70 mm, diameter 60 mm, wire aperture 200  $\mu\text{m}$ ) supported by a 600 mm diameter holder which vibrated regularly via a motor. Each rhizospheric soil-root system, put on a sieve, has its top immersed 5 mm in distilled water. The horizontal oscillations were sinusoidal with an amplitude of 2 cm and a frequency of 1.6 Hz, applied for a period of 1 hour. The mixture (G+CS+Ag) of gravels, coarse sands and  $>200 \mu\text{m}$  aggregates remaining on the sieve was oven-dried at  $105^\circ\text{C}$  for 48 h and carefully sieved at 2 mm for determining the gravelly rock fragment content leaving apart the mixture (CS+Ag) of coarse sand and  $>200 \mu\text{m}$  aggregates. From CS+Ag,  $>200 \mu\text{m}$  aggregates were removed by crushing them on an inox 200  $\mu\text{m}$  sieve. Triplicate proportions of water-stable  $> 200 \mu\text{m}$  aggregates was calculated by subtracting the  $105^\circ\text{C}$  oven-dried weight of CS+Ag from the  $105^\circ\text{C}$  oven-dried weight of coarse sand particles obtained by disrupting the water-stable aggregates by hand on an inox 200  $\mu\text{m}$  sieve. Because the observed heterogeneity in gravel and coarse sand contents, water-stable  $> 200 \mu\text{m}$  aggregates were also expressed as proportions of  $< 200 \mu\text{m}$  particles and microaggregates which were macro-aggregated. No estimation of WSA was realised on  $T-V_{1m}$ .

### **I.3.5. Microbial analysis**

#### *Acetylene reduction assay*

Nitrogenase activities in soils were determined using the acetylene to ethylene reduction technique (ARA) (Hardy *et al.*, 1968; Turner and Gibson, 1980). Five grams (equivalent dry weight) of each soil were placed in a sterile 150 ml flask and added with 2 ml of a solution containing glucose (1 mg C  $\text{g}^{-1}$  dry soil) and disodium malate (1 mg C  $\text{g}^{-1}$  dry soil), then the flask was tightly closed by a rubber stopper. The gaseous atmosphere was evacuated and replaced by a 90:10 mixture of air: acetylene ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ). and the flasks were incubated for 5 days at  $24^\circ\text{C}$ . Assays were performed in triplicates. On each day of

incubation, a 400µl aliquot of vessel atmosphere was withdrawn to measure the mass of ethylene produced by GC with a flame ionization detector. A lag phase (during 3 days) was observed, after which the rate of ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) production remained constant until day 5. Results were expressed as moles of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> released per gram soil.

#### *Catabolic diversity assay*

A primary determination of the basal metabolism of each sample was realized using the method described by Anderson and Domsch (1985). Briefly, two grams of soil of each sample (eq. dry weight) were put in McCartney bottles, humidified to 50 % water holding capacity (WHC) (with distilled water) and sealed with parafilm. After 6 days of incubation (25°C), solution of glucose was added so as to adjust the soil humidity to 100% WHC and to supply 0 (reference), 50, 100, 200 or 500 µg C g<sup>-1</sup> soil. The CO<sub>2</sub>-efflux from each sample was assessed using a Paraplot column gas chromatography (SRA analytical Instruments, MTI P200 Microsensor Technology Inc., Fremont, CA, USA) hourly within the six first hours (t<sub>0</sub> to t<sub>6</sub>).

The functional diversity of heterotrophic microbial communities was assessed using the catabolic response profile (CRP) methodology developed by Degens and Harris (1997). The variations (evenness) in CRPs were determined on three replicates of soil samples by measurement of the respiration responses to 21 organic substrates. The substrates used in the assay were: two amines (D-glucosamine, L-glutamine), three carbohydrates (D-glucose, D-mannose, sucrose), six amino acids (L-asparagine, L-serine, L-histidine, L-arginine, L-glutamic acid, L-cysteine), 8 carboxylic acids (citric acid, fumaric acid, malic acid, ascorbic acid, malonic acid, quinic acid, succinic acid, tartaric acid), one aromatic chemical (gallic acid) and one polymer (α-cyclodextrine). Two grams of soil of each sample (eq. dry weight) were put in McCartney bottles, humidified to 50 % WHC (with distilled water), sealed with vacutainer stoppers and incubated 6 day at 25°C. Then, each substrate was added to adjust the soil humidity to 100% WHC and to supply the carbon amount required to potentially recover the basal metabolism of the soil communities (see above). The CO<sub>2</sub>-efflux from each sample was assessed after mixing (vortex mixer, 15s, at 1-2 h and 10 min before measurement) using a Paraplot column gas chromatography after incubation of the bottles for 4 h at 25°C (Degens and Harris, 1997).

Catabolic diversity may be determined by both the richness and evenness of the use of substrates (Zak et al., 1994, Degens et al., 2000). Denges et al. (2000) defined richness as the number of substrates metabolised and evenness as the variability in substrate use. Catabolic evenness ( $E$ ) was evaluated by calculating Simpson-Yule diversity index ( $H$ ) and Shannon diversity index ( $D$ ).  $H$  was calculating as (Magurran, 1988):  $H = 1 / \sum pi^2$  and  $D = -\sum pi (\ln pi)$  where  $pi$  = ratio of respiration response on the  $i$ th substrate to the sum of catabolic responses on all substrates.

### **I.3.6. Statistical analysis**

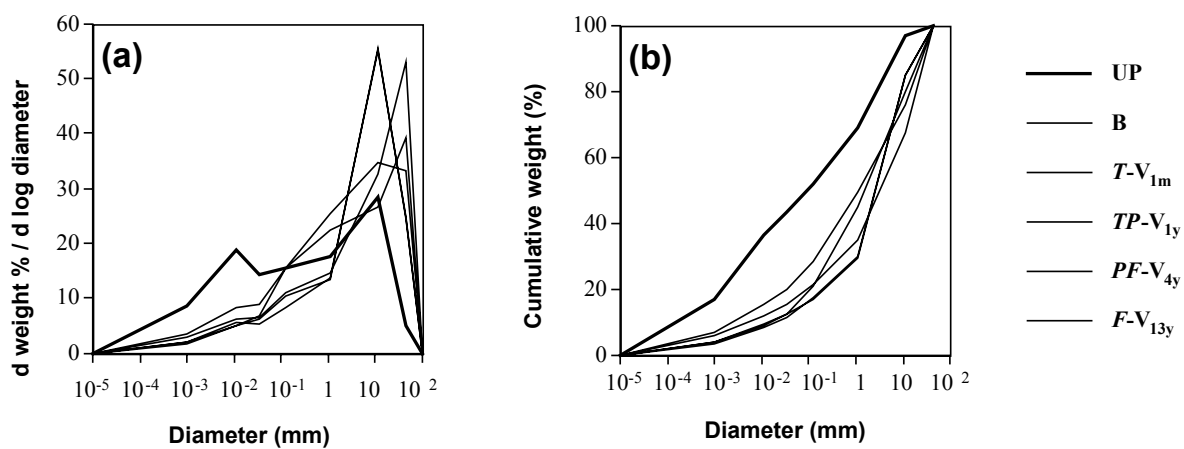
The significant difference between porosity values are given by t-test. The differences between ARA values, CRP's and the diversity indices were analyzed by the Mann-Withney test. Pearson's correlation was used to determine whether there were significant linear relationships between measured soil properties and heterotrophic evenness (Statistica 5.5, Statsoft Inc).

## **I.4. Results**

### **I.4.1. Soil texture**

At observation scale to the cubic samples (equivalent cubic side of 145 mm), particle size distribution of the climacic grassland (Up) topsoil was characterized by a complex bimodal broad distribution centred at 0.01 and 10 mm (figure I.1a.) leading to a median particle diameter of 0.08 mm. In contrast, median particle diameters of the bare topsoil and of the restored topsoils approximately corresponded to the main particle distribution peaks: 4.6 mm, 4.6 mm, 2.2 mm, 1.1 mm and 5.7 mm for the disturbed bare soil (B) and the restored ski area chronosequence ( $T-V_{1m}$ ,  $TP-V_{1y}$ ,  $PF-V_{4y}$  and  $F-V_{13y}$ ), respectively. Particle size distributions of all the bare and restored soils were characterised by a relatively narrow distribution centred within a 1 to 10 mm diameter range and a tail or a shoulder for finer diameters (figure I.1a). This tail corresponded to the slow increase of the cumulative particle

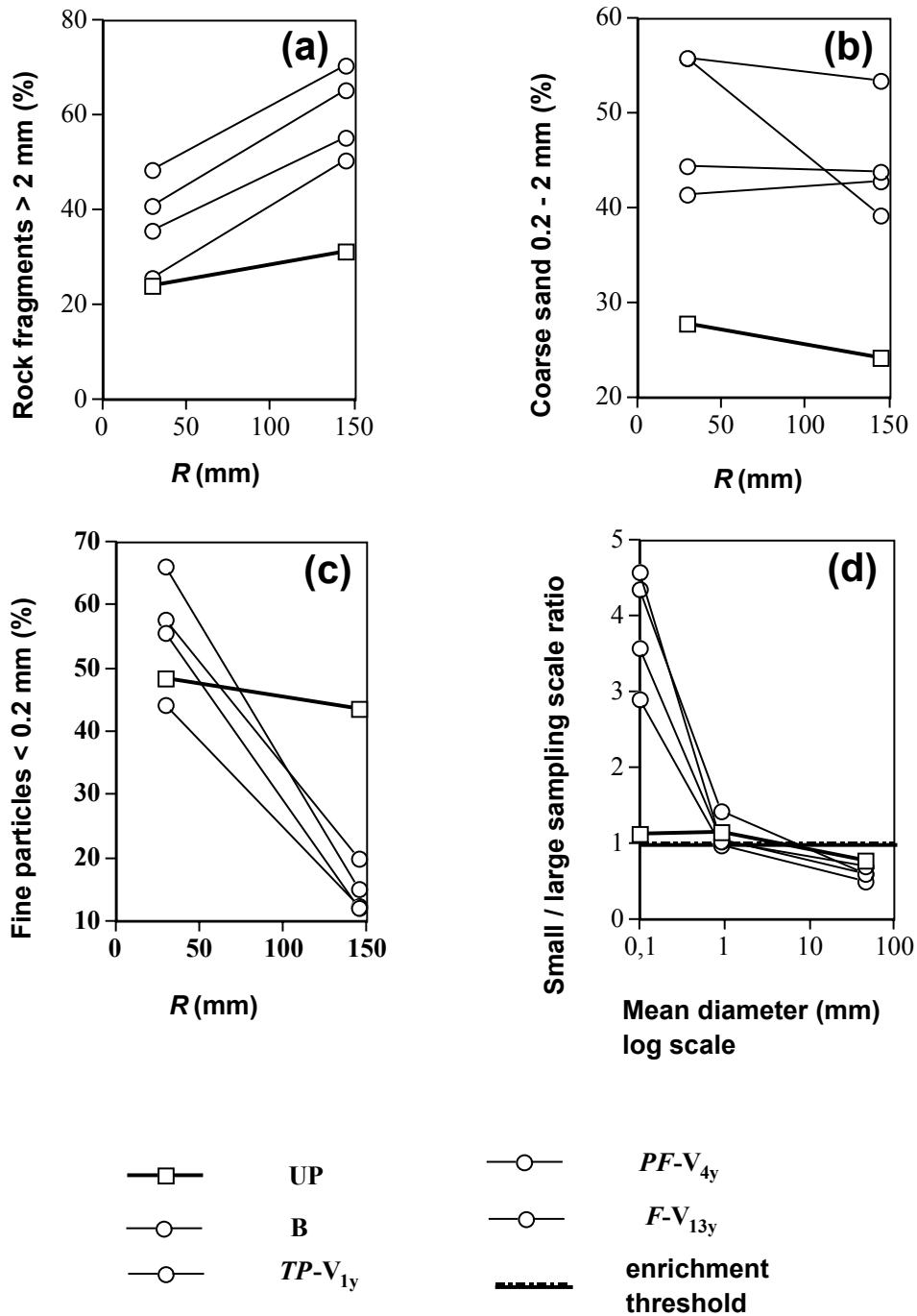
size curve up to a diameter threshold value ranging from 1 to 10 mm (figure I.1b.). In contrast, median particle diameters of the bare topsoil and of the restored topsoils approximately corresponded to the main particle distribution peaks: 4.6 mm, 4.6 mm, 2.2 mm, 1.1 mm and 5.7 mm for the disturbed bare soil (B) and the restored ski area chronosequence ( $T-V_{1m}$ ,  $TP-V_{1y}$ ,  $PF-V_{4y}$  and  $F-V_{13y}$ ), respectively. Particle size distributions of all the bare and restored soils were characterised by a relatively narrow distribution centred within a 1 to 10 mm diameter range and a tail or a shoulder for finer diameters (figure I.1a.). This tail corresponded to the slow increase of the cumulative particle size curve up to a diameter threshold value ranging from 1 to 10 mm (figure I.1b.).



**Figure I.1.** : Particle size distribution ( $d \text{ weight } d \log \text{ diameter}^{-1}$ ) at large observation scale of studied soils (a) and cumulative particle size curve(b).

We also characterized the soil texture at equivalent cubic side of 30 mm (rhizosphere scale) The results were as follows. Amounts of  $< 0.2$  mm fine fraction, of  $0.2 - 2$  mm coarse sand and of  $> 2$  mm rock fragments were nearly the same for the small and large observation scale Up soil samples (figure I.2.). Similarly, coarse sand contents of the bare and the restored soil samples were nearly equivalent whatever was the observation scale (figures I.2b. and I.2d.). In contrast, for the bare and restored soils, amounts of  $> 2$  mm rock fragments increased from the small to the large observation scale (figure I.2.). This was attributed to a better capture of the particle size distribution at 145 mm than at 30 mm observation scale. However the selected large observation scale should not be yet totally representative, a plateau at larger observation scale being expected from figure I.2a. Conversely, proportions of

< 0.2 mm fine fraction was 3 to 5 times larger in the rhizospheric soil (“hot spots”) than in its large observation scale soil counterpart (figures I.2c. and I.2d.).



**Figure I.2 :** Particle size distribution at small observation scale (a) rock fragment content, (b) coarse sand content, (c) fine particle content, and scale change observation on distribution (d).

Finally, from particle size distributions of only the < 2 mm soil fraction, textural class for soils was Loam for the climacic grassland (Up) and Sandy Loam for disturbed bare soil (B) and restored ski areas ( $T-V_{1m}$ ,  $TP-V_{1y}$ ,  $PF-V_{4y}$  and  $F-V_{13y}$ ). Particle size distributions (PSD) (Table 2) shown an average increase of 69% of sand content within degraded soils compared to undisturbed soil (Up). Clay contents have decreased within B (-47 %) and during the first year of restoration ( $T-V_{1m}$ : -58 %;  $TP-V_{1y}$ : -66 %).

**Table I.2.** : Main characteristics of top soil samples

Situation	Mechanical analysis				C	N	C/N	pH (H <sub>2</sub> O)	Exchangeable cations				Sat.
	Sand	Silt	Clay	Gravel					Ca	Mg	K	Na	
	% (< 2000 $\mu$ )			% (whole soil)	mg g <sup>-1</sup>			cmole <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>				%	
UP	36.6	38.7	24.7	31.3	5.6	0.47	12	4.5	0.78	0.38	0.35	0.003	8
B	58.8	28.0	13.1	70.4	2.7	0.27	10	5.2	2.5	0.22	0.37	0.0015	34
$T-V_{1m}$	61.3	27.8	10.9	70.2	2.5	0.25	10	5.3	2.6	0.61	0.57	0.003	47
$TP-V_{1y}$	72.5	19.1	8.5	55.1	1.3	0.17	7.6	5.4	1.43	0.16	0.26	0.0015	31
$PF-V_{4y}$	60.0	26.2	13.9	50.5	1.5	0.15	10	5.7	1.53	0.18	0.35	0.0015	40
$F-V_{13y}$	56.5	27.3	16.3	65.0	7.8	0.3	26	5.1	1.14	0.14	0.14	0.0015	9

#### I.4.2. Soil structure

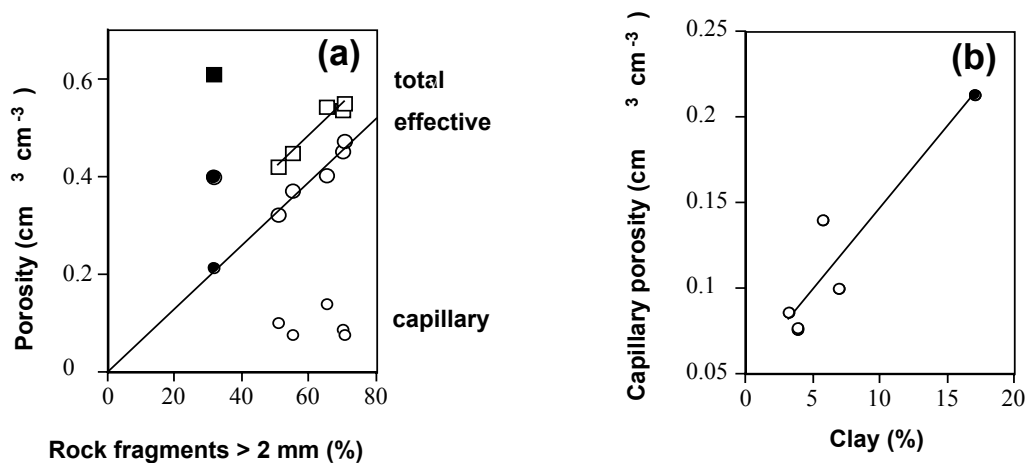
##### *Total, effective and capillary porosity*

Total porosity values ranged from 42 and to 61 % of soil volume in the topsoils (Table I.3.). No significant difference was observed between Up and B,  $T-V_{1m}$  or  $F-V_{13y}$ . A significant decrease of the total porosity was observed for  $TP-V_{1y}$  (-26.7 %) and  $PF-V_{4y}$  (-31 %) compared with Up ( $P < 0.05$ ).

**Table I.3.** : Plot scale soils attributes

Site	Root dry biomass	Total Porosity	Soil moisture	
	g dm <sup>-3</sup>	%	g dm <sup>-3</sup>	% < 2000 μm
UP	2.6 ±0.68	61.1 ±6.9	21.56	33.2 ±6.01
B	0.00	54.9 ±2.2	9.11	8.5 ±3.53
<i>T-V</i> <sub>1m</sub>	0.3 ±0.02	53.8 ±1.9	10.38	8.7 ±3.18
<i>TP-V</i> <sub>1y</sub>	3.2 ±0.29	44.8 ±4.4	10.42	11.5 ±2.82
<i>PF-V</i> <sub>4y</sub>	2.9 ±0.95	42.2 ±1.3	15.21	18.2 ±3.88
<i>F-V</i> <sub>13y</sub>	26.9 ±8.05	54.4 ±1.37	16.85	10.2 ±3.18

A positive correlation between total porosity and proportion of > 2 mm coarse rock fragment was found for the ski run soils ( $p < 0.01$ ) (figure I.3a.). Another positive correlation, including the climacic reference soil, was found between the effective porosity and the proportion of > 2 mm coarse rock fragments ( $p < 0.01$ ) (figure I.3a.) with the same slope. The restored soil total porosity vs rock fragment content straight line but passing by the origin. By contrast no relationship was found between the capillary porosity and the rock fragment content (figure I.3a.). Capillary porosity occurring within soil aggregates was positively correlated with clay content, (figure I.3b.).



**Figure I.3.** : Soil porosity changes: (a) relationships between rock fragment proportions and three hierarchical porosity, (b) linear relation between capillary porosity and clay content.

### *Water stable aggregates*

Mean proportion of water-stable aggregates was low for the bare soil (11.5 %) and in the same order of magnitude for the Up soil (46.5 %) and the *TP-V<sub>1y</sub>*, *PF-V<sub>4y</sub>* and *F-V<sub>13y</sub>* restored soils (35.4 %, 46.9 % and 32.4 %, respectively).

#### **I.4.3. Soil chemistry (total carbon and nitrogen contents, CEC)**

Carbon and nitrogen contents decreased along the chronosequence by 44% for B to *T-V<sub>1m</sub>* compared to Up (Table I.2.). By contrast, C and N contents were the highest in the older site (*F-V<sub>13y</sub>*). In that site, soil organic matter content was higher than that of the UP site. Whatever the site. Carbon and nitrogen content were significantly correlated with plant root biomass ( $r=0.94$ ;  $P < 0.05$ ). Root biomass of the older site was multiplied by 10 compared to the undisturbed grassland site (Table I.3.).

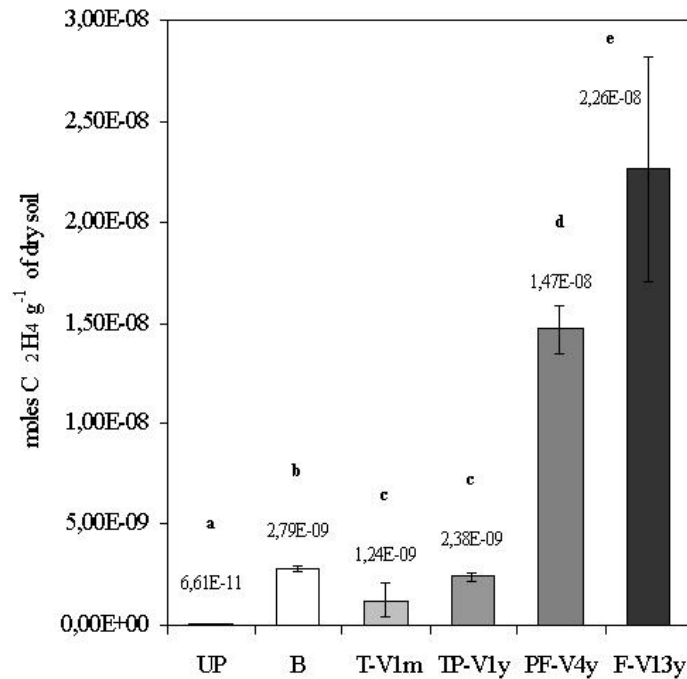
Cation exchange capacity (CEC) (Table I.2.) of B and *T-V<sub>1m</sub>* soils decreased by 49% compared to Up. During the later stage of the restoration (*TP-V<sub>1y</sub>* and *PF-V<sub>4y</sub>*), CEC values decreased by 67.5 % compared to Up. CEC value became not significantly different from the undisturbed soil in *FV<sub>13y</sub>* (respectively 16.4  $\text{cmole}_c \text{ Kg}^{-1}$  and 14.4  $\text{cmole}_c \text{ Kg}^{-1}$ ). Cation exchange capacity was significantly correlated with clay amount ( $r = 0.86$ ;  $P < 0.05$ ) and carbon content ( $r = 0.97$ ;  $P < 0.05$ ) in soils of the chronosequence. (data not shown).

#### **I.4.4. Microbial activities**

##### *Potential atmospheric N<sub>2</sub> fixation*

The potential N<sub>2</sub> fixation values were consistently higher in the bare and revegetated soils than in undisturbed situation (Up) (Figure I.4.). This potential was very low in Up soil (6.61 E-11 mol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>) and it significantly increased in ski run parent material (B) (2.79 E-9 moles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>;  $P < 0.05$ ). The potential amount of N<sub>2</sub> fixed in the first restoring step (*T-V<sub>1m</sub>*) was significantly decreased (-55%) compared with B, but remained higher than in Up. The ARA values reached 1.47 E-8 and 2.26 E-8 moles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> for *PT-V<sub>4y</sub>* and *F-V<sub>13y</sub>*, respectively. Maximum potential N<sub>2</sub> fixation was recorded for the older restored site, ARA value being multiplied by 342 compared to Up.





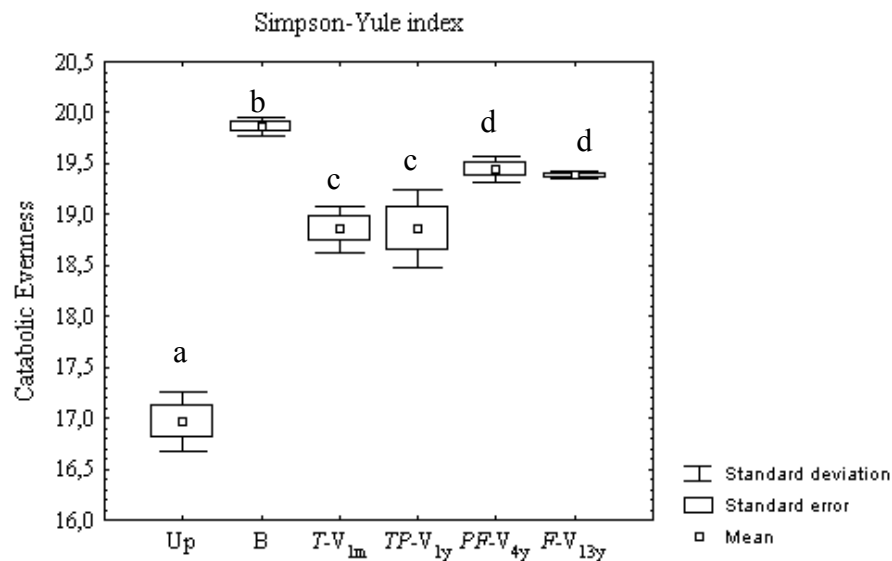
**Figure I.4.** : Potential N<sub>2</sub> fixation from soils (moles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> soil). Values followed by the different letters differ significantly according to t test ( $P < 0.05$ ). Bars represent standard deviations.

Value of ARA and soil gravimetric moisture were highly correlated in linear regression ( $r = 0.98$ ;  $P < 0.005$ ;  $n = 5$ ), values increasing with age in all restoring soils. Potential N<sub>2</sub> fixation was also correlated to organic C content and root biomass,  $r = 0.97$  ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$ ) and  $r = 0.99$  ( $P < 0.01$ ;  $n = 4$ ), in restoring soils except for the 4-year old site.

#### *Catabolic responses and evenness in bare soil and vegetated soils*

A great change in CRP's were observed between Up soil and all others ski-run area chronosequence soils (bare and vegetated soils) (data not shown). The change in CRP's of disturbed soils were attributed to a great and highly significant decrease on catabolic responses for all substrates ( $P < 0.0001$ ) compared with Up soil. Major CO<sub>2</sub>-efflux decreases between Up and B samples were measured for the three carbohydrates (glucose: -82 %, mannose and sucrose: -76 % each), and for three of six used amino acids (ascorbic acid: -86 %, fumaric acid: -81 % and malic acid: -85 %). Restoration chronosequence effect on catabolic response was marked by the greatest decrease occurring for TP-V<sub>1y</sub> CRP on 21

substrates, then by a slightly but significant positive response ( $P < 0.05$ ) on 14 substrates for  $PF-V_{4y}$  sample and on 15 substrates for  $F-V_{13y}$  sample.



**Figure I.5.** : Responses to catabolic evenness to soil disturbances and restoration chronosequence. Values followed by the different letters differ significantly according to Mann Withney test ( $P < 0.05$ ).

Catabolic evenness ( $E$ ) evaluated by Simpson-Yule diversity index ( $H$ ) within all ski-run area chronosequence soils were greater than in the undisturbed pasture (Up) soil with perennial vegetation (Figure I.5.). For undisturbed soil, the catabolic evenness was 17, whereas within bare soil and vegetated chronosequence soil, evenness averaged 19.3 (range: 18.9-19.9). The hard disturbances produced by ski-run construction caused a great increase by up to 2.9 units in catabolic evenness in the bare soil (B). One month after the disturbance, the catabolic diversity slightly (but significantly) decreased in the first vegetated soil ( $T-V_{1m}$ ) and remains stable one year after the disturbance ( $TP-V_{1y}$ ). Others significant changes in  $E$  within vegetated chronosequence soils were measured for the two older soils which showed a similar and significant increase of the catabolic evenness by up to 0.6 unit compared with  $TP-V_{1y}$ . Similar patterns were obtained by calculating Shannon's diversity index ( $D$ ) (data not shown).  $D$  of disturbed soils were highly negatively correlated with fine sand content ( $r = -0.97$ ,  $P < 0.005$ ,  $n=5$ ). We measured for the four vegetated degraded sites a positive linear correlation between  $D$  and soil gravimetric moisture (GM) ( $r = 0.91$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ).

## I.5. Discussion

Restoration of ski-runs or, to use a more precise word, rehabilitation of ski runs, meaning the action of restoring to a previous condition or to begin the vegetational dynamic process. Restoration without reaching the previous status (Bradshaw, 1997) is the objective of many studies being soil erosion dangerous in many interested areas and being the alpine landscape evidently damaged (Dinger, 1997), and being herbaceous plant colonization strategies (Urbanska, 1995). This paper is the first attempt to investigate the evolution of soil biological functioning after a ski-run construction and during the rehabilitation chronosequence. In a sub-alpine grassland of the French Alps, we examined the functional diversity and N<sub>2</sub>-fixation activity of whole soil bacteria in relation to physical factors and plant colonization.

### *Soil development and organisation after disturbances and along the restoration chronosequence*

The main characteristics of the undisturbed soil under perennial vegetation are a medium particle size distribution defining the textural class of Up soil as Loam, a favourable amount of clay (24.7 %) and total carbon (5.6 %) for a consecutive stability of aggregation, a good cation exchange capacity (16.9 cmole<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) but highly unsaturated. Our results showed that disturbance result in great changes in such parameters, particularly in particle size distribution and carbon amount, influencing the structural properties such as porosity and aggregate stability.

In our study, the degraded soils are characterised by the abundance of coarse mineral particle of the gravel size (> 2 mm). The Increase of coarse material (> 2 mm dia) and sand particles content in the degraded soils (bare soil and restored ski area soils), resulted from the mechanical crushing of stones during the ski-runs construction. A similarly impact of stones crushing was observed on the fractions < 0.2 mm isolated from the rhizosphere. This accumulation of fine particles may originate from the rhizospheric effect, these particles being glued together by root exudates (Chenu and Robert, 1992). Moreover, root growth and physiology produced some particular soil physical properties around the root as strong amplitude of dry-wet cycles usually result in increased strength linking soil particles (Lafond et al., 1992). Because of the physical forces exerted by root growth and by localized drying

caused by water uptake (Kay, 1990; Oades, 1993), root density plays a role in determining aggregate size. The drying of soil by roots together with the organic binding material produced in the rhizosphere (Oades, 1993) is expected to enhance soil structural stability.

A major evolution of soil texture within restored chronosequence soils occurred for the finer particles (silts and clays) content that increased for the two older situations (*PF-V<sub>4y</sub>* and *F-V<sub>13y</sub>*). Ley et al. (2001) have showed that the vegetated high altitude talus slopes, compared with proximate uncover barren soil, had greatest percentage of silts and clays. Chemical weathering processes which are typically the result of organic acid production by plants and associated microbes (Gerrard, 1992) could be advocated to explain this enrichment in fine particles. Because plant biomass is lesser for *PF-V<sub>4y</sub>* site than for *F-V<sub>13y</sub>*, we assumed that the difference between sites could also be due to their position in the slope, the intensity of erosion or accumulation being related to that position. Although chemical weathering is generally considered a minor process in periglacial regions recent research suggested that it is as important as physical weathering in many arctic–alpine areas (Darmody and Thorn, 1997; Darmody et al., 2000). Thus, we hypothesised that this chemical process occurring only for the 13-yr old soil, may be strongly supplemented by a physical weathering process due to the climatic action. Indeed, the frequent alternate periods of freezing and thawing at these high altitudes may be a major factor of the weathering of the acidic metamorphic bedrock and enhance the clay-size particles content. The subsurface physical weathering process of the bedrock was favoured in ski runs soils by the mechanical crushing of the stones. Our result showed that the initial mechanical treatment enhance the coarse fragments and sand contents. It is well known that rock bodies which are massive and free of fissures will therefore be less sensitive to weathering than those highly fractured or granularly crushed (Selby, 1993). Physical breakdown of the black schist, rich in metamorphized carbon (lignite), may be the second factor with plant root colonisation responsible for the great increase in the total carbon content into the *F-V<sub>13y</sub>* soil.

The increase in the content of rock fragments was similarly correlated to the decrease in the bulk density of the fine earth (Stewart *et al.*, 1970; Torri *et al.*, 1994). This was attributed by the extra porosity resulting from contact between the stones and the fine earth, which in turn occurred because the space between the rock fragments is incompletely filled by fine earth or because the stones prevent the microaggregates from packing (Stewart *et al.*, 1970; Poesen and Lavee, 1994). In contrast, capillary porosity occurring within soil aggregates and positively correlated with clay content, may be attributed to the interfacial microaggregation key role played by clays. So our results evidenced the key role in our

evolutionary system of the rock fragments supply vs fine earth depletion and clay particles content on the structural organisation of soils. Aggregates stability was affected by ski run constructions and the key point is that only after one year of restoration of aggregate stability occurred with the increasing content of clay particles and the great colonisation of plant roots.

*Specific microbial properties into a climacic grassland soil at high altitudes*

Our results concerning both nitrogenase activity and catabolic diversity highlighted the specific microbial pattern of a climacic grassland soil at high altitudes. The studied area is characterised by a relatively stressful climate with low temperatures, short growing seasons and by hard soil conditions such as low soil pH and heavily sequestrate organic carbon into stable aggregates. These conditions can be considered as major limiting factors of the microbial growth and activities, resulting in communities structure substantially different from those in other grassland soil ecosystems.

A very low nitrogenase activity was recorded in the undisturbed soil. This suggests either that the activity of free ? nitrogen fixing bacteria is limited by physical factors, or that the N<sub>2</sub> fixation at high altitudes into a climacic grassland soil is not related to N supply. At high altitudes, N demand is low because plant growth is limited by the short growing season and low temperature (Jeager et al., 1999). Moreover, Jacot et al. (2000) reported that symbiotic N<sub>2</sub> fixation in high altitude did not constitute a predominant N supply into the system. They concluded that at a medium altitude (1380 m a.s.l.) N mineralization appears to be the main source of N for growth of the sward, whereas at high altitude (2100 m a.s.l.) N from symbiotic N<sub>2</sub> fixation and wet deposition appear to be of a similarly important as soil N mineralization. Moreover, nitrogen fixation is an activity requiring a high energy and soil acidity is an important factor affecting N<sub>2</sub> fixation (Tamm, 1990). Then, we assumed that at low soil pH (4.5) and great proportion of probably sequestrate carbon form of an alpine soil may are pertinent factors which determine the low efficiency of nitrogen fixation into a high altitude soil. Therefore low soil pH and carbon availability, substantially N supply by symbiotic N<sub>2</sub> fixation and low N demand in these extreme ecosystems, likely resulted in low N<sub>2</sub> fixation by free-living bacteria.

These physicochemical edaphic properties seem to control not only the N<sub>2</sub> fixation but also the heterotrophic catabolic evenness. Our results showed a low catabolic diversity (H = 17) into the soil under a climacic perennial grassland. The observed low microbial diversity in our undisturbed alpine soil may be attributed to a decrease in the variability of resources (Schipper et al., 2001). This is consistent with Wardle et al. (1999) who suggested that the

heterogeneity of microbial substrates could be an important determinant of the microbial community. Great catabolic responses were recorded for energy rich and easily degradable substrates such as glucose and sucrose, and some N rich amino acids substrates. These results support the hypothesis that the main limiting factors of the microbial diversity is at the same time the low carbon availability because probably sorbed to clay surface and protected against microbial attacks, and the low fresh organic matter input into soils at this high altitude where plant productivity is relatively poor. Low carbon availability can act as stress factor particularly important in cold environment because heterotrophic organisms rely on carbon compounds for their energy requirements (Othonen et al., 1999).

#### *Microbial activities responses to disturbances and rehabilitation steps*

Soil microbial activity is largely controlled by physical and chemical conditions in the soil resulting from management practices such as tillage (Doran and Linn, 1994). Our results suggest that ski run construction, then ski runs rehabilitation processes induced a wide and long lasting changes of soil microbial attributes. We found that ski run construction promotes aggregate breakdown which could induced the release and subsequent degradation of previously protected organic matter. Potential dinitrogen fixation increased in same range into bare soil and during the first year of the restoration, then strongly increased in the later succession steps. Despite the fact that total carbon content decreased in bare soil compared with undisturbed soil, the coarse texture, the clay losses, and the aggregates weakness show that the protected organic matter is became available for micro-organisms. Moreover, soil pH elevation may be favourable for microbial growth and activities into the bare soil. We found a positive correlation between ARA values and soil C content, root biomass and soil moisture. The evolution of physical properties during the restoration chronosequence was marked by an increase of clay content correlated with capillary porosity. Capillary porosity represents micropores between particles and microaggregates belonging to the elementary fabric units. Volumetric soil moisture at field capacity represents the so-called 'immobile' water which moves slowly through the network of micropores (e.g. van Genuchten and Wierenga, 1976, Chen et al., 1993) and which fills capillary porosity occurring within soil aggregates. Nitrogen fixation is a reduction process, performed by enzymes highly sensitive to the presence of oxygen. Thus nitrogenase activity during the restoration chronosequence may be stimulated by the slightly increase of soil moisture content in the microporosity (Merrick and Edwards, 1995). No correlation was found between pH of restored chronosequence soils and ARA values suggesting that in alpine grassland soils soil organic matter and soil moisture may be

of greater importance in regulating nitrogen fixation activity than soil pH. This finding is consistent with Zeller et al. (2001) who also found that changes in soil microbial biomass C was not correlated with soil pH, but were influenced more by organic matter quality. Nevertheless, we must be prudent because a correlation is not an explicative result and because a hidden factor may be used in these processes.

Ski runs construction induced an increase of the catabolic diversity but also a decrease of the catabolic responses for all used organic substrates. Ski runs construction have initiated changes in many abiotic factors that are known to affect soil microbiology. The rapid and durable increase in heterotrophic evenness reflects the ubiquity of heterotrophic microorganisms and their rapid growth rates once carbon resources becomes available (Degens et al., 2000). We assumed that initial soil disturbances as well as other restored stage successions created some diversified microbial habitats by changing in structural properties and provided easy degradable organic matter which would encourage the growth of more generalist and fast-growing microbial community in soils, r-selected microbes with high catabolic evenness. Consequently, the high catabolic diversity in older restored soils was probably maintained by the constant evolution of soil structure during the restoration chronosequence as well as C input by plant roots colonisation. Nevertheless, our results showed that the increase of microbial functional diversity is not necessary related with an increase of the catabolic responses. Indeed, soil disturbances induced a disproportional decrease of the organic C decomposition rates (both degraded soils compared with undisturbed soil) for all used organic substrates. Soil disturbances may result in a great reduction in the population size due to the dessiccation, mechanical destruction, soil compaction and reduced pore volume. Moreover, we have found a low catabolic evenness in the undisturbed soil (see above), suggesting a large presence of K-strategists in this soil which are know to be highly sensitive to environmental changes. This hypothesis is supported by the fact that microbial communities in soil with low catabolic evenness are less likely to be resist to acute changes in soil conditions (Degens et al. 2000). The significant increase of catabolic response for a majority of organic substrates within the older restored soils (13-yrs old) may underline the come back to an initial bacterial functioning.

The changes in soil structure and in C availability represent the major components of bacterial functioning of climacic, heavily degraded and restored alpine soils. They control the microbial activities and heterotrophic functional diversity. Our results show a specific microbial pattern of climacic alpine soil with low non-symbiotic nitrogen fixation activity and low heterotrophic functional diversity. The microbial population of these stable ecosystems is

characterised by a dominance of K-strategists micro-organisms. The K-strategists of stable habitats are sensitive species of equilibrium. The effects of soil organisation changes caused by the ski run construction works on bacterial properties are largely dependent of the initial sensitivity of the ecologically stable soil. In accordance with the positive relationships between catabolic evenness and ecosystem function, our data suggests that in the early stage of ecosystem restoration (< 13-yrs old) the microbial population is unstable, being dominated by opportunists micro-organisms. Our results suggest also that there are probably positive linkages between proceeded changes in the structure of the bacterial communities and changes of microbial habitats, such as aggregate-sizes habitats and rhizosphere soils.

### **Acknowledgements**

Financial support of R. GROS was provided by the French "Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME)". Funding for this research was supported by the Programme National de Recherches Sols et Erosion ACI " Ecologie Quantitative Biogéochimie des sols" (INSU). The technical assistance of Mr Saidou SALL (IRD, Dakar) for CRPs determinations is greatly acknowledged.

## **I.6. References**

- Anderson, J. P. E. and K. H. Domsch. 1985. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **17**:197-203.
- Adu, J. K. and J. M. Oades. 1978. Physical factors influencing decomposition of organic matter in soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry* **10**:89-115.
- Bartoli, F., R. Philippy, M. Doirisse, S. Niquet and M. Dubuit. 1991. Structure and self-similarity in silty and sandy soils : the fractal approach. *Journal of Soil Science* **42**:167-185.
- Blake, G. R. and K. H. Hartge. 1986. Particle density. Pages 377-382 *In* A. Klute, editor. *Methods of soil analysis. Part 1*, 2<sup>nd</sup> edn. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Bowman, W. D., T. A. Theodose, J. C. Schardt and R. T. Conant. 1993. Constraints of nutrient availability on primary production in two alpine tundra communities. *Ecology* **74**:2085-2097.



Bradshaw, A. D. 1997. What do we mean by restoration?. Pages 8-4 *In* K. M. Urbanska, N. R. Webb and P.J. Edwards, editors. Restoration Ecology and sustainable development. Cambridge University Press, Cambridge.

Brewer, R. 1964. Fabric and Mineral Analysis of Soils. John Wiley & Sons, New York.

Brimecombe, M. J., F. A. De Leij and J. M. Lynch. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. Pages 95-141. *In* R. Pinton, Z. Varanini and P. Nannipieri, editors. The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, Inc., NY.

Calderón, F. J., L. E. Jackson, K. M. Scow and D. E. Rolston. 2000. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **32**:1547-1559.

Cambardella, C. A. and E. T. Elliot. 1994. Carbon and nitrogen dynamics of soil organic matter fractions from cultivated grassland soils. *Soil Science Society of America Journal* **58**:123-130.

Cihacek, L. J. and M. G. Ulmer. 1995. Estimated soil organic carbon losses from long-term crop-fallow in the northern Great Plains of the USA. Pages 85-92 *In* R. Lal et al., editors. Advances in soil science: Soil management and greenhouse effect. Lewis publishers, CRC Press, Boca Raton, FL.

Chan, K. Y., A. M. Bowman, W. Smith and R. Ashley. 2001. Restoring soil fertility of degraded hardsetting soils in semi-arid areas with different pastures *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**:507-514.

Chen, C., D. M. Thomas, R.E. Green and R. J. Wagenet. 1993. Two-domain estimation of hydraulic properties in macropore soils. *Soil Science Society of America Journal* **57**:680-686.

Darmody, R. G. and C. E. Thorn. 1997. Elevation, age, soil development, and chemical weathering at Storbreen, Jotunheimen, Norway. *Geographical Annals* **79**:215-222.

Darmody, R. G., C. E. Thorn, R. L. Harder, J. P. L. Schlyter and J. C. Dixon. 2000. Weathering implications of water chemistry in an arctic-alpine environment, northern Sweden. *Geomorphology* **34**:89-100.

Degens, B. P. and J. A. Harris. 1997. Development of a physiological approach to measuring the metabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **29**:1309-1320.

Degens, B. P., L. A. Schipper, G. P. Sparling and M. Vojvodic-Vukovic. 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **32**:189-196.

Dinger, F. 1997. Végétalisation des espaces dégradés en altitude. Cemagref, Grenoble.

- Doran, J. W. and D. M. Linn. 1994. Microbial ecology of conservation management systems. Pages 1-27 *In* J. L. Hatfield and B. A. Stewart, editor. *Soil Biology: effect on soil quality*. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- Doran, J. W., D. C. Coleman, D. F. Bezdincek and B. A. Stewart. 1994. Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA special publication no. 35. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, Wisconsin.
- Elliot, E. T. 1986. Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. *Soil Science Society of America Journal* **50**:627-633.
- Garcia, C., T. Hernandez, A. Roldan, A. Martin. 2002. Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. *Soil Biology and Biochemistry* **34**:635-642.
- Gee, G. W. and J. W. Bauder. 1986. Particle size analysis. Pages 383-411 *In* A. Klute, editor. *Methods of soil analysis, part 1*, 2nd edition. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Gerrard, J. 1992. *Soil geomorphology: an integration of pedology and geomorphology*. Chapman & Hall, London.
- Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson and R. C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation-laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* **43**:1185-1207.
- Haynes, R. J. and R. S. Swift. 1990. Stability of soil aggregates in relation to organic constituent and soil water content. *Journal of Soil Science* **41**:73-83.
- Jacot, K. A., A. Lüscher, J. Nösberger and U. A. Hartwig. 2000. The relative contribution of symbiotic N<sub>2</sub> fixation and other nitrogen sources to grassland ecosystems along an altitudinal gradient in the Alps. *Plant and Soil* **225**:201-211.
- Jaeger, C. H., R. K. Monson, M. C. Fisk and S. K. Schmidt. 1999. Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology* **80**:1883-1891.
- Jastrow, J. D., R. M. Miller and J. Lussenhop. 1998. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregates stabilization in restored prairie. *Soil Biology and Biochemistry* **30**:905-916.
- Jocteur Monrozier, L., J. N. Ladd, R. W. Fitzpatrick, R. C. Foster and M. Raupach. 1991. Components and microbial biomass content of size fraction in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* **49**:37-62.
- Kay, B.D. 1990. Rates of changes of soil structure under different cropping systems. *Advances in Soil Science* **12**:1-52.

- Kemper, W. D. and R. C. Rosenau. 1986. Aggregate stability and size distribution. Pages 425-442 *In* A. Krute, editor. *Methods of Soil Analysis, part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Agronomy monograph 9, 2nd edition. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison.
- Kladivko, E. J. 2001. Tillage systems and soil ecology. *Soil and Tillage Research* **61**:61-76.
- Ladd, J. N., R. C. Foster and J. O. Skjemstad. 1993. Soil structure: Carbon and nitrogen metabolism. *Geoderma* **56**:401-434.
- Lafond, J., D. A. Angers and M. R. Laverdière. 1992. Compression characteristics of a clay soil as influenced by crops and sampling dates. *Soil and Tillage Research* **22**:233-241.
- Ley, R. E., D. A. Lipson and S. K. Schmidt. 2001. Microbial biomass in barren and vegetated high altitude talus soils. *Soil Science Society of America Journal* **65**:111-117.
- McLean, E. O. 1982. Soil pH and lime requirement. Pages 1999-224 *In* A.L. Page et al., editors. *Methods of soil analysis. Part 2*. 2<sup>nd</sup> edition. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Merrick, M. J. and R. A. Edwards. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Review* **59**:604-622.
- Muller, S., T. Dutoit, D. Alard and F. Grevilliot. 1998. Restoration and rehabilitation of species-rich grassland ecosystems in France: a review. *Restoration Ecology* **6**:94-101.
- Munshower, F. F. 1994. *Practical handbook of disturbed land revegetation*. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
- Oades, J. M. 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* **56**:377-400.
- Ohtonen, R., H. Fristze, T. Pennanen, A. Jumpponen and J. Trappe. 1999. Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. *Oecologia* **119**:239-246.
- Rosset, M., M. Montani, M. Tanner and J. Fuhrer. 2001. Effects of abandonment on the energy balance and evapotranspiration of wet subalpine grassland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **86**:277-286.
- Salve, R. and B. Allen-Diaz. 2001. Variations in soil moisture content in a rangeland catchment. *Journal of Range Management* **54**: 44-51
- Sanchez-Maranon, M., M. Soriano, G. Delgado and R. Delgado. 2002. Soil quality in Mediterranean mountain environments: effects of land use. *Soil Science Society of America Journal* **66**:948-958.

- Selby, M. J. 1993. Hillslope materials and processes-2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Shipper, L. A. and G. P. Sparling. 2000. Performance of soil condition indicators across taxonomic groups and land uses. *Soil Science Society of America Journal* **64**:300-311.
- Schipper, L. A., B. P. Degens, G. P. Sparling, L.C. Duncan. 2001. Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. *Soil Biology and Biochemistry* **33**:2093-2103.
- Soil Survey Staff. 1994. Keys to soil taxonomy, sixth edition. USDA, Washington.
- Sparling, G. P. 1995. The substrate-induced respiration method. Pages 397-404 *In* K. Alef and P. Nannipieri, editors. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London.
- Staben, M. L., D. F. Bezdicek, J. L. Smith and M. F. Fauci. 1997. Assessment of soil quality in conservation reserve program and wheat fallow soils. *Soil Science Society of America Journal* **61**:124-130.
- Tamm, C. O. 1990. Nitrogen in terrestrial ecosystems: Question of productivity, vegetational changes and ecosystem stability. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York.
- Tisdall, J. M., B. Cockroft, N. C. Uren. 1978. The stability of soil aggregates as affected by organic materials, microbial activity and physical disruption. *Australian Journal of Soil Research* **16**:9-17.
- Turner, G. L. and A. H. Gibson. 1980. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. Pages 111-138 *In* F. Bergersen, editor. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Urbanska, K.M. 1995. Biodiversity assessment in ecological restoration above the timberline. *Biodiversity and Conservation* **4**:679-695.
- Urbanska, K. M. and M. Fattorini. 2000. Seed Rain in High-Altitude Restoration Plots in Switzerland. *Restoration Ecology* **8**:74-79.
- Van Genuchten, M. T. and P. J. Wierenga. 1976. Mass transfer studies in sorbing porous media. I. Analytical solutions. *Soil Science Society of America Journal* **40**:473-480.
- Wardle, D. A., K. E. Giller, G. M. Barker. 1999. The regulation and functional significance of soil biodiversity in agrosystems. Pages 87-121 *In* D. Wood and J. Lenne, editors. *Agrobiodiversity characterisation, utilization and management*. CAB International, Wallingford, UK,
- Young, I. M., K. Ritz. 2000. Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil and Tillage Research* **53**:201-213.

Zak, J. C., M. R. Willig, D. L. Moorhead and H. G. Wilfmand. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* **26**:1101-1108.

Zeller, V., R. D. Bardgett and U. Tappeiner. 2001. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biology and Biochemistry* **32**:639-649.

## Chapitre II

### **Réponses des communautés bactériennes à des modifications de la structure physique d'un écosystème prairial alpin : influence de la localisation des bactéries**

---

Nous avons mis en évidence dans le chapitre précédent, que des perturbations importantes de certaines activités microbiennes (fixation d'azote et minéralisation du carbone) interviennent à la suite d'une dégradation sévère du sol et au cours des étapes successives de la restauration de l'écosystème. Ces dysfonctionnements physiologiques peuvent traduire des modifications dans la structure des populations bactériennes responsables de ces activités. Les travaux rapportés dans le chapitre I montrent que les changements de dynamique microbienne sont induits principalement par les modifications des propriétés structurales des sols et par les apports de carbone organique en relation directe avec la dynamique de la végétation, particulièrement de la colonisation racinaire.

Le sol sous une prairie se caractérise par une importante complexité et une forte hétérogénéité dues à son organisation en agrégats de taille, de stabilité et de composition variés (Kilbertus, 1980), ainsi qu'à l'influence d'un système racinaire graminéen invasif particulièrement actif dans l'organisation des particules entre elles, dans la génération d'une agrégation stable et dans l'apport de substrats carbonés, source d'énergie pour les bactéries (Tisdall et Oades, 1982 ; Misra, 1986 ; Campbell et Greaves, 1990). **Cette organisation permet l'existence d'un ensemble de micro-environnements différents en terme de caractéristiques physico-chimiques et structurales qui représentent autant d'habitats pour les microorganismes bactériens.** Par conséquent, une modification des propriétés structurales d'un sol, aussi bien que le changement de la nature spécifique et de la dynamique de la couverture végétale, est susceptible de modifier ces microhabitats et d'influencer une réponse adaptative physiologique mais également génétique des communautés bactériennes. Nous avons donc consacré ce deuxième chapitre à l'étude des microhabitats bactériens, fractions granulométriques et sol rhizosphérique, en suivant les modifications de leurs propriétés physico-chimiques.

L'objectif de ce deuxième chapitre est d'étudier les changements dans la structure des communautés bactériennes présentes dans différents microhabitats d'un sol, dont les propriétés structurales et la couverture végétale subissent une modification brutale et évoluent au cours du temps. Cette analyse comparative n'est possible qu'en utilisant des techniques de biologie moléculaire qui rendent compte des modifications dans la structure des communautés bactériennes globales ou fonctionnelles, et qui s'affranchissent des limites inhérentes aux études classiques (biomasses bactériennes, activités...). Les deux techniques qui ont été choisies et utilisées dans ces travaux sont l'A-RISA (Automated-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) et la PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism) d'une partie du gène *nifH*.

Le principe de l'A-RISA (Ranjard *et al.*, 2000) est de prendre en compte les particularités morphologiques de la région intergénique (IGS) située entre 2 gènes codant l'un pour l'ARN ribosomique 16S et l'autre pour le 23S. Ces deux gènes sont présents dans le génome de toutes les bactéries et l'IGS présente des caractéristiques de tailles et de séquences variables selon les espèces (Normand *et al.*, 1996). La diversité de l'intergène ribosomique est donc représentative de la communauté globale des eubactéries du sol.

Le gène *nifH* est un des gènes de structure de la nitrogénase codant pour la sous-unité ferroprotéique (= nitrogénase réductase). Les fragments d'ADN obtenus par PCR d'une portion du gène *nifH* ont une taille quasi identique (environ 360 pb) pour toutes les bactéries fixatrices mais leur séquence est plus ou moins variable d'une espèce à l'autre (Young, 1992). Les amplifiats sont ensuite digérés par des enzymes de restriction : c'est la technique RFLP. La RFLP permet de considérer la variabilité de ces séquences estimant ainsi la diversité des espèces fixatrices (Poly, 2001).

L'A-RISA nous permet ainsi d'accéder à la structure génétique de la communauté globale, la PCR/RFLP de *nifH* de considérer uniquement la communauté des fixateurs d'azote. Nous tenterons à l'issus de ce chapitre de déterminer les relations entre les activités potentielles et la structure des communautés bactériennes.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de **R. GROS**, L. JOCTEUR MONROZIER et P. FAIVRE. Cet article a été soumis à la revue *Microbial Ecology*.



# **Microbial communities structure shifts associated with soil habitats of restored alpine grasslands**

GROS Raphaël<sup>a</sup>, JOCTEUR MONROZIER Lucile<sup>b\*</sup> and FAIVRE Pierre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des Sciences du Sol, CISM, Université de Savoie 73376 Le Bourget du Lac cedex, France.

<sup>b\*</sup> Corresponding author: Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, Bat. Gregoir Mendel, 16 rue Dubois Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel: 04.72.43.13.80.; e-mail: lucile.jocteur-monrozier@univ-lyon1.fr

**Key words:** Alpine ecosystem; ski runs construction; microbial habitats; rhizosphere; genetic fingerprints; nifH gene pools; A-RISA.

**Running title:** Microbial habitats and communities structure changes

## II.1. Abstract

Changes in genetic structure of the whole bacterial communities and of the N<sub>2</sub>-fixer communities associated to various microenvironments were investigated during the process of restoration of an alpine grassland ecosystem. One undisturbed climatic grassland soil, one bare substrate before restoration and four soils under restoring vegetation chronosequence were sampled from field plots in the French Val Thorens ski-runs area. Disturbed bare soil showed severe changes in soil organisation compared with undisturbed soil. The gravel content was increased by 124 %, the clay and organic C contents were decreased by 47 % and 52 % and the particle size fractions distribution showed a degradation of the soil structure. The fractionation of soil samples permit us to access to bacterial habitats and revealed some changes in organic C and clay contents for the different particle size fractions. Moreover, the four revegetalised plots showed a plant species succession, accompanied by an increase of root density colonisation and by changes in rhizosphere soil characteristics. Automated ribosomal intergenic spacer analysis (A-RISA) fingerprints and RFLP of *nifH* gene pools were used to compare bacterial community structures in two particle size fractions (2000-250 µm and 50-2 µm) and in rhizosphere soil samples. Multivariate analysis of these fingerprints revealed that N<sub>2</sub>-fixers communities were more specific to the size of aggregate size properties than whole bacteria communities. Our results demonstrated that the whole bacterial communities were affected to a greater extent by the degradation and the restoration process than by the particles size fraction. Rhizosphere communities were largely dependent to the plant species and the age of colonisation. The results showed also a specific effect of wheat rhizosphere in the first step of revegetation on bacteria community structure. Therefore, our results demonstrate specific microbe-habitats associations that are affected to changes in soils organisation and in grassland composition during the process of the restoration.

## II.2. Introduction

Bacterial location in soil is determined through both the process of inoculation via plants (litter, seeds), wind dusts, animals faeces, man-made introduction, and survival plus growth via favourable environmental conditions (organic carbon resources, water availability and protection against predation and stresses). Plant rhizosphere that contributes to introduce into soil material most of the organic substrates for bacteria feeding is also involved in physical processes which generate pores and aggregates, and strongly influence soil structure. In the absence of plants, soil structure is largely dependent on mechanical properties : texture (amount and nature of clay-size particles), disturbance like plowing (clods, fragments), or geochemical processes (concretions). When plants influence soil structure, granular and crumbly aggregates are formed. They provide micro-habitats for microbial communities and control the microbial dynamics of the soil system. These factors are especially dominant in densely rooted grassland soil who generate a strong structure (Haynes and Swift, 1990).

Rhizosphere constitute dynamic habitats colonised by soil bacteria. The high microbial activity in these habitats is due to an elevated supply of carbon and energy-rich materials (e.g. sugars, amino acids and fatty acids) from plant root exudates (Campbell and Greaves, 1990). The quantity and quality of carbon release by plant roots is affected by plant species, physiological state (and age) of roots, and environmental conditions (Newman, 1985; Lynch and Wipps, 1990; Neumann and Römheld, 2001). Moreover, several studies showed that the variety of organic compounds released by plants may be a key factor influencing the diversity of microorganisms in the rhizosphere of different plants species (Maloney et al., 1997; Grayston et al., 1998). Root growth and physiology produced also some particular soil physical properties around the root as compaction (Misra et al., 1986) and strong amplitude of dry-wet cycles usually result in increased strength linking soil particles (Lafond et al., 1992). The drying of soil by roots together with the organic binding material produced in the rhizosphere is expected to enhance soil structural stability. All these processes contributed to create specific microbial habitats. and, through physical disconnection, to increase the disparities between bacterial communities.

Aggregate structure influences carbon availability, water and gas diffusion into soil, all directly involved in the dynamics and survival of bacterial populations. Soil structural organisation in aggregates of different size and stability defines a mosaic of microenvironments differing by their physical, chemical and structure properties (Kilbertus,

1980; Hattori, 1988; Robert and Chenu, 1992, Ranjard et al., 2000). Ranjard and Richaume (2001) produced an exhaustive overview reporting the influence of soil structure on quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria. Soil aggregation, responsible for soil structure, consists of mineral particles and various binding agents. Tisdall and Oades (1982) suggested three broad categories of binding agents based on their temporal persistence: i) transient (mainly polysaccharides); ii) temporary (root, fungal hyphae, bacterial cells) and iii) persistent (humic materials associated with polyvalent metal cations and polymers strongly sorbed to clays). Organic matter in the finest soil fractions is the most resistant to degradation due to the presence of humified forms and physical protection against attack by microbial enzymes (Gregorich et al., 1989). Several studies showed a higher microbial biomass (Jocteur Monrozier et al., 1991; van Gestel et al., 1996) and enzyme activities (Kandeler et al., 1999) in smaller size fractions. Richaume et al. (1993), Kabir et al. (1994) and more recently Ranjard et al. (2000) reported the higher abundance of total bacteria in the microaggregate fractions and in the dispersible clay fraction. The heterogeneous distribution of bacterial cells was imputed to the level of organic carbon (Christensen, 1992) and clay contents which created beneficial environments (e.g. substrates and nutrients availability, protective habitats, water content).  $N_2$  fixation activity has been also found dependent of the aggregate-size distribution and of the cell localisation in particular fractions. Chotte et al. (2002) recently reported that more than 70% of the  $N_2$  fixing microorganisms were isolated from the dispersible clay fraction from a tropical soil. In contrast, they found a hot spot of  $N_2$  fixing activity in the coarse fraction (2000-50  $\mu\text{m}$ ) and demonstrated that this hot spot was disconnected from the highest density of free  $N_2$ -fixers. They attributed these results to the presence of roots and roots exudates which supply the microorganisms with energy required for  $N_2$  fixation. If microorganisms and their activities can be heterogeneously distributed among soil aggregates, so their distribution may change in response to management practices that affect aggregate formation.

A degradation of plant cover and soil structure can cause heavy disturbances of structural organisation and may lead to changes in biological properties (Jocteur Monrozier et al., 1991; Kladvko, 2001, Young and Ritz, 2000). We studied the effect of restoring process after the destruction of the native vegetation, topsoil removal, and traffic of heavy machinery needed to establish new ski-runs in mountain region. The beneficial effect of gramineae rhizosphere was used to fasten the process of soil restoration. We investigated more specifically the structure of the bacterial communities in soils of a range of restoration time and in different habitats such as rhizosphere soil. Possible differences in bacterial communities

living in aggregates of coarse (crumbs) and fine size (granular) peds were also investigated. Data presented here result from an approach of the effect the restoration process via the soil microhabitats and the genetic structure of the telluric eubacteria communities. Studied communities were the whole soil eubacteria by the way of the ribosomic intergene spacer analysis (RISA) and a functional microbial community involved in organic poor soil colonization by plants, the free-living N<sub>2</sub>-fixing bacteria community, by RFLP on *nifH* gene pool.

### II.3. Material and Methods

#### II.3.1. Field sites and soil sampling

The field sites are located at Val-Thorens (45°17'48" N, 6°34'50" E, 2300 a.s.l.) east of Chambéry (Savoie) in the French Alps. About 50% of the 1320 mm mean annual precipitation occur as snow which covers soil about 5 month per years. The mean air temperature is -6.0 °C in January and 10.0 °C in July (annual mean temperature for 1982-2002: 0.7 °C). According to the USDA classification, undisturbed soil of the site is a loamy lithic dystrochrept. Main characteristics of the climacic soil are given in Table 1 (UP).

**Table II.1.** : Main characteristics of top soil samples

Situation	Mechanical analysis				C	N	C/N	pH (H <sub>2</sub> O)	Exchangeable cations				P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
	Sand	Silt	Clay	Gravel					Ca	Mg	K	Na	
	% (< 2000 μ)			% (whole soil)	mg g <sup>-1</sup>			cmole <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>				g kg <sup>-1</sup>	
UP	36.6	38.7	24.7	31.3	5.6	0.47	12	4.5	0.78	0.38	0.35	0.003	0.031
B	58.8	28.0	13.1	70.4	2.7	0.27	10	5.2	2.5	0.22	0.37	0.0015	0.224
T-V <sub>1m</sub>	61.3	27.8	10.9	70.2	2.5	0.25	10	5.3	2.6	0.61	0.57	0.003	0.459
TP-V <sub>1y</sub>	72.5	19.1	8.5	55.1	1.3	0.13	10	5.4	1.43	0.16	0.26	0.0015	0.454
PF-V <sub>4y</sub>	60.0	26.2	13.9	50.5	1.5	0.15	10	5.7	1.53	0.18	0.35	0.0015	0.170
F-V <sub>13y</sub>	56.5	27.3	16.3	65.0	7.8	0.78	10	5.1	1.14	0.14	0.14	0.0015	0.256

Five disturbed ski runs sites were chosen according to the age since the restoration starts.. Initial bare soil (B) resulted from land management to ski-runs previously described by Gros (2002). A 1 month old ( $T-V_{1m}$ ), a 1-yr old ( $TP-V_{1y}$ ), a 4-yr old ( $PF-V_{4y}$ ) and a 13-yr old ( $F-V_{13y}$ ) restoration sites were selected. Vegetation composition is marked by a succession of dominant plant species due to an oriented revegetation process (Gros, 2002). Dominant species are *Triticum aestivum* (100%) for  $T-V_{1m}$ , *T. aestivum* (50%) and *Phleum pratense* (40%) for  $TP-V_{1y}$ , *P. pratense* (60%) and *Festuca rubra* (20%) for  $PF-V_{4y}$ , *Festuca sp* (70%) for  $F-V_{13y}$ . Main characteristic of restoring soils are described in Table II.1.

Undisturbed soil samples ( $20 \times 20 \times 10 \text{ cm}^3$ ) were cored with a spade in triplicate from 0-10 cm soil layer of undisturbed and restoring soils in July. All the samples were wrapped in plastic bags and stored in the cold room ( $4^\circ\text{C}$ ) until analysis. From each set of triplicate samples, one was air-dried and sieved ( $<2 \text{ mm}$ ) to determine main parameters given in Table II.1. The two other cores were used for root-adhering or non-adhering soils study and size fractionation as follow.

### II.3.2. Soil fractionation

A gentle physical soil fractionation method based on a slaking procedure was used to isolate microbial habitats (Kabir et al., 1994). The core sample kept in reserve for fractionation was divided in three sub-samples and 2mm sieved to remove gravels and pebbles; no aggregates coarser than 2mm could be observed on the sieve.. Hundred grams (equivalent oven dry weight) of the  $<2 \text{ mm}$  soil were immersed during 24 h in sterile cool water (UP water; 250 ml;  $4^\circ\text{C}$ ). Then fractions were separated by size according the protocol defined by Chotte et al (1994, 2002). It results in sand-size fractions ( $F_{2000-250}$  2000 to 250  $\mu\text{m}$  and  $F_{250-50}$  250 to 50  $\mu\text{m}$ ) containing stable macroaggregates plus coarse sand and fine sand respectively, silt-size fraction containing microaggregates, coarse and fine silts ( $F_{50-2}$  50 to 2  $\mu\text{m}$ ) and dispersible clay-size fraction ( $F_{<2}$   $<2\mu\text{m}$ ). Free water was removed from soils fractions by centrifugation (9800 xg for 20 min) and moist fractions ( $F_{2000-250}$ ,  $F_{250-50}$ ,  $F_{50-2}$  and  $F_{<2}$ ) were weighed in tared beakers. One fractionation replicate was used for dry weight and physico-chemical analysis and the two others were composited and homogenised for microbiological analysis.

### II.3.3. Rhizosphere and non rhizosphere soil collection and root biomass measurement

One of the two cores reserved for biological studies was divided in six sub-samples before soil separating. On one set of three sub-samples, non-rhizosphere soil was collected as material separated from roots by vigorous hand-shaking of the A1 layer sample. Non-adhering soil was sieved through a 2 mm-mesh sieve, gently crushed by hand and homogenised. Adhering rhizosphere soil was collected by washing the roots with UP water, the resulting suspension was centrifuged (9800 xg for 20 min) to evacuate exceeding water and was finally homogenised. On three other sub-samples, the root biomass was obtained by washing a volume of soil on an inox 50  $\mu\text{m}$  sieve. Roots were collected and dried at 60°C during 48 h before weighed (g dry weigh  $\text{dm}^{-3}$ ).

### II.3.4. Soil texture and C and N content

**Table II.2.** : Aggregates-size fraction characteristics

Soil samples	Weight distribution†	C	N	Clay	Weight distribution	C	N	Clay	Weight distribution	C	N	Clay	Weight distribution	C	N	Clay
	F <sub>2000-250</sub>				F <sub>250-50</sub>				F <sub>50-2</sub>				F <sub>&gt;2</sub>			
UP	80.3±1.7	6.1	0.5	25.8	10.4±0.9	5.0*	0.5	4.6	7.1±0.6	3.4	3.2	24.4	2.2±0.5	ND	ND	100
B	60.3±2.9	2.2	0.2	3.7	17.2±1.1	4.2*	0.4	3.3	19.2±0.7	3.5	2.9	35.8	3.4±0.3	ND	ND	100
T-V <sub>1m</sub>	53.2±2.6	1.7	0.2	4.3	24.9±1.6	4.4*	0.4	3.0	18.5±1.3	2.7	2.3	30.0	3.4±1.1	ND	ND	100
TP-V <sub>1y</sub>	46.9±1.6	7.8	0.1	3.9	20.2±0.6	2.4*	0.2	3.8	25.1±0.4	2.0	1.9	12.4	7.8±1.3	ND	ND	100
PF-V <sub>4y</sub>	58.6±1.5	1.3	0.1	3.9	20.6±0.6	1.7*	0.2	1.7	16.4±1.4	2.2	2.1	21.3	4.3±0.8	ND	ND	100
F-V <sub>13y</sub>	51.4±1.5	7.1	0.2	5.7	27.4±1.3	5.0*	0.2	6.1	16.5±0.6	5.6	2.9	38.6	4.7±0.6	ND	ND	100

† Mean  $\pm$  standard deviation for duplicate samples

\* Calculated values

ND = Not determined

Particle size distribution (Table II.2.) from non-rhizospheric soil and from the size fractions of the rhizosphere soil was determined using the usual procedure of the mechanical analysis (Gee and Bauder, 1986) after chemical dispersion with sodium hexametaphosphate ( $102 \text{ g l}^{-1}$ ) and physical dispersion with ultrasounds (20 min, 35 KHz).

An aliquot of oven-dried rhizosphere soil, non rhizosphere soil and size fractions were finely mechanically ground. Carbon and nitrogen amount were measured using a Carlo Erba CHN Analyser (Table 3).

**Table II.3.** : Rhizosphere soil characteristics and root biomass

Situation	C (mg g <sup>-1</sup> )	N (mg g <sup>-1</sup> )	C/N	Root biomass (g dm <sup>-3</sup> )
UP	10.11	7.5	13.5	2.60 ±0.68
B				0.00
<i>T-V</i> <sub>1m</sub>	3.84	3.4	11.3	0.26 ±0.02
<i>TP-V</i> <sub>1y</sub>	2.81	2.1	13.4	3.24 ±0.29
<i>PF-V</i> <sub>4y</sub>	2.89	2.2	13.1	2.90 ±0.95
<i>F-V</i> <sub>13y</sub>	6.35	4.4	14.4	26.96 ±8.05

### II.3.5. Extraction and purification of DNA from soil and fraction samples

Bacterial DNA was extracted directly in three replicates from fresh rhizosphere soil, non-rhizosphere soil, size fractions  $F_{2000-250}$  and  $F_{50-2}$  (0.5 g equivalent dry weight) and purified using a commercial kit (Fast DNA® SPIN Kit for soil, Bio 101) described by Roose-Amsaleg et al. (2001). Because some of the studied soil samples were organic-rich, two rounds of bead-beating lysis were performed to extract DNA and a supplementary purification step using a microconcentrator was completed for successful PCR amplification.



### **II.3.6. Automated intergenic spacer analysis (A-RISA): global soil microbial community**

The intergenic spacer region between the 2 sub-units of ribosomal sequences (*rrs* and *rrl* genes) was amplified by PCR using 100 ng of purified template DNA with the primers FGPS1490-72 and FGPL132-38 (Normand *et al.*, 1996). PCR conditions were as previously described (Ranjard *et al.*, 2000a). For A-RISA, we used the S-D-Bact-1522-b-S-20 primer labelled at its 5' end with the Cy3 fluorochrome (Eurogentec, Belgium). A-RISA fragments were resolved using an AlExpress DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech France) (30 sec injection at 3KV; run during 210min at 6KV; chemistry : DyeSet2). The relative peak heights within a profile were calculated by dividing the height of an individual peak by the total peak height (the sum of the heights of all peaks). The sizes of the fragments, in bp, were calculated from external size standards of 37 fragments (60 to 900 bp) (ET-ROX 900, Amersham).

### **II.3.7. PCR-RFLP on the *nifH* gene pool: the community of nitrogen-fixing bacteria**

We used 100 ng of DNA as a template for PCR with primers PolF and PolR to amplify a 360 bp region (Poly *et al.*, 2001a). Each PCR product was directly used for restriction enzyme cleavage (NdeII, MnlI) (Poly *et al.*, 2001a). Digested DNA samples were analysed by electrophoresis in 5% polyacrylamide gels (19:1) (Bio-Rad). The electrophoresis conditions were as previously described by Poly *et al.* (2001a). This procedure was repeated at least twice for each DNA extraction to check that the patterns obtained were consistent. The software used (Bio 1D++, Fisher Bioblock, France) converted staining data into peak profiles, which were analysed as for the A-RISA method (see above).

### II.3.8. Statistical analysis

Multivariate analysis techniques were used to analyse and to compare the pattern of peak profiles (A-RISA and PCR-RFLP) of all samples. The A-RISA and *nifH* matrix was subjected to a principal component analysis (PCA) on a covariance matrix. This method enabled variations to be studied within the community A-RISA and *nifH* profiles. It also provided an ordination of bacterial DNA IGS pools plotted in two dimensions on the first two principal components. The proportion of the data variance explained by each principal component was calculated.

PCA on correlation matrix was performed on the data matrix obtained from physico-chemical characteristics of bulk soil or soil microenvironments.

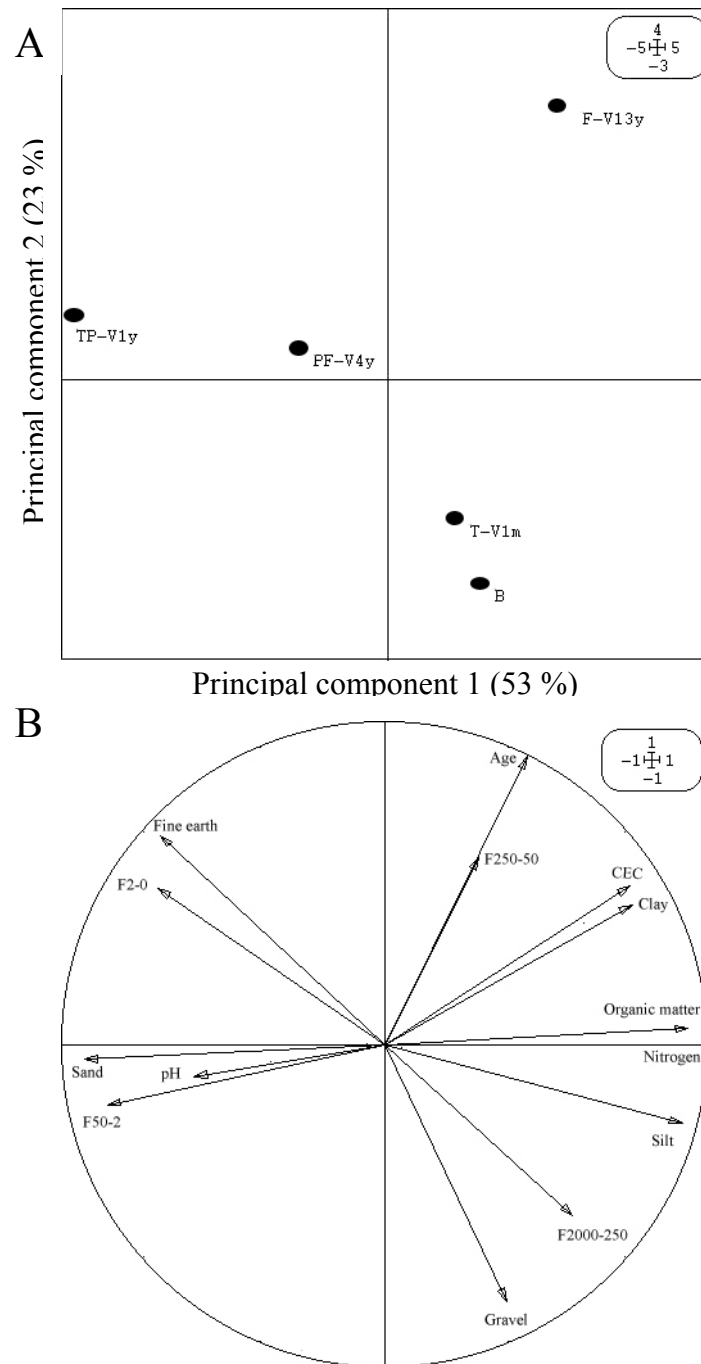
We calculated the Euclidian distance and carried out hierarchical cluster analysis using the agglomerative second-order moment algorithm known as Ward's method to produce dendrograms showing the relatedness of the bacterial communities of rhizosphere soil. Cluster analysis and PCA were carried out with ADE-4 software (Thioulouse *et al.*, 1997).

## II.4. Results

### II.4.1. Multivariate analysis of bulk soils and microenvironments

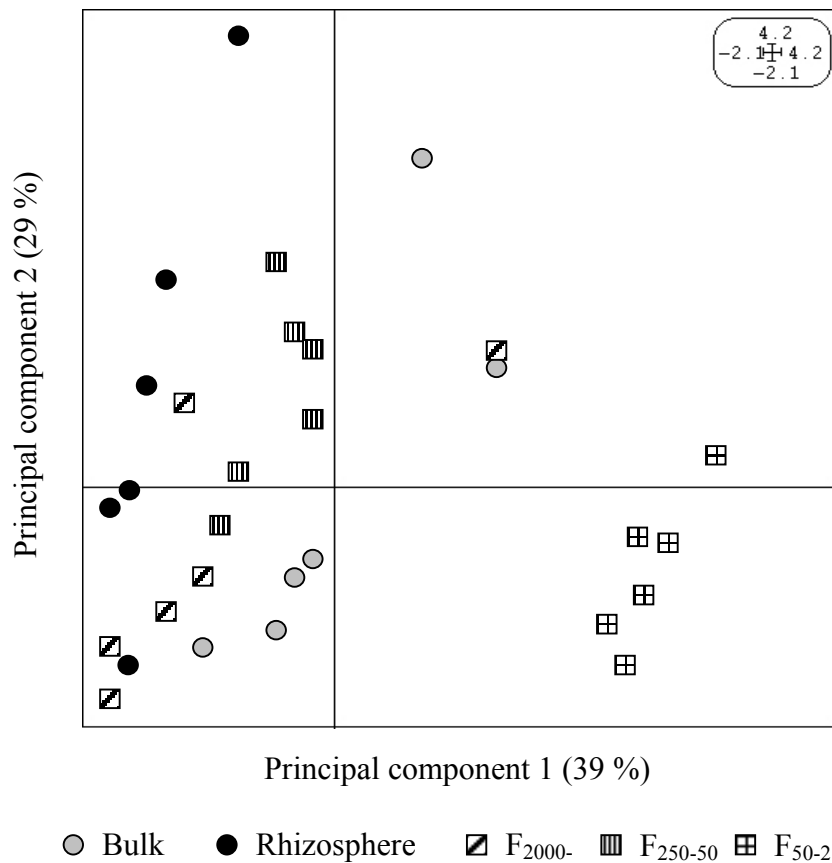
Two millimeters sieved field soil samples (bulk soils) were compared on the basis of their physico-chemical characteristics by PCA (Figure II.1.). The first principal component explained 53% of the variance in bulk soil properties (Figure II.1A.). The correlation circle showed that main parameters discriminating soils on the first principal component axis included soil organic carbon content, clay and silt content which were correlated with the amount of nitrogen and the Cation Exchange Capacity (CEC) of soils (Figure II.1B.). The second principal component representing 23% of the variance was built on gravel content in soil and age of site restoration. This representation pointed out that gravel content was the main physico-chemical property which grouped the B (70.4 %) and *T-V*<sub>1m</sub> (70.2 %) soils and differentiated them from Up (31.3 %), *TP-V*<sub>1y</sub> (55.1 %) and *PF-V*<sub>4y</sub> soils (50.5 %) (Table II.1.). *TP-V*<sub>1y</sub> and *PF-V*<sub>4y</sub> soils differed mainly by sand content, 72.5 % and 60.0 %

respectively and clay content, 8.5 % and 13.9 % respectively (Table II.1.). The older restored  $F-V_{13y}$  soil which has high organic carbon and clay content (Table II.1.), differed from  $TP-V_{1y}$  and  $PF-V_{4y}$  soils, and was in opposite situation on the second principal component with the younger B and  $T-V_{1m}$  pair soils.



**Figure II.1.** : Factorial map (A) and correlation circle (B) of PCA on physico-chemical ski runs soil properties.

Selected soil micro-environments were compared on the basis of their physico-chemical characteristics by PCA (Figure II.2.). The two first principal components (1 and 2) of the PCA explained 39% and 29% of the variance in environments properties (Figure II.2A.). First axis separated each soil environments and second axis was built on restoration situation. Microaggregate fraction samples were in opposite situation on the first principal component with other microenvironments.



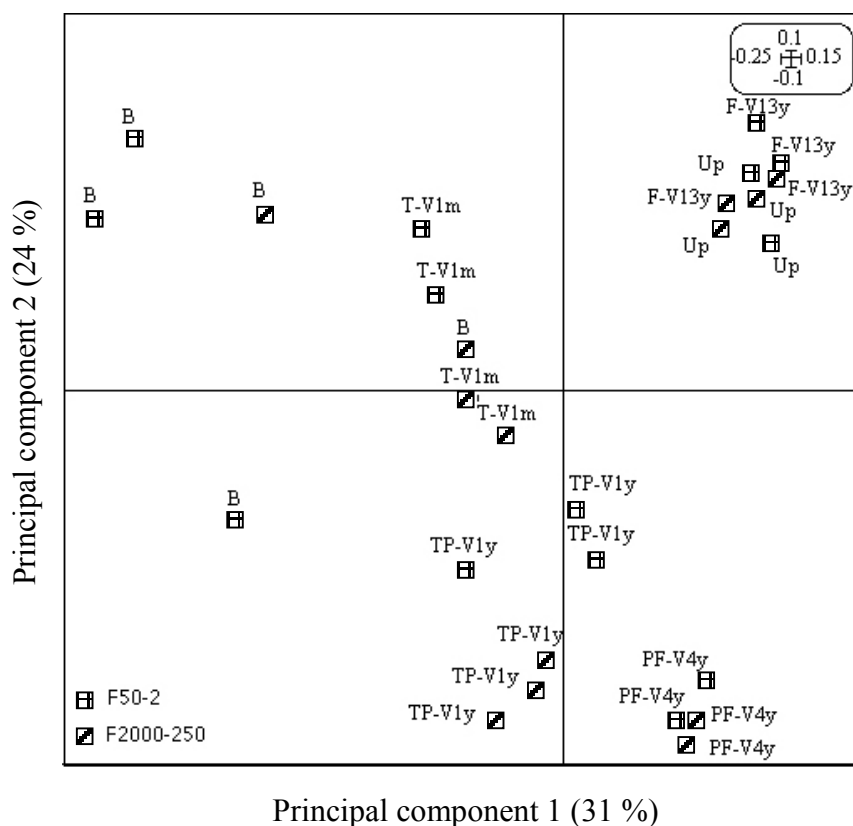
**Figure II.2.** : Principal component (PC1xPC2) plot (A) and dendrogram (B) generated from edaphic parameters from bulk soil (Bs), rhizosphere soil (Rs) and F2000-250, F250-50 and F50-2 aggregate-size fractions.

#### II.4.2. Bacterial community structure analysis from F<sub>2000-250</sub> and F<sub>50-2</sub> aggregate-size fractions

##### *Whole bacterial community structure by A-RISA*

The PCA allowed us to ordinate bacterial pools associated with the aggregate-size fractions on the two first principal components and to compare the magnitude of changes induced by grassland management process (Figure II.3.). The first principal component explained 31% of the variance in the data and the second component explained 24% of this variance. The factorial map showed that ordination on the two first component mostly corresponds to changes consecutive from process of degradation and restoration. The bacterial structure of the two fractions of the undisturbed soil (Up) which associated with the older restored soil (*F-V*<sub>13y</sub>) were in opposite situation on axis 1 to bare soil (B) and on axis 2 with *PF-V*<sub>4y</sub>. The bacteria pools of the two fractions for B, *T-V*<sub>1m</sub>, and *TP-V*<sub>1y</sub> were different while high similarity was observed between aggregate fractions for *PF-V*<sub>4y</sub> and *F-V*<sub>13y</sub> (Figure II.3.). The chronosequence of restoration (age of site) was ordinated on the first axis. Correlation between soil sample characteristics and third component scores demonstrated a significant correlation with organic carbon and clay contents (data not shown). A PCA realised only with the F<sub>2000-250</sub> fractions showed an ordination of all samples on the first axis depending of the age of the restoration, an high similarity between Up and *F-V*<sub>13y</sub> and an high difference between B and the Up – *F-V*<sub>13y</sub> pool (data not shown). In contrast, a PCA realised with F<sub>50-2</sub> fractions showed an high similarity between *T-V*<sub>1m</sub>, *TP-V*<sub>1y</sub>, *PF-V*<sub>4y</sub> and *F-V*<sub>13y</sub> and an high difference between Up and B communities, between Up and the pool (on axis 2) and between B and the pool (on axis 1) (data not shown).

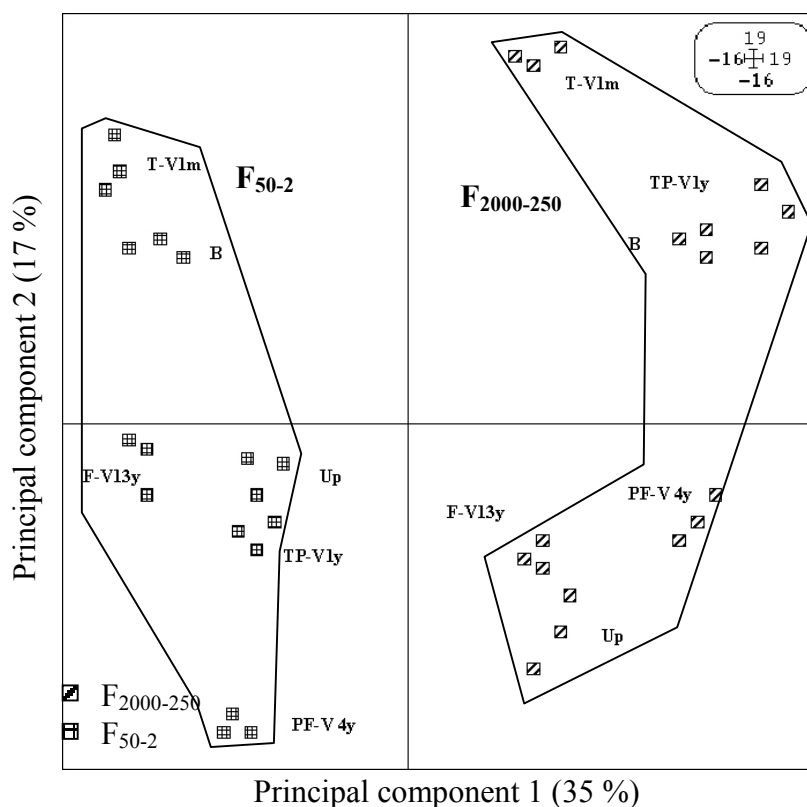
A total of 223 and 361 bands were detected in the F<sub>2000-250</sub> and F<sub>50-2</sub> samples, respectively. The number of peaks was highest in the F<sub>50-2</sub> fraction of *F-V*<sub>13y</sub> and Up soils (178 and 195 bands respectively) than in F<sub>2000-250</sub> (130 and 136 bands). In opposite, the micro-aggregate fraction (F<sub>50-2</sub>) of the *T-V*<sub>1m</sub>, *TP-V*<sub>1y</sub>, *PF-V*<sub>4y</sub> samples showed a lowest number of bands (140, 114, 148 bands, respectively) compared to F<sub>2000-250</sub> (192, 147 and 172 bands). The only exception was the bare soil sample (B), in which the number of peak is same for both fraction (141 bands). Five bands of 155, 290, 350, 630 and 830 pb were significantly enriched in F<sub>2000-50</sub> compared to F<sub>50-2</sub> from Up soil. Moreover, two bands with sizes of 645 and 650 pb were found on several samples of restored soil but were absent in Up soil. These two bands represented in mean for the two fractions 32 % of the sum of the relative peak heights in B samples, 9.6 % in *T-V*<sub>1m</sub>, 4.4 % in *TP-V*<sub>1y</sub>, 1.3 % in *PF-V*<sub>4y</sub> and 1 % in *F-V*<sub>13y</sub>.



**Figure II.3.** : Principal component analysis (PC1xPC2) generated from A-RISA profiles of the bacteria pools from F<sub>2000-250</sub>, and F<sub>50-2</sub> aggregate-size fractions.

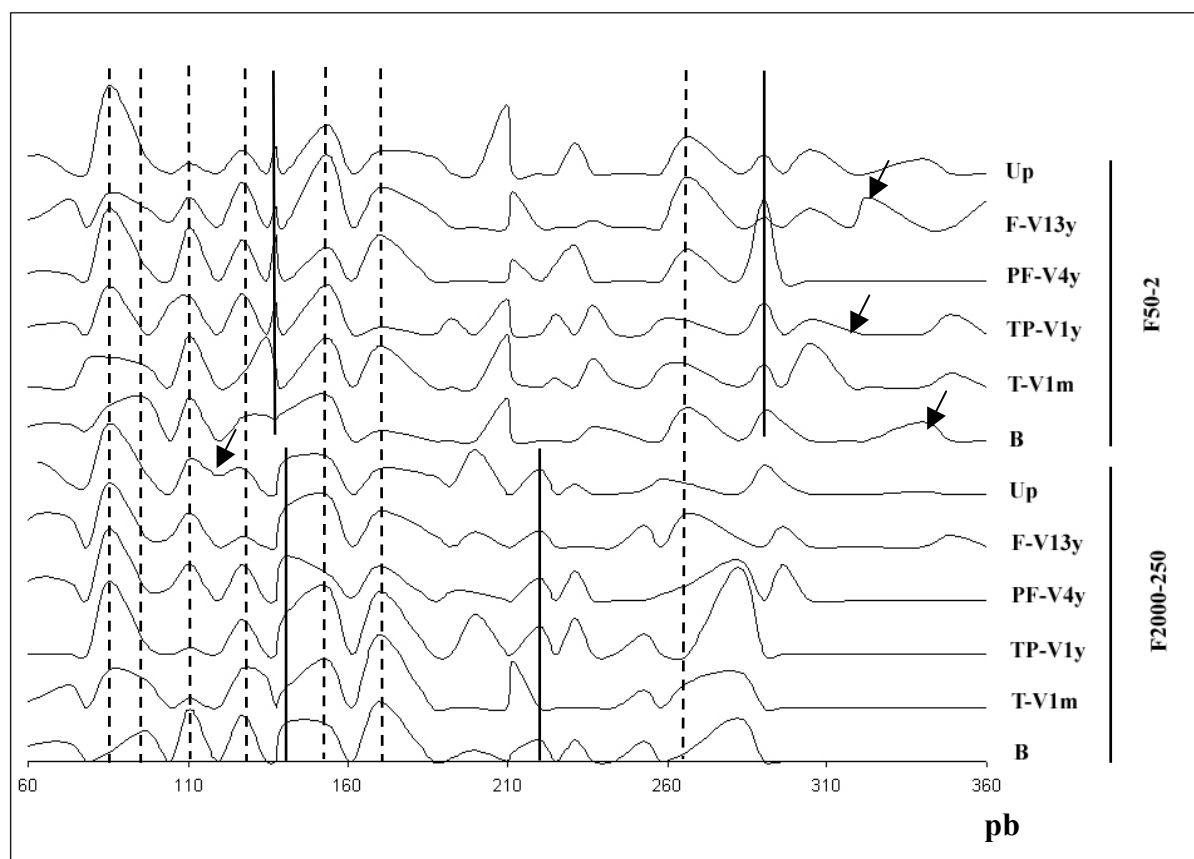
#### *RFLP analysis of nifH gene pools*

Multivariate statistical analysis by PCA of *nifH* gene profiles from F<sub>2000-250</sub> and F<sub>50-2</sub> fractions from undisturbed and restored grassland soil, allowed ordination of *nifH* gene pools. The first principal component and the second component explained 35% and 17% of the variance of the data, respectively (Figure II.4.). The factorial map showed an ordination on the first axis separating the F<sub>2000-250</sub> sand-size fractions to the F<sub>50-2</sub> silt-size fractions. Three of the studied soils (*PF-V*<sub>4y</sub>, *F-V*<sub>13y</sub> and *Up*) for the F<sub>2000-250</sub> fraction were grouped, whereas the other soils of this fraction split apart this group on the axis 2. *B* and *TP-V*<sub>1y</sub> were formed a second group distinct of the first on the second axis. Concerning the F<sub>50-2</sub> fraction, the factorial map showed that *Up* and *F-V*<sub>13y</sub> soils were grouped and distinctly opposed of *B* and *T-V*<sub>1m</sub> on the axis 2. *B* and *T-V*<sub>1m</sub> of the two fractions were not different on the second axis of the PCA.



**Figure II.4.** : Principal component analysis (PC1xPC2) generated from *nifH* restriction profiles from sand-size fraction (F<sub>2000-250</sub>) and silt-size fraction (F<sub>50-2</sub>).

PCR/RFLP of *nifH* gene pool given reproducible profiles for triplicates soils samples. Contrasting patterns for the different samples (soils and fractions) showed differences in terms of presence/absence of fragments and in terms of relative intensity of existing fragments. Restriction by *MnII* provided 37 different bands from the twelve fractionated soils, whereas RFLP with *NdeII* resulted in 32 bands. A total of six fragments from RFLP with *MnII* (Figure II.5.) and 10 fragments from *NdeII* restriction (figure for *NdeII* is not shown) were found in all soils, for example *NdeII*<sub>1-2</sub> at 65 pb and 70 pb, *MnII*<sub>4-5</sub> bands at 85 pb and 100 pb, *MnII*<sub>7</sub> at 110 pb, *MnII*<sub>15</sub> at 170 pb, *NdeII*<sub>16</sub> at 190, *NdeII*<sub>27</sub> at 280 pb. Others bands were found to be specific to one fraction whatever soil (Figure II.5.). The fraction F<sub>2000-250</sub> exhibited four specific bands (*MnII*<sub>18</sub> at 200 pb, *MnII*<sub>21</sub> at 220 pb, *MnII*<sub>29</sub> at 280 pb, *NdeII*<sub>31</sub> at 340 pb); three bands (*MnII*<sub>11</sub> at 140 pb, *NdeII*<sub>12</sub> at 155 pb, *NdeII*<sub>30</sub> at 335 pb) characterized the F<sub>50-2</sub> for all soils. Few bands were specific to one soil sample and one fraction (*MnII*<sub>8</sub> at 120 pb for Up F<sub>2000-250</sub>, *MnII*<sub>14</sub> at 160 pb for PF-V<sub>4y</sub> F<sub>2000-250</sub>, *MnII*<sub>33-34</sub> at 320 pb and 325 pb for TP-V<sub>1y</sub> F<sub>50-2</sub> and F-V<sub>13y</sub> F<sub>50-2</sub>, respectively, *NdeII*<sub>11</sub> at 145 pb for F-V<sub>13y</sub> F<sub>50-2</sub> and *NdeII*<sub>21</sub> at 235 pb for B F<sub>50-2</sub>).



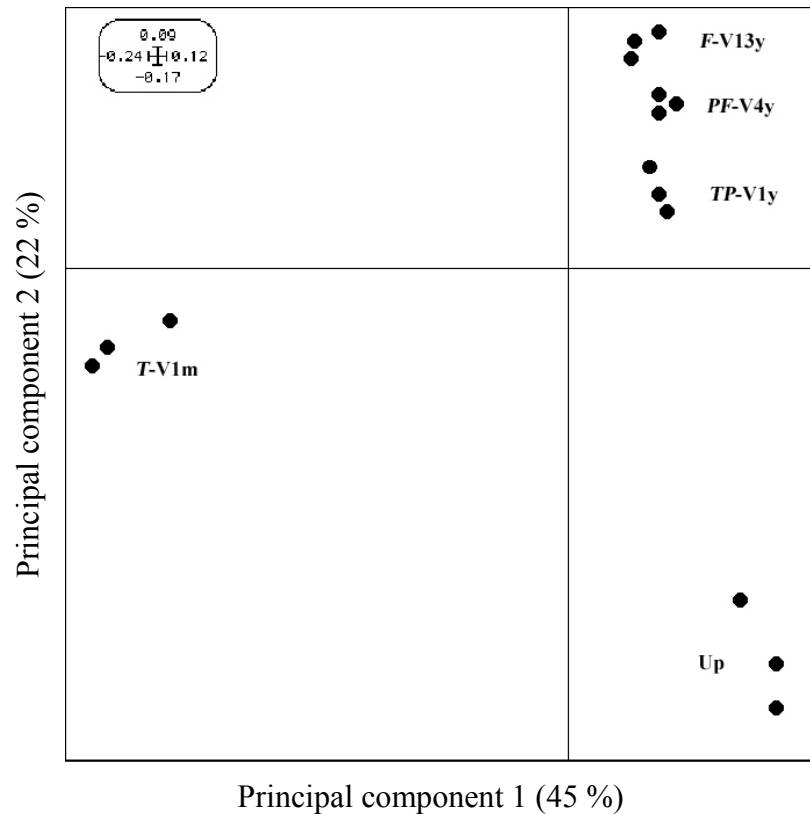
**Figure II.5.** : Electrophoregram of *MnII* RFLPs of *nifH* PCR products obtained from the six studied soils. Dotted lines indicate peaks common to several soils and lines are common to several fractions; specific fragments are indicated next to the arrows.

### II.4.3. Bacterial community structure analysis from rhizosphere soil

#### *Whole bacterial community structure by A-RISA*

The factorial map produced by PCA revealed high similarity of bacterial population located in the rhizosphere of *TP-V<sub>1y</sub>*, *PF-V<sub>4y</sub>* and *F-V<sub>13y</sub>* samples (Figure II.6.). Bacterial communities of *T-V<sub>1m</sub>* and Up rhizosphere were quite distinct compared with other soils. *T-V<sub>1m</sub>* was in opposite with *T-V<sub>1m</sub>*, *TP-V<sub>1y</sub>*, *PF-V<sub>4y</sub>* and *F-V<sub>13y</sub>* on the axis 1 (45 % of the inertia) and Up was in opposite with *TP-V<sub>1y</sub>*, *PF-V<sub>4y</sub>* and *F-V<sub>13y</sub>* on the axis 2 (22 % of the inertia).





**Figure II.6.** : Principal component analysis (PC1xPC2) generated from A-RISA profiles of the bacteria pools from bulk and rhizosphere soils.

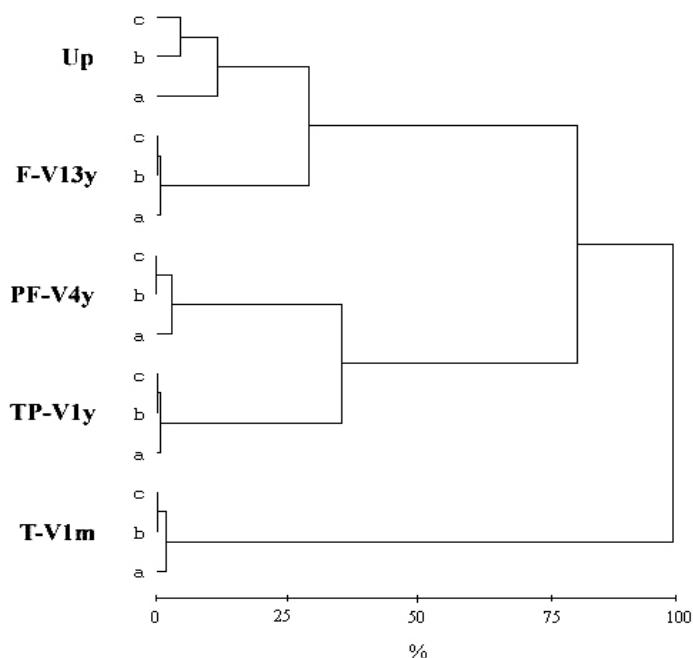
A total of 278 bands were detected including all soil samples. The number of bands in individual sample profiles ranged from 119 (*T-V<sub>1m</sub>*) to 187 (*F-V<sub>13y</sub>*) (Table II.4.). The median size of the bands for Up sample was 420 pb (Table II.4.). The median size increased to 560 pb for *T-V<sub>1m</sub>* and *PF-V<sub>4y</sub>* and to 573 for *TP-V<sub>1y</sub>*, then it decreased to 515 for the older restored site (*F-V<sub>13y</sub>*). Major differences between Up and *T-V<sub>1m</sub>* A-RISA profiles consisted in the presence of 6 specific bands accounted for more than 31 % of the total recorded intensity for the Up sample (bands of size 300, 360, 400, 410, 415, 420 pb) and 6 specific bands accounted for more than 44 % for the *T-V<sub>1m</sub>* sample (bands of size 545, 555, 565, 645, 650 and 680 pb) (data not shown). The relative intensity of the bands with size of 645 and 650 pb slightly increased in *TP-V<sub>1y</sub>* then decreased in other samples (their relative intensity not exceeded 1 %). The more important band found on Up sample with size of 419 pb (16 % of the total intensity) disappeared on *T-V<sub>1m</sub>* and reappeared on other samples but with a relative intensity which not exceeded 1 %.

**Table II.4.** : Statistical characteristics of A-RISA profiles from rhizosphere samples

Situation	Number of bands	Quartile 1	Median size	Quartile 3
UP	146	390	421	574
<i>T-V</i> <sub>1m</sub>	113	526	560	646
<i>TP-V</i> <sub>1y</sub>	163	428	573	674
<i>PF-V</i> <sub>4y</sub>	173	417	560	750
<i>F-V</i> <sub>13y</sub>	187	356	515	729

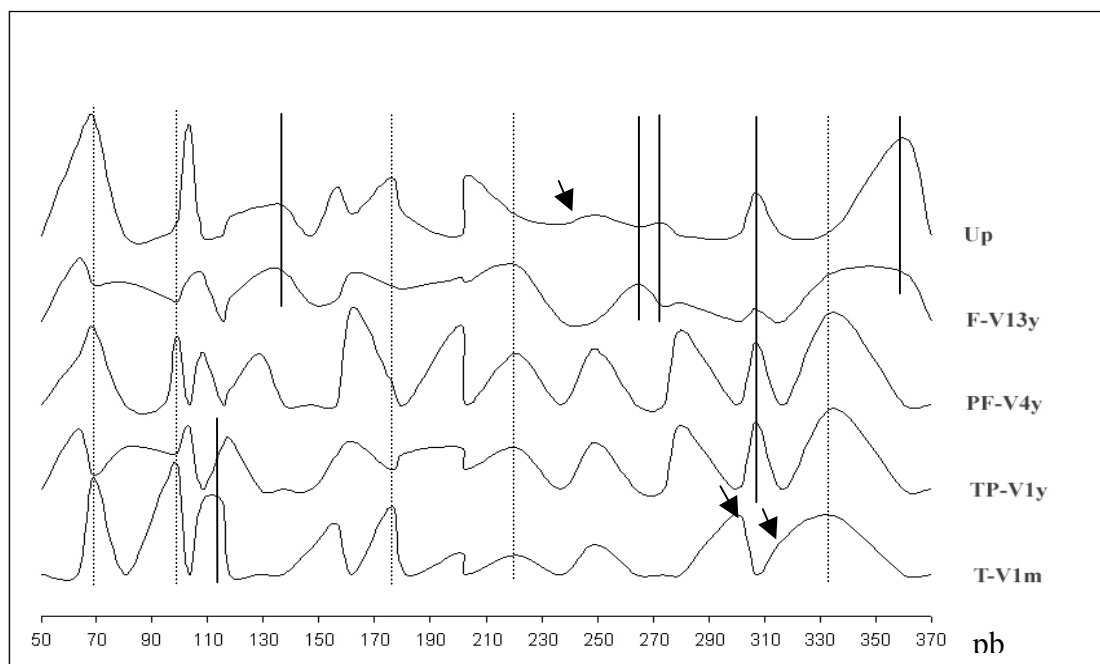
### *RFLP analysis of nifH gene pools*

The dendrogram resulting from cluster analysis performed with *nifH* gene pools matrix from rhizosphere soils permit us to differentiate the pools located in different studied soils. showed (Figure II.7.). The Figure II.7. revealed an ordination of the N<sub>2</sub>-fixer community structure on the age and plant species succession. *T-V*<sub>1m</sub> rhizosphere community was distinct from two main groupings: one with the *TP-V*<sub>1y</sub> and *PF-V*<sub>4y</sub> rhizosphere communities and the other one with the *F-V*<sub>13y</sub> and Up rhizosphere pools.



**Figure II.7.** : Dendrogram generated from *nifH* restriction profiles from rhizosphere soils samples. a, b and c represents the three independent replicates.

Restriction by *MnII* provided 26 different bands from the twelve fractionated soils (figure for *MnII* is not shown), whereas RFLP with *NdeII* resulted in 29 bands (Figure II.8.). Maximum of bands was found for F-V13y (19 with *MnII* and 24 with *NdeII*). *TP-V<sub>1y</sub>*, *PF-V<sub>4y</sub>* and *Up* soils accounted 35, 31 and 33 bands (with *MnII* and *NdeII*), respectively, whereas *T-V<sub>1m</sub>* showed the smaller number of bands (22 bands). Contrasting patterns for the different samples showed differences in terms of presence/absence of fragments and in terms of relative intensity of existing fragments. Two specific bands was found for *T-V<sub>1m</sub>* only with *NdeII* RFLPs (*NdeII*<sub>25</sub> at 300 pb and *NdeII*<sub>27</sub> at 320 pb). Two bands from *NdeII* RFLPs and two other one from *MnII* RFLPs of *T-V<sub>1m</sub>* samples were common with all samples and were marked by their more higher relative intensity (*NdeII*<sub>5</sub> at 100 pb, *NdeII*<sub>15</sub> at 175 pb, *MnII*<sub>7</sub> at 110 pb *MnII*<sub>16</sub> at 230 pb). Four bands from restriction with *NdeII* and one band with *MnII* was common to the F-V13y and *Up* samples (*NdeII*<sub>11</sub> at 140 pb, *NdeII*<sub>22</sub> at 265 pb, *NdeII*<sub>23</sub> at 275 pb, *NdeII*<sub>29</sub> at 360 pb, *MnII*<sub>5</sub> at 100 pb).



**Figure II.8.** : Electrophoregram of *NdeII* RFLPs of *nifH* PCR products obtained from the five studied soils. Dotted lines indicate peaks common to several soils and lines are common to two samples; specific fragments are indicated next to the arrows.

## II.5. Discussion

### *Changes of soil properties during the restoration chronosequence*

Soils characteristics, such as texture, pH, nutrient and C content, are keys determinants of soil microbial growth, activity, and populations structure (van Gestel et al., 1991; Anderson and Domssch, 1993; Bardgett et al., 1999; Zeller et al., 2001). All edaphic factors and climatic conditions will strongly influence vegetation characteristics, such as plant productivity and species composition, which are also keys determinants of soil microbial properties (Wardle and Nicholson, 1996; Wardle et al., 1999).

The multivariate analyse of soil samples factors revealed a few discriminating parameters. Bare (B) and  $T-V_{1m}$  soils were grouped on the PCA factorial map (Figure II.1A.). The discriminate factor with others soils was the gravel content (Figure I.1B.).  $TP-V_{1y}$  and  $PF-V_{4y}$  showed similarities and are differentiated from the B –  $T-V_{1m}$  pool and the  $F-V_{13y}$  soil by gravel, organic matter and clay content and age of the restoration. The management of alpine grassland (ski-runs construction and restoration) induced severe changes into physico-chemical properties and structural organisation of the soils, accompanied by a modification of plant species composition and diversity. The texture of disturbed soils, compared with undisturbed soil, was enriched out of gravel and sand amounts (Table II.1.). Consequence was a decrease of fine particles content such as silts and clays (Table II.1.). Clay contents measurement showed a maximum decrease of 66 % in one year after seeding ( $T-V_{1y}$ ). Organic carbon content was also decreased in bare soil and all restored soils except for the older situation. This disturbance is related to destruction of native vegetation and to removal of the topsoil during the ski-runs construction with heavy machinery. The rapid establishment of a herbaceous cover has not allowed to reconstitute the initial stock of organic matter in the first steps of the restoration process. This situation is unfavourable to the maintenance of soil structure which is fundamental for the activity and the distribution of bacteria. Indeed, it is well known that soil texture and organic matter are major factors which influence the form and the stability of soil structure (Emerson et al., 1986; Angers et al., 1993). Kemper and Kock (1966) have observed a strong decrease in aggregate stability with decreasing clay content. Tisdall and Oades (1982) also showed that the stability of aggregates strongly depend on organic materials, with bacterial polysaccharides, fungal hyphae and plant roots with direct consequences on pore-sizes and aggregate-sizes distribution. However, pore-sizes and aggregate-sizes distribution determine the possible habitats of microbes, as well as hydric and

aeration conditions which control microbial activities. For example, Pagliai and De Nobili (1993) have found that important biological activities such as soil enzyme are positively correlated with the amount of small pores. The 13-yr old restored site (*F-V*<sub>13y</sub>) showed a clay content near the undisturbed soil and an increase of carbon content correlated with the root biomass increase (Table II.3.). The mineral particles are gradually incorporated into organic complexes so that water-stable aggregates are formed. Such macro-aggregation is a slow process, taking many years. Low (1955) reported long term studies of water-stable macroaggregation on clay soils under grass and with subsequent cultivation. He showed a moderately rapid increase of water-stable aggregates in the first 3 years under grass, and an aggregation after 15-yr had still only reached 50 % as compared with 75 % for the permanent pasture. More recently, Edgerton et al. (1995) reported an significant increase of water-stable macroaggregates content for 11-yr old restored coal mine sites with grasses and showed a linear relationship between aggregates stability and microbial biomass.

The physical fractionation of soil samples may give an information on soil organisation, particularly on soil structure. The fraction 2000-250  $\mu\text{m}$  was more abundant under the undisturbed grassland than in bare soil and under restored chronosequence. This fraction which contains stable macroaggregates decreased during the ski-runs construction and the first year of restoration. The mechanical disruption of macroaggregates was completed by the organic matter depletion and the decrease of clay content. Our data showed a high decrease of clay content in 2000-250  $\mu\text{m}$ -size fraction of disturbed soils (Table II.2.). The structure of the 1-yr old restored site appeared as the more affected. Indeed, we found a high decrease of macroaggregate content accompanied by an important dispersion of clay particles. The macroaggregates formation seems to start in the 4-yr old restored soil with increasing of clay content in whole soil. In contrast, our results revealed that there was almost no macroaggregates formation in the older restored site (*F-V*<sub>13y</sub>) in spite of the favourable increase of clay content and organic matter contribution by plant roots. However, we showed the formation of aggregates with a size of 250-50  $\mu\text{m}$ , accompanied by an increase of clay content in this fraction. These results suggested that the structure of the 13-yr old restored soil was highly induced by direct and indirect effects of the high root density which contributed to formed a microstructure. Because of the physical forces exerted by root growth and by localized drying caused by water uptake (Kay, 1990; Oades, 1993), root density plays a role in determining aggregate size. Jastrow et al. (1998) reported that a proliferation of very fine roots results in higher root densities of a restored prairie, may prohibit the extensive development of larger macroaggregates. The modification of soil characteristics and structural

organisation caused by the management of the ski-runs, provides heterogeneous habitats for microorganisms. These habitats are characterised by qualitative and quantitative differences of organic compounds, mineral substrates, and environmental conditions such as nutrients content, pH and water contents. PCA ordination (Figure II.2.) evidenced the differences between the coarse fractions (2000-250 and 250-50  $\mu\text{m}$ ) and the 50-2  $\mu\text{m}$ -size fraction which are in opposite on the first axis. The correlation circle (data not shown) produces with the data of the Table II.2. and silt and sand contents (data not shown) allowed to determine that main parameters discriminating fractions on first axis included the amount of fine particles such as clay, loam and coarse silt.

#### *Response of bacteria in particle-size fractions to ski-runs construction and restoration process*

The physical fractionation procedure have been commonly used to describe and access specific bacterial microhabitats (Hattori, 1988; Jocteur Monrozier et al., 1991; Chotte et al., 1998; Ranjard et al., 2000; Sessitsch et al., 2001). Chotte et al. (2002) reported that soil aggregate fractions can be referred to as functional compartments disconnected from each other and used to identify the processing of ecological functions.

Complex and variable A-RISA profiles, defined by the number and the relative intensity of bands, were observed in the aggregate-size fractions as reported by Ranjard et al. (2000). We found more bands in microaggregates than in macroaggregates for the native grassland soil (Up) suggesting a higher fingerprint complexity in smaller fractions of a stable soil. The observed complexity among the aggregate fractions suggests that a variable diversity exists into aggregates of different size. Recently, it was demonstrated by Sessitsch et al. (2001) that bacterial community structure was significantly affected by particle size and that smaller size fractions host higher diversities of microbes than larger size particles. The physical disturbance conducted to a decrease of number of band in the microaggregates, then in the profiles complexity. This effect is prolonged 4 years after the disturbance (*PF-V<sub>4y</sub>*) and we noted the recovering of the number of bands in smaller aggregates in the 13-yr old restored sample (*F-VI<sub>3y</sub>*). However, we can not concluded to a change in diversity in term of specific richness because A-RISA is not an appropriate tool for estimate the bacterial diversity (Fisher et al., 1999; Jensen et al., 1993). Changed profiles indicated altered community structure. PCA ordination (Figure 3) of IGS fingerprint evidenced three groups of soil, one with the bare soil and the recently vegetalised soil with wheat (B and *T-V<sub>1m</sub>*), one with the two younger vegetalised soils (*TP-V<sub>1y</sub>* and *PF-V<sub>4y</sub>*), and one with the older restored

soil and the native grassland soil (*F-V*<sub>13y</sub> and Up). Our data showed that disturbances on soil organisation and properties modified the bacteria communities structure indifferently of their location. The major differences of genetic structure between the micro- and the macroaggregates were observed for B, *T-V*<sub>1m</sub> and *TP-V*<sub>1y</sub> samples. The bacterial community structure of the native grassland soil was relatively similar in the two aggregate-size fractions. Moreover, we noted that the communities localised in the microaggregates was generally more affected. Shifts within A-RISA profiles were principally due to the emergence of two bands in each fraction of all disturbed soils (645 and 650 pb) which may belonged to the *proteobacteria* group. In earlier studies it has been shown that Gram-negative bacteria belonging either to the  $\beta$ - and  $\gamma$ -*proteobacteria* or to  $\alpha$ -*proteobacteria* were stimulated with a heavy metal (Ranjard et al., 2001) or organic pollution (Macnaughton et al., 1999).

The ordination of *nifH* gene pools showed different results than those obtained from IGS profiles. Ordination of samples by PCA evidenced that the greatest differences into *nifH* fingerprint occurred between the coarse fraction and the fine fraction (Figure 4). The effects of the physical disturbance and of the restoration process on the genetic structure of N<sub>2</sub>-fixers are less important than the differences between the two fractions. The communities associated with macroaggregates were ordinate on the second axis in relation with the age of the restoration. Heterogeneous distribution in soil aggregates of different sizes of cell density of free N<sub>2</sub>-fixers and their activity (Chotte et al., 2002), as well as diversity and distribution of particular taxa (*Azospirillum* sp.: Chotte et al., 2002; *Rhizobium leguminosarum*: Mendes and Bottomley, 1998) and genetic structure of *nifH* gene pools (Poly et al., 2001) have been observed. Our results support the hypothesis that the presence of roots and roots exudates could supply to the microorganisms the energy required for N<sub>2</sub> fixation, thus contributing to their distribution and their selection in various microhabitats. PCA made on the physico-chemical characteristics ordines microhabitats on the first principal component (Figure II.2.) similar to that of PCA made on *nifH* patterns. Therefore, clay, organic matter and nitrogen contents but also aggregates and particles sizes distributions could be involved in the relatedness between *nifH* gene pools of the aggregates size fractions. Clay contents between the coarse fraction and the fine fraction were very different (Table II.2.). Therefore, we can hypothesised that clay content is a key factor which control the difference of *nifH* gene pools between the two fractions. Nevertheless, the great variation of clay content in microaggregates of the various soils samples have not appeared to be a discriminate factor in this case. Indeed, the Figure II.4. showed a pool with Up, *F-V*<sub>13y</sub> and *TP-V*<sub>1y</sub> who present similar *nifH* fingerprint but a high difference in clay content. Another parameter that could

influence the N<sub>2</sub>-fixer community structure is the amount and quality of organic matter. Carbon:nitrogen ratio increased in the macroaggregates (2000-250 and 250-50 µm) of the 4-yr and 13-yr old restored sites compared with bulk soil (Table II.1.) while it is decreased in the microaggregates (50-2µm) of the same samples. These results indicated an important supply on the last step of the restoration, of fresh and N-rich organic matter by plant roots essentially. The coarse fractions are principally stabilised by roots exudates (Oades, 1993). Thus, the colonisation of N<sub>2</sub>-fixers into macroaggregates may be attributed to the high root density and probably high content of root exudates.

### *Impact of grassland succession on the rhizosphere bacterial communities*

The aboveground plant community influences microbial functioning and spatial heterogeneity in soil, particularly in the rhizosphere. Furthermore, microbial activity is stimulated in this area because of the nutrients and the carbon energy source provided by root exudates. The composition of the plant community may influence the diversity (Grayston et al., 1998) and the structure of the bacterial community due to the variability in chemical composition of the exudates. PCA ordination (Figure II.6.) evidenced three groups of soils differing from the fingerprint of the whole community. These soils were under grassland differing in grass species composition and diversity and in soils properties, factors which may influence the genetic structure and diversity on bacterial communities. The genetic fingerprint in rhizosphere soil from Up sample showed a majority of bands with a size inferior to 400 pb. According to the distribution of the RISA bands length in the bacterial phylum established by Ranjard et al. (2000b), the RISA bands <400 pb size included mainly high and low G+C Gram-positives bacteria. Our results support the hypothesis that Gram-positives bacteria are predominant in soil (Felske et al., 1998), particularly in old rhizospheric grassland soil (Bornman et al., 1996). Some authors have shown that the r-strategists (principally gram-positive bacteria) were predominant in the bacterial community of the rhizosphere, whereas the k-strategists were predominant in the non rhizosphere (De Leij et al., 1993), and that the r-strategists are more sensitive to disturbances than the k-strategists (De Leij et al., 1993; Kunito et al., 2001). Our work showed for restored soils under wheat and *Phleum pratense* culture (*T-V*<sub>1m</sub> and *TP-V*<sub>1y</sub>) a clear selective effect of the roots towards the *proteobacteria*, to the detriment of the Gram-positive bacteria. The older restored site (*F-V*<sub>13y</sub>) with extensive roots colonisation from perennial gramineae showed a recovering of the proportion of RISA bands <400 pb, accompanied by a increasing complexity of A-RISA profiles. Our results support the findings derived from eco-physiological index calculated by De Leij et al. (1993),



in that the microbial community on young roots has an uneven distribution of r- and K-strategists. As roots became older this distribution became more even (Table II.4.).

Considerable variations were also observed in *nifH* gene pools from both the undisturbed grassland and the improved plots. The differences observed between the *nifH* gene pools of the various studied soils could result from a selection of N<sub>2</sub>-fixers to floristic composition. Cluster analysis (Figure II.7.) pooled the 1-yr old soil with the 4-yr old soil and the 13-yr old soil with the undisturbed grassland soil, while the *nifH* fingerprint associated with the rhizosphere from the initial wheat culture was distinguished from the others. The selective influence of the wheat rhizosphere on the whole bacteria community was also observed on N<sub>2</sub>-fixers. This observation can mean that the wheat rhizosphere during the first step of the plant growth strongly influences the high level of one or more species of N<sub>2</sub>-fixers belonging to the *proteobacteria*. This has been clearly demonstrated for the genera *Azospirillum* (an  $\alpha$  sub-group of *proteobacteria*) on wheat roots by Schloter and Hartmann (1998), for *Klebsiella* (an  $\gamma$  sub-group of *proteobacteria*) and for *Agrobacterium* (an  $\alpha$  sub-group of *proteobacteria*) by Ruppel (1989). Cluster analysis also suggested that selection for nitrogen-fixing bacteria may occurred in the former plot in relation with plant diversity and composition. The next step of this study would be the isolation, cloning and sequencing the predominant emerging *nifH* gene and IGS sequence to identify the major bacterial taxas implied in the bacterial colonisation of degraded soil.

In summary, we have found that the bacterial communities structure associated with microenvironments can change significantly in a contiguous landscape as the result of changes in the soil properties, and plant community structure, brought about by the ski-runs construction. Studied microbial communities have responded differently to changes in their microhabitats and it may seem odd that the microorganisms in old restored soils become similar to those in climacic grassland. A possible explanation of this observation is that soil microbial communities respond to soil characteristics that require long periods of time to recover from disturbance and who depend in part of the plant cover characteristics. Our work supports also the hypothesis that the bacterial colonisation within degraded soils was mainly influenced by the root colonisation which contribute to the diversity of microhabitats due to their important role in soil structure and in supply of soil organic matter.

### **Acknowledgements**

Financial support of R. Gros was provided by the French "Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME)". Funding for this research was supported by the Programme

National de Recherches Sols et Erosion ACI " Ecologie Quantitative Biogéochimie des sols" (INSU).

## II.6. References

1. Anderson T-H, Domsch KH (1993) The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol Biochem* 25:393-395
2. Angers DA, Samson N, Légère A (1993) Early changes in water stable aggregation induced by rotation and tillage in a soil under barley production. *Can J Soil Sci* 73:51-59
3. Bardgett RD, Lovell RJ, Hobbs PJ, Jarvis SC (1999) Temporal dynamics of soil microbial communities in grassland soils along a fertility gradient. *Soil Biol Biochem* 31:1021-1030
4. Bornman JP, Skroch PW, O'Sullivan KM, Palus JA, Rumlanek NG, Jansen JL, Neinhuis J, Triplett EW (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 62:1935-1943
5. Campbell R, Greaves, MP (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: Lynch JM (ed) *The rhizosphere*. John Wiley & Sons, Ltd, New York, pp 11-34
6. Chenu C (1989) Influence of a fungal polysaccharide, scleroglucan, on clay microstructures. *Soil Biol Biochem*. 21:299-305
7. Chotte JL, Ladd JN, Amato M (1998) Sites of microbial assimilation and turnover of <sup>14</sup>C soluble and particulate substrates decomposing in a clay soil. *Soil Biol Biochem* 30:205-218
8. Chotte JL, Schwartzmann A, Bally R, Jocteur Monrozier L (2002) Changes in bacterial community and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 and 19 years of natural fallow. *Soil Biol Biochem* 34:1083-1092
9. Christensen BT (1992) Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Adv Soil Sci* 20:2-76
10. De Leij F A A M, Whipps J M and Lynch J M 1994 The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microb Ecol* 27:81-97
11. Edgerton DL, Harris JA, Birch P, Bullock P (1995) Linear relationship between aggregate stability and microbial biomass in three restored soils. *Soil Biol Biochem* 27:1499-1501

12. Emerson WW, Foster RC, Oades JM (1986) Organo-mineral complexes in relation to soil aggregation and structure. In: Huang PM, Schnitzer M (eds) Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. SSSA Special publication number 17, Soil Science Society of America, Inc. Madison, USA. pp 521-548
13. Felske A, Wolterink A, Van Lis R, Akkermans ADL (1998) Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soil (the Netherlands). *Appl Environ Microbiol* 64:871-879
14. Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 65:4630-4636
15. Gee GW, Bauder JW (1986) Particle size analysis. In: Klute A (ed) *Methods of soil analysis, part 1*, 2nd edn. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA, Madison, WI. pp. 383-411
16. Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 30:369-378
17. Gregorich EG, Kachanoski RG, Voroney RP (1989) Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregates disruption. *J Soil Sc* 40:649-659
18. Gros R (2002) Comportement du sol, de la flore et de la microflore bactérienne sous l'influence de perturbations anthropiques physiques et chimiques: relation entre structuration physique du milieu et structuration biologique. Thèse de doctorat, Université de Savoie, 235p
19. Hattori T (1988) Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Biol Fertil Soils* 6:189-203
20. Haynes RJ, Swift RS (1990) Stability of soil aggregates in relation to organic constituent and soil water content. *J Soil Sci* 41:73-83
21. Jastrow JD, Miller RM, Lussenhop J (1998) Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregates stabilization in restored prairie. *Soil Biol Biochem* 30:905-916
22. Jensen MA, Webster JA, Sraus N (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified DNA spacer polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 59:945-952
23. Jocteur Monrozier L, Ladd JN, Fitzpatrick RW, Foster RC, Raupach M, 1991. Components and microbial biomass content of size fraction in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* 49:37-62

24. Kabir M, Chotte JL, Rahman M, Bally R, Jocteur Monrozier L (1994) Distribution of soil fractions and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial grass. *Plant Soil* 163:243-255
25. Kanazawa S, Filip Z (1986) Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microb Ecol* 12:205-215
26. Kandeler E, Tscherko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung W (2000) Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of heavy metal polluted soil. *Soil Biol Biochem* 32:390-400
27. Kandeler E, Stemmer M, Klimanek E-M (1999) Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol Biochem* 31:261-273
28. Kay BD (1990) Rates of changes of soil structure under different cropping systems. *Adv Soil Sci* 12:1-52
29. Kemper WD, Kock EJ (1966) Aggregate stability of soils from western United States and Canada. USDA Tech. Bull. No.1355. U.S. Govt. Print. Off., Washington, DC.
30. Kilbertus G (1980) Etudes des microhabitats contenus dans les agrégats du sol, leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Rev Ecol Biol Sols* 17:543-557
31. Kladvko EJ (2001) Tillage systems and soil ecology. *Soil Till Res* 61:61-76
32. Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H, Matsumoto S (2001) Characterisation of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur J Soil Biol* 37:95-102
33. Lafond J, Angers DA, Laverdière MR (1992) Compression characteristics of a clay soil as influenced by crops and sampling dates. *Soil Till Res* 22:233-241
34. Low AJ (1955) Improvements in the structural state of soils under leys. *J Soil Sci* 6:179-199
35. Lynch JM, Wipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1-10
36. Maloney PE, van Bruggen AHC, Hu S (1997) Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizosphere and in bulk soil. *Microb Ecol* 34:109-117
37. Macnaughton S, Stephen JR, Chang YJ, Peacock A, Flemming CA, Leung KT, White DC. (1999) Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain reaction--denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. *Can J Microbiol* 45:116-24

38. Mendes IC, Bottomley PJ (1998) Distributioj of a population of *rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii among different size classes of soil aggregates. *Appl Environ Microbiol* 64:970-975
39. Misra RK, Dexter AR, Alston AM (1986) Penetration of soil aggregates of finite size II plant roots. *Plant Soil* 107:11-18
40. Neumann G, Römheld V (2001) The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker Inc, New York, Basel, pp 41-94
41. Newman EI (1985) The rhizosphere: carbon sources and microbial populations. In: Fitter AH, Atkinson D, Read DJ, Usher MB (eds) *Ecological interactions in soil*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 107-121
42. Normand P, Pansonnet C, Nesme X, Neyra T, Simonet P (1996) ITS analysis of procaryotes. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular Microbiology Ecological Manual*, Kluwer, Dordrecht, The Netherland. pp 1-12
43. Oades JM (1993) The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* 56:377-400
44. Pagliai M, De Nobili M (1993) Relationships between soil porosity, root development and soil enzyme activity in cultivated soils. *Geoderma* 56:243-256
45. Poly F, Bally R, Jocteur Monrozier L (2001a) Improvement of the RFLP procedure to study the diversity of the *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* 152:95-103
46. Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, Jocteur Monrozier L (2001b) Comparison of *nifH* pools between soils and between soil microenvironments of contrasting properties. *Appl Environ Microbiol* 67:2255-2262
47. Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J, Nazaret S (2000a) Heterogeneous Cell density and genetic structure studies of bacterial pools associated with various soils microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol* 39:263-272
48. Ranjard L, Richaume A (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res Microbiol* 152:707-716

49. Ranjard L, Brothier E, Nazaret S (2000b) Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl Environ Microbiol* 66:5334-5339
50. Richaume A, Steinberg C, Jocteur Monrozier L, Faurie G (1993) Difference between direct and indirect enumeration of soil bacteria: influence of soil structure and cell location. *Soil Biol Biochem* 25:641-643
51. Robert M, Chenu C (1992) Interactions between soils minerals and microorganisms. In: Stotzky G, Bollag JM (eds) *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong. pp.307-404
52. Roose-Amsaleg E, Garnier-Sillam M, Harry T (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl Soil Ecol* 18: 47-60
53. Ruppel S (1989) Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of triticum eastivum and Ammophila arenaria. In: Vancura V, Kunc F (eds) *Interrelationships between microorganisms and plant in soil*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokio. pp 253-262
54. Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeller E (2001) Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertiliser field experiment. *Appl Environ Microbiol* 67:4215-4224
55. Tisdall JM, Oades JM (1982) Organic matter and water stable aggregates in soils. *J Soil Sci* 33:141-163
56. van Gestel M, Ladd JN, Amato M (1991) Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: Influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biol Biochem* 23:313-322
57. van Gestel M, Merckx R, Vlassek K (1996) Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. *Soil Biol Biochem* 28:503-510
58. Wardle DA, Nicholson KS (1996) Synergistic effects of grassland species on soil microbial biomass and activity: implications for ecosystem-level effects of enriched plant diversity. *Function Ecol* 10:410-416
59. Wardle DA, Bonner KL, Barker GM, Yeates GW, Nicholson KS, Bardgett RD, Watson RN, Ghani A (1999) Plant removal in perennial grassland: vegetation dynamics, decomposers, soil biodiversity and ecosystem properties. *Ecological Monographs* 69:535-568
60. Young IM, Ritz K (2000) Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil Till Res* 53:201-213

61. Zeller V, Bardgett RD, Tappeiner U (2001) Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biol Biochem* 32:639-649

## Conclusions

---

L'étude du fonctionnement biologique de ces sols de pistes de ski alpins en relation avec la structuration physique du milieu (organisation du sol et dynamique végétale) se justifie par la volonté de développer des indicateurs intégrés de la qualité des sols et d'approfondir les connaissances sur la dynamique d'un écosystème terrestre dans les premiers stades de son développement.

Les écosystèmes terrestres, offrant à la fois le stade initial et les stades précoces de leur développement, sont relativement rares. Le modèle "pistes de ski reconstituées" permet d'étudier un certain nombre de ces processus (altération et formation du sol, colonisation végétale et bactérienne...) sur des échelles spatiales et temporelles acceptables (proximité des sites, topographie et passé climatique identiques...), c'est à dire dont l'influence sur le fonctionnement de l'écosystème ne constitue pas un biais majeur dans l'étude de son évolution au cours du temps.

Nos travaux montrent que la succession écologique définie par les étapes chronologiques de restauration d'une piste de ski, constitue un bon modèle à la fois dans l'interprétation des processus de dégradation et de réhabilitation de la qualité des sols, mais également dans l'étude de la dynamique d'un compartiment complexe de l'écosystème tel que l'est un sol. La figure 3 rappelle le modèle de dégradation des écosystèmes et les voies principales de leur restauration.



Un ensemble de facteurs physiques, chimiques et biologiques est responsable des modifications du fonctionnement biologique de ces sols perturbés. La qualité structurale des sols (distribution des tailles d'agrégats, de leur stabilité et de leur composition) et la densité du système racinaire (apport d'une source carbonée) sont les facteurs prédominants dans la dynamique bactérienne du sol climacique (non perturbé) et des sols de la succession écologique.

Nos résultats dévoilent un modèle de fonctionnement bactérien spécifique des écosystèmes prairiaux climaciques d'altitude, déterminé par une **faible activité fixatrice et une faible diversité catabolique**. Ces propriétés fonctionnelles caractérisent des populations microbiennes dominées par des microorganismes dont **la stratégie adaptative est de type *k***, c'est à dire des populations stables et fortement adaptées à l'hétérogénéité du milieu.

La stratégie démographique des communautés bactériennes ainsi que l'activité des microorganismes fixateurs du sol climacique est limitée par le manque de carbone assimilable. L'étude des propriétés physiques de ce sol a effectivement montré une très forte stabilité des agrégats traduisant une proportion importante du carbone séquestré sous la forme de complexes argilo-humiques et organo-métalliques (Al-humus, Fe-humus...) très stables et peu disponible pour les fonctions bactériennes.

Le changement d'état de l'écosystème climacique crée des modifications importantes dans la dynamique des activités microbiennes qui sont fortement dépendantes du fonctionnement initial de cet écosystème :

- La stimulation de l'activité fixatrice a été attribuée principalement à une augmentation de la disponibilité du carbone, soit par destruction des agrégats dans l'étape initiale de la succession (sol nu), soit par l'apport important de substrats carbonés par les racines des plantes au cours des étapes chronologiques de la restauration.
- La dégradation du milieu favorise un accroissement de la diversité hétérotrophique qui traduit l'explosion démographique des espèces bactériennes stratégiques *r*, c'est à dire des espèces opportunistes caractérisant les milieux jeunes ou dégradés (milieux instables). La perturbation imposée par la construction de la piste de ski intervient sur un sol très évolué. Elle est suffisamment forte pour réinitialiser le cycle naturel des successions.

Nous assistons ici à un véritable **rajeunissement de l'écosystème** au sens écologique du terme. Ce rajeunissement est vraisemblablement accompagné d'une diminution de la taille des populations qu'il serait nécessaire de vérifier, mais qui se traduit par un déclin sur l'activité minéralisatrice du carbone. La dominance de ces stratégies *r* sur l'ensemble de la succession écologique (du sol nu au stade 13 ans) traduit une évolution constante de la structure physique de l'écosystème et des apports en carbone minéralisable. La fréquence relativement rapide de ces changements d'organisation du sol et de dynamique du peuplement végétal au cours de la succession écologique étudiée, semble interdire la colonisation du milieu par des espèces de climax (stratégies *k*) sur une période minimum de treize ans (âge de la piste la plus ancienne).

**Les techniques moléculaires** utilisées dans ces travaux sont suffisamment **sensibles** pour révéler un impact d'une **perturbation** physique sur la structure des communautés présentes dans différents **micro-environnements**. Elles permettent également de mettre en évidence l'influence de certains paramètres écologiques (changements de végétation, évolution du développement des sols) sur les changements de structure de ces populations bactériennes au cours du temps.

**Le couplage des mesures d'activités avec des approches abordant la structure des communautés bactériennes**, nous permet d'appréhender le niveau fonctionnel qui est affecté par les modifications du milieu. Ainsi, il est possible d'identifier si les modifications d'activités observées résultent de modifications de l'état physiologique de la cellule, de l'expression l'activité enzymatique ou de déséquilibre dans les populations fonctionnelles. Ces comparaisons indiquent que les modifications des conditions environnementales induites par la dégradation de l'écosystème peuvent résulter dans les premiers stades de la succession (sol nu, piste d'un mois et piste d'un an) en partie **de perturbations dans les populations fonctionnelles**. Cependant, nous constatons que les modifications durables des activités à long termes (> à 4 ans) ne correspondent plus aux changements observés dans la structure des communautés bactériennes. **Ces différences traduisent l'influence favorable de conditions environnementales sur l'expression des activités enzymatiques et dévoilent la formation de "hotspot" d'activités.**

Les résultats de cette première partie suscitent plusieurs questions. Le comportement adaptatif des communautés bactériennes est-il identique pour d'autres types de perturbations ou dans d'autres conditions environnementales ? Les propriétés physico-chimiques des sols mises en avant dans ces travaux comme des facteurs agissant sur le déterminisme des communautés bactériennes et de leurs activités sont-ils les mêmes dans d'autres systèmes perturbés ? Les techniques, les indicateurs et les différentes échelles d'approches qui ont été appréhendées, peuvent-ils être appliqués dans des schémas plus globaux d'évaluation de la qualité des sols ?

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de compléter ces travaux par l'étude d'une situation différente (par exemple étude d'un autre type de perturbation, dans une situation géographique différente...). Toutefois, pour conserver la possibilité d'une comparaison valable entre les deux situations, et pour offrir une interprétation pertinente des processus mis en jeu dans le fonctionnement des sols dégradés, il est nécessaire de conserver une démarche (comparaison état initial et états dégradés, plusieurs échelles d'observation...) et des indicateurs (structure du sol, composition chimique, fonctionnement bactérien...) identiques pour les deux situations.

---

## **Troisième partie**

Réponses du sol, de la flore et de la microflore bactérienne à des perturbations chimiques complexes

---

## Introduction : problématique, contexte et objectifs des travaux

---

Nous nous sommes attachés dans cette troisième partie à associer deux approches de l'écologie pour définir le risque environnemental lié à la valorisation de déchets industriels :

- **La recherche d'indicateurs pertinents** (biotiques et abiotiques). La plupart d'entre eux sont **identiques** à ceux qui ont été utilisés dans la partie précédente de ce mémoire (caractéristiques chimiques du sol, stabilité structurale, structure et dynamique de la végétation, structure et activité des communautés bactérienne...).

- **L'étude des interactions** entre certains protagonistes d'un écosystème à la base du fonctionnement global de celui-ci. La démarche générale qui est adoptée dans cette troisième partie est donc **identique** à la précédente : **démarche comparative** (comparaison entre l'état initial et l'état contaminé, comparaison de différentes situations expérimentales = essais sur colonne et essais au champ, sous différente végétation...) et **intégrative** (étude des impacts à différentes échelles d'observation, étude des interactions sol-plantes-bactéries...).

L'écosystème qui a été étudié dans cette recherche est une nouvelle fois un **écosystème prairial**. La perturbation qui lui a été appliquée est cette fois-ci une **contamination minérale complexe**, à laquelle s'ajoute dans certaines conditions expérimentales, **une perturbation physique des premiers centimètres du sol** (scarification de la couverture végétale). L'originalité de ces travaux réside dans la nature des contaminants chimiques étudiés : des effluents produits à partir de déchets d'incinération ; dans l'étude intégrée du fonctionnement d'un écosystème (réponse du sol, de la flore et des communautés bactériennes), mais également dans la variété des conditions expérimentales utilisées : effets à court terme et à long terme; sol nu, couvert végétal non perturbé, couvert végétal monospécifique; essais de laboratoire et essais au champ.

Ces travaux ont été menés dans le cadre du programme de recherche Ecocompatibilité des déchets initié et financé par l'ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie). L'objectif de ce programme était de définir le niveau d'acceptabilité d'un écosystème naturel sollicité pour la réception de flux de polluants issus d'un déchet considéré et placé dans un contexte physico-chimique et biologique défini, **l'eau étant le vecteur des éléments contaminants**. Les objectifs précisés pour chaque terme du programme, la démarche globale de celui-ci et les approches techniques, ainsi que certains résultats ont fait l'objet d'une publication par PERRODIN Y, GOBBEY A, GRELIER VOLATIER L, CANIVET V, FRUGET JF, GIBERT J, TEXIER C, CLUZEAU D, **GROS R**, POLY F, JOCTEUR MONROZIER L (2002) Waste ecocompatibility in storage reuse scenarios : methodology and detailed presentation of the impact study on the recipient environments. Waste Management 22 : 215-228. (Annexe1).

### **Problématique**

Ces dernières années, l'augmentation de la consommation a engendré une croissance des quantités de déchets et des problèmes de pollution qu'ils engendrent. De ce fait, l'élimination de ces déchets est devenu un sujet de préoccupation pour notre société. L'incinération est une technique de traitement des déchets qui consiste à transformer, par la combustion, des ordures de nature hétérogène en un résidu inerte, tout en générant un minimum de pollution dans l'environnement. En effet, la dégradation thermique des ordures génère de nouveaux produits, qui sont les déchets généralement appelés "déchets de seconde génération". Ces déchets de seconde génération sont, pour les deux principaux, des mâchefers et des résidus solides de l'épuration des fumées.

Les mâchefers issus d'incinération des ordures ménagères (MIOM) sont des scories solides résultant de l'incinération des ordures ménagères. Ils se présentent sous la forme de granules de couleur grise, mélange de métaux, de verre, de silice, d'alumine, de calcaire, de chaux, d'imbrûlés et d'eau. Les mâchefers sont classés en fonction de leur potentiel polluant. Depuis 1994, les mâchefers doivent subir un test de lixiviation qui va déterminer leur possibilité de valorisation en technique routière et permettre un classement. Ce test consiste à mettre en contact un échantillon de cent grammes de mâchefers avec un litre d'eau, afin d'évaluer les quantités de polluants solubilisés.

L'application de ce test conduit à classer les mâchefers dans l'une des trois catégories suivantes :

- " V " : valorisable directement
- " M " : valorisable après maturation
- " S " : stockable en centre d'enfouissement de classe II.

Les résidus solides de l'épuration des fumées d'incinération ou REFIOM, sont les résidus récupérés dans le système de dépoussiérage (cendres et poussières). Ainsi, la composition des REFIOM laisse à penser que deux types de constituants représentent un réel danger de pollution: **les sels solubles et les métaux lourds**. La solidification est l'un des procédés qui permet de rendre inerte le déchet et de minimaliser les risques écologiques. Ce procédé consiste à stabiliser la charge toxique par solidification des déchets, c'est-à-dire par mélange avec un ou plusieurs liants assurant un piégeage mécanique ou chimique des éléments toxiques dans une matrice solide et résistante, particulièrement envers l'élément liquide.

La génération, le transport, le stockage, le traitement, la récupération et l'élimination des déchets posent de nombreux problèmes pour la société et représentent un sérieux danger pour la santé publique et l'environnement. Dès lors, il convient de gérer au mieux les déchets que nous produisons, ce qui implique une adaptation de la législation et des innovations du point de vue technologique et scientifique. Au sens de la loi du 15 juillet 1975, relative à l'élimination des déchets et à la récupération des matériaux, on appelle déchets l'ensemble des résidus d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien meuble abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon (Murat, 1981).

La production abondante de déchets industriels et ménagers par la société, oblige les pouvoirs publics à engager de nombreuses études sur leur élimination. Les efforts se sont jusqu'à présent concentrés sur les méthodes de transformation, de maturation, de stockage ou de revalorisation de ces déchets. La demande sociale évolue actuellement vers l'attente d'un environnement propre et préservé. Cette attente oblige le gouvernement à modifier sa politique de gestion des déchets qui doit permettre l'orientation des recherches vers leur caractère potentiellement polluant vis à vis du milieu d'accueil sollicité pour leur utilisation. C'est pourquoi l'état français considère l'importance d'une acquisition rapide de bases scientifiques qui permettraient d'intégrer le concept d'impact environnemental dans les modèles de gestion des déchets. Dans ce contexte, les données résultant des essais réalisés

pour mesurer ces paramètres toxicologiques doivent être acceptées par tous les partenaires concernés : pouvoirs publics, industriels, laboratoires... Il en découle la nécessité de la mise au point de méthodes d'analyses adaptées et de rechercher les indicateurs des altérations éventuelles. Ces données permettront à tous ceux qui sont chargés d'effectuer les expérimentations et de prendre des décisions, de disposer de références communes sur la base desquelles ils pourront engager une gestion raisonnée et adaptée des déchets.

Cette évolution notable du domaine de la gestion des déchets fut fortement motivée par une législation récente. Des mesures de prévention sont mises en œuvre dans le cadre de la loi du 13 juillet 1992 relative à l'élimination des déchets, renforcée par un arrêt ministériel relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux rejets des installations classées pour la protection de l'environnement. Pour les sites et sols pollués la circulaire du 3 décembre 1993 précise les principes et les moyens pour mener des actions de réhabilitation. Dans le cadre de la directive européenne (91/689) concernant les déchets dangereux, récemment transposé en droit français par le décret n°97-517 du 15 mai 1997 relatif à la classification des déchets dangereux, il est demandé d'évaluer les propriétés qui les rendent dangereux. Parmi ces propriétés figure le critère "Ecotoxique" (H14) (Riviere, 1998).

Les orientations préconisées par les pouvoirs publics en matière de déchets conduisent parfois à l'extension de leur valorisation directement ou indirectement en contact avec les milieux naturels. Ces textes législatifs et les préoccupations des citoyens donnent dès lors, une place de plus en plus importante à l'évaluation des conséquences potentielles et actuelles des pollutions sur l'environnement et la santé humaine.

L'évaluation des effets écotoxiques de cette banalisation est, par ailleurs, essentielle pour orienter les conditions de cette valorisation et constitue un complément aux analyses physico-chimiques pour déterminer si le déchet ou le produit dérivé est banalisable. Elle permet également de déterminer le degré de contamination du site de valorisation.

L'élaboration d'une typologie des sites contaminés (inventaire, classification et hiérarchisation) est donc devenue une nécessité pour répertorier les cas qui se présentent et mieux comprendre l'origine et la mise en place des phénomènes auxquels on est confronté. Les sites contaminés peuvent être classés sur la base de différents critères (Leconte, 1995) : situation juridique, mode de pollution, nature du (ou des) polluant(s), type d'activité et nombre de polluants, modalités de dispersion des polluants, etc. Parallèlement à l'élaboration de la classification des sites pollués à des fins juridiques, une nouvelle stratégie de gestion des



déchets est mise en place. Elle prend en compte les préoccupations économiques actuelles et donc s'attarde sur les techniques de valorisation et de revalorisation. Elle répond également à aux attentes des pouvoirs publics de la mise en œuvre d'une gestion non polluante des déchets. Cette nouvelle stratégie découle d'un concept récent : **l'écocompatibilité**.

Un déchet écocompatible se dit d'un déchet qui par sa structure, sa nature, ses propriétés et son comportement peut s'inscrire dans l'environnement en équilibre avec celui-ci sans affecter la survie d'une espèce et mettre en péril l'équilibre des communautés et du fonctionnement des écosystèmes. L'une des problématiques majeures que pose l'Écocompatibilité de déchets vis à vis de l'environnement est donc d'estimer le risque écotoxique ou le niveau d'acceptabilité des flux de polluants émis par ces déchets placés dans un certain contexte physique, physico-chimique et biologique déterminé par le milieu récepteur concerné (Perrodin et Gobbey, 1998 ; Perrodin *et al.*, 2002).

La définition de l'écocompatibilité d'un déchet nécessite l'intégration des diverses approches qui sont complémentaires :

- **L'étude du comportement d'un déchet** et du relargage de contaminants organiques et minéraux. Cette approche analyse le devenir d'un déchet placé dans des conditions physico-chimiques définies et stables, et elle établit la présence et les concentrations des composés toxiques relargués suite à des tests comportementaux effectués au laboratoire ou in situ.
- **L'approche écotoxicologique** étudie le comportement de certaines espèces animales ou végétales indicatrices face aux flux de polluants issus des déchets. Cette approche consiste à réaliser des tests de laboratoire dans des conditions environnementales contrôlées, soit sur une seule espèce (tests monospécifiques), soit sur un nombre réduit d'espèces présentes dans un même milieu recréant ainsi un écosystème simplifié (tests plurispécifiques en microcosmes ou mésocosmes). Un chapitre de ce mémoire (Chapitre I) est consacré à la mise en place d'une batterie de tests sur quelques espèces végétales.

- **L'approche écologique** permet d'établir l'écotoxicité d'un déchet sur un écosystème naturel par la mise en évidence des effets écologiques. Cette approche est donc, au contraire de la précédente, une approche intégrée. Elle considère le fonctionnement et la dynamique d'un écosystème dans toute sa complexité et dans des conditions naturelles (climatiques, géographiques...) et apporte ainsi des informations précieuses sur l'état de santé des écosystèmes sollicité pour la valorisation du déchet. C'est cette approche que nous avons désiré développer dans nos recherches.

### **Contexte et objectif de l'étude**

Le bon fonctionnement d'un écosystème est caractérisé par l'intégrité des cycles des éléments et des flux d'énergie, par sa stabilité, et par la résilience des perturbations ou des stress (O'Neill *et al.*, 1986). Van Bruggen et Semenov (1999) précisent que la qualité des sols peut être considérée comme un des éléments de la santé d'un écosystème. Nous avons vu dans la synthèse bibliographique de ce mémoire que de nombreux auteurs ont tenté de développer des indicateurs physiques, chimiques et biologiques de la qualité des sols (Karlen *et al.*, 1997 ; Doran et Zeiss, 2000 ; Hess *et al.*, 2000). Ils sont utilisés pour définir l'influence de différents aménagements environnementaux ou agricoles, de perturbations chimiques ou biologiques, de valorisation inadaptée de déchets, de contamination, etc., sur la "santé" des sols (Sommerfeldt et Chang, 1985 ; Ovreas et Torsvick, 1998). Actuellement les recherches visant à évaluer le potentiel écotoxicologique de polluants, sont fréquemment orientées vers la détermination d'indicateurs biologiques pertinents.

Les déchets d'incinération des ordures ménagères possèdent, de par leur composition minérale, un fort potentiel écotoxicologique. Leur valorisation dans un milieu naturel nécessite la détermination du risque de contamination et de toxicité encourue par l'écosystème récepteur. L'étude des risques écotoxicologiques de tels matériaux oblige la définition préalable de scénarios de valorisation des déchets, leur caractérisation chimique et de celles de leurs effluents, ainsi qu'une bonne connaissance du fonctionnement du milieu récepteur. Nos travaux ont pour objectif de définir le niveau d'acceptabilité des flux de polluants issus de deux types de déchets d'incinération sur le fonctionnement biologique de l'écosystème "prairie".

Les espèces végétales sont particulièrement sensibles à toutes les modifications environnementales de leur habitat et aux contaminations minérales (Muller, 1995 ; Sanità di Toppi et Gabbrielli, 1999). Un stress salin affecte de nombreux aspects métaboliques et physiologiques d'une plante (statut hydrique, balance ionique, réactions biochimiques...). Ces modifications induisent des changements anatomiques et une réduction de la croissance (Rozema, 1991). Les éléments traces tels que Zn, Pb, Cu, Cd, Ni et Cr sont parmi les plus toxiques et provoquent une inhibition de la croissance, une réduction de la biomasse et une modification de l'activité métabolique et physiologique de la plante (Clijsters *et al.*, 1991 ; Ebbs et Kochian, 1997). Ernst *et al.* (2000) rapportent que les plantes métallo-tolérantes sont d'excellents indicateurs des effets phytotoxiques des solutions polymétalliques.

Les micro-organismes bactériens sont de plus en plus souvent utilisées comme indicateurs biologiques de la qualité des sols. Il existe en effet d'importantes relations entre la diversité bactérienne, la qualité des sols et des plantes, et la santé d'un écosystème (Eijsackers, 1983 ; Atlas *et al.*, 1991 ; Doran *et al.*, 1996). Le choix des microorganismes comme bioindicateur est également motivé par leur sensibilité accrue aux perturbations anthropiques, leur relation avec les principales fonctions du sol notamment celles qui conditionnent le fonctionnement de l'écosystème (Bengtsson, 1998 ; Doran et Zeiss, 2000). L'ubiquité de présence et la diversité des niches écologiques des bactéries telluriques en font des indicateurs pertinents (Soulas, 1999). Par ailleurs, de nombreux travaux montrent que des perturbations environnementales et anthropiques provoquent des changements dans les populations microbiennes telluriques et dans le fonctionnement du sol (McGrath *et al.*, 1995 ; Kozdroj et van Elsas, 2000 ; Margesin *et al.*, 2000).

Certaines techniques (mesure de biomasse, d'activités enzymatiques, d'activités microbiennes) traduisent la résultante d'un ensemble de changements physiologiques et de réarrangements dans la composition spécifique des communautés bactériennes. Elles conduisent cependant à une sous évaluation du risque (Sauvé *et al.*, 1999). Ward *et al.* (1992) estiment, par exemple, que les études classiques sur les bactéries cultivables ne prennent en compte, selon les sols, que 0,1 à 10 % de la microflore totale. Les techniques qui permettent d'évaluer les modifications de la structure spécifique ou fonctionnelle des communautés microbiennes par l'établissement d'empreintes génétiques, chimiques ou métaboliques, s'affranchissent des imprécisions inhérentes aux cultures bactériennes. L'avantage de l'étude directe, sur l'ADNr bactérien, est de prendre en compte plus de 80% des bactéries du sol (More *et al.*, 1994 ; Zhou *et al.*, 1996 ; Ranjard et al, 1999).

Nos travaux ont pour **objectif de définir l'impact d'effluents** produits à partir de la définition de scénarios de revalorisation de deux déchets d'incinération (Perrodin *et al.*, 2002, annexe 1) sur le fonctionnement et la dynamique de l'écosystème "prairie". Deux types de déchets d'incinération ont été étudiés: les Mâchefers d'Incinération des Ordures Ménagères (**MIOM**) et les Résidus d'Épuration des Fumées d'Incinération des Ordures Ménagères (**REFIOM**) stabilisés et solidifiés dans un liant hydraulique. La description des matériaux solides d'origine est effectué dans l'article présenté en annexe 1.

### **Déchets étudiés et conditions expérimentales de terrain**

#### *Obtention des effluents*

Les déchets étudiés sont différents de part leurs origines, leurs natures, leurs traitements et leurs utilisations. Les MIOM et les Scories sont deux déchets granulaires résiduels de la combustion de déchets ménagers (MIOM) et industriels (Scories). Les effluents issus de ces deux déchets granulaires sont obtenus par une percolation d'eau au travers d'un tas de déchets (conditionnés dans des lysimètres).

Ce procédé d'obtention conduit à l'appellation de "percolat" de MIOM et de Scories (Scories de seconde fusion du plomb : SCPb). Le REFIOM est un résidu de cendres volatiles piégées dans un filtre et entrant dans la composition d'un déchet massif après sa stabilisation et sa solidification dans un liant hydraulique. L'effluent est obtenu par l'immersion du déchet solidifié dans de l'eau. Le relargage des éléments minéraux du déchet vers la solution est effectué par lixiviation. Les percolats de MIOM, de SCPb et le lixiviat de REFIOM ont été produits par le CERED (Centre d'Essai et de Recherche sur l'Élimination des Déchets).

Pour plus de commodité, les termes "percolat" et "lixiviat" seront utilisés indifféremment pour les trois déchets. La composition des lixiviats est détaillée dans le Tableau 1.

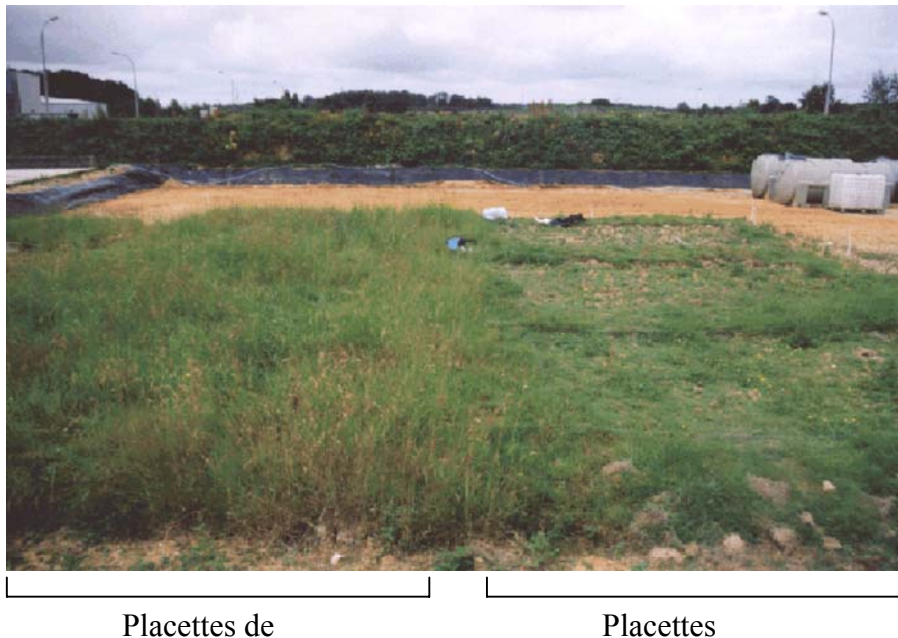
Matériau	MIOM			SCORIES			REFIOM	
<b>volume de lixiviation pour 1kg de matériau</b>	2L			7.5L				
Eléments	mg par kg de matériau lixivié	mg/L	meq/L	mg par kg de matériau lixivié	mg/L	meq/L	mg/L	meq/L
Cl-	3435	1717,5	48,38	6705	894,00	25,18	3680	103,66
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	300	150	1,56	169192	22559,00	234,99	18,5	0,19
<b>somme Cl+SO4</b>			49,94			260,17		103,85
<b>S (anion HS-)</b>	113	56,5	1,77	63109	8415,00	262,97	nd	
<b>somme des anions dosés</b>			<b>51,71</b>			<b>523,14</b>		<b>103,85</b>
<b>Na</b>	1445	722,5	31,41	88497	11800	513,04	610	26,52
<b>K</b>	798	399	10,23	582	77,60	1,99	1000	25,64
<b>Ca</b>	238	119	5,95	1621	216,00	10,80	902	45,10
<b>Mg</b>	0,05	0,025	0,00		0,00		nd	
<b>somme Na+K+Ca+Mg</b>			47,59			525,83		97,26
<b>Fe(Fe<sup>2+</sup>)</b>	<sd			4313	575,00	20,54	0,01	0,00
<b>somme des cations dosés</b>			<b>47,59</b>			<b>546,37</b>		<b>97,26</b>
<b>Mn</b>	<sd				0,00		<0.003	
<b>Hg</b>							<0.0005	
<b>Pb</b>	0,23	0,115		79,4	1,10		<0.07	
<b>Zn</b>	0,04	0,02		66	0,09		<0.015	
<b>Cu</b>	4	2		6,5	0,01		<0.01	
<b>Cd</b>	<sd			59,08	0,08		<0.01	
<b>Cr total</b>	0,1	0,05		0,03	0,00		<0.02	
<b>Ni</b>	0,03	0,015		1,03	0,00		nd	
<b>As</b>	<sd			0,09	0,00		<0.05	
<b>somme des constituants dosés en mg /L</b>		<b>3167</b>			<b>44538</b>		<b>6211</b>	
<b>residu sec en mg</b>	<b>6345</b>	<b>3173</b>		<b>262326</b>	<b>34977</b>		<b>6980</b>	
<b>résidus sec réel</b>		1700			19170		4720	

**Tableau 1. :** Composition des lixiviats*Préparation des placettes expérimentales et contamination*

En mars 1997, le Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Sol (CNRS, Lyon1) a reconstitué une prairie de 100 m<sup>2</sup> sur le site du CERED (Vernon, Eure) (Poly, 2000). La zone expérimentale a été préalablement rendue étanche par l'installation d'une géomembrane.

Le sol a été prélevé à proximité de la zone expérimentale sur un site homogène sous une prairie permanente à l'aide d'une pelle mécanique. Le travail fut réalisé de manière à perturber le moins possible le sol et la végétation. Des blocs de 0,5 m × 2 m sur une

profondeur de 20 cm ont été prélevés puis déposés sur la zone expérimentale en respectant la succession naturelle des horizons pédologiques : la couche prélevée entre 0 et 20 cm de profondeur recouvre la couche prélevée entre 20 et 40 cm. La parcelle a été entourée d'une zone tampon de terre compactée (Poly, 2000).



**Photographie 1.** : Placettes expérimentales sur le site du CERED

Après une année de stabilisation (mars 1998), destinée à permettre un fonctionnement du sol le plus proche possible des conditions initiales, six placettes de 10 m<sup>2</sup> chacune ont été délimitées sur la prairie expérimentale (Photographie 1). Sur trois d'entre d'elles, la végétation prairiale spontanée fut conservée intacte. Les trois autres ont subi un désherbage manuel en supprimant les deux premiers centimètres du sol avant d'y semer de l'*Agrostis tenuis* (environ 200 g de graines par m<sup>2</sup>). Le choix de cette plante fut motivé par son importante présence sur les prairies naturelles proche du site expérimental, mais également pour son caractère pionnier et gazonnant. Ce semis a précédé les traitements avec les lixiviats, réalisés en avril 1998.

Le volume total de percolats à épandre sur les placettes a été calculé par Poly (2000) de façon à saturer la macro-porosité de l'horizon A1 du sol. La densité apparente des 10 premiers centimètres de l'horizon A1 varie de 1 à 1,4 g / cm<sup>3</sup> (soit 100 à 140 kg / m<sup>2</sup>) sous la prairie naturelle et la prairie d'*Agrostis* respectivement (Gros, 1999). Ceci permet d'estimer

les volumes de percolats à épandre entre 40 et 56 l / m<sup>2</sup>. Un volume identique devant être appliqué sur toutes les placettes, le volume intermédiaire de 44 l / m<sup>2</sup> a été choisi. Ainsi, deux des placettes ont été arrosées avec de l'eau (44 l / m<sup>2</sup>), elles constituent les placettes témoins. Deux autres placettes furent traitées successivement avec les percolats de MIOM (44 l / m<sup>2</sup>). Les deux dernières ont été traitées avec le lixiviat de REFIOM (44 l / m<sup>2</sup>). Ces volumes ont été apportés sur 4 jours, ce qui représente 11 l / m<sup>2</sup> par jour.

### *Le sol du site expérimental*

Le sol étudié est de type luvisol (WRB Soil Classification, 1999). Il présente un horizon A1 (0 à 15 cm) de structure grumeleuse et de couleur brune légèrement jaunâtre (10 YR 6/4). L'horizon suivant est un horizon E (15 à 20 cm) qui caractérise les sols lessivés. Il possède une structure plus compacte, moins organisée signe du lessivage des argiles, une couleur brun pâle (10 YR 7/3) et une épaisseur variable. En dessous, se trouve l'horizon Bt (20 cm à >1,2 m) qui concentre les argiles lessivées à partir de l'horizon E. Il possède une structure polyédrique et des marques de marmorisation signifiant la présence d'une nappe perchée temporaire ou tout au moins d'un mauvais drainage (code munsell®: 10 YR 6/2).

Seul l'horizon superficiel A1 fut considéré et étudié dans nos travaux car c'est l'horizon le plus exposé aux pollutions. Cet horizon est également le plus actif du point de vue des populations et des activités bactériennes et il contient la plus grande densité racinaire.

Les caractéristiques analytiques physiques et chimiques de l'horizon A1 sont détaillées dans le Tableau 2. Le sol possède une texture limoneuse (76 % de particules dont la taille est située entre 50 et 2 µm) ce qui implique une macro-porosité moyenne en l'absence d'un système racinaire structurant. La capacité d'échange en cation bien que faible (faible quantité d'argile et de matière organique) est saturé par l'ion calcium. Le ratio carbone/azote indique que l'activité biologique globale du sol est satisfaisante et la dégradation de la matière organique rapide.

pH	C	N	C/N	$\rho_b$	Cond	Analyse texturale						Bases échangeables					
						H <sub>2</sub> O	KCl	SG	SF	LG	LF	Ag	CEC	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
		%		kg dm <sup>-3</sup>	$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	g kg <sup>-1</sup>					cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>						
6.7	6	1.74	0.16	11	0.97	90	32	97	527	198	146	8.1	0.21	0.04	7.9	0.1	0.09

$\rho_b$  Densité apparente

Cond: conductivité

SG: sables grossiers, SF: sables fins, LG: limons grossiers, LF: limons fins, Ag: argiles

**Tableau 2. :** Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'horizon A1 (sol du site du CERED)

### *La végétation du site expérimental*

Un relevé floristique sur la prairie naturelle voisine des placettes expérimentales fut réalisé en septembre 1998 en utilisant la méthode de Braun-Blanquet (1928). L'inventaire floristique réalisé sur une aire minimale de 10 m<sup>2</sup> (surface de la placette) est accompagné d'un coefficient quantitatif (abondance). Cet outil définit l'appartenance de groupements floristiques à une association phytosociologique. Il permet de situer la prairie étudiée par rapport à d'autres non seulement dans sa composition floristique mais également dans son mode de fonctionnement, voir dans son contexte écologique. Le tableau 3 présente la composition floristique de la prairie.

L'appartenance phytosociologique de ce groupement floristique est délicat à définir du fait de l'existence de plusieurs influences (effet de lisière : *Quercus robur*, influence rudérale : *Cirsium arvens*, influence mésophile : *Vicia cracca* et acidophile : *Rumex acetosela*). Néanmoins le groupement floristique peut être défini comme appartenant à l'alliance de l'Arrhenatherion eliatoris (groupement mésophile). L'abondance de l'*Agrostis tenuis* indique qu'il s'agit d'un sol de friche industrielle. Cette espèce possède effectivement pour écotype des sites pollués en cours de recolonisation (Ross, 1994).



Surface du relevé (m <sup>2</sup> )	10
Recouvrement total (%)	100
espèces	Fréquence (%)
<i>Qercus robur</i>	1
<i>Agrostis capillaris</i>	18
<i>Arrhenaterum elatius</i>	18
<i>Holcus lanatus</i>	9
<i>Poa nemoralis</i>	7
<i>Poa trivialis</i>	5
<i>Festuca rubra</i>	2
<i>Dactylis glomerata</i>	5
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	5
<i>Alopecurus pratensis</i>	2
<i>Rumex acetosela</i>	5
<i>Pastanica sativa</i>	3
<i>Rubus fruticosus</i>	2
<i>Rosa canina</i>	1
<i>Agrimonia eupatoria</i>	2
<i>Vicia cracca</i>	1
<i>Vicia sepium</i>	1
<i>Epilobium</i> sp	3
<i>Cirsium arvens</i>	3
<i>lotus corniculatus</i>	3
<i>Ranunculus auricomus</i>	3
<i>Senecio vulgare</i>	1

**Tableau 3. :** Composition floristique de la prairie proche des placettes expérimentales

Nous rapportons dans cette troisième partie les effets d'une pollution ponctuelle sur les propriétés physico-chimiques d'un sol lessivé (Chapitre I), sur le comportement à court terme des communautés bactériennes dans différentes conditions expérimentales (Chapitre II), sur les relations entre la flore et les bactéries à moyen et long terme (Chapitre III). Les solutions ont été testées par un épandage unique sur des placettes expérimentales reconstituant des prairies naturelles et des prairies monospécifiques d'*Agrostis tenuis* L. Une batterie de tests de phytotoxicité a été mise au point pour compléter les travaux au champ. Ces tests ont été réalisés dans des conditions contrôlées pour mesurer les impacts des effluents de MIOM et de REFIOM stabilisés et solidifiés, ainsi que d'un effluent produit à partir d'un troisième déchet (les scories de seconde fusion du plomb), sur des plantes de sensibilité différentes aux perturbations chimiques (Chapitre IV).

## Chapitre I

### **Perturbations des propriétés physico-chimiques d'un sol lessivé soumis à l'épandage d'effluents de déchets d'incinération**

---

La composition minérale des effluents permet d'envisager une contamination saline du sol, essentiellement sodique, très importante. Le premier chapitre de cette partie a pour objectifs (i) de quantifier la contamination minérale consécutive à l'épandage des solutions de MIOM et de REFIOM stabilisés sur les prairies expérimentales, (ii) de déterminer les dégradations de certaines propriétés physico-chimiques des sols engendrées par cette contamination et (iii) d'évaluer le rôle qualitatif et quantitatif du couvert végétal sur les modifications des propriétés édaphiques. Nous décrivons dans ce chapitre, l'évolution des teneurs des principaux contaminants ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ) et la réponse de la structure du sol à cette contamination ceci au cours du temps : 4 jours, 6 mois et 15 mois après la contamination.

La mesure de la capacité d'échange et la détermination de la garniture cationique d'un sol constituent des outils de suivi de la qualité physique et chimique des sols. Ils permettent de caractériser ces propriétés chimiques (Duchaufour, 1977), de prévoir les modifications certaines propriétés physiques (Tessier *et al.*, 1999) et d'apprécier le risque écotoxique de l'importante concentration de certains éléments (Bergkvist, 1987; Chun *et al.*, 2001). Les propriétés de rétention en eau d'un sol varient d'un sol à l'autre en fonction du volume poral et du mode d'assemblage des particules d'argile (Richards, 1960). Ils précisent le rôle de la capacité d'échange cationique dans le mode d'assemblage des argiles et le volume poral. Le rôle de la CEC sur la stabilité physique et les propriétés mécaniques du sol est bien connu (Quirk et Schofield, 1955; Goldberg *et al.*, 1988; Salim et Tessier, 1998).

L'augmentation de la densité de charge des constituants des sols tend à augmenter la stabilité physique. Néanmoins, chaque cation possède des propriétés particulières vis à vis de ces caractéristiques physiques. Le cation  $\text{Ca}^{2+}$  est dit flocculant. Il joue un rôle important dans l'agrégation car il est à l'origine de forces d'attractions très fortes entre les colloïdes (rôle du chaulage). Le  $\text{Na}^+$  est au contraire un élément qui provoque la dispersion des argiles (Gupta *et al.*, 1984) et est ainsi susceptible de provoquer la déstructuration du sol (Salim et Tessier, 1998).

Les ions échangeables du complexe absorbant sont en équilibre avec la solution du sol : toutes modifications de la composition du sol provoquent un changement de cet équilibre par "échange" et conduit à des changements importants des propriétés physiques du sol. Nous décrivons dans ce chapitre les effets de la contamination sur la porosité totale, la distribution des tailles des particules et la stabilité des agrégats.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de **R. GROS**, J. POULENARD, L. JOCTEUR MONROZIER et P. FAIVRE. Cet article a été soumis à la revue *European Journal of Soil Science*.

## **Physico-chemical disturbances in a luvisol added with solid waste leachates.**

R. GROS<sup>1\*</sup>, J. POULENARD<sup>1</sup>, L. JOCTEUR MONROZIER<sup>2</sup> & P. FAIVRE<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup> Corresponding author: Laboratoire des Sciences du Sol, CISM Université de Savoie 73376  
Le Bourget du Lac Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, Bat. Gregoir Mendel, 16 rue  
Dubois Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

**Key words:** MSWI-ashes, ecocompatibility, sodium, soil structure, soil quality

**Running title:** Saline MSWI-ash leachates and soil properties

## I.1. Summary

The increasing use of incineration wastes for civil works necessitates the definition of relevant indicators of environmental compatibility. Diffusion of sodium-contaminated leachates onto soils may cause soil structural changes, with consequences on soil biological quality. In this study, the effect of incineration waste leachates from municipal solid waste incineration ashes (bottom ash and solidified air pollution control residue), on soil physical and chemical properties was investigated. Leachates were added on two experimental grasslands developed on an alfisol covered with vegetation differing by age and floristic composition. In the soil surface layer (0-10 cm), exchangeable sodium percentage (ESP) increased up to 13%, versus 0.4% in control plots. Total porosity decrease induced by the addition of leachates averaged 14% of the control soil porosity. In laboratory studies only the addition of pure SAPCr on 0-10 cm layer sample in non-polluted initial grassland, caused a decrease of the mean weight diameter (MWD) of aggregates by 49%. This decrease in MWD correlated with the slaking of the millimeter size macro-aggregates. Dispersive or flocculative effects on clay particles also were observed, depending on electrolyte concentration and composition of leachates ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ). Laboratories and field experiments suggested a structural deterioration in soil matrix originated from clogging pores. Such results showed that the impact of leachates on soil physics must be considered to define the environmental compatibility of waste reuse scenarios.

## I.2. Introduction

Soil structure is an important characteristic determining soil quality (Arshad *et al.*, 1996) that is affected by soil use and management (Angers *et al.*, 1993; Sánchez-Marañón *et al.*, 2002). Changes in soil porosity may affect soil biological activities (Šantrůčková *et al.*, 1993; Giusquiani *et al.*, 1995). Conversely, the fact that soil biota could influence on pore physical properties have been largely investigated (Tisdall & Oades, 1979; Dorioz *et al.*, 1992; Gorres *et al.*, 2001; Lavelle & Spain, 2001).

Whatever soil management, many investigations showed that hydrodynamic behaviour (Quirk & Schofield, 1955; Balks *et al.*, 1998; Aringhieri & Giachetti, 2001; Zangh & Norton, 2002), as well as structural state of soils (Curtin *et al.*, 1994; Mamedov & Levy, 2001), depend on both chemical composition and electrolyte concentration of percolating solutions. An increase in soil Na<sup>+</sup> content cause soil structural deterioration through (i) slaking (or disaggregation) with subsequent reduction of the amount of macropores (Abu-Sharar *et al.*, 1987); (ii) breakdown (microcracking) by differential swelling of clays, resulting in a reduction of pore size (McNeal *et al.*, 1966); (iii) dispersion and migration of clay, followed by the blocking of water conducting pores by lodged clay particles (Abu-Sharar *et al.*, 1987; Frenkel *et al.*, 1972; Amezketta & Aragues, 1995); and (iv) flocculation of the dispersed particles. In the paper presented here, we focussed on the first process of structure modifications, which involves disaggregation of millimeter size aggregates, due to disturbances caused by the spreading of leachates from municipal solid waste.

Municipal wastes incineration processes generate solid residues, as Municipal Solid Waste Incinerator Bottom Ash (MSWI BA) and Air Pollution Control residue (APCr). As a result of recent developments in waste management, considerations are given to recycling and various scenarios in outdoor buildings (Van der Sloot *et al.*, 2001; Mangialardi *et al.*, 1999). Such use in civil engineering raises some concern on the short and long term effect of rain water weathering and on dissemination of contaminants in the environment.

Leachates from such waste materials have complex and variable mineral composition (Wiles, 1996; Park *et al.*, 2001). The chemical composition of these municipal solid waste leachates depends on the nature of the refuse, the methods of storage, stabilisation processes, landfill or valorisation. Wiles (1996) specified that such solutions are characterised by a high monovalent cation concentration (especially Na and K) with large content of other cations as Ca, Mg, Cu, or anions as chloride, sulphate and carbonate. These effluents are characterised by a pH slightly higher than neutral for Stabilised APCr (SAPCr) leachate and exceeding 11 for bottom ash leachate. Soil surface is usually the first recipient environment for running water from such materials resulting in an addition of waste solutes to the soil. Direct consequences may be expected on soil quality, particularly on soil chemical and physical properties in soil structure.

Effect of saline municipal wastewater or irrigation waters on soil physical properties (e.g. hydraulics parameters) are well known (Curtin *et al.*, 1994; Bond, 1998; Levy *et al.*, 1999; Mamedov *et al.*, 2001). But, there are few papers describing the effect of complex leachates produced from municipal or industrial waste in field experiments. To mimic such effluents, Lieffering & McLay (1996) studied the effect of two hydroxides (NaOH and KOH) and two chloride (NaCl and KCl) on aggregate stability and saturated hydraulic conductivity (Ks) of three New Zealand soils. In laboratory experiments, they showed that hydroxide solutions dramatically weaken aggregates, reduced aggregate stability and decrease Ks in soil, more than chloride. Nevertheless, The effect obtained through the addition of synthetic solutions or irrigation waters may differ from effluents because they do not contain a wide variety of cations and anions. Similar results on soil permeability were obtained with Na rich industrial effluents by Meenner *et al.* (2001).

The effect of similarly strongly saline leachates resulting from rain water weathering of two municipal incineration wastes (MSWI BA and MSWI SAPCr), on soil structure was investigated. This paper reports the results of field experiments and laboratory tests to characterise the mineral contamination of soil and the effect on soil aggregation. Modulation of these effects on field structural disturbances by vegetation cover (age and type) was also approached.

### **I.3. Materials and methods**

#### **I.3.1. Soil, leachates and field experiment**

*Soil:*

A field experiment on a luvisol under grassland was set up at the CERED Research and Tests Center for Waste Elimination (Normandie, France). Table I.1. reports some soil characteristics. Soil texture was determined by the pipette method (Gee & Bauder, 1986). Cation-exchange capacity (CEC) and exchangeable cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) were determined in  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  extract. Soil sub-samples were added with pure water or 1M KCl (10/25 w/v) before pH measurement with glass electrode (McLean, 1982).

Carbon and nitrogen amount were measured using a Carlo Erba CHN Analyser. Soil bulk density ( $\rho_b$  in  $\text{g cm}^{-3}$ ) was determined by the paraffin method (Blake & Hartge, 1986).

**Table I.1.** : Physical and chemical properties of the soil used in the study

pH		C <sup>a</sup>	$\rho_b$	Particle-size distribution <sup>b</sup>					Exchangeable cations					
H <sub>2</sub> O	KCl			CS	FS	CSi	L	Cl	CEC	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
		%	$\text{kg dm}^{-3}$	$\text{g kg}^{-1}$					$\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$					
6.7	6	1.74	0.97	32	97	527	198	146	8.1	0.21	0.04	7.9	0.1	0.09

<sup>a</sup>Organic carbon

<sup>b</sup>CS is coarse sand; FS is fine sand; Csi is coarse silt, L is loam and Cl is clay

#### Leachates:

The MSWI BA and MSWI SAPCr leachates used in this work were produced in lysimeters (laboratory device) and in field pilot plants. Technical processes of percolation and leaching were established according to reuse scenarios defined by Perrodin *et al.*, 2002. The main characteristics of leachates are given in Table I.2. A useful index for predicting excessive exchangeable Na is sodium adsorption ratio (SAR) of saline water (US Salinity Laboratory Staff, 1954). SAR indicates the level of sodium relative to other cations in the saline solution and is defined by:  $\text{SAR} = (\text{Na}^+)/[(\text{Ca}^{2+}) + (\text{Mg}^{2+})/2]^{1/2}$ , where ( $\text{Na}^+$ ), ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and ( $\text{Mg}^{2+}$ ) are the concentrations of sodium, calcium and magnesium ( $\text{mmol l}^{-1}$ ). In addition to the SAR index, total salinity of leachates must be also considered (Keren, 2000). For experiments on both dispersion and aggregate stability tests, five dilutions of MSWI BA and MSWI SAPCr leachates in water (v/v) were used: 5, 15, 25, 35, 50 mL per 100 mL, as well as undiluted leachate (pure leachate). Pure water was added in control treatment.

#### Field experiment:

Six plots (5m×2m) were delimited at the CERED site. Indigenous plant cover was left on three plots. Main grass species were colonial bentgrass (*Agrostis tenuis*), *Arrhenaterum eliatum* and *Holcus lanatus*. After removal of the indigenous cover and of the first centimeter



of top soil, *A. tenuis* was seeded on the resulting three bare soil plots. Three plot pairs, each consisting of one plot with permanent and elderly grass cover and one with *A. tenuis* shoots, were defined. MSWI BA leachate, MSWI SAPCr leachate or rainwater (control water plot) were added at a rate of 11 l m<sup>-2</sup> per day during four days. These volume and flux of leachates addition agreed with the scenarios of solid waste valorisation (Perrodin *et al.*, 2002).

**Table I.2.** : Main characteristics of leachates

	MSWI-BA	MSWI-SAPCr
pH	11.1	7.6
EC (dS/m)	7.5	11.2
	(mg l <sup>-1</sup> )	
Cl <sup>-</sup>	1723	3680
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.8	1.1
HS <sup>-</sup>	58	<sd
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	152	18.5
Na	726	610
K	401	1000
Ca	119	900
Mg	0.025	<sd
Mn	<sd	<sd
Na + Ca + Mg	1246.025	2510
SAR	18.3	5.6

### *I.3.2. Soil sampling and analysis during field experiment*

Three soil samples were collected from the A1 layer (0-10cm). After collection, the samples were air dried, sieved (< 4mm) and mixed. This composite sample was used for main analysis of soil (Table I.1.), dispersion tests and structural stability tests.

Soil from each plot was sampled, as follows: three samples, of 10x10x10cm each, were removed by coring, wrapped in plastic bags and stored in the cold room (4°C) until analysis. A first sampling was carried out 4 days after leachate spreading. The second and third sampling were done 6 and 15 month after plot contamination, respectively.

For salt contamination determination, soil sub-samples were air-dried, sieved (<2 mm) and composited. Cation-exchange capacity (CEC) and exchangeable cations (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) were measured at soil pH in Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> (Orsini & Rémy, 1976). With these

data, we computed CEC saturation (sat) by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , and for each cation, exchangeable cation percentage which represents the CEC occupied by sodium (ESP), calcium (ECaP), potassium (EKP), magnesium (EMgP) or manganese (EMnP).

Total C was measured using the Carlo Erba CHN Analyser. Particle density ( $\rho_p$  in  $\text{g cm}^{-3}$ ) was measured on composite core sample using water pycnometer method (six replicates of each sample) (Blake & Hartge, 1986). Soil bulk density ( $\rho_b$  in  $\text{g cm}^{-3}$ ) for each core sample was determined at 1, 5, 9 cm depth, by the paraffin method. Total porosity was calculated as follows:  $\Phi_t \% = 1 - (\rho_b / \rho_p)$ .

### **I.3.3. Aggregate stability test**

Stability of aggregates was determined by modified wet-sieving method (Kemper & Rosneau, 1986; Le Bissonnais, 1996) on soil samples after pre-treatment with pure water or MSWI leachates. Three replicates were used for each treatment.

#### *Pre-treatment:*

Approximately 15 g of dry coarse fraction (1-4 mm size) were put on a 50  $\mu\text{m}$  mesh size grid, and left to moisten at the surface of pure water or leachates during 1 hour (Liefvering & McLay, 1996). The wet aggregates were then poured on a 50  $\mu\text{m}$  mesh size sieve, and briefly submitted to a mild shutter in pure water. The more stable part of aggregates ( $>50 \mu\text{m}$ ) as well as the  $<50 \mu\text{m}$  fractions generated by the pre-treatment, were gently washed on the top of a column of 4 sieves and were separated in 5 fractions by serial wet sieving.

#### *Wet sieving:*

Serial sieving of aggregates and particles was performed on a automatic shaker (Fritsch, Oberstein) during 30 minute under controlled aspersion ( $1 \text{ l mn}^{-1}$ ). Sieving resulted in five size fractions:  $>2000 \mu\text{m}$  (F1), 2000 to 1000  $\mu\text{m}$  (F2), 1000 to 200  $\mu\text{m}$  (F3), 200 to 50  $\mu\text{m}$  (F4) and  $<50 \mu\text{m}$  (F5).

*Separation of aggregated material and coarse particles:*

The coarse fractions F1 and F2 contained aggregates and coarse sand particles. To distinguish and measure the amount of aggregate material, each F1 or F2 fraction was forced through the mesh grid until particles of the nominated mesh-size only would be left on the sieve (F1<sub>S</sub> and F2<sub>S</sub>). Aggregates components obtained by this mild crushing were collected on a container, dried and weighed (F1<sub>agg</sub> and F2<sub>agg</sub>).

Other sized fractions (F3 and F4) as well as coarse particles (F1<sub>S</sub> and F2<sub>S</sub>) were also oven-dried (105°C) and weighed.

The amount of fraction <50 µm size (F5) was calculated by the difference between initial soil mass and the sum of the fractions coarser than 50 µm.

*Aggregate stability*

The data on aggregate stability are presented as the mean weight diameter (MWD i.e.  $MWD = \sum (\% \text{ of sample on sieve} \times \text{mean intersieve size})$ ) The effect of each treatment on aggregate stability was expressed as the mean weight diameter (MWD) (Kemper & Rosneau 1986; Le Bissonnais, 1996).

**I.3.4. Grain size distribution in presence of MSWI-leachates**

The usual procedure of the mechanical analysis has been used to determine the particle size distribution (Table I.1.) (Gee & Bauder, 1986).

To assess the dispersive-flocculating effect of leachates, undiluted leachates and various dilutions of them in water were used as dispersive reagents on air dried subsamples. Twenty grams of air dry sieved soil (<2 mm) were end-over-end shaken in 200 mL of undiluted or diluted MSWI-leachates (15/100 and other dilutions as aggregate stability test). Pure water was used as control.

Results are expressed as in classical mechanical analysis in 3 grain sizes: sand-size (2000 – 50 µm), silt-size (50 – 2 µm) and clay-size (less the 2 µm).

## I.4. Results

### I.4.1. Field impact assessments

#### I.4.1.1. Contamination

Analysis of soil mineral composition after leachates spreading on experimental plots, showed that high amount of  $\text{Na}^+$  was immobilised on the first centimeters of top soil. Four days and six months after contamination, ESP increased has shown in Table I.3., as well in MSWI BA as in SAPCr plots. The amount of Na of contaminated plots was significantly higher than in control ( $P < 0.05$ ). ESP values under indigenous grassland (IG) were multiplied by 13.5 in MSWI BA contaminated plot and by 18.3 in SAPCr contaminated plot ( $P < 0.05$ ), compared to the control plot, when the ESP values were multiplied respectively by 5.1 and 5.4 ( $P < 0.05$ ) under *A. tenuis* cover (AC). MSWI BA plots showed a significant increasing of the cation-exchange capacity saturation (sat) du to  $\text{Na}^+$  increase. Contrastingly, a significant increase of the  $\text{Ca}^{2+}$  content within soils of SAPCr plots was revealed by a strong increase of ECaP with values up to 100% of the CEC. The increase in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  contents of the contaminated soils resulted in a saturation of the exchange capacity and in an increase of salt concentration in the soil solution.

Six months after the addition of leachates, the sodic contamination was still significant (Table 3) indicating a long-term residence for  $\text{Na}^+$  in MSWI BA and SAPCr contaminated soils. The ESP values measured under the young cover contaminated with SAPCr leachate (AC) was significantly more important (13.4) than under indigenous cover (9.4) ( $P < 0.05$ ). Then, the cation-exchange capacity remained saturated with  $\text{Na}^+$  while  $\text{Ca}^{2+}$  content significantly decreased independently of the grass cover. In MSWI BA contaminated soils under AC,  $\text{Na}^+$  remained similarly with the value obtained 4 days after plots contamination, when under IG ESP value decrease moderately but significantly.

Fifteen months after contamination, results were similar to those observed at six months (data not shown).

**Table I.3.** : Chemicals and physicals properties of field experimental soils, 4 days, 6 and 15 months after leachate addition.

	Indigenous grassland			<i>Agrostis tenuis</i> cover		
	Water	MSWI BA	MSWI SAPCr	Water	MSWI BA	MSWI SAPCr
Day 4						
ESP	0.6 a	7.6 b	10.3 c	1,5 a	8.0 b	8.3 b
ECaP	78.0 a	79.3 a	99.8 b	77.2 a	77.4 a	103.1 b
EKP	6.0 a	3.5 b	5.3 a	3.1 a	3.5 a	4.4 b
EMgP	6.2 a	5.8 a	6.7 a	5.7 a	4.4 b	5.3 a
EMnP	2.4 a	2.4 a	2.9 a	2.4 a	2.1 a	2.8 b
Sat	93.2 a	98.6 b	125 c	89,9 a	95.4 b	123.9 c
Month 6						
ESP	1.1 a	7.1 b	9.4 c	1.0 a	8.1 b	13.4 c
ECaP	83.2 a	85.1 a	73.8 b	86.6 a	77.5 b	76.6 b
EKP	3.1 a	4.1 b	3.8 a	2.8 a	6.0 b	3.9 a
EMgP	3.6 a	5.7 b	5.9 b	3.6 a	4.4 b	5.9 c
EMnP	1.9 a	1.7 a	1.8 a	1.6 a	1.6 a	1.8 a
Sat	92.9 a	103.7 b	94.7 a	95.6 a	97.6 a	101.6 b
C (%)	2.5 a	1.9 b	2.1 a	1.8 a	1.3 a	1.58 a
$\rho_p$	2.35 a			2.43 a		
Month 15						
C (%)	1.9 a	2.0 a	1.8 a	1.5 a	1.5 a	1.6 a
$\rho_p$	2.50 b			2.56 b		

† Values presented represent means of 6 replicate analyses

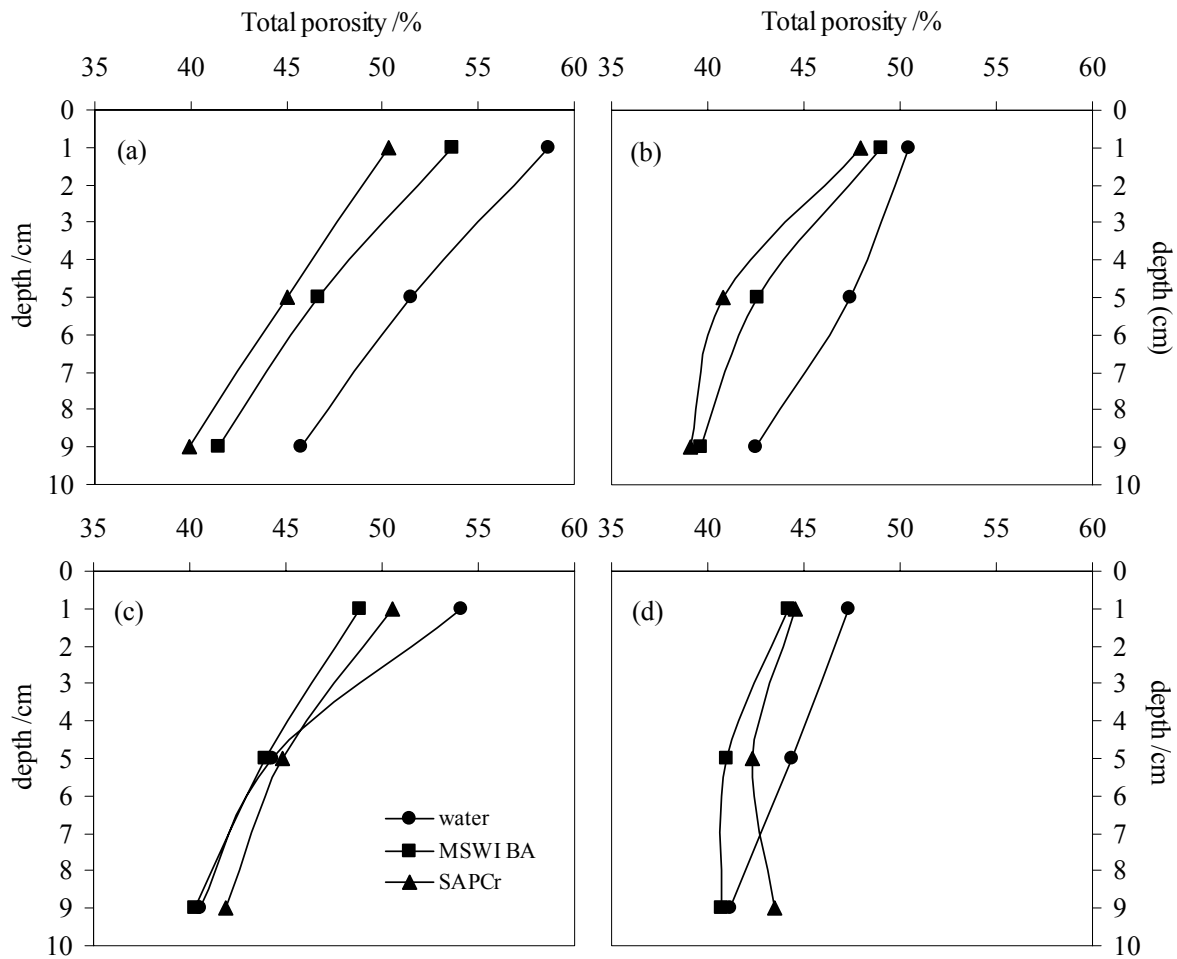
‡ ESP : Exchangeable Sodium Percentage ; ECaP : Exchangeable Calcium Percentage ; EKP : Exchangeable Potassium Percentage ; EMgP : Exchangeable Magnesium Percentage ; EMnP : Exchangeable Manganese Percentage ; Sat : saturation percentage of CEC ;  $\rho_p$  are express in  $\text{kg dm}^{-3}$

‡‡ Values followed by the same letter, plots by plots, are not significantly different to water treatment according to t test ( $P < 0.05$ )

#### *I.4.1.2. Total porosity (TP)*

Six months after the addition of leachates, a significant decrease of TP, under indigenous (IG) (Figure I.1a.) and *Agrostis* grassland (AC) (Figure I.1b.), was measured on contaminated soils compared to control soil. In MSWI BA contaminated soil, a significant decrease (*t* test) of TP was measured at 5 cm depth only: -9% under IG and -10% under AC ( $P < 0.001$ ). In SAPCr contaminated soil, negative effects for each depth were measured (*t* test): -14% at 1 cm ( $P < 0.05$ ), -13% at 5 cm ( $P < 0.005$ ) and 9 cm depth ( $P < 0.05$ ) under indigenous cover; -5% at 1 cm ( $P < 0.05$ ) and -14% at 5 cm ( $P < 0.001$ ) under *Agrostis* cover. For MSWI BA, variance test on the global 0-10 cm top soil total porosity values showed no significant variation between leachate treated and water treated soil, whatever the vegetation cover. In SAPCr contaminated soil, an average effect was observed on the 0-10 cm top soil and resulted in stronger decrease of TP under IG (-13%; Anova test  $P = 0.015$ ) than under AC (-8% decrease; Anova test  $P = 0.038$ ).

At month 15, TP values of the two uncontaminated control had plots significantly decreased when compared to month 6: at 5 cm depth -14% under IG (Figure I.1c.) and -6.5% under AC (Figure I.1d.). At this time, and at this depth, the plots which received MSWI BA and SAPCr treatments showed TP values significantly lower than the control plot: -10% for BA-treated soil and -7% for SAPCr-treated soil under IG ( $P < 0.05$ ); -7% and -6% with BA or SAPCr ( $P < 0.05$ ) respectively under AC.



**Figure I.1.** : Total porosity of experimental field plots, 6 months after the treatment with water, MSWI BA or SAPCr under Indigenous grassland (a) and under *Agrostis* cover (b); 15 months after the treatments under Indigenous grassland (c) and under *Agrostis* cover (d).

#### I.4.2. Aggregates stability test

##### I.4.2.1. Mean weight diameter

Aggregate stability was significantly lower ( $p < 0.05$ ) for all concentrations of MSWI SAPCr pre-treatment compared to distilled water pre-treatment, with the greatest decrease occurring with pure leachate (Table I.4.). The aggregate stability decreased linearly with increasing concentration [conc] of SAPCr in pre-treatment used between 0% and 35% ( $MWD = -0,0026 [\text{conc}] + 0,2192; r=0.98$ ) and between 35% and 100% ( $MWD = -0,0002 [\text{conc}] + 0,1367; r=0.89$ ). By contrast, the variations in total electrolyte concentration of

MSWI BA pre-treatments did not result in variation of the stability of the aggregates. In general, aggregates are less stable ( $P < 0.05$ ) when pre-treated with low dilutions of MSWI BA (5%, 15%, 25% and 50%) and the major effect was found with lower concentrations when pure MSWI BA pre-treatment leachate had no significant effect.

**Table I.4.** : Aggregate stability expressed as mean weight diameter (MWD) as influenced by MSWA-BA and MSWI – SAPCr treatments.

Concentrations %	MSWI BA		MSWI SAPCr	
	MWD	% of water <sup>a</sup>	MWD	% of water <sup>a</sup>
0	229 a	100	229 a	100
5	184 b	81	193 b	84
15	185 b	81	183 b	80
25	184 b	81	156 b	68
35	191 b	83	127 c	56
50	189 b	83	131 c	57
100	199 a	87	116 c	51

<sup>a</sup>% of water =  $100 \times \text{MWD (pre-treatment)} / \text{MWD (distilled water)}$

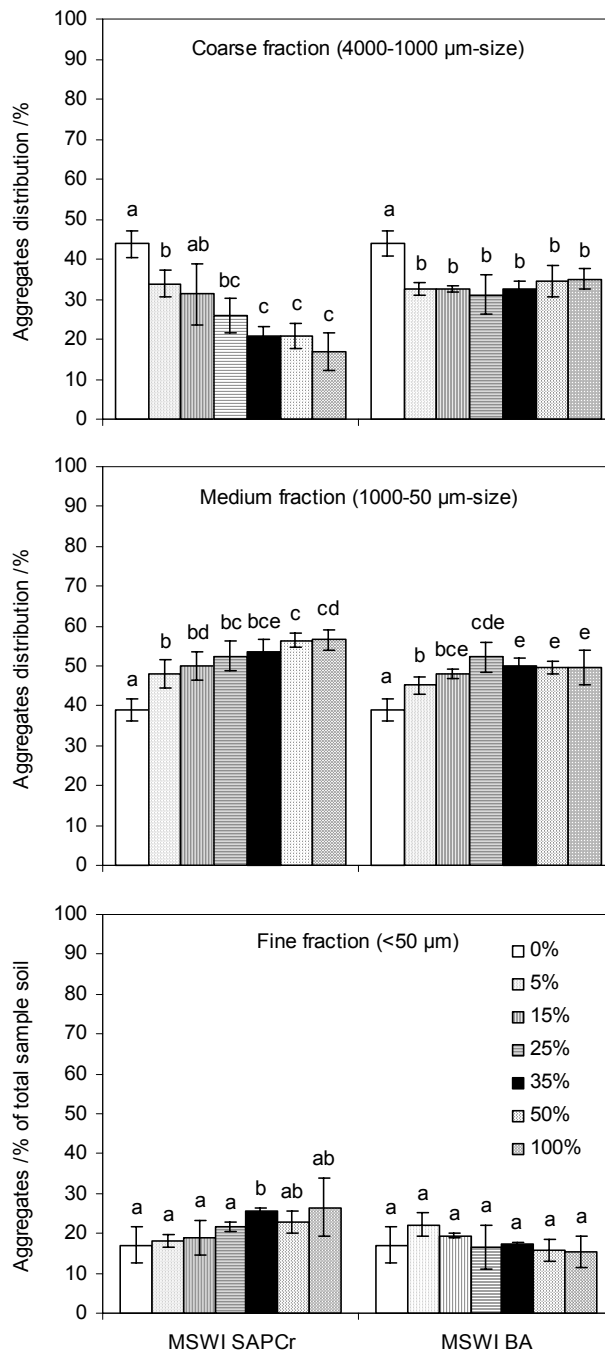
Values followed by the different letters differ significantly according to t test ( $P < 0.05$ )

#### *1.4.2.2. Aggregate size distribution*

Aggregate size distribution was calculated by grouping the  $F1_{agg}$  and  $F2_{agg}$  as coarse fraction (CF),  $F3$  and  $F4$  as medium fraction (MF),  $F5$  remains as fine fraction (FF). These three fraction weights were plotted versus the concentrations of leachates used in pre-treatment (Figure I.2.). Amount of CF was lowered by leachate pre-treatment ( $< 0.05$ ) (Figure I.2a.), with an increase in the 50-1000 $\mu\text{m}$  size fraction (CM) (Figure I.2b.). Fine fraction (FF) (Figure I.2c.) was not significantly affected by leachate pre-treatments except with the 35% SAPCr pre-treated soil. The main decrease of the amount of coarse aggregates (Figure I.2a.) occurred with pure SAPCr pre-treatment, when the effect was independent of leachate

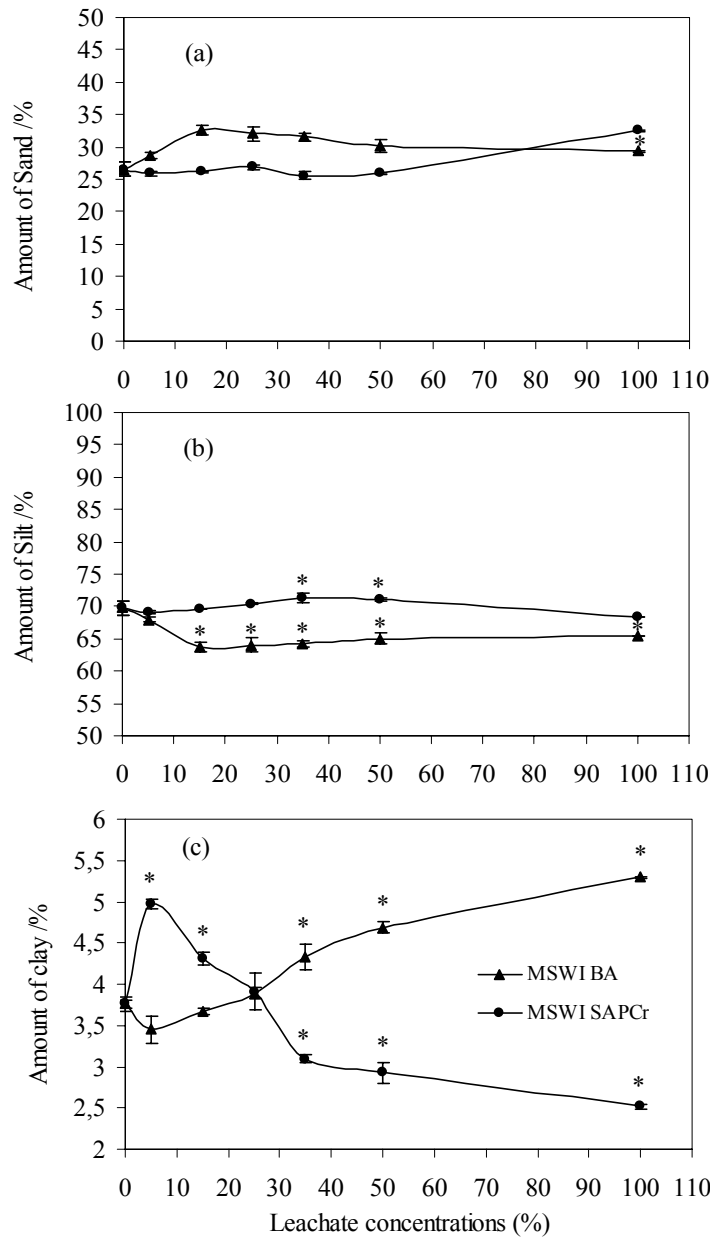


concentration with MSWI BA. The MF increased proportionally to the proportion CF decrease, when the FF proportion remained nearly unchanged.



**Figure I.2.** : Aggregates size distribution after MSWI BA or SAPCr pre-treatment. Error Bars represent standard errors among 3 replicates for each sampling point. Means with the same letter within leachate are not significantly different at  $P < 0.05$ .

### I.4.3. Effects of leachates on grain size distribution



**Figure I.3.** : Effects of leachate pre-treatment on grain size distribution for sand-size (a), silt-size (b), and clay-size (c). Asterisks indicate significant differences between control measure (distilled water) and other concentrations of leachates (t-test,  $P < 0.05$ ). Error Bars represent standard errors among 3 replicates for each sampling point.

Grain size distributions, determined by chemical dispersion with decreasing concentrations of both leachates, are shown in Figure I.3.. The behaviour of each particle size differed according to the MSWI-leachate used as dispersive reagent and initial electrolyte

concentration and composition. Concentrations of MSWI BA between 35 and 100% induced a significant dispersion of clay-size particles (Figure I.3c.). The dispersion with undiluted leachate resulted in a maximum 41% increase compared to the amount of dispersible clay obtain with water ( $P < 0.01$ ). Dispersion was accompanied by a significant decrease of the amount of silt-size fraction (-8%;  $P < 0.05$ ) (Figure I.3b.). MSWI SAPCr showed contrasting effects on clays behaviour: leachate concentrations between 35 and 100% caused a significant flocculation of clays (Figure 3c). Maximum flocculation was obtained with undiluted leachate resulting in a amount of 2.7% of clay-size fraction ( $P < 0.01$ ) when dispersion in water resulted in a amount of 3.7% (Figure I.3c.). More diluted leachate (5 and 15%) induced a significant dispersion of these fine particles (maximum dispersion for 5% with 32% increase of water clay amount;  $P < 0.01$ ). Flocculation induced by 35 and 50% solutions was concomitant with significant, but low increase of silt size fraction amount (Figure I.3b.). No modification of sand size fraction amount with solid waste leachates was observed (Figure I.3a.).

## I.5. Discussion

Contamination of soil by MSWI ash leachates was investigated on a luvisol. Main characteristics of this soil are: (i) a low amount of clay, and the consecutive weakness of aggregation; (ii) a low cation exchange capacity ( $8.1 \text{ cmole}_c \text{ kg}^{-1}$ ) nearly saturated by  $\text{Ca}^{2+}$  (78.7%) with minor and variable participation of  $\text{K}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\approx 6\%$ ); acidic cation like  $\text{Mn}^{2+}$  (2.4%) revealed luvisolic conditions;  $\text{Na}^+$  was less than 1.5% of the CEC.

Addition of the saline leachates should result in great changes in such soil sensitive to parameters influencing aggregate stability, pH and cation equilibrium.

MSWI BA exhibited strongly alkaline pH (11.1), high SAR (18.3) and moderately high electric conductivity ( $7.5 \text{ dS m}^{-1}$ ) when MSWI SAPCr (APCr stabilised in concrete) exhibited neutral pH (7.6), low SAR (5.6) and very high electric conductivity ( $11.2 \text{ dS m}^{-1}$ ). The sodicity hazard of solution increase with SAR (Mace & Amrhein, 2001), and specifically in a poorly structured soil like the upper layer of the studied luvisol. Expected effects are decrease in soil permeability, through modifications of structure and porosity (McNeal & Coleman, 1966; Pupisky & Shainberg, 1979; Shainberg *et al.*, 1981; Curtin *et al.*, 1995; Crescimanno *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1999).

Under the humid climate of western Europa ( $\approx 800 \text{ mm year}^{-1}$ ), the duration of the modifications of soil salinity and aggregation status due to leachates addition will be largely dependent on lixiviation processes. The possible restoration of initial conditions was investigated after one growth season (6 months) and after one annual climatic cycle (15 months).

Experiments in field situation were completed by laboratory assays to test the impact of more or less diluted leachates on aggregate stability and dispersivity of clays in controlled conditions. Laboratory tests involved impregnation or immersion in leachates before physical fractionation of aggregates, and helped interpretation of the observed changes in field contaminated soil parameters.

#### *Soil contamination and chemical changes*

Analysis of the cationic composition of experimental plot soil revealed a general increasing in soil of the major cations brought by leachates. Four days after the contamination, exchangeable sodium percentage (ESP) had exhibited as so strong increase that the level of Na contamination can be considered as strongly adverse for structure stability. MSWI BA contaminated soils were marked by the abundance  $\text{Na}^+$ , which persisted six and fifty months after the spreading of leachate. Sodium cation has preferentially replaced monovalent cations ( $\text{K}^+$  and  $\text{H}^+$ ) when the proportion of exchangeable  $\text{Ca}^{2+}$  constantly remained dominant at 80% of the CEC. With the addition of MSWI BA, soil CEC was saturated by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$ .

With addition of MSWI SAPCr leachate the sum of exchangeable cation exceeded the CEC that reveals the presence of soluble salt in soil solution (Thomas, 1984). The salinity of the soil solution could hide the exact rate and balance of cations exchange. Nevertheless, the calcium seems preferentially adsorbed from the leachate but not durably and partly replaced by sodium on exchange sites after the dry season (six months). The explanation lies in the differential solubility of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  ions when soil solution concentration increases. This process was explained by Sumner *et al.* (1993) and Keren (2000) for natural sodic soils. They showed that evaporation of water at dry season causes salt precipitation of the least soluble cations,  $\text{Ca}^{2+}$  and, to a lesser extent  $\text{Mg}^{2+}$ . In these conditions, exchange sites adsorb preferentially  $\text{Na}^+$  ions that are more soluble. Under our experimental conditions, soils contaminated by MSWI SAPCr leachates can harbour similar process which lead to some sodization and contrast to the salinisation occurring in MSWI BA contaminated soils.

### *Total porosity*

This study showed that ashes leachates induced a decrease of total porosity in field experiments soils. Changes in total porosity reveal changes which affect pore size distribution. Two successive steps in physico-chemical changes would decrease when experimental plots are added with MSWI leachates:

- First, the electrolyte concentration of leachates, induced disaggregation (slaking) of mm-size aggregates after a short time of contact as evidenced by the laboratory tests. The additional test on aggregate stability has shown that both leachates affect aggregates size distribution and cause soil destructuration. Both leachates favour slaking of macro-aggregates (1000-4000 $\mu$ m), highly correlated with MWD's decrease ( $r=0.95$ ). Aggregates slaking was more important with undiluted MSWI SAPCr because electrolyte concentration is more high than in undiluted MSWI BA (Table 2). US Salinity Laboratory Staff (1954) suggested an ESP of 15% as the critical level above which soil structure could be deleteriously affected. Abu-Sharar *et al.* (1987) showed that silt-size aggregates slaking could occur at  $ESP < 10$ . Other studies, have shown that macro-aggregates slaking was expressed only in the range of  $ESP > 5$  (Aly & Letey, 1990; Shainberg *et al.*, 1992). In MSWI-ash leachate contaminated soils, ESP values ranged between 7 and 13. Such values support the hypothesis that increasing electrolyte concentration, specially with high Na content could induce the observed slaking.

- Secondly, aggregate breakdown has caused clays and others fine particles to be dislodged and transported into pores, thereby blocking the pores and decreasing total porosity. Nevertheless, results of laboratories tests on grain-size distribution suggest that the dispersion following the slaking process may be modified with specific electrolyte concentration and composition of each leachate.

We have shown that pre-treatment of soil with pure MSWI BA leachate induced clay dispersion, indicating that slaking may be followed by pore plugging by each dispersed clays and slaked particles. The collapse of aggregates related to the dispersion of fine particles has been well documented for soils saturated with monovalent cations, particularly  $Na^+$  (e.g. Quirk & Shofield, 1955; Frenkel *et al.*, 1972. Curtin *et al.*, 1994).

In field MSWI SAPCr contaminated soils, we observed a large increase of exchange  $\text{Ca}^{2+}$  when laboratory test indicated that clay flocculation occurred with this pure leachate. Calcium, may reduce the adverse effects of the disaggregation by a flocculation process (Quirk & Shofield, 1955). However, we have shown that the dilution of SAPCr leachate below 25% (i.e. lower electrolyte concentration) induced clays dispersion. Thus, we suggest that a further mechanism could occur on field experimental MSWI SAPCr plots through rainwater dilution of soil solution. Such dilution caused clay dispersion followed by aggregate collapse and dislocation of particles into pores. This conclusion is support by a recent work by Mace & Amrhein (2001), showing that structural perturbations, e.g. modification of hydraulic conductivity, and clay dispersion increased as decreasing electrolyte concentration of moderate SAR water using for irrigation.

#### *The influence of plant cover*

We have previously discussed about the direct effects of leachate composition on structural properties of contaminated soils. A question now arises on indirect effect of vegetation cover physico-chemical properties of soil in the field experimental plots. Plant cover effect on chemical properties was revealed on  $\text{Na}^+$  duration on MSWI-ash leachates contaminated soil under *Agrostis* cover more important than under indigenous grassland. This duration may due to a low absorption of the sodium by the young plant and a strong evaporation under a scattered plant cover resulting in a concentration of soil solution and in a limitation of Na lixiviation.

It is well-known that the vegetation affects structure morphology and stability at different scales and through various direct and indirect mechanisms. By penetrating the soil, roots form macropores (Stewart *et al.*, 1999) which favour fluid transport and create zones of failure which contribute to fragment the soil and form aggregates (Marshall *et al.*, 1996; Angers & Caron, 1998). Anchorage of roots and the exudation of cementing material stabilises soil structure (Bowen & Rovira, 1991; Gale *et al.*, 2000).

In field experiments, we have shown an effect of plant cover revealed on the two control plots: under *Agrostis* seeding, the surface of soil was nearly bare at the beginning of the experiment with a lower porosity than under indigenous grass cover. The total porosity of the two control plots decreased between 6 and 15 months: previous works (Gros *et al.*, 2002) have shown a significant decrease of root biomass between 6 and 15 months on these experimental plots which could explain this evolution.

## **I.6. Conclusion**

It is obvious from this study that both MSWI BA and MSWI SAPCr leachates affect structural properties of the soil with probable limitation on soil hydrodynamics, on the quality of plant nutrition and water supply, and modification of biota environments and niches. These changes, generally adverse, result from the addition to soils of large amounts of salts when MSWI-ashes are submitted to rain water leaching. This paper showed that field porosity can be similarly lowered by the addition of two different incineration waste leachates. Field and complementary laboratory tests have been necessary to display different mechanisms of the structural degradation.

One year after leachate addition, differences in chemical properties between young *Agrostis* cover and indigenous grass cover remained non significant excepted for Na<sup>+</sup> content. Contrastingly, micro-physical properties were durably affected as revealed by aggregates size distribution in laboratory tests and total porosity of field crumbs.

Assessment of the environmental compatibility of incineration waste used for civil works was traditionally defined using a battery of bioassays and biomarkers, adjusted to the concerned recipient environments. A major concern for outdoor reuse of these materials is their weathering and the pollutant diffusion by rainwater. Assessment of the impact of MSWI-ash leachates must be supported by experiments designed with realistic as well neutral condition and focuses on factors indicating whether leachates modify key functions or properties of soil. Our results highlight the importance to take into account for environmental risk assessment physical and chemical disturbances, resulting from mineral contaminants other than those usually considered as toxicants.

### **Acknowledgments**

This investigation was supported by the “ Ecocompatibility of Solid Wastes ” program (grant 9674056/DIMT/mfb) for the French “ Agence de l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie (ADEME).

## I.7. References

- Abu-Sharar, T.M., Bingham, F.T. & Rhoades, J.D. 1987. Reduction in hydraulic conductivity in relation to clay dispersion and disaggregation. *Soil Science Society of American Journal*, 51, 342-346.
- Aly, S. & Letey, J. 1990. Physical properties of sodium-treated soil as affected by two polymers. *Soil Science Society of American Journal*, 54, 501-504.
- Amezketta, E. & Aragues, R. 1995. Hydraulic conductivity, dispersion and osmotic explosion in arid-zone soils leached with electrolyte solutions. *Soil Science*, 159, 287-293.
- Angers, D.A. & Caron, J. 1998. Plant induced-changes in soil structure: processes and feedbacks. *Biogeochemistry*, 42, 55-72.
- Angers, D.A., Samson, N. & Légère, A. 1993. Early changes in water-stable aggregation induced by rotation and tillage in soil under barley production. *Canadian Journal of Soil Science*, 73, 51-59.
- Aringhieri, R. & Giachetti, M. 2001. Effect of sodium adsorption ratio and electrolyte concentrations on the saturated hydraulic conductivity of clay-sand mixtures. *European Journal of Soil Science*, 52, 449-458.
- Arshad, M.A., Lowery, B. & Grossman, B. 1996. Physical tests for monitoring soil quality. In: *Methods for assessing soil quality* (eds J.W. Doran & A.J. Jones), pp. 123-142. SSSA Spec. Publ. 49, SSSA, Madison, WI.
- Balks, M.R., Bond, W.J. & Smith, C.J. 1998. Effects of sodium accumulation on soil physical properties under an effluent-irrigated plantation. *Australian Journal of Soil Research*, 36, 821-830.
- Blake, G.R. & Hartge, K.H. 1986. Particle density. In: *Methods of soil analysis. Part 1, 2nd edn* (ed A. Klute), pp. 377-382. *Agronomy Monograph 9*. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Bond, W.J. 1998. Effluent irrigation – an environmental challenge for soil science. *Australian Journal of Soil Research*, 36, 543-555.
- Bowen, G.D. & Rovira, A.D. 1991. The rhizosphere. In: *Plant roots. The hidden half*. (eds Y. Waisel, *et al.*), pp. 641-669. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
- Curtin, D., Stephun, H. and Selles, F. 1994. Structural stability of chernozemics soils as affected by exchangeable sodium percentage, and electrolyte concentration. *Canadian Journal of Soil Science*, 74, 157-164.



Curtin, D., Stephun, H., Mermut, A.R. & Selles, F. 1995. Sodicty in irrigated soils in Saskatchewan: chemistry and structural stability. *Canadian Journal of Soil Science*, 75, 178-184.

Crescimanno, G., Iovino, M. and Provenzano, G. 1995. Influence of salinity and sodicity on soil structural and hydraulic characteristics. *Soil Science Society of American Journal*, 59, 1701-1708.

Dorioz, J.M., Robert, M. and Chenu, C. 1993. The role of roots, fungi and bacteria on clay particle organisation: An experimental approach. In: *Workshop on methods of research on soil structure / Soil biota interrelationships* (eds L. Brussaard & M.J. Kooistra), pp. 179-193. *Geoderma*, 56.

Frenkel, H., Goetzen, J.O. & Rhoades, J.D. 1972. Effect of clay type and content, exchangeable sodium percentage, and electrolyte concentration on clay dispersion and hydraulic conductivity. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 32-39.

Gale, W.J., Cambardella, C.A. & Bailey, T.B. 2000. Root-derived carbon and the formation and stabilization of aggregates. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 201-207.

Gee, G.W. & Bauder, J.W. 1986. Particle size analysis. In: *Methods of soil analysis, part 1, 2nd edn* (ed A. Klute), pp. 383-411. *Agronomy Monograph 9*. ASA and SSSA, Madison, WI.

Giusquiani, P.L., Pagliai, M., Gigliotti, G., Bisinelli, D. & Benetti, A. 1995. Urban waste compost: Effects on physical, Chemical, and biochemical soil properties. *Journal of Environmental Quality*, 24, 175-182.

Gorres, J.H., Savin, M.C. & Amador, J.A. 2001. Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Soil Biology Biochemistry*, 33, 1881-1887.

Gros, R., Poly, F., Jocteur Monrozier, L., Trosset L. et Faivre P. 2002. Search for floristic and microbial indicators revealing the impact on the soil of solutions resulting from incineration waste. In: *Proceedings Book of the Third International Congress "Man and Soil at the Third Millennium"* (eds J.L. Rubio, R.P.C. Morgan, S. Asins & V. Andreu), pp. 929-944. Valencia (Spain), 28 March – 1 April, 2000. *Geoforma Ediciones*, Logroño (Spain).

Kemper, W.D. & Rosenau R.C. 1986. Aggregate stability and size distribution. In: *Methods of soil analysis, part 1, 2nd edn* (ed A. Klute), pp. 425-442. *Agronomy Monograph 9*. ASA and SSSA, Madison, WI.

Keren, R. 2000. Salinity. In: *Handbook of Soil Science* (ed M. E. Sumner), pp. G-3 – G-26. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Lavelle, P. & Spain, A.V. 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

- Le Bissonnais, Y. 1996. Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodability: I. Theory and methodology. *European Journal of Soil Science*, 47, 425-437.
- Levy, G.L., Rosenthal, A., Tarchitzky, J. & Chen, Y. 1999. Soil hydraulic conductivity changes caused by irrigation with reclaimed waste water. *Journal of Environmental Quality*, 28, 1658-1664.
- Lieffering, R.E. & McLay, C.D.A. 1996. The effect of strong hydroxide solutions on the stability of aggregates and hydraulic conductivity of soil. *European Journal of Soil Science*, 47, 43-50.
- Mace, J.E. & Amrhein, C. 2001. Leaching and reclamation of soil irrigated with moderate waters. *Soil Science Society of American Journal*, 65, 199-204.
- Mamedov, A.I. & Levy, G.L. 2001. Clay dispersivity and aggregates stability effects on seal formation and erosion in effluent-irrigated soils. *Soil Science*, 166, 631-639.
- Mamedov, A.I., Shainberg, I. & Levy, G.J. 2001. Irrigation with effluents: Effects of prewetting rate and clay content on runoff and soil loss. *Journal of Environmental Quality*, 30, 2149-2156.
- Mangialardi, T., Paolini, A.E., Polettini, A. and Sirini, P. 1999. Optimization of the solidification/stabilization process of MSW fly ash in cementitious matrices. *Journal of Hazardous Material*, 70, 53-70.
- Marshall, T.J., Holmes, J.W. & Rose, C.W. 1996. *Soil physics*, 3rd edn. Cambridge University Press, NY.
- McLean, E.O. 1982. Soil pH and lime requirement. In: *Methods of soil analysis. Part 2. 2nd edition* (eds A.L. Page *et al.*), pp. 1999-224. *Agronomy Monograph 9*. ASA and SSSA, Madison, WI.
- McNeal, B.L., Norvell, W.A. & Coleman, N.T. 1966. Effect of solution composition on the swelling of extracted clays. *Soil Science Society of American Journal*, 30, 313-317.
- Meenner, J.C., McLay, C.D.A. & Lee, R. 2001. Effects of sodium-contaminated wastewater on soil permeability of two New Zealand soils. *Australian Journal of Soil Research*, 39, 877-891.
- Orsini, L. & Rémy, J.C. 1976. Utilisation du chlorure de cobaltihexamine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols. *Science du Sol*, 4, 269-275.
- Park, S., Choi, K.S., Joe, K.S., Kim, W.H. & Kim, H.S. 2001. Variations of landfill leachates properties in conjunction with treatment process. *Environmental technology*, 22, 639-645.
- Perrodin, Y., Gobbey, A., Grelier-Volatier, L., Canivet, V., Fruget, J. F., Gibert, J., Texier, C., Cluzeau, D., Gros, R., Poly F. & Jocteur-Monrozier, L. 2002. Waste ecocompatibility in storage and reuse scenarios: global

methodology and detailed presentation of the impact study on the recipient environments. *Waste Management*, 22, 215-228

Pupisky, H. & Shainberg, I. 1979. Salt effects on the hydraulic conductivity of a sandy soil. *Soil Science Society of American Journal*, 43, 429-433.

Quirk, J.P. & Schofield, R.K. 1955. The effect of electrolyte concentration on soil permeability. *Journal of Soil Science*, 6, 163-178.

Sánchez-Marañón, M., Soriano, M., Delgado, G. & Delgado, R. 2002. Soil quality in mediterranean mountain environments: Effects of land use change. *Soil Science Society of American Journal*, 66, 948-958.

Šantrůčková, H., Heinemeyer, O. & Kaiser, E.A. 1993. The influence of soil compaction on microbial biomass and organic carbon turnover in micro- and macroaggregates. In: *Int. Workshop on methods of research on soil structure / Soil biota interrelationships* (eds L. Brussaard & M.J. Kooistra), pp. 587-598. *Geoderma*, 56.

Shainberg, I., Rhoades, J.D. & Prather, R.J. 1981. Effect of low electrolyte concentration on clay dispersion and hydraulic conductivity of a sodic soil. *Soil Science Society of American Journal*, 45, 273-277.

Shainberg, I., Levy, G.J., Rengasamy P. & Frenkel, H. 1992. Aggregate stability and seal formation as affected by drops' impact energy and soil amendments. *Soil Science*, 154, 113-119.

Stewart, J.B., Moran, C.J. & Wood, J.T. 1999. Macropore sheath: quantification of plant root and soil macropore association. *Plant and Soil*, 211, 59-67

Sumner, M.E. 1993. Sodics soils : new perspectives. *Australian Journal of Soil Research*, 31, 683-750.

Thomas, G.W. 1984. In: *Methods of soil analysis. Part 2, chemical and micro-biological properties 2nd edn* (eds A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney), pp. 159-165. Series Agronomy n°9, SSSA and ASA, Madison, Wis., USA.

Tisdall, J.M. & Oades, J.M. 1979. Stabilization of soil aggregates by root systems of rye-grass. *Australian Journal of Soil Research*, 17, 429-441.

US Salinity Laboratory Staff. 1954. *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils*. USDA Handbook 60. Available at <http://www.ussl.ars.usda.gov/hb60/hb60.htm> (verified 2 may 2002).

Van der Sloot, H.A., Kosson, D.S. & Hjelmar, O. 2001. Characteristics, treatment and utilization of residues from municipal waste incineration. *Waste Management*, 21, 753-765.

Wiles, C.C. 1996. Municipal solid waste combustion ash : state-of-the-knowledge. *Journal of Hazardous Material*, 47, 325-344.

Zangh, X.C. & Norton, L.D. 2002. Effect of exchangeable hydraulic conductivity, disaggregation and clay dispersion for disturbed soils. *Journal of Hydrology*, 260, 194-205.

## Chapitre II :

### **Réponses à court terme des communautés bactériennes telluriques : empreintes génétiques et activité potentielles**

---

La diversité des micro-organismes du sol est un élément essentiel de l'équilibre biologique du sol et du fonctionnement du couvert végétal. Les travaux de Naeem *et al.* (1994) montrent que la diminution de la biodiversité d'un écosystème engendre la réduction de certains processus écologiques. Ils précisent que les écosystèmes les plus diversifiés sont aussi les plus productifs.

L'ubiquité de présence et la diversité des niches écologiques des bactéries dans les sols en font des indicateurs biologiques pertinents (Soulas, 1999). Les communautés microbiennes sont capables de transformer les matières organiques introduites (débris végétaux, toxiques organiques...) dans des conditions de milieu (pH, aération, humidité) extrêmement variées, ce qui est une conséquence de leur capacité d'adaptation individuelle et de la diversité des populations. Les micro-organismes sont impliqués dans de nombreuses et importantes fonctions comme le cycle des éléments (N, P...) nécessaires à la nutrition des plantes et ont donc un rôle primordial dans la croissance et la dynamique des populations

végétales, dans la synthèse de biomolécules telles que les exopolysaccharides aux rôles édaphiques multiples (Amellal *et al.*, 1996), ou encore dans le comportement du développement racinaire des graminées (interactions et adhésion sol/ racines (Chenu et Guerif, 1991), effet PGPR (Gouzou, 1992; Shloter et al, 1997). Des stress environnementaux physiques ou chimiques peuvent altérer certaines populations microbiennes et ainsi mettre en danger les fonctions dont elles sont responsables.

Nous avons montré dans le chapitre précédent une augmentation importante et durable des teneurs en sodium dans les sols traités avec les effluents. Un apport important d'éléments ioniques dans les sols augmente la concentration de la solution du sol qui voit sa conductivité et sa pression osmotique s'élever (McIntyre, 1980). Des changements rapides de la concentration en sel induit un relargage immédiat de certains constituants cellulaires (Kincannon et Gaudy, 1968) provoquant ainsi un ajustement de la physiologie des cellules bactériennes. Ces changements physiologiques peuvent alors se traduire par des dysfonctionnements de certaines activités enzymatiques et par des réarrangements dans la composition spécifique des communautés microbiennes initiales.

Dans ce chapitre, nous décrivons la réponse à court terme des communautés bactériennes telluriques à une contamination chimique du sol imposée par les effluents de déchets d'incinération MIOM et REFIOM. Cette réponse est évaluée en terme d'activité potentielle (fixation d'azote et dénitrification) et en terme de structure de la communauté bactérienne globale et d'une communauté fonctionnelle: les fixateurs d'azote.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de F. POLY, **R. GROS**, L. JOCTEUR MONROZIER and Y. PERRODIN, 2002. Short-term changes in bacterial community fingerprints and potential activities in an alfisol supplemented with solid waste leachates. *Environmental Science and Technology*, 36, 4729-4734.

# Short-term changes in bacterial community fingerprints and potential activities in an alfisol supplemented with solid waste leachates

F. POLY<sup>1</sup>, R. GROS<sup>2</sup>, L. JOCTEUR MONROZIER<sup>1\*</sup> and Y. PERRODIN<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup> Corresponding author: UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Bat. Gregoir Mendel, 16 rue Dubois Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France. e-mail: [jocteur@univ-lyon1.fr](mailto:jocteur@univ-lyon1.fr)

<sup>2</sup> Laboratoire Science du sol CISM-Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France

<sup>3</sup> INSAVALOR sa-Division Polden, BP 2132 69603 Villeurbanne Cedex, France ENTPE Laboratoire des Sciences de l'Environnement rue Maurice Audin, 69518 Vaux en Velin Cedex, France

**Key-words:** MSWI-ashes, denitrification, N<sub>2</sub> fixation, A-RISA, PCR-RFLP, *nifH* gene, environmental monitoring, soil microbial ecology, leachate.

## II.1. Abstract

We investigated the effect on soil functioning of adding leachates from municipal solid waste incinerator (MSWI) ashes to laboratory columns (bare soil) and to field experimental plots (bare soil or grass cover). Leachate of MSWI-solidified air pollution control residues (SAPCr) contained more salts but less heavy metals than did MSWI-bottom ash (BA) leachate. Leachate-supplemented soils (BA soil, SAPCr soil) and control (water added) soil (W) were analyzed after 30 days. Potential denitrifying activity (PDA) and potential N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction assay, ARA) were measured in controlled conditions. PDA was significantly lower in SAPCr soil than in W soil, both in the laboratory (-45%) and in bare soil in the field (-31%). ARA values were lower in bare SAPCr soil (54%) and in bare BA (25%) soil. Both activities remained unaffected by leachate supplementation in soil under permanent grass cover. Automated ribosomal intergenic spacer analysis (A-RISA) fingerprints and RFLP of *nifH* gene pools were used to assess changes in the structure of bacterial community. Multivariate analysis of these fingerprints revealed that SAPCr leachate had a stronger effect than BA leachate on the total and N<sub>2</sub>-fixing bacterial communities. Similar results were obtained for laboratory and bare soil field plots, but leachates did not affect *nifH* gene pools from soil under permanent grass cover. The stronger impact of SAPCr leachate on both structure of bacterial communities and activities supports the conclusion that observed effects would result from the abundance of salts rather than from heavy metal toxicity.

## II.2. Introduction

The quantities of solid waste materials released by human domestic activities are steadily increasing. The possibility of reusing such waste is therefore being considered as a potential component of public environmental policies. A major concern surrounding the use of solid or solidified waste products is the potential for the release of contaminants into the environment due to contact with rain, and with surface and runoff water (1).



Incineration substantially reduces the volume (by about 90%) and the mass (by about 70%) of domestic solid waste and produces bottom ash (BA) and flying ash, both of which are potentially toxic due to their heavy metal and salt contents (2). Municipal solid waste incinerator (MSWI) air pollution control residues (APCr), or fly ash, contain significantly higher concentrations of cadmium, lead and zinc than does bottom ash. Both wastes contain a high concentration of soluble salts (3). APCr are enriched in metals and require specific treatment, such as solidification/stabilization with cement (4; 2) or other hydraulic binders (5), before incorporation into construction materials (6).

The outdoor use of such waste materials may result in the contamination of soils by leachates or rain water percolating through the waste. In most situations, solute concentrations display the following pattern in MSWI-BA:  $\text{Na} > \text{Cl} > \text{K} > \text{Ca}$ , with  $\text{SO}_4$  present at a similar molar concentration to Ca (7). The leaching of solidified/stabilized APCr (SAPCr) from construction materials also results in the release of large amounts of salt. One approach that can be used to describe and to predict the effects of such leachates on soil functioning is to assess the effects of leachates on soil bacterial communities in controlled laboratory conditions and to compare them with results obtained in field experiments.

Assessment of the impact of realistic additions of MSWI ash leachates should focus on factors indicating whether leachates modify key functions or properties of soil. Short-term changes can be assessed within a few weeks whereas the long-term effects may still be evident one year after application.

Leachates of MSWI-BA and MSWI-SAPCr affect the composition of the soil solution and may have consequences for the physical properties of surface soil layers, and for the supply of nutrients and water to plants (8). We describe here the effects of adding MSWI-BA or -SAPCr leachates to soil on bacterial activities and community structures. We studied the following activities, which play a key role in the functioning of the soil: i) potential denitrification, which is carried out by a large variety of soil bacteria (9) and reflects changes in soil aeration and the nitrogen cycle, and ii) fixation of atmospheric  $\text{N}_2$ , which is carried out by diazotrophs with *nif* genes and corresponds to the main point of entry of nitrogen into the biosphere and ecosystems (10). Techniques are available for measuring these activities in controlled and reproducible conditions, in which the potential of soil microbial communities to express these activities was optimized. Relationship between the modifications of the structure of functional communities and activities is poorly documented (11). Actually available tools to establish such relationship are still developing. In our study, the

modifications in the structure of the soil bacterial community were assessed by analyzing gene pools, using ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) of eubacteria community (12) or restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the *nifH* gene pool (13).

## II.3. Materials and methods

### II.3.1. Soil and experimental design

#### II.3.1.1. Column experiment

Sharp-ended PVC cylinders ( $\varnothing$  6cm, h 8cm) were used to extract cores of the undisturbed surface layer of an alfisol at the Field Ecocompatibility Facilities of CERED (Research and Waste Elimination Test Center) near St Marcel (Eure, France). The main characteristics of the soil are given in Table II.1. Leachates (MSWI-BA or –SAPCr) were added to the cylinders of soil to be treated and water (W) was added to the control cylinders. Before the addition of leachate or water, cylinders were equilibrated from the bottom with pure water for one day to ensure that the water potential conditions of the soil samples were similar to those in the usual field gradient. Leachate or water (60 ml in each case) was applied to the surface and allowed to percolate the soil. Each cylinder was covered with Parafilm “M”® (American National Can<sub>TM</sub>, Chicago, Il.) and incubated at 24°C for 30 days. Triplicates were obtained by removing the soil from 3 cylinders for each treatment.

**Table II.1.** : Characteristics of the studied soil

	Coarse Sands	Fine Sands	Coarse silts	Loam	Clays	Organic Matter	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	CEC cmol kg <sup>-1</sup>
g kg <sup>-1</sup>	29	81	602	160	128	31	6.7	6.0	8.1
	CaO	K <sub>2</sub> O	MgO	Na <sub>2</sub> O	Al	Cl	S	Total N	C/N
mg kg <sup>-1</sup>	2240	138	110	20	9	10	3460	1600	11

### II.3.1.2. *Field-plot experiment*

Six plots (5m x 2m) were defined within an area left fallow at the Field Ecocompatibility Facilities of CERED. Indigenous plant cover was left on three plots. The other three plots were cleared in early spring; the first cm of soil was removed to expose bare soil. Three plot pairs, each consisting of one plot with permanent grass cover and one with bare soil, were defined. One week after clearing, each plot pair received 44 l.m<sup>-2</sup>, at a rate of 11 l.m<sup>-2</sup> per day, of MSWI-BA leachate, MSWI-SAPCr leachate or rainwater. Conditions of leachate addition were determined according to the local climatic conditions following the scenario of MSWI ashes re-use proposed in preliminary studies (14). Thirty days after addition, soil was sampled as follows: three samples, each 10x10x10cm in size, were removed from each plot by coring, wrapped in plastic bags and stored in the cold room (4°C) until use.

### II.3.2. **Chemical analysis**

In water percolating through laboratory columns, the total amount of cations (Na, Ca, Mg, K, Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) was determined by ICP-MS, anions (SO<sub>4</sub>, Cl and NO<sub>3</sub>) by HPLC, at the CNRS-SCA laboratory (Solaize, France). Comparison of content in solution after soil percolation to those in the initial leachates (Table II.2.) allowed to determine the amounts of leachate components immobilized during passage through the soil column (Table II.3.).

**Table II.2.** : Leachate properties and components ; nd = not detected.

Leachate	pH	Dry weight	Na	K	Ca	Mg	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
			mg.L <sup>-1</sup>					
MSWI-BA	11	3172,5	722.5	399	119	0.025	1718	150
MSWI-SAPCr	7.6	6980	610	1000	902	nd	3680	18.5

Leachate	Cu	Cr	Zn	Pb	Cd	Ni
	mg.L <sup>-1</sup>					
MSWI-BA	2	0.05	0.02	0.115		0.015
MSWI-SAPCr	<0.01	<0.02	<0.015	<0.07	<0.01	nd

### II.3.3. Microbial activities

#### II.3.3.1. Potential denitrification

Potential denitrifying activity (PDA) was measured as described by Lensi *et al.* (15). We placed soil (the equivalent of 5 g of dry matter) in a 150ml tube with 3 ml of a solution containing KNO<sub>3</sub> (0.2 mg N g<sup>-1</sup> dry soil), glucose (1mg C g<sup>-1</sup> dry soil), glutamic acid (1 mg C g<sup>-1</sup> dry soil) per gram of dry soil. The tubes were sealed with rubber stoppers. The atmosphere of each tube was evacuated and replaced with a 90:10 mixture of helium: acetylene. The helium provided anaerobic conditions and the acetylene inhibited N<sub>2</sub>O reductase activity. The tubes were incubated at 24 °c for 4h. N<sub>2</sub>O was quantified in aliquots (200 µl) of the atmosphere within the tube by gas chromatography (GC) using an electron capture detector (Varian 3400 CX). Results are expressed as N<sub>2</sub>O-N µg released per day and per g of soil (equivalent dry weight).

#### II.3.3.2. Potential atmospheric nitrogen fixation

Nitrogenase activity in the soil was determined with the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction technique (16; 17). We placed 5 g of soil (equivalent dry weight) at room temperature in a sterile 150 ml vessel with a rubber stopper. We added 2 ml of a solution containing glucose (1 mg C g<sup>-1</sup> dry soil) and disodium malate (1 mg C g<sup>-1</sup> dry soil). The gaseous atmosphere was replaced with a 90:10 mixture of air: acetylene (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) and the vessels were incubated for 5 days at 24°C. Four replicates were performed for each assay. On each day of incubation, a 400µl aliquot of gas was sampled from the atmosphere of each flask and injected to GC with a flame ionization

detector to measure the mass of ethylene produced by ARA. A lag phase (during 3 days) was observed, after which the rate of ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) production remained constant until day 5. Results are expressed as the mean amount of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> released (mole h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> dry soil).

### II.3.3.3. *Microbial community structure*

#### *Extraction and purification of DNA from soil*

Bacterial DNA was extracted directly from the triplicate soil columns. Four replicates were extracted from contaminated field samples and six from uncontaminated field soil samples in order to evaluate the variability of bacterial fingerprints. Extracted DNA was then purified and quantified as previously described by Ranjard *et al.* (18).

#### *Automated intergenic spacer analysis (A-RISA): global soil microbial community*

Bacterial intergenic spacers (IGS) located between the *rrs* and *rrl* genes were amplified with the following primers: S-D-Bact-1522-b-S-20 (eubacterial *rrs* gene, 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3') and L-D-Bact-132-a-A-18 (*rrl* gene, 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') (19). Amplified sequences contained the IGS plus approximately 150 bp corresponding to the 20 nucleotides of the S-D-Bact-1522-b-S-20 primer and about 130 bp of the 23S rRNA gene. PCR conditions were as previously described (12). For A-RISA, we used the S-D-Bact-1522-b-S-20 primer labeled at its 5' end with the Cy3 fluorochrome (Eurogentec, Belgium).

We mixed 6 µl of PCR product with 3 µl of formamide and loaded on the gel. A-RISA fragments were resolved by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel run under denaturing conditions for 12 h at 1700 V on an AlExpress DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech France). The electrophoregram was analyzed with Fragment Manager software (Amersham Pharmacia Biotech France). The relative peak heights within a profile were calculated by dividing the height of an individual peak by the total peak height (the sum of the heights of all peaks). The sizes of the fragments, in bp, were calculated from external size standards 100 bp, 300 bp (Amersham Pharmacia Biotech France) and 940 bp (made in our own laboratory) long.

*PCR-RFLP on the nifH gene pool: the community of nitrogen-fixing bacteria*

We used 100 ng of DNA as a template for PCR with primers PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') and PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') to amplify a 360 bp region (13). Each PCR product was directly used for restriction enzyme cleavage (NdeII, MnlI, HaeIII) (13). Digested DNA samples were analyzed by electrophoresis in 5% polyacrylamide gels (19:1) (Bio-Rad). The electrophoresis conditions were: 15 h at 35 V in 1x TBE buffer, followed by 30 min staining in 1xSYBRGreenI (FMC BioProducts). This procedure was repeated at least twice for each DNA extraction to check that the patterns obtained were consistent. The software used (Bio 1D++, Fisher Bioblock, France) converted staining data into peak profiles, which were analyzed as for the A-RISA method (see above).

*Multivariate analysis*

Multivariate analysis techniques were used to analyze and to compare the pattern of peak profiles (A-RISA and PCR-RFLP) of all samples and treatments. We carried out principal component analysis (PCA) on covariance matrix with the data matrix of relative peak heights (bacterial communities as rows and size fragments as columns). This method provided an ordination of bacterial communities, which were plotted in two dimensions, based on scores for the first two principal components (PC). We then carried out a Monte Carlo test with 10,000 random permutations to test the significance of the PCA results. Results are expressed as projections on the map for the two main factors.

We calculated the Euclidian distance between the communities and carried out hierarchical cluster analysis using the agglomerative second-order moment algorithm known as Ward's method to produce dendrograms showing the proximity of treated and untreated samples. Cluster analysis and PCA were carried out with ADE-4 software (20).

**II.4. Results****II.4.1. Immobilization of MSWI ash leachate components in soil columns**

Analysis of soil percolate after the addition of leachate to soil columns showed that large amounts of monovalent cations ( $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ ) and chloride ions were immobilized in the first

few centimeters of the soil, whereas nitrate was extracted from the soil (Table II.3). Unexpectedly, we found that calcium was not retained (BA soil) and even calcium already present in the soil was solubilized (SAPCr). Copper and Cr present in BA were retained in significant amounts in the soil.

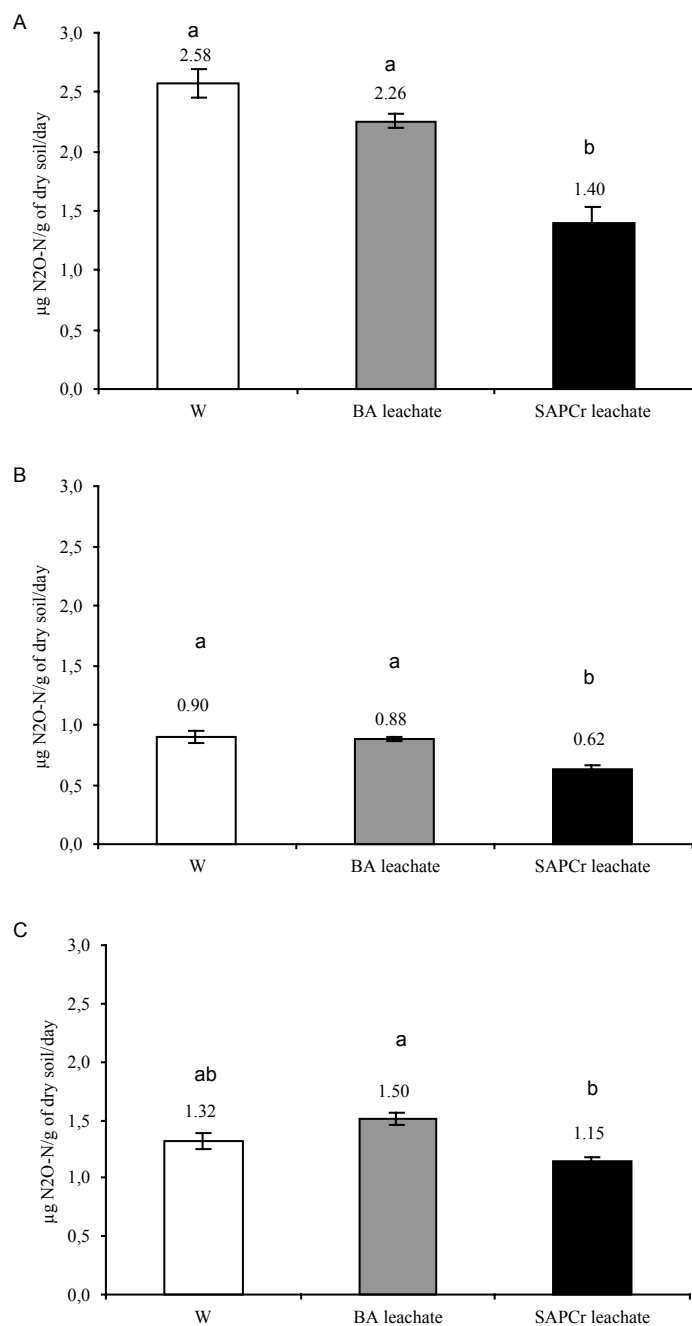
**Table II.3.** : Amounts of leachate components immobilized in soil columns (laboratory experiment). Pb, Zn and Cd were not determined; - (minus): component released (then not immobilized) by the soil.

mg kg <sup>-1</sup>	Na	K	Ca	Cl	SO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	Cu	Cr	Organic C
MSWI-BA	129	97	1	400	23	-26	0.6	0.01	-2
MSWI-SAPCr	78	190	-36	802	-0.6	-12	0.00	0.00	0.00

## II.4.2. Microbial activities on day 30

### II.4.2.1. Potential denitrification

In control soil (W), potential denitrification activity (PDA) (Fig. II.1.) was between 2.6 µg N<sub>2</sub>O-N g<sup>-1</sup> of dry soil equivalent per day in samples from the column experiment (Fig. II.1A.) to 0.9-1.3 µg in field soil samples (Fig. II.1B. and Fig. II.1C.). The addition of MSWI-BA leachate had no significant effect on PDA in any situation (laboratory and field experiments). Conversely, MSWI-SAPCr had a negative effect on the denitrification process: the decrease in the amount of N<sub>2</sub>O-N released ranged from 45% in column experiments (Fig. II.1A.) and 31% in bare soil in the field (Fig. II.1B.) to 13% under grass cover (not significant) (Fig. II.1C.).

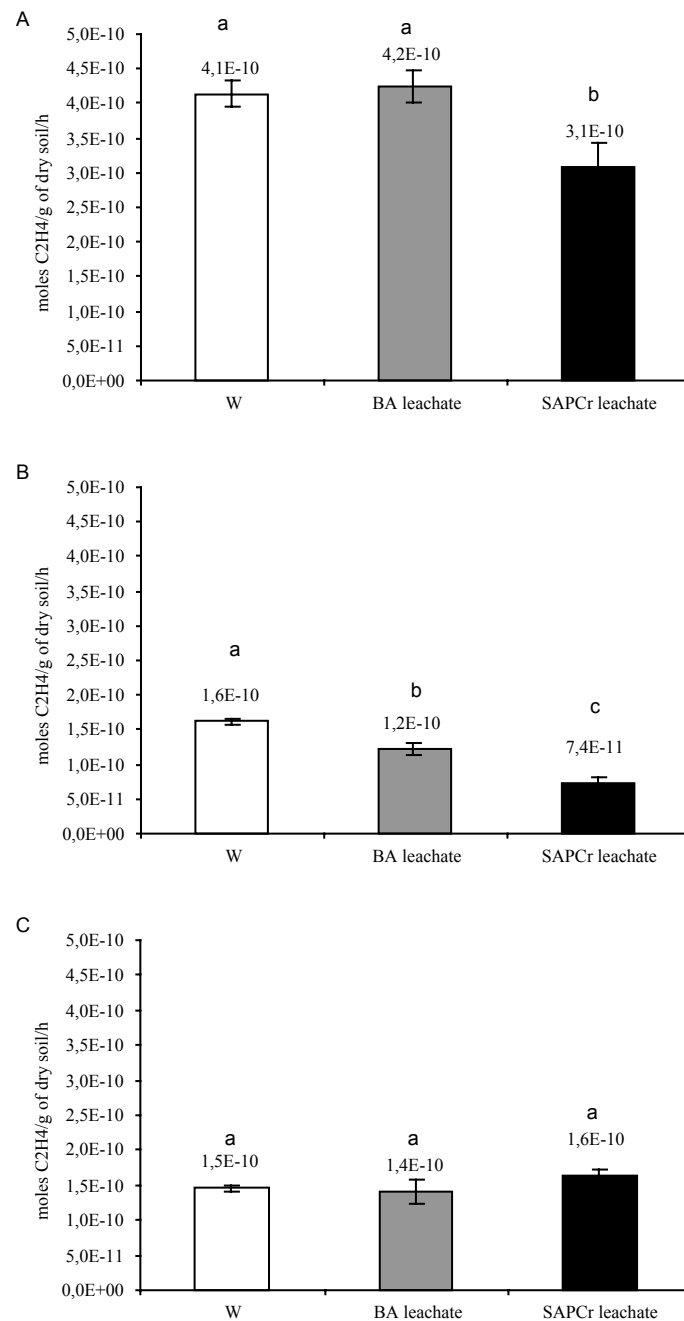


**Figure II.1.** : Potential denitrification of soil samples in control and MSWI-BA and MSWI-SAPCr. Mean values and standard deviation from three replicates. A- Column experiment, B- Field plot bare soil, C- Field plot under grass cover



### II.4.2.2. Potential atmospheric nitrogen fixation by ARA

The ARA values obtained for control soil ranged from  $4.1 \times 10^{-10}$  in soil columns to  $1.5 \times 10^{-10}$  moles of  $C_2H_4$   $g^{-1}$  dry soil  $h^{-1}$  in field plots (Fig. II.2.).



**Figure II.2.** : Potential nitrogen fixation by ARA in control soil and MSWI-BA and MSWI-SAPCr treated soils. Mean values and standard deviation from four replicates. A- Column experiment, B- Field plot bare soil, C- Field plot under grass cover

MSWI-BA had no detectable effect in soil columns on ARA values, but decreased it by 25% in bare soil. These values for soil under grass cover (Fig. II.2C.) were unaffected by the addition of leachates. In laboratory columns (Fig. II.2A.) and bare field plots (Fig. II.2B.), MSWI-SAPCr significantly decreased ARA values by 25% for columns to 54% for bare soil.

### **II.4.3. Structure of soil bacterial communities on day 30**

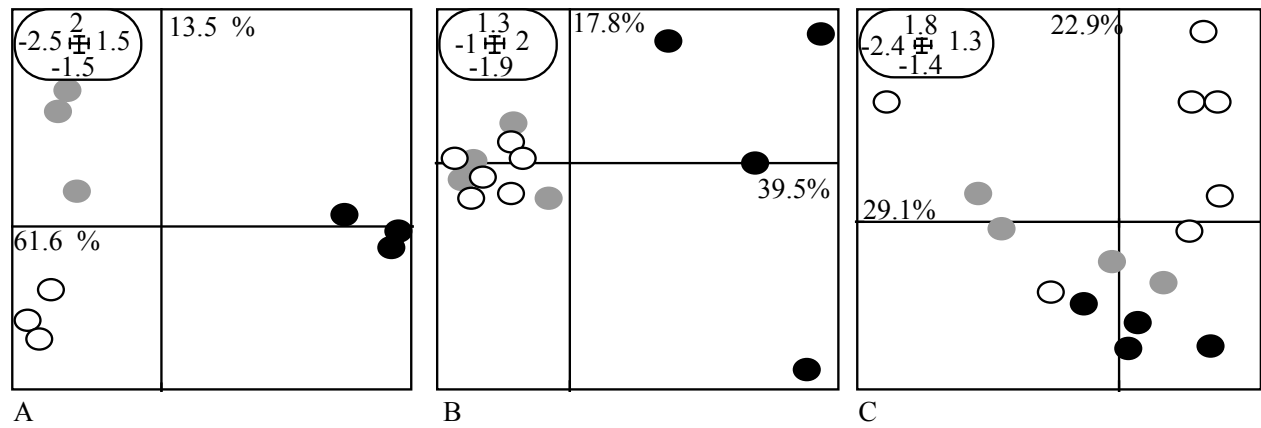
#### *II.4.3.1. Whole soil communities by A-RISA*

The electrophoretic peak profiles (data not shown) of the intergene spacers between the *rrs* and *rrl* genes present in all bacteria included at least 140 bands. Analysis of these reproducible profiles showed that the 15 most prominent bands accounted for more than 50% of the total recorded intensity for the whole profile in control and BA soil (data not shown).

For soil columns, the factor map produced by PCA (Fig. II.3A.) showed a weak but significant effect ( $P < 0.01$ ) of MSWI-BA leachate and a strong effect of MSWI-SAPCr, accounting for 61% of the variance in the data.

In field bare soil, the addition of MSWI-BA leachate did not affect the structure of the bacterial community: on the PCA map : BA-treated soil samples and control soil occupied similar positions. Following the addition of SAPCr leachate, the communities of bare-soil plots changed in a similar fashion (Fig. II.3B.) to those in laboratory experiments.

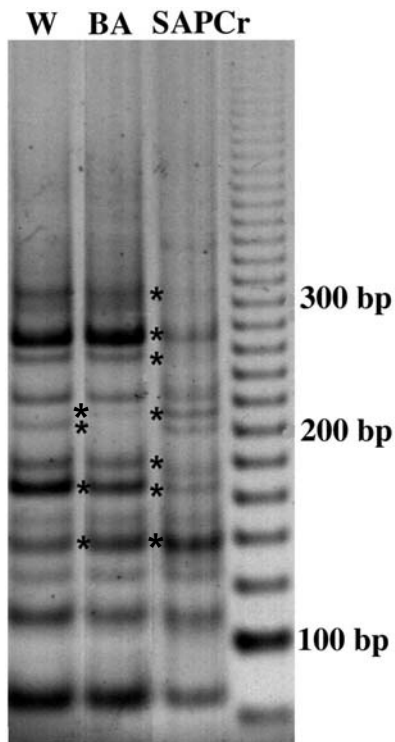
Wide spreading of representative points, for samples under grass cover, on factorial map, with substantial overlap of the three clusters (Fig. II.3C.), evidenced that the variance of each cluster was larger than the variance between clusters. It means that MSWI SAPCr or BA leachates did not significantly affect A-RISA fingerprints.



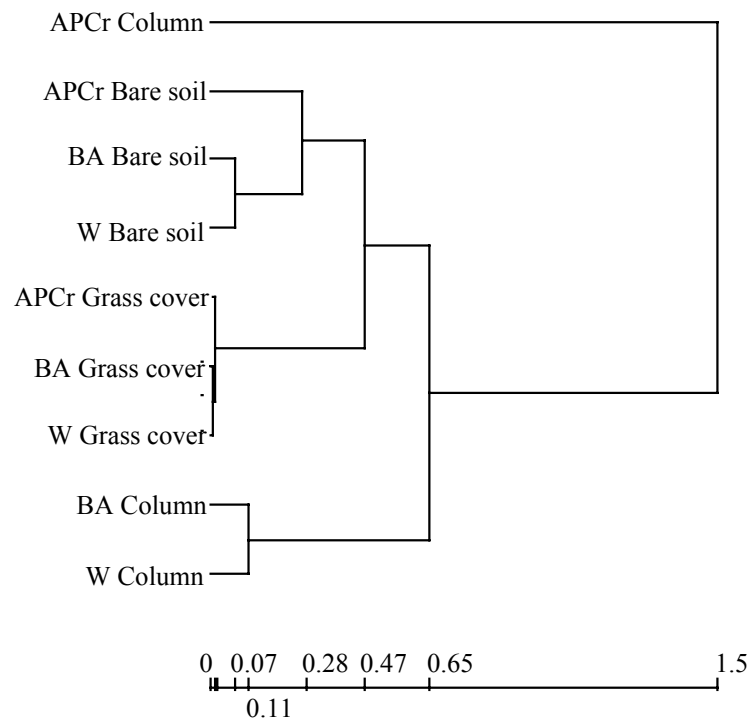
**Figure II.3.** : Principal component (PC1 X PC2) plots generated from A-RISA profiles of bacterial community. Symbols independent replicates of: ○, control water treatment; ●, MSWI-Bottom ash leachate; ●, MSWI-SAPCr leachate. A, columns experiments; B, bare field experiment; C, grass cover field experiment.

#### II.4.3.2. Structure of the *nifH* gene pools

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) profiles of *nifH* gene pools are shown in Fig. II.4. Replicate DNA extractions give consistent banding patterns in term of presence/absence of band but also in term of band intensity (data not shown). RFLP complexity is shown as a dendrogram of the distance between pools (Fig. II.5.). *NifH* gene pools were clustered on specific branches according to experimental conditions i.e. in laboratory columns, bare field plots or field plots under grass cover. The structure of *nifH* gene pools in soils under grass cover were not affected by either treatments. As already observed with A-RISA, for laboratory experiments and bare soil, the *nifH* gene pool of MSWI-BA-treated soil was more similar to that of the control than to the *nifH* gene pool of MSWI-SAPCr-treated soil.



**Figure II.4.** : Polyacrylamide gel electrophoresis of *MnlI* RFLPs from *nifH* PCR products obtained from laboratory experiment. Lane W, Control soil; Lane BA, MSWI-BA soil; Lane SAPCr, MSWI-SAPCr soil. Asterisks, fragments differing by their presence, their relative intensity from control soil.



**Figure II.5.** : Dendrogram of *nifH* gene RFLP fragment patterns

## II.5. Discussion

### *Impact of MSWI ash leachates*

We studied changes in the biological functioning of the top 10 cm of soil following the application of MSWI-ash leachates. This layer of soil is the input layer for leachates and for superficial and rain water. In addition, most organic substrates and microorganisms are found in the superficial layers of the soil (21), specifically the root biomass concentration in the upper 20 cm of grass land soils (22). We found that most of the K, Na and chloride from the leachates was retained in these first 10 centimeters of soil and that a “salt effect” should be expected in soils to which the leachates were added. Only small amounts of Cu and Cr from the MSWI-BA leachate were immobilized in the soil and may have influenced soil biota. However, multivariate analysis and potential activity measurements in all cases showed there to be a larger distance between SPACr-contaminated soil and control soil than between BA soil and control soil. The low amounts of soluble heavy metals should have slight or no influence when compared to the specific effect of the excessive concentration of salts (chloride, sulfate).

### *Relationship between potential activity and community structure*

Bacterial functions may be affected in three ways: i) inactivation of the enzyme, ii) inhibition of the synthesis of enzyme, iii) death of bacteria carrying functional genes. We found that potential denitrification activity was not sensitive to the addition of BA leachate. Potential denitrifying activity was decreased by the addition of MSWI-SAPCr leachate when the soil was not covered with plants. Changes in the structure of the total bacterial community (A-RISA) followed the same pattern. The total bacterial community consists of many populations of microorganisms belonging to different functional communities, as each population of soil bacteria can express various activities. Changes in A-RISA are unlikely to reflect changes in the soil denitrifying community, which accounts for 5 to 10% of all bacteria in most soils (9; 15). However, given that a large diversity of genera and species of soil bacteria are able to carry out denitrification (9), these bacteria are probably affected similarly to other communities by a treatment that was found to have an effect on the total community. No direct effect of MSWI-ash leachates on denitrification enzymes can be identified from our results but the profound changes in soil bacterial populations observed may account, at least in part, for the decrease in denitrification.

As nitrogen-fixing bacteria have *nif* genes, encoding the proteins involved in N<sub>2</sub> -fixation, changes in the structure of *nifH* gene pools may affect activity. We observed a decrease in ARA values when changes occurred in *nifH* gene pools, whereas no change in ARA was observed when the structure of *nifH* gene pools remained unchanged. The decrease in N<sub>2</sub> fixation presumably results from the inhibition of the nitrogenase and/or the decrease in the number of efficient N<sub>2</sub>-fixing bacteria. This is consistent with the findings of Giller *et al.* (23), who reported that N<sub>2</sub>-fixing bacteria that survived the addition of contaminants to soil had intrinsically low N<sub>2</sub>-fixation potentials. The observed decrease in ARA values accompanying changes in the structure of *nifH* gene pools, with no change in A-RISA results, is accounted for by the low proportion of nitrogen-fixing bacteria in the soil community, ranging from 1/10<sup>5</sup> to 1/10<sup>2</sup> (24; 25; 26).

#### *Comparison of laboratory and field experiments*

Comparison of the results of laboratory and field experiments highlighted similarities in the effects of leachates on undisturbed soil columns and bare field plots. In both situations, leachates were applied to bare soil as the soil was cleared of any surface vegetation and the top 1 cm removed before testing. Thus, assays on soil columns could be used to assess the possible perturbation of bare soils, such as land prepared for cultivation or next to road buildings, which may be subject to contamination with leachates of re-used MSWI-ash.

#### *The influence of plant cover*

Overall, our results show that plant cover protects soil bacteria and their activities from the effects of a single pulse of leachates. As stated in Material and Methods, this pulse was designed to mimic the most active phase of solid waste weathering by rain water. The pulse of leachates used in our experiments had brought to soil, in four days, the amount of water and solutes equivalent to several months of "natural" exposition. Such procedure should have maximized the effects on the short-term. The observed protection may result from either a phytoremediation process involving the absorption of the toxic components by the plant (27) or the immobilization of toxic substances in the organic matter of the surface layer. Nevertheless, changes in soil bacterial activities may become evident much later, as shown by Richnow *et al.*, (28), and Tyler *et al.* (29), for the metal cations. Chaudri *et al.*, (30), for heavy metals, and Swift *et al.* (31), for organic contaminants, showed that significant effects on microbial characteristics may not become evident until six months or more after

contamination. Further investigations are also required to assess the impact of leachates on the plants themselves and the role of the rhizosphere in the restoration of microbial life.

### Acknowledgments

We thank Lucie Lambolez-Michel and Jean Claude Legris (Cered, Vernon, France), for their help with field experiments. This investigation was supported by the “Ecocompatibility of Solid Wastes” program (grant 9674056/DIMT/mfb) for the French “*Agence de l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie (ADEME)*”.

### II.6. References

- (1) Eikelboom, R.T.; Ruwiel, E.; Goumans, J. M. *Waste Manage.* **2001**, *21*, 295-302.
- (2) Ibáñez, R.; Andrés, A.; Viguri, J. R.; Ortiz, I.; Irabien, J. A. *J. Hazard Mater.* **2000**, *79*, 215-227.
- (3) Wiles, C. C. *J. Hazard. Mat.* **1996**, *47*, 325-344.
- (4) Chang, J. E.; Tzong-Tzeng, L.; Ming-Sheng, K.; Der-Shyun, L. *J. Environ. Sci. Heal. A.* **1999**, *34*, 1143-1160.
- (5) Barna, R.; Rethy, Z.; Imyim, A.; Perrodin, Y.; Moszkowicz, P.; Tiruta-Barna, L. *Waste Manage.* **2000**, *20*, 741-750.
- (6) Cenni, R.; Janisch, B.; Spliethoff, H.; Hein, K. R. *Waste Manage.* **2001**, *21*, 17-31.
- (7) Johnson, C. A.; Kaeppli, M.; Brandenberger, S.; Ulrich, A.; Baumann, W. *J. Contam. Hydrol.* **1999**, *40*, 239-259.
- (8) Fuchs, B.; Track, C.; Lang, S.; Gimmler, H. *J. Appl. Bot. Angew Bot.* **1997**, *71*, 154-163.
- (9) Tiedje, J. In *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J.B. Zehnder Ed; Wiley: New-York, **1988**; pp 179-244.
- (10) Ulehlova, B. In *Soil Microbial Associations — Control of Structure and Functions*. Vancura, V.;Kunc, F. Eds.; Elsevier, Amsterdam, **1988**; pp 406-469.

- (11) Philips, C.J.; Harris, D. ; Dollhopf, S.L. ; Gross , K.L. ; Prosser, J.I. ; Paul, E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 5410-5418.
- (12) Ranjard, L.; Poly, F.; Combrisson, J.; Richaume, A.; Gourbière, F.; Thioulouse, J.; Nazaret, S. *Microbial Ecol.* **2000**, 39, 263-272.
- (13) Poly, F.; Bally, R.; Jocteur Monrozier, L. *Res. Microbiol.* **2001**, 152, 95-103.
- (14) Perrodin, Y.; Gobbey, A.; Grelier-Volatier, L.; Canivet, V.; Fruget, J.F.; Gibert, J.; Texier, C.; Cluzeau, D.; Gros, R.; Poly, F.; Jocteur-Monrozier L. *Waste Management.* **2002**, 22, 215-228.
- (15) Lensi, R.; Clays-Josserand, A.; Jocteur Monrozier, L. *Soil Biol. Biochem.* **1995**, 27, 61-69.
- (16) Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K.; Burns, R.C. *Plant Physiol.* **1968**, 43, 1185-1207.
- (17) Turner, G. L.; Gibson, A. H. In *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Bergersen, F. Ed.; John Wiley & Sons, Chichester, **1980**; pp 111-138.
- (18) Ranjard, L.; Poly, F.; Combrisson, J.; Richaume, A.; Nazaret, S. *Eur. J. Soil Biol.* **1998**, 34, 89-97.
- (19) Normand, P.; Ponsonnet, C.; Nesme, X.; Neyra, M.; Simonet, P.; In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermans, D.L.; van Elsas, J.D.; de Bruijn, F.J. Eds.; Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **1996**. pp 1-12.
- (20) Thioulouse, J.; Chessel, D.; Dolédec, S.; Olivier, J. M. *Stat. Comput.* **1997**, 7, 75-83.
- (21) Dommergues, Y. In *Soil Microbial Ecology*. Dommergues, Y.; Mangenot, F. Eds.; Masson, Paris. **1970**.
- (22) Sims, P. L.; Coupland, R. T.; In *Grassland ecosystems of the world: analyses of grassland and their uses*. Coupland, R. T. Ed.; Cambridge University Press, **1979**; pp 49-72.
- (23) Giller, K.E.; McGrath, S.P.; Hirsch, P. R. *Soil Biol. Biochem.* **1989**, 21, 841-848.
- (24) Kabir, M. M.; Chotte, J. L.; Rahman, M.; Bally, R.; Jocteur Monrozier, L. **1994**, *Plant Soil* 163, 243-255.
- (25) Peoples, M. B.; Ladha, J. K.; Herridge, D. F.; *Plant Soil.* **1995**, 174, 83-101.
- (26) Vancura V. In *Soil Microbial Associations — Control of Structure and Functions*. Vancura, V.; Kunc, F. Eds.; Elsevier, Amsterdam, **1988**; pp 193-280.



- (27) Chaudry, T.M.; Hayes, W.J.; Khan, A.G.; Khoo, C.S. *Aust. J. Ecotox.* **1998**, *4*, 37-51.
- (28) Richnow, H. H.; Seifeert, J.; Kastner, M.; Mahro, B.; Mickaelis, W. *Adv. Organic Geochem.* **1993**, *22*, 671-681.
- (29) Tyler, G.; Balsberg Pahlsson, A. M.; Bengtsson, G.; Baath, E.; Tranvik, L. *Water Air Soil Poll.* **1989**, *47*, 189-215.
- (30) Chaudri, A.; McGrath, S.P.; Giller, K.E. *Soil Biol. Biochem.* **1992**, *24*, 625-632.
- (31) Swift, M. J.; Heal, O. W

## **Chapitre III :**

### **Réponses des plantes et des communautés bactériennes des perturbations chimiques complexes**

---

La contamination saline des sols dont nous avons estimé l'ampleur dans le premier chapitre est susceptible d'affecter la physiologie des plantes et d'induire des modifications des communautés bactériennes particulièrement au niveau de la rhizosphère. Les sols des systèmes prairiaux sont en effet très étroitement imbriqués dans la rhizosphère des plantes herbacées, particulièrement des graminées. La rhizosphère, définie comme le volume de sol sous l'influence des racines d'une plante (Hitner, 1904), est un environnement dynamique caractérisé par une importante activité et diversité microbienne, comparativement au sol non rhizosphérique (Bolton *et al.*, 1992). C'est aussi par le système racinaire que vont entrer dans la plante les nutriments produits par les micro-organismes à partir de la décomposition des matières organiques, ainsi que les éléments toxiques organiques ou minéraux.

Le principal objectif des travaux présentés dans ce troisième chapitre est d'intégrer à la fois la phytotoxicité des effluents MIOM et REFIOM et le comportement des communautés bactériennes globales vis à vis de ces traitements chimiques. Nous présentons les effets des percolats sur la végétation composite (placettes "prairie") ou monospécifique (placettes "*Agrostis tenuis*") des prairies expérimentales et déterminons la ou les origines possibles de la phytotoxicité des effluents. L'influence de la composition floristique d'une prairie sur la structure initiale des communautés bactériennes et le rôle du développement du système racinaire au cours du temps sur le comportement de ces communautés exposées aux traitements chimiques sont également appréhendés. Nous avons ainsi étudié les impacts à court terme (90 jours), à moyen terme (180 jours) et long terme (450 jours) d'une pollution ponctuelle sur la structure de la communauté bactérienne tellurique totale par profils d'IGS et appréhender l'influence des racines dans les modifications de cette communauté.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de **R. GROS**, F. POLY, L. JOCTEUR MONROZIER and P. FAIVRE. Cet article a été soumis à la revue Plant and Soil.

## **Plant and soil microbial communities responses to solid waste leachates diffusion on grassland**

R. GROS<sup>1\*</sup>, F. POLY<sup>2</sup>, L. JOCTEUR MONROZIER<sup>2</sup> and P. FAIVRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences du Sol, CISM, Université de Savoie 73376 Le Bourget du Lac cedex, France. Tel. 04.79.75.88.76., Email : raphael.gros@univ-savoie.fr

<sup>2</sup>Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, Bat. Gregoir Mendel, 16 rue Dubois Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

**Key words:** grassland, microbial communities, MSWI-ashes, phytotoxicity, soil quality, soil functioning

**Running title:** Plant and microbial responses to MSWI-ash leachates

### III.1. Abstract

This work aims to define the effect on soil-plant relationships and soil quality of adding leachates from municipal solid waste incinerator (MSWI) ashes on recipient experimental grasslands. Leachates from MSWI-bottom ashes (BA) and MSWI-solidified air pollution control residues (SAPCr) contained a large content of salts and may be a source of an important disturbance of biological functioning of contaminated soils or grassland ecosystems. Leachates obtained from solid waste were spread on field experimental plots with indigenous grasses (herbaceous fallow) or with introduced vegetation (seedlings of an indigenous colonial bentgrass: *Agrostis tenuis*). Some effects on vegetation and on bacteria communities of soil were assessed, 180 days and 450 days after the spreading of leachates. The study of the contamination of the soils showed a significant increasing of Na<sup>+</sup> percentage of the exchange complex (ESP). The colonial bentgrass was found to be more sensitive to BA phytotoxicity than indigenous grasses, with a decrease of root (43%) and aerial (29%) biomasses 180 days following the contamination. Conversely, a positive effect on the biomass was observed following the contribution of SAPCr lixiviat. The use of a molecular tool to assess the effects on soil eubacteria community (A-RISA) showed a significant modification of the community structure with SAPCr lixiviat, but more slightly with BA. Grass cover and root influences on the behaviour of the bacterial communities with respect to the leachates were showed.

### III.2. Introduction

A healthy ecosystem is characterised by the integrity of nutrient cycles and energy flows, and by stability and resilience to disturbance or stress (O'Neill *et al.*, 1986). Thus soil health can be considered a subset of ecosystem health and may be associated with biological diversity and stability (van Bruggen and Semenov, 1999). Many authors developed physical, chemical and biological indicators of soil quality (Doran et Zeiss, 2000; Hess *et al.*, 2000; Karlen *et al.*, 1997). These indicators are used to define the influence of various environmental or agricultural practices, the effects of chemical or biological disturbances, of

various kinds of contamination, etc..., on soil health (Lynch and Elliot, 1997; Ovreas et Torsvick, 1998; Sommerfeldt et Chang, 1985). In research on ecotoxic assessment of pollutant sources, one uses pertinent biological indicators more and more often.

Municipal solid incineration waste ashes represent, because of their mineral composition, an important toxic potential. Storage or reuse conditions of wastes within an ecosystem require, in addition to the assessment of their own toxicity, the determination of the risk of contamination and toxicity incurred by the receiving environment. The study of the ecotoxicological risks of such materials requires the preliminary definition of the waste reuse or storage scenarios, the determination of the chemical properties of these materials and of their effluents, as well as a good knowledge on the functioning of the receiving ecosystem.

Plants are particularly sensitive to the modifications of their habitat and mineral pollution (Clijster *et al.*, 1991; Ebbs and Kochian, 1997; van Andel *et al.*, 1991; Turner, 1994). A salt stress affects many metabolic and physiological aspects of a plant. If the adverse osmotic and ion-specific effects of salt uptake exceed the level tolerable to the plant, functional disturbances and injuries occur (Almansouri, 2001; Dieter Jeschke and Hartung, 2000; Larcher, 1995). Photosynthesis and nitrogen assimilation are impaired. Respiration, especially in the roots, can be either increased or decreased by salt (Larcher, 1995). Growth processes are especially sensitive to the effects of salt, so that growth rates and biomass production provide reliable criteria for assessing the degree of salt stress and the ability of a plant to withstand (Grime and Campbell, 1991; Larcher, 1995).

Bio-indicators of soil quality and health relate mainly to their utility in defining ecosystem processes and must be sensitive enough to reflect the management on long-term changes in soil quality (Bengtsson, 1998). Soil Bacteria micro-organisms meet this criterion and are more and more used to define soil quality (Filip, 2002; Turco *et al.*, 1992). Indeed, microbial characteristics of soils are being evaluated increasingly as sensitive indicators of soil health because of the clear relationships between microbial diversity, soil and plant quality, and ecosystem sustainability (Atlas *et al.*, 1991; Doran *et al.*, 1996; Doran et Zeiss, 2000; Eijsackers, 1983). Their abundance and diversity are well correlated with beneficial soil functions (Pankhurst *et al.*, 1997). Several authors showed sensitive responses of soil bacteria populations to environmental and anthropogenic disturbances (e.g. Brohon *et al.*, 2001; Kozdroj et van Elsas, 2000; Kuperman and Carreiro, 1997; McGrath *et al.*, 1995). Ward *et al.* (1992) estimate that traditional studies on cultivable soil bacteria consider, depending on the kinds of soils, only 0.1 to 1% of total micro-flora. Tools to assess the modifications of the structure of specific or functional bacterial communities through genetic, chemical or

metabolic fingerprint establishment, are freed from the imprecision relative to the bacterial cultures. Various studies have shown that rDNA from 60% to 90% of the micro-organisms that can be observed microscopically in situ can be extracted and analysed (More *et al.*, 1994; Ranjard *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1996), as compared with less than 1% of the micro-organisms observed in soil that can be recovered on culture media. Molecular methods thus provide relevant results on the modifications of soil bacteria communities.

In this study, the impacts on grassland ecological functioning of two leachates from incineration ashes were analysed. Leachates from MSWI-bottom ashes (BA) and MSWI-solidified air pollution control residues (SAPCr) were spread on field experimental plots with indigenous grasses (herbaceous fallow) or with introduced vegetation (seedlings of *Agrostis tenuis*). Aerial and root biomasses were measured for 180 days (medium term) and for 450 days (long term) after contamination to determine the phytotoxicity of leachates. The rRNA intergenic spacer analysis (A-RISA) was used to study the genetic structure of the telluric bacterial pools. Different fingerprints and consequently different genetic structures were observed between the rhizospheric soil and non-rhizospheric soil. Automated-Ribosomal Intergenic Spacer Analysis were performed on two biological characteristic cycles: 90 days after treatments and after a complete vegetation cycle (450 days).

### III.3. Materials and methods

#### III.3.1. Experimental design

##### *Leachates:*

The MSWI-BA and MSWI-SAPCr leachates used in this work were reproduced with lysimeters (laboratory device) and field pilot plants (Barna *et al.*, 2000). Technical processes of percolation and leaching are accord with reuse scenarios defined by Perrodin *et al.*, 2002. The scenarios studied here are a water storage reservoir for fire fighting, and a road embankment. The reservoir construction is made of a mixture of hydraulic binders and APC residues from a municipal solid waste incinerator (MSWI). Bottom ash from MSWI is used as road embankment material. Elements were measured by Inductively coupled Plasma mass spectrometry (ICPMS). The main characteristics of leachates are given in Table III.1.

**Table III.1.** : Main characteristics of leachates

	pH	Electrical conductivity	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na	K	Ca	Mg
		dS cm <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>					
MSWI-BA	11	7.5	1718	150	722,5	399	119	0,03
MSWI-SAPCr	7,6	11.2	3680	18,5	610	1000	900	<sd

	Fe	S	Pb	Cu
	mg l <sup>-1</sup>			
MSWI-BA	<sd	56,5	0,115	2
MSWI-SAPCr	0,01	nd	<0.07	<0.01

*Field-plots experiment:*

Six plots (5m×2m) were delimited at the "Field Ecocompatibility Facilities" of the CERED Research and Tests Center for Waste Elimination. Indigenous plant cover was left on three plots. These grasslands (called I) are made up mainly with *Agrostis tenuis* Sibth., *Arrhenaterum eliatum* L. and *Holcus lanatus* L.. The three other plots (called A) were weeded by removing the first cm of soil. Following this operation, we have seeded *Agrostis tenuis* L. at a rate of 20 g m<sup>-2</sup> on the bare soil. Three plot pairs, each consisting of one plot with permanent and elderly grass cover and one with single species and young cover, were defined. Two weeks after seeding, each plot pair received 44 l m<sup>-2</sup>, at a rate of 11 l m<sup>-2</sup> per day, of MSWI-BA leachate, MSWI-SAPCr leachate or rainwater (control water plot).

*Laboratory experiment:*

In parallel, laboratory experiments were performed on the model plant *Agrostis tenuis* to remove field variability. The soil used for this study was collected from the surface 10 cm (A1 horizon) of the indigenous grassland on the field experiment site. After collection, the samples were sieved (< 4mm) and mixed. Soil microcosms were prepared by weighing 750 g dry weight equivalent soil (30% moisture content) into containers (20×30×5 cm). After treatment with soil/solution ratio used on field experiment: 300 ml water, BA or SAPCr leachates, microcosms were planted with seedling of *Agrostis tenuis*, and incubated in a constant environment growth chamber (temperature 20 °C, light dark cycle 16/8 h) for 40



days. Soil was maintained at 30% moisture content by the daily addition of distilled water. In this paper, we will present the global qualitative effects with a photograph.

### **III.3.2. Soil contamination measurements**

Soil samples were cored from the A1 layer (0-10 cm) at 180 and 450 days after pollution, air-dried and sieved (<2mm). Exchangeable Na<sup>+</sup> was measured after extraction in Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> (Orsini et Rémy, 1976). Lead and copper content of sample soils were analysed after extraction by ICPMS.

### **III.3.3. Plant biomasses and carbon nitrogen contents**

Samples collection of aerial and roots parts was realised at 180 and 450 days after pollution, on each indigenous and *Agrostis* plots. Aerial parts were collected on each plot by cutting and dried at 60 °C during 48 h. Aerial dry weight biomass was measured per surface unit (3 samples of 1 m<sup>2</sup> per plot). Root dry weight biomass was measured after washing and drying roots contained within a volume of 10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> from surface layer 0-10 cm.

Carbon and nitrogen contents were determined on dried and crushed material. Elemental analysis of dried aerial or root material was performed on a Carlo Erba Analyser.

### **III.3.4. Microbial community structure by Automatised – Ribosomal Intergenic Spacer Analysis**

Bacterial DNA was extracted directly from fresh soil samples (1 g equivalent dry weight), purified and quantified as previously described by Ranjard *et al.* (1998). Bacterial intergenic spacers (IGS) located between the *rrs* and *rriI* genes were amplified with the following primers: S-D-Bact-1522-b-S-20 and L-D-Bact-132-a-A-18 (Normand *et al.*, 1996). Amplified sequences contained the IGS, plus approximately 150 bp corresponding to the 20 nucleotides of the S-D-Bact-1522-b-S-20 primer and about 130 bp of the 23S rRNA gene. PCR conditions were as previously described (Ranjard *et al.*, 2000). For A-RISA, we used the S-D-Bact-1522-b-S-20 primer labelled at its 5' end with the Cy3 fluorochrome (Eurogentec,

Belgium). A-RISA fragments were resolved by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel run under denaturing conditions for 12 h at 1700 V on an AlfExpress DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech France). The electrophoregram was analyzed with Fragment Manager software (Amersham Pharmacia Biotech France). The relative peak heights within a profile were calculated by dividing the height of an individual peak by the total peak height (the sum of the heights of all peaks). The sizes of the fragments, in bp, were calculated from external size standards 100 bp, 300 bp (Amersham Pharmacia Biotech France) and 940 bp (made in our own laboratory) long. A statistical analysis of the resulting profiles was performed by principal components analysis (PCA). This method provided an ordination of bacterial pools that were plotted in the two dimensions based on score on the first two principal components (Ranjard *et al.*, 2000).

The DNA fingerprint approach was realised on fresh bulk soil samples collected 90 days after pollution and on a second sampling collected the following year (at day 450). The seedlings of *Agrostis tenuis* had not reached, for medium-term (180 days), a sufficient development to evaluate effects of the contaminants via the plants. At long-term (450 days), the rhizospheric influences which can be observed, the analysis of the bacterial communities was realised at the same time as the plant biomass measurements. For these samplings, we could separate the non-rhizosphere soil to the rhizosphere soil. Non-rhizosphere soil is obtained by shaking the roots. Rhizosphere was obtained by washing the roots with UP water. Three replicates were realised on each soil samples.

## III.4. Results and discussion

### III.4.1. Soil contamination

The field experiment and laboratory tests were realised on a silty loam soil (Aquic Hapludalf: Soil Survey Staff, 1994). The soil (A1 layer) had an pH average of 6.6 (H<sub>2</sub>O 1:2.5); an organic carbon content of 0.017 g g<sup>-1</sup>; a clay content of 0.146 g g<sup>-1</sup>; a CEC of 8.1 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; and a saturation rate of 100%.

**Table III.2.** : Na, Pb and Cu content in soil of indigenous and *Agrostis tenuis* field plots.

	Indigenous plots			<i>Agrostis tenuis</i> plots		
	Water	MSWI-BA	SAPCr	Water	MSWI-BA	SAPCr
180 days						
Na <sup>+</sup>	0.09	0.62	0.81	0.08	0.72	1.01
Pb	21	22	22	20	21	20
Cu	47	46	39	39	44	39
450 days						
Na <sup>+</sup>	0.07	0.57	0.66	0.08	0.60	0.73
Pb	51	52.5	51.5	50.5	43	49
Cu	57.5	52.5	58.5	62.5	60.5	65

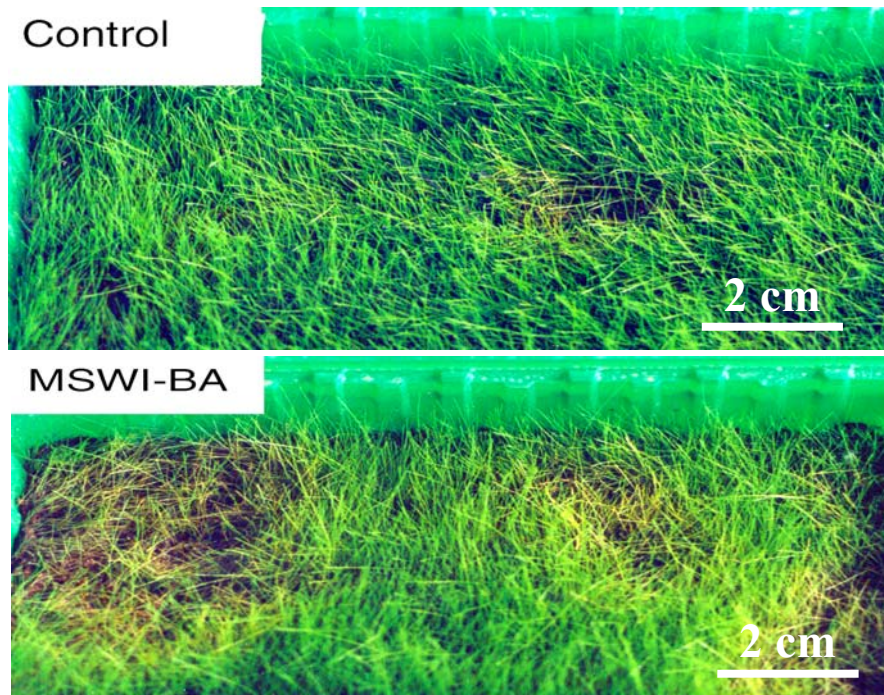
Na<sup>+</sup> expressed in cmole<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; Pb and Cu in mg g<sup>-1</sup>

We measured an excessive sodic contamination with both BA and SAPCr leachates (Table III.2.). The content of Na<sup>+</sup> increased significantly ( $P < 0.001$ ; Students *t*-test) for each contaminated plot and remained significant 180 and 450 days after the contamination.

Leachates did not bring an excess content of heavy metals such as total Pb and Cu. The Pb and Cu concentrations are not in the ranges of high toxicity but correspond to industrial waste lands soils slightly contaminated by copper. Toxic level of heavy metals was considered to be 60-125 mg Cu kg<sup>-1</sup> dry weight and 100-400 mg Pb kg<sup>-1</sup> dry weight (Kabata Pendias and Pendias, 1992; Ross, 1994).

### III.4.2. Effects of leachates on vegetation

#### III.4.2.1. Global effects



**Figure III.1.** : *Agrostis tenuis* growth on soil added with water or MSWI BA.

The qualitative effects on the growth of *Agrostis tenuis* cultivated in laboratory condition, are shown on Figure III.1. : the yellowing and death of leaves with BA treatment compared with control, which are not observable on the plants developing on SAPCr treated soil.

These effects were observed in two different field situations from the vegetation: plots with indigenous vegetation (I) installed for more than 40 years, and plots planted with seedling of *Agrostis tenuis* in the year of the contamination (A) (data not shown).

#### III.4.2.2. *Aerial and root biomasses:*

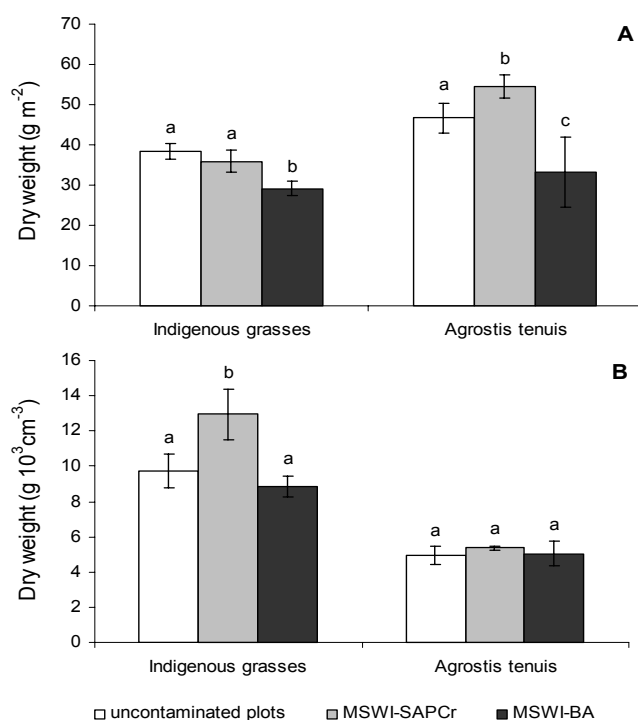
##### *Medium-term (180 days)*

The average root biomass above indigenous grassland plots (I) was twice more significant than above *Agrostis tenuis* plots (A) ( $P < 0.001$ ; Students *t*-test).

Solidified APCr did not have a significant effect on aerial biomass of the indigenous grasses (Figure III.2A.). However, there was a considerable increase of root biomass of these grasses

(47%;  $P < 0.05$ ) (Figure III.2B.). Plants of A plot contaminated with SAPCr, have showed a significant increase of their aerial biomass (17% ,  $P < 0.05$ ), whereas root biomass does not seem affected.

Bottom ashes leachate induced a sensible aerial biomass decrease of indigenous (24%;  $P < 0.01$ ) and *Agrostis* plots (29%;  $P < 0.05$ ) (Figure III.2A.). This treatment did not have any significant effect on the root biomass (Figure III.2B.).

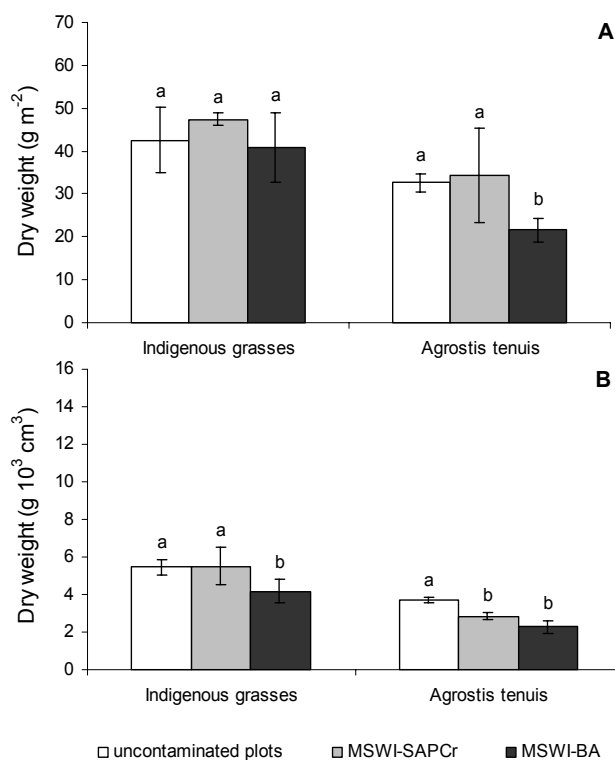


**Figure III.2.** : Aerial (A) and root (B) biomasses of indigenous grasses and *Agrostis tenuis* of field experimental plots, 180 days after contamination with MSWI bottom ash or SAPC residues leachates.

#### Long-term (450 days)

We also used aerial and root biomasses dry weight as phytotoxicity indicators of both the SAPCr and BA leachates (Figure III.3.), which we correlated with C or N contents of the aerial parts and roots.

Solidified APCr and MSWI-BA treatments on indigenous grasslands plots did not induce significant modification of the aerial biomass compared to the control plot (Figure III.3A.). However, aerial biomass on *Agrostis tenuis* plots decreased to 34% ( $P < 0.05$ ) after BA treatment. No effect was measured after SAPCr contamination. Concerning root biomass, we noted a 24% decrease of the dry weight ( $P < 0.05$ ) after BA leachate spreading on the indigenous plot (Figure III.3B.). This reduction was 39% ( $P < 0.001$ ) for *Agrostis* plot contaminated with BA and 24% ( $P < 0.05$ ) with SAPCr leachate.



**Figure III.3.** : Aerial (A) and root (B) biomasses of indigenous grasses and *Agrostis tenuis* of field experimental plots, 450 days after contamination with MSWI bottom ash or SAPC residues leachates.

Negative effects of BA on biomasses are correlated with the variations of C and N contents of leaves and roots. (Table III.3.): C ( $r = 0,839$ ;  $P < 0,005$ ) and N ( $r = 0,873$ ;  $P < 0,005$ ). Bottom ashes leachate seems to cause a dysfunction on photosynthesis of *Agrostis tenuis* which results in the yellowing of the plants of *Agrostis tenuis* plot and in a disturbance in nitrogen assimilation ( $R = 0,977$ ;  $P < 0,05$ ). An excess of Na and Cl ions in the soil solution can be inhibitory to various plant physiological processes (i.e. photosynthesis activity, nitrogen assimilation) (Poljakoff-Mayber and Lerner, 1994). The literature indicates that changes in mineral nutrient concentration of the medium result in a modification of endogenous phytohormone concentration. Degenhardt *et al.* (2000) have recently shown an accumulation of the phytohormone abscisic acid (ABA) of a plant growing on a similar alkaline substrate (MSWI-bottom slag). They concluded to a salt stress, nutrient deficiency and microbial interactions disturbances. Thus, the MSWI-BA contribution seems to disturb the biological functioning of the plant-soil system, without this effect being able to be imputed to a direct action of pollutants on the aerial parts.

**Table III.3.** : C and N content in aerial and root parts of plant grown in field experiment (% of dry matter)

	Uncontaminated soil				MSWI-BA contaminated soil				MSWI-SAPCr contaminated soil			
	Leaves		Roots		Leaves		Roots		Leaves		Roots	
	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
Agrostis tenuis (introduced)	35.94	1.68	34.83	1.26	34.66	1.27	34.91	1.47	35.53	1.55	40.31	1.16
Indigenous grasses	41.63	2.14	30.84	1.31	41.5	2.26	34.21	1.25	41.48	2.09	37.46	1.43

### III.4.3. Effects of leachates on soil microbial community structure

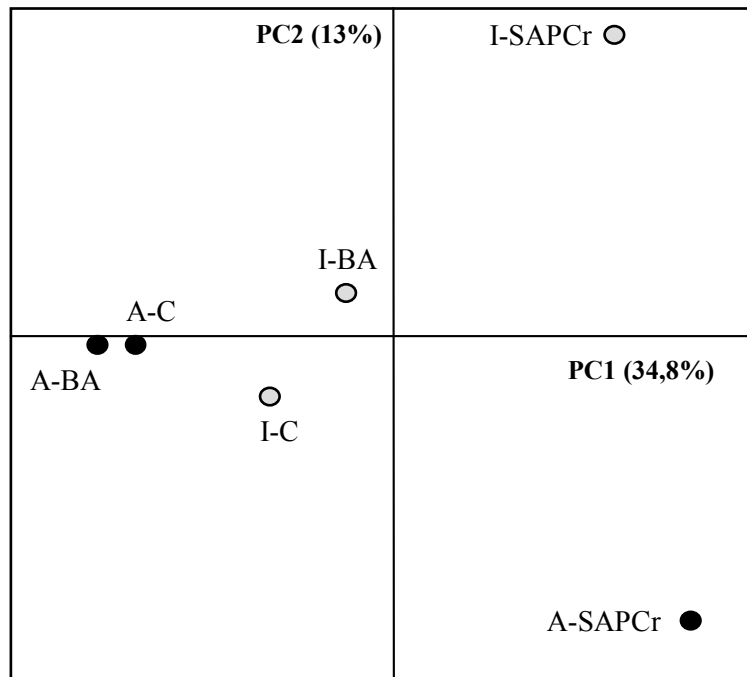
A-RISA involves the analysis of the length polymorphism of the spacer between the *rrs* and *rfl* genes (IGS). IGS is present within the genome of each eubacteria and owns variable sizes and sequences (Normand *et al.*, 1996). The high size variability of this spacer can then allow detection of slight changes in the genetic structure of the community. A principal component analysis (PCA) on covariance matrix performed on the A-RISA profiles data (bacterial pool as rows and bands as columns) provides a representation of the soil bacterial communities structure (Ranjard *et al.*, 2000; 2001).

#### III.4.3.1. Short-term effects (90 days).

The microbial communities structure from indigenous plant covered soil (I) and *Agrostis tenuis* planted soil (A) was strongly affected by SAPCr leachate (Figure 4). The first principal F1 component explained 34.8% of the variance and the second component explained 13% of this variance.

The factorial map showed that ordination on F1 and F2 differentiates the RISA profile of the control samples (I-C and A-C) and contaminated soils (I-SAPCr and A-SAPCr). BA leachate slightly modified bacterial pool from indigenous grassland soil (I-BA) (ordination on F2), but does not have affected microbial community structure from *Agrostis* soil (A-BA). A-RISA

results show that BA treatment was less disturbing for bacterial pools than SAPCr treatment, as the distance between BA and control samples show it.



**Figure III.4.** : Principal component (PC1xPC2) plot generated from A-RISA profiles from indigenous grasslands soil (I-) and *A. tenuis* plots soil (A-) 90 days after control (-C), MSWI-BA (-BA) or MSWI-SAPCr (-SAPCr) treatments.

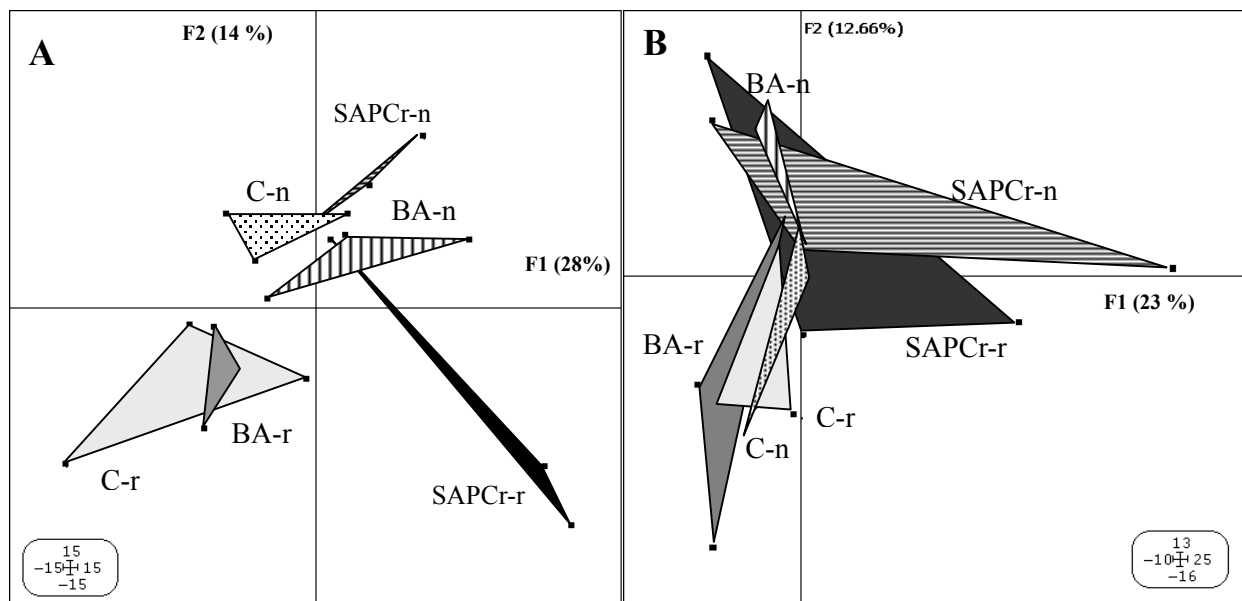
The analysis also demonstrates that both control plots have a bacterial community of different genetic structure. This difference comes from the preparation mood of the *Agrostis* planted plots. Indeed, before sowing, indigenous vegetation was weeded by removing the first centimetres of soil. The bare soil has microbial characteristics closer to the minimum tillage than to perennial grassland. These results display an influence of the preliminary physical treatment of the soil on the initial bacterial communities structure and, besides, on the behaviour of these communities with respect to the contaminant solutions.



### III.4.3.2. Long-term effects (450 days)

The minor floristic diversity and the low root growth under *Agrostis tenuis* are two principal factors that may influence the structure of the microbial community in the long-term and explain differences with indigenous cover.

The analysis of A-RISA profiles, 450 days after contamination, enables us to assess the resilience or the sustainability of the impacts on soil bacteria communities. We can also appreciate the influence of the roots on microbial disturbances. Indigenous grasslands (Figure III.5A.) are distinguished from the *Agrostis tenuis* plots (Figure III.5B.).



**Figure III.5.** : Principal component (PC1xPC2) plot generated from A-RISA profiles from rhizosphere (-r) and non-rhizosphere (-n) soils of indigenous grasslands soil (5A) and *A. tenuis* plots soil (5B), 450 days after control (C-), MSWI-BA (BA-) or MSWI-SAPCr (SAPCr-) treatments.

#### *Indigenous grassland*

Concerning PCA plots, different A-RISA profiles lead to surfaces representative of the different treatments and which are organised according to their factorial distance. Non-rhizosphere soil communities (C-n, BA-n and SAPCr n) are not very distinctive (Figure III.5A.). The rhizosphere communities reveal a minor impact of BA and greater of SAPCr, as we had observed for bulk soil in the short-term. The first principal F1 component (28%)

shows the modifications of A-RISA profiles induced by leachates. The second principal F2 component (14%) opposes the rhizosphere to the non-rhizosphere bacterial communities. The impact of SAPCr leachate under indigenous cover was extended in the long-term on the rhizosphere bacterial community (SAPCr-r). BA leachate induced a sensitive impact on the non-rhizosphere community (BA-n) but did not disturb the rhizosphere community (BA-r). These results confirm the rhizospheric property of a densely rooted grassland soil, also described by Sims and Coupland (1979).

These results display the responsiveness of the rhizosphere community and the sustainability of the effects on this community without allotting these characteristics to a direct or indirect effect via the plant. The chemical and biochemical properties within and immediately adjacent to the root zone are very different from those of the non-rhizosphere soil (Dormaar, 1988). Rhizosphere microbial communities can vary in structure and species composition in different root locations or in relation to soil type, plant species, age, stress or other environmental factors (De leij *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1999; Steer and Harris, 2000; Yang and Crowley, 1999). Some authors have shown that the r-strategists were predominant in the bacterial community of the rhizosphere, whereas the K-strategists were predominant in the non rhizosphere (Bolton *et al.*, 1992; De Leij *et al.*, 1993), and that the r-strategists are more sensitive to toxic substances than the K-strategists (De Leij *et al.*, 1994; Kozdroj, 1995; Kunito *et al.*, 2001).

#### *Agrostis tenuis* plots

Under *Agrostis tenuis* cover (Figure III.5B.), the factorial map does not illustrate a distinct leachates effect between rhizosphere and non-rhizosphere communities. Control surfaces are also almost superimposed, which is very different from the indigenous grassland. In this context, SAPCr leachate durably disturbed the communities under *Agrostis* cover, whereas the structure of the communities was slightly modified by MSWI-BA. However, the variability of A-RISA profiles within samples is so important that the PCA is not very selective. In general, the disturbances measured under *Agrostis* cover seem less durable than those under indigenous cover.

### III.5. Conclusion

MSWI-ashes leachates can disturb in a different way the living organisms in the recipient environment. BA leachates stimulated a decrease in the aerial and root biomasses, whereas we measured a positive effect of SAPCr leachate on leaves production. Concerning the behaviour of soil microbial communities, the effects are opposite: BA was the least disturbing, whereas changes in the microbial communities structure after SAPCr treatment were significant.

The significant increase of  $\text{Na}^+$  in contaminated soils is conceivably the main source of contamination. However, we do not exclude the possibility of toxicity through heavy metals, even if we did not measure an increase of total Pb and Cu within contaminated soils. Indeed, we have recently demonstrated a significant copper bioaccumulation in root of *Agrostis tenuis* sampled 450 days after the contamination with SAPCr (Perrodin *et al.*, 2002).

Consequences of the toxicity for the plants on the structure of Bacterial communities were not perceptible on a recent system (*Agrostis tenuis* plots), but were noteworthy on the rhizosphere communities of a perennial grassland that included an important proportion of *Agrostis tenuis*. In this context, we noted that the rhizosphere influence is only manifest when the plant is positively influenced (SAPCr), whereas we did not measure any effect due to the phytotoxicity (MSWI-BA) related to roots degeneration.

A-RISA was a sensitive device which allowed us to detect and analyse modifications of the structure of non-rhizosphere bacterial communities different from those of the rhizosphere communities. We have also noted the influence of the grassland type (e.g. plant species, minimum tillage, roots growth) on microbial behaviour with respect to the leachates. However, we contend that the use of a simplified model of grassland ecosystem as a receiving environment test (recent and monospecific grassland) does not fully represent the complexity of the biological function of an ecologically stable soil underneath indigenous grassland.

## Acknowledgements

This investigation was supported by the “ Ecocompatibility of Solid Wastes ” program (grant 9674056/DIMT/mfb) for the French “Agence de l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie (ADEME).

## III.6. References

Almansouri M, Kinet J M and Lutts S 2001 Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil* 231, 243-254.

Atlas R M, Horowitz A, Krichevsky M and Bej A K 1991 Responses of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.* 22, 249-256.

Barna R, Rehty Z, Imyim A, Perrodin Y, Moszkowicz. P and Tiruta-Barna L 2000 Environmental behaviour of a construction made of a mixture of hydraulic binders and air pollution control residues from Municipal Solid Waste Incineration. Part 1. Physico-chemical characterisation and modelling of source term. *Waste Management* 20, 741-750.

Bengtsson J 1998 Wich species? Wath kind of diversity? Wich ecosystem fonction? Somes problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 10, 191-199.

Bolton H Jr, Fredrickson J K and Elliott L F 1992 Microbial ecology of the rhizosphere. *In* *Soil Microbial Ecology*. Ed F B Jr Metting. pp. 27–63. Marcel Dekker Inc., New York.

Brohon B, Delolme C and Gourdon R 2001 Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality, *Soil Biol. Biochem.* 33, 883-891.

Clijsters H, Van Asshe F and Gora L 1991 Physiological responses of higher plants to soil contamination with metals. *In* *Ecologicals responses to environmental stresses*. Eds J Rosema and J A C Verkleij, pp. 32-39. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

De Leij F A A M, Whipps J M and Lynch J M 1994 The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microb. Ecol.* 27, 81–97.

Degenhardt B, Gimmler H, Hose E and Hartung W 2000 Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, distribution and transport in plant roots. *Plant and soil* 225, 83-94.

Dieter Jeschke W and Hartung W 2000 Root-shoot interactions in mineral nutrition. *Plant and Soil* 226, 57-69.

Doran J W and Zeiss M R 2000 Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15, 3-11.

Doran J W, Sarrantonio M and Liebigh M A 1996 Soil health and sustainability. *Adv. Agron.* 56, 2-54.

Dormaer J F 1988 Effect of plant roots on chemical and biochemical properties of surrounding discrete soil zones. *Can. J. Soil Sci.* 68, 233-242.

Ebbs S D and Kochian L V 1997 Toxicity of zinc and copper to brassica species implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26, 776-781.

Eijsackers H 1983 Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environ. Monitoring Assesm.* 3, 307-316.

Filip Z 2002 International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88, 169-174.

Griffiths B S, Ritz K, Ebbelwhite N and Dobson G 1999 Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.* 31, 145-153.

Grime J P and Campbell B D 1991 Growth rate, habitat productivity, and plant strategy as predictors of stress responses. *In Responses of plants to multiples stresses*. Eds H A Mooney, W E Winner and E J Pell. pp 143-159. Academic Press, Inc., San Diego, CL.

Hess G R, Cambell C L, Fiscus D A, Hellkamp A S, MacQuaid B F, Munster M J, Peck S L and Shafer S R 2000 A conceptual model and indicators for assessing the ecological condition of agricultural lands. *J. Environ. Qual.* 29, 728-737.

Kabata Pendias A and Pendias H 1992 *Traces Elements in Soils and Plants*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Boca Raton, FL.

Karlen D C, Mausbach M J, Doran J W, Clire R G, Harris R F and Schuman G E 1997 Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 4-10.

Kozdroj J 1995 Microbial responses to single or successive soil contamination with Cd or Cu. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1459–1465.

Kozdroj J and Van Elsas J D 2000 Response of the bacterial community to roots exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approach. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1405-1417.

Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H, Matsumoto S 2001 Characterisation of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 95–102.

Kuperman R G and Carreiro M M 1997 Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 29, 179-190.

Larcher W 1995 *Physiological plant ecology*. Springer-Verlag, Berlin.

Lynch J M and Elliot LF 1997 Bioindicators: perspectives and potential value for landusers, researchers and policy makers. *In* *Biological indicators of soil health*. eds C E Pankhurst, B M Doube and W S R Gupta. pp 79-96. CAB international, London.

McGrath S P, Chaudri A M and Giller K E 1995 Long-term effects in sewage sludge on soils, microorganismes and plants. *J. Industr. Microbiol.* 14, 94-104.

More M I, Herrich V L, Silva M C, Ghiorse W C and Madsen E L 1994 Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1572-1580.

Normand P, Pansonnet C, Nesme X, Neyra T, Simonet P 1996 ITS analysis of prokaryotes. *In* *Molecular Microbiology Ecological Manual*, eds A D L Akkermans, J D van Elsas, F J de Bruijn. pp 1-12. 3.4.5.. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

O'Neill R V, Angeles D E, Waide D L and Allen J B 1986 *A hierarchical concept of ecosystems*. Princeton University Press, Princeton.

Orsini L et Rémy J C 1976 Utilisation du chlorure de cobaltihexamine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols. *Sci. Sol* 4, 269-275.

Ovreas L and Torsvik V 1998 Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36, 303-315.

Pankhurst C, Doube B M and Gupta V V S R (eds) 1997 *Biological indicators of soil health*. CAB International, Wallingford.

Perrodin Y, Gobbey A, Grelier-Volatie L, Canivet V, Fruget J F, Gibert J, Texier C, Cluzeau D, Gros R, Poly F and Jocteur Monrozier L 2002 Waste ecocompatibility in storage and reuse scenarios: global methodology and detailed presentation of the impact study on the recipient environments. *Waste Management* 22, 215-228.

Poljakoff-Mayber A and Lerner H R 1994 Plants in saline environments. *In Handbook of plant and crop stress*. Ed Pessaraki M. pp. 65-96. Marcel Dekker Inc., New York.

Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A and Nazaret S 1999 A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fraction of soil suitable for PCR based assays of bacterial. *Eur. J. Soil Biol.* 34, 2, 89-97.

Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J and Nazaret S 2000 Heterogeneous Cell density and genetic structure studies of bacterial pools associated with various soils microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb. Ecol.* 39:263-272.

Ranjard L, 2001 Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152, 707-716.

Ross S M 1994 Source and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. *In Toxic metals in soil-plant systems*. Ed Ross S M. pp 3-26. John Wiley & Sons, Chichester.

Sims P L and Coupland R T 1979 Producers. *In Grassland ecosystems of the world: analyses of grassland and their uses*. Ed Coupland R T. pp 49-72. Cambridge University Press, Cambridge.

Soil Survey Staff 1994 Keys to soil taxonomy, sixth edition. USDA, Washington.

Sommerfeldt T G and Chang C 1985 Change in soil properties under annual applications of feedlot manure and different tillage practices. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 983-987.

Steer J and Harris J A 2000 Shifts in microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biol. Biochem.* 32, 869-878.

Turco R F, Kennedy A C and Jawson M D 1994 Microbial indicators of soil quality, *In Defining soil quality for a sustainable environment*. Eds Doran J.W. and *et al.*, pp 73-90. SSSA/ASA, Special Publication 35.

Turner A P 1994 The responses of plants to heavy metals. *In Toxic metals in soil-plant systems*. Ed S M Ross. pp153-188. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Van Andel J, Van Baalen J and Rozijn N A M G 1991 Population ecology of plant species in disturbed forest and grassland habitats. *In* Ecological responses to environmental stresses. Eds J Rosema and J A C Verkleij, pp. 136-149. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Van Bruggen A H C and Semenov A M 1999 In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Appl. Soil Ecol.* 15, 13-24.

Ward D M, Weller R and Bateson M M 1990 16 rRNA sequences reveal numerous uncultured micro-organisms in natural community. *Nature* 345, 63-65.

Yang C H and Crowley D E 1999 Rhizosphere microbial community structure in relation to roots location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 345-351.

Zhou J, Bruns M A and Tiedje J M 1996 DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.



## **Chapitre IV :**

### **Elaboration d'une batterie de tests de phytotoxicité: Essais de laboratoire.**

---

#### **IV.1. Résumé**

L'écotoxicité des effluents MIOM, REFIOM et SCPb est très complexe. L'évaluation de leur phytotoxicité impose l'utilisation d'une batterie de tests en laboratoire. Le percolat SCPb provoque une réduction de la productivité foliaire et racinaire, et inhibe l'allongement des racines d'une espèce végétale résistante (orge). L'accumulation de proline dans les tissus foliaires et racinaires met en évidence un stress salin. La contamination de cultures de laitue (espèces plus sensibles) permet d'évaluer la phytotoxicité des solutions MIOM et REFIOM sur la croissance des plantes et de déterminer l'origine des contaminants. L'utilisation d'espèces végétales de sensibilité différente au stress et le couplage de mesure de différents paramètres sont discutés.

## IV.2. Introduction

Chez les glycophytes la réalisation de l'ajustement osmotique lors d'un stress salin conduit à l'accumulation de solutés organiques, tels que des glucides solubles et des polyols (Greenway et Munns, 1980) ou encore certains acides aminés (Bates *et al.*, 1973; Hernandez *et al.*, 2000). Parmi ces acides aminés la proline, de teneur habituellement faible dans les tissus des plantes cultivées sur milieu dépourvu de sel et donc peu contraignant sur le plan hydrique, se trouve accumulée en réponse au stress salin. L'accumulation de la proline relève d'une adaptation métabolique au stress salin. Elle est également considérée comme un symptôme révélateur des dommages causés au niveau du métabolisme azoté.

Nous avons constaté et mesuré un impact considérable des percolats REFION et MIOM sur le développement des plantes des prairies expérimentales du CERED (Gros, 1999 et Cf. Partie III Chapitre III). L'une des origines de la toxicité avait été attribuée à l'accumulation racinaire de certains métaux lourds. Néanmoins, nous avons montré dans les chapitres précédents que les effluents contaminent fortement les sols par un apport en Na<sup>+</sup>, engendrant des perturbations importantes des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol. Nous pouvons donc supposer que le dosage de la proline dans les plantes contaminées confirmeras l'hypothèse d'un stress salin. Dans le présent travail, la teneur relative de la proline est déterminée après application des effluents de MIOM, de SCPb et de REFION sur des cultures en conditions contrôlées de jeunes plants d'orge, de laitue et d'Agrostis. Cette approche se propose de mettre en évidence les relations entre l'amplitude de l'accumulation de proline et l'impact phytotoxique des effluents sur la croissance des plantes (biomasses racinaires et foliaires, longueur racinaire). L'objectif est de proposer une batterie de tests fiables et sensibles qui révèle la phytotoxicité des effluents sur des cultures en laboratoire.

## IV.3. Matériel et méthodes

### IV.3.1. Préparation des cultures expérimentales

Les cultures sont réalisées dans des pots d'horticulture en plastique noir (dimensions : 8×8×10 cm). Cent soixante grammes de sol provenant du site expérimental du CERED sont utilisés pour ces tests. Dans chacun des pots nous avons semé 5 graines d'orge (*Hordeum vulgare* L.) ou de laitue (*Lactuca sativa* L.), ainsi que 150 graines d'*Agrostis tenuis*. Le choix des espèces végétales est motivé par la sensibilité de la laitue à de multiples polluants et par la résistance de l'orge et de l'*Agrostis* (graminées) aux pollutions minérales et métalliques. L'orge est également utilisé pour un test normalisé ISO concernant l'inhibition de la croissance des racines (ISO/DIS 11269-1). Les pots sont disposés en chambre de culture régulée (température : 20°C ; photopériode L/O : 16h/8h). Deux jours après la germination des graines, chaque culture est contaminée avec les effluents MIOM, REFIOM ou SCPb produits et testés au cours du programme "écocompatibilité des déchets" (Cf. introduction de la partie III). La contamination ponctuelle est réalisée avec 60 ml de percolats de MIOM, de SCPb ou 60 ml de lixiviat de REFIOM. Les plantes entières (racines + feuilles) sont récoltées 10 jours après la contamination pour la laitue et l'orge, 30 et 50 jours en ce qui concerne l'*Agrostis*. Trois cultures de répétitions sont réalisées pour chacun des effluents testés sur les deux espèces végétales (soit 6 cultures par percolat + 3 témoins).

#### **IV.3.2. Paramètres mesurés**

##### *Biomasses foliaires et racinaires*

Les masses de feuilles et de racines fraîches des plants germés sont mesurées par pesée et exprimées en gramme de matière fraîche par plant (g MF) pour la laitue et l'orge, et en gramme de MF ou de matière sèche (g MS) pour 100 plants pour l'*Agrostis*.

##### *Longueur racinaire*

Le principe de cette méthode est d'analyser les différences de longueurs des racines des plants d'orge et de laitue qui ont germé dans les sols contaminés et de les comparer avec celles des témoins. Le test qui utilise l'orge est normalisé sous la référence ISO/DIS 11269-1. Il permet de mesurer l'impact de divers polluants sur la croissance des racines. Les longueurs racinaires sont exprimées en cm. La faible taille ainsi que la grande fragilité des racines ne permet pas de réaliser cette mesure sur les plants d'*Agrostis*.

### *Dosage des teneurs en proline dans les feuilles et les racines*

L'extraction des composés solubles des explants de feuilles et de racines est effectuée par immersion du matériel végétal dans 3 ml d'eau distillée et incubation au bain-marie à 100°C (30 mn). La suspension obtenue est agitée vigoureusement (vortex). Le surnageant constitue l'extrait. Il est utilisé directement pour la détermination quantitative de la proline. Les teneurs en proline, déterminées selon la méthode de Troll et Lindsey (1954) améliorée par Bates *et al.* (1973) puis par Magné et Larher (1992), sont exprimées en  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  MF.

Cinq cents  $\mu\text{l}$  de l'extrait à doser sont déposés dans des tubes à essais auxquels nous ajoutons 1 ml de solution de ninhydrine (50 ml de solution de ninhydrine = 0,5 g de ninhydrine + 30 ml d'acide acétique glacial + 20 ml d'eau distillée). Le contenu des tubes à essais est homogénéisé puis incubé au bain-marie pendant 20 mn. La réaction est stoppée en plongeant les tubes dans un bain d'eau glacée. Le produit coloré est extrait avec 3 ml de toluène suivi d'une agitation vigoureuse. La proline est quantifiée par la mesure de densité optique (DO) de la phase organique par spectrophotométrie à 520 nm.

### **IV.3.3. Analyses statistiques**

Les comparaisons statistiques entre les échantillons sont réalisées en utilisant le test-*t*. Les analyses de corrélations (Pearson) déterminent les relations éventuelles entre les paramètres mesurés de phytotoxicité et l'accumulation de proline.

## **IV.4. Résultats et discussion**

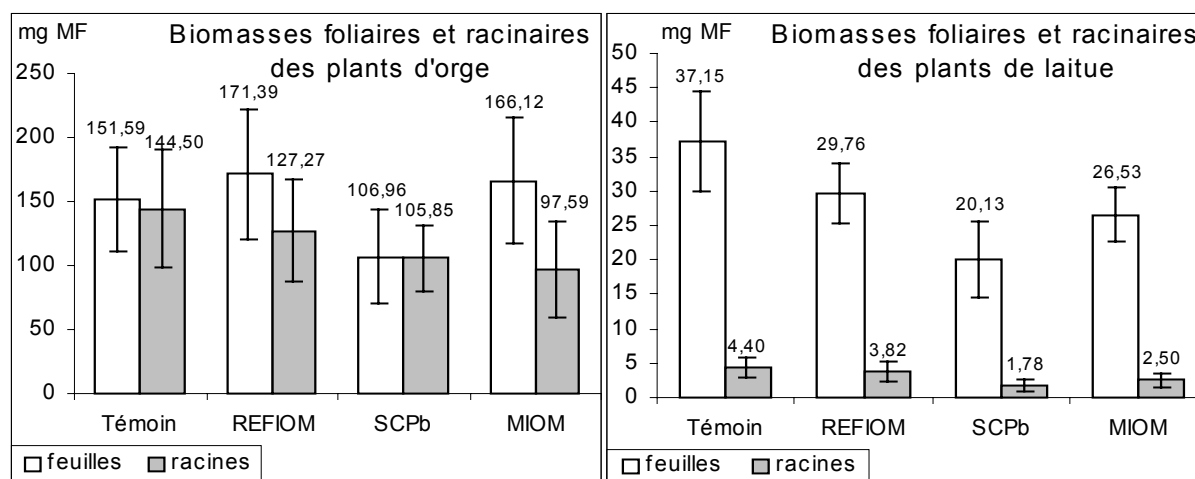
### **IV.4.1. Biomasses foliaires et racinaires**

#### *Laitue et orge*

Les essais confirment une sensibilité plus importante de la laitue aux solutions testées (Figure IV.1.). Les percolats MIOM et SCPb affectent significativement les biomasses foliaires (MIOM : -28,6 %,  $\rho < 0,0005$  ; SCPb : -45,8 %,  $\rho < 0,0005$ ) et racinaires (MIOM : -43,2 %,  $\rho < 0,0005$  ; SCPb : -59,5 %,  $\rho < 0,0005$ ) des plants de laitue. Le lixiviat de REFIOM

provoque un impact moins important mais significatif sur la biomasse foliaire (-19,9% ;  $\rho < 0,05$ ).

Les biomasses foliaires et racinaires des plants d'orge sont perturbées simultanément par le percolat SCPb ( $r=0,96$ ) (Biomasse foliaire : -29,5 %,  $\rho < 0,001$  ; Biomasse racinaire : -26,7 %,  $\rho < 0,01$ ). Des résultats semblables ont été obtenus au cours de précédents travaux (Gros, 1999). Les traitements MIOM et REFIOM sont beaucoup moins phytotoxiques sur l'orge. Seul MIOM provoque une réduction significative de la biomasse foliaire de cette graminée (-32,5% ;  $\rho < 0,0005$ ).



**Figure IV.1.** : Effets des effluents sur les biomasses foliaires et racinaires des plants d'orge et de laitue.

#### *Effets des effluents sur la biomasse foliaires d'Agrostis tenuis*

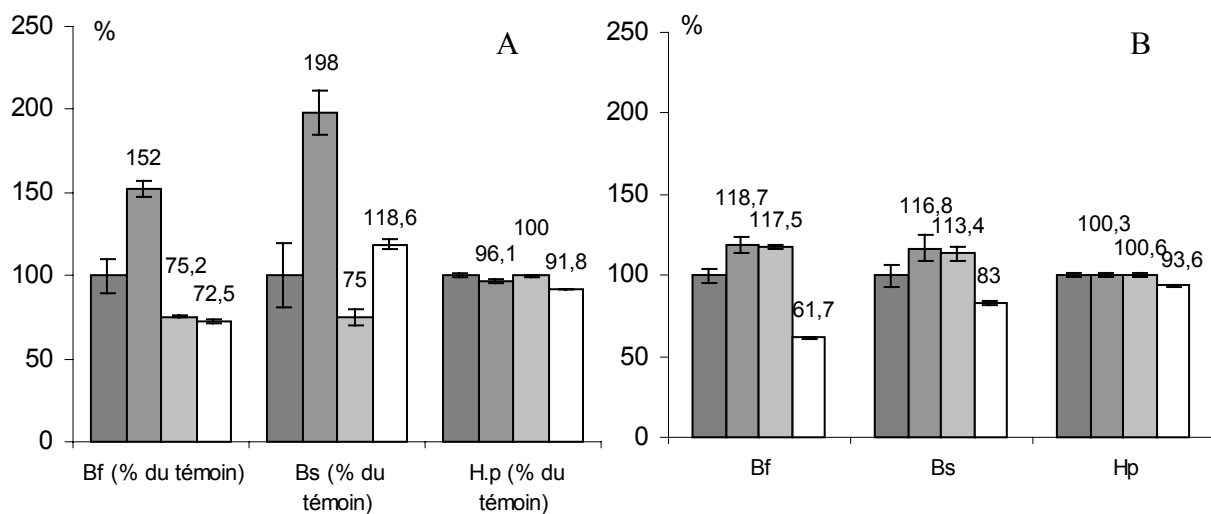
Le témoin représente 100% (écart-type  $\sigma$  de 10% calculé sur les valeurs brutes pour 5% d'intervalle de confiance). Les résultats sont exprimés, en pourcentage du témoin, les variations sur la mesure des trois paramètres : biomasse fraîche (Bf), biomasse sèche (Bs) et humidité pondérale (Hp) des parties aériennes et racinaires des plantes.

*Cultures de 30 jours* (Figure IV.2A.)

La biomasse fraîche mesurée après traitement par le REFIOM augmente de 52 % par rapport au témoin. Les réponses induites par les percolats de MIOM et de SCPb sont quant à elles négatives, respectivement de – 25 % et – 28 % par rapport au témoin.

La biomasse sèche augmente de 98 % après ajout de REFIOM. Le percolat de MIOM quant à lui induit une diminution de la biomasse sèche de 25 % du poids sec. Dans le cas du traitement SCPb, l'augmentation du poids sec de 19 % n'est pas significative.

L'humidité pondérale est calculée ici en pourcentage de matière fraîche ( $H_p \%MF = (Pf - Ps) / Pf \times 100$ , Pf et Ps étant respectivement le poids frais et le poids sec). Il est par la suite calculé en pourcentage du témoin comme pour les paramètres précédents. Nous ne mesurons pas de modification significative de l'humidité pondérale des plantes traitées par le MIOM. REFIOM induit une faible mais significative diminution de la teneur en eau dans les feuilles (- 4 %). Seul le traitement par les scories entraîne une diminution significative de 9 % par rapport au témoin.



**Figure IV.2.** : Effets des effluents sur les biomasses foliaires des plants d'Agrostis. A : cultures de 30 jours, B : cultures de 50 jours.

*Cultures de 50 jours* (Figure IV.2B.)

Le REFIOM induit une augmentation du poids frais (19 %) et du poids sec (17 %), sans effet significatif sur la teneur en eau.

Les résultats obtenus pour les MIOM en 50 jours de culture sont nettement différents de ceux obtenus après 30 jours. Le poids frais et le poids sec augmentent respectivement de 17 % et 13 %.

Le percolat de SCPb induit une diminution des trois paramètres mesurés (Bf : - 44 %; Bs : -27 % ; Hp : -6 % du témoin).

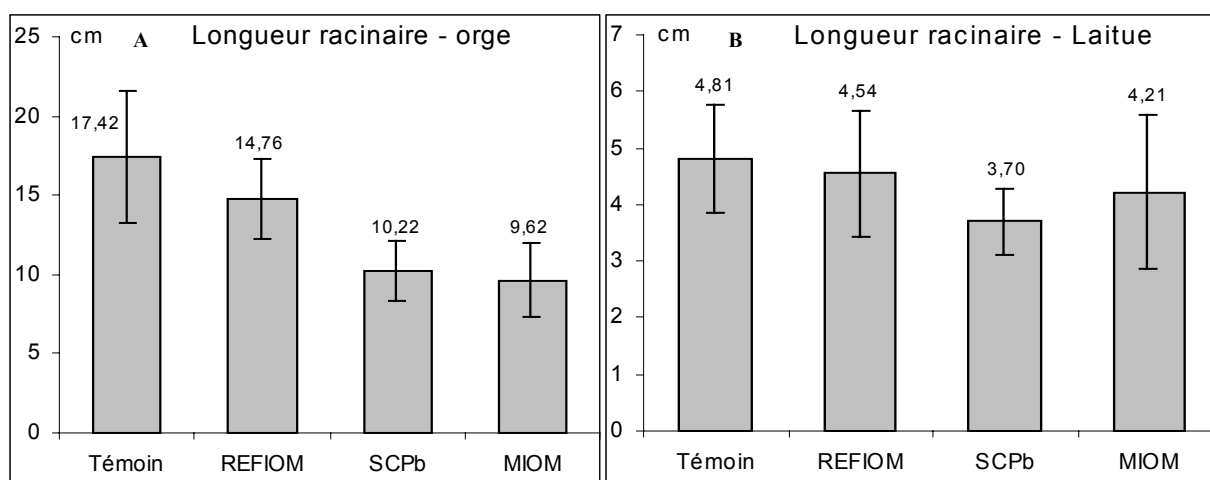
Le lixiviat REFION a un effet significatif sur deux des trois paramètres mesurés. Il conduit à une augmentation de la biomasse foliaire fraîche et sèche (biomasse sèche multipliée par deux par rapport au témoin). La faible diminution de la teneur en eau dans les feuilles permet de conclure à un effet relativement peu important sur les échanges hydriques entre le sol et la plante. Des mouvements d'eau qui seraient liés à l'augmentation du potentiel osmotique de la solution du sol en raison de l'apport massif d'éléments ioniques par les percolats. Le lixiviat de REFION présente les propriétés d'un produit fertilisant vis à vis de l'Agrostis que l'on pourrait qualifier de "starter" (en référence aux engrais de ce type). L'augmentation sensible de la production de matière végétale sur des cultures de 30 jours, se maintient avec une moindre importance à l'issue des 50 jours.

L'effluent MIOM induit un effet significatif et inverse de celui du REFION sur le poids frais et sec des feuilles traitées. La phytotoxicité du MIOM peut être attribuée à la fois à l'absorption d'éléments toxiques (métaux) qu'au dérèglement osmotique induit par la présence des sels. Cette graminée semble ensuite mettre en place des mécanismes de tolérance que seules des analyses de la composition chimique de ces plants permettraient d'appuyer.

L'impact des scories sur Agrostis est très important sur le bilan hydrique de la plante. Cette interprétation est appuyée par une diminution du poids frais corrélée à une diminution de l'humidité pondérale, tandis que le poids sec n'est pas affecté. La perte en eau de la plante peut s'expliquer soit par l'augmentation du pouvoir osmotique du sol impliquant ainsi un mouvement d'eau des racines vers le sol, soit par un processus de transpiration stomatique accru traduisant une forte augmentation de la concentration intracellulaire en sodium notamment. Le dérèglement des mécanismes osmotiques durant les premiers jours de croissance d'Agrostis conduit à une nécrose de la plante.

Les biomasses foliaires et racinaires sont des paramètres sensibles qui permettent d'évaluer la toxicité de divers polluants. Ces travaux montrent néanmoins qu'il est impératif d'utiliser des espèces végétales présentant une sensibilité différente aux pollutions minérales. Les cultures de laitue, d'orge et d'Agrostis permettent de comparer la toxicité de chaque effluent. Ainsi nous mesurons une toxicité croissante pour le REFIOm, le MIOM et le SCPp qui est le plus phytotoxique.

#### IV.4.2. Croissance des racines



**Figure IV.3.** : Effets des effluents sur la croissance des racines d'orge et de laitue (la lettre "a" minuscule indique que les valeurs mesurées sont significativement différentes des valeurs témoins).

L'inhibition de la croissance racinaire (biomasse racinaire, longueur racinaire) diminue le volume de sol prospecté et perturbe l'alimentation minérale et hydrique des plantes. Elle affecte la colonisation des bactéries rhizosphériques et réduit le rôle structurant du système racinaire. L'objectif de la mesure de l'allongement racinaire est de mettre en évidence l'impact des effluents sur le développement du système racinaire et donc du métabolisme de la plante.

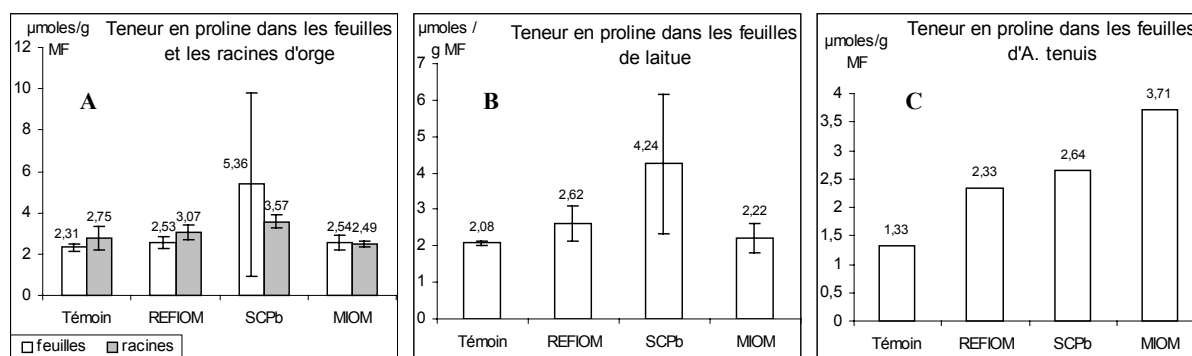
Les tests qui ont été réalisés avec l'orge sont très pertinents. Nous mesurons des impacts différents selon le type de déchet (Figure IV.3A.). Les percolats MIOM et SCPp sont les plus toxiques. Ils provoquent respectivement une diminution de  $-44,7\%$  et de  $-41,3\%$  ( $P < 0,0001$ ) par rapport au témoin. L'impact du REFIOm est moins important. La longueur



des racines contaminées avec cet effluent diminue de  $-15,3\%$  ( $P<0,05$ ). Les impacts des effluents sur la longueur racinaire des plants d'orge sont fortement corrélés aux diminutions de la biomasse racinaire ( $r=0,99$ ). Ce constat traduit des effets similaires sur les deux paramètres.

Les tests sur la laitue, une plante plus sensible, sont beaucoup moins probants (Figure IV.3B.). Seul le percolat SCPb inhibe significativement l'allongement des racines ( $-23,1\%$  ;  $\rho<0,0005$ ). Les essais ne permettent pas de comparer la phytotoxicité de différents déchets. Il permet uniquement d'observer l'impact d'un déchet potentiellement très toxique. Nous mesurons par ailleurs une forte corrélation entre ce paramètre et les impacts sur les biomasses foliaires ( $r=0,97$ ) et racinaires ( $r=0,98$ ) des plants de laitues.

#### IV.4.3. Biosynthèse de la proline



**Figure IV.4.** : Teneur en proline dans les feuilles et racines d'orge, les feuilles de laitue et d'*Agrostis tenuis*.

L'augmentation des teneurs en proline est significative dans les feuilles et les racines des plants d'orge contaminés par SCPb (Figure IV.4A.). (feuilles :  $+132\%$  et racines :  $+129,5\%$  ;  $\rho<0,05$ ). Les traitements MIOM et REFIOM ne produisent pas d'effets significatifs. Quel que soit le traitement, l'accumulation de proline dans les feuilles d'orge est corrélée à son accumulation dans les racines ( $r=0,856$ ). Ces résultats montrent donc que l'ajustement osmotique s'effectue dans les deux organes simultanément.

La biosynthèse de proline est également plus importante dans les feuilles de laitues contaminées par REFION et SCPb (Figure IV.4B.) (REFION : + 26,2% et SCPb : + 104,3% ;  $p < 0,005$ ).

Le dernier essai à été réalisé sur des plants d'*A. tenuis*. Les résultats permettent de constater une réponse prolinique foliaire plus importante que chez les autres espèces (Figure IV.4C.) (REFION : +74% ; SCPb : + 97% ; MIOM : + 178%). *A. tenuis* semble plus sensible au stress osmotique provoqué par les 3 traitements.

Ces résultats confirment l'induction d'un stress salin par les effluents MIOM, REFION et SCPb. Ce stress peut se traduire en 3 types de contraintes : (i) un stress hydrique, (ii) un stress de toxicité minérale, (iii) une perturbation de la nutrition minérale du végétal. Le percolat SCPb possède la plus forte toxicité quelle que soit l'espèce végétale testée. Les solutions REFION et MIOM sont plus ou moins toxiques en fonction de la plante cible. La laitue est plus sensible au REFION et *A. tenuis* plus sensible au MIOM.

Les fortes concentrations en sels des effluents produisent une augmentation de la pression osmotique de la solution du sol et créent un déséquilibre avec la pression osmotique intracellulaire. La plante doit alors lutter contre une perte d'eau de ces cellules. Pour limiter ces flux hydriques, la plante synthétise de la proline qui augmente la concentration intracellulaire et permet de rééquilibrer les pressions osmotiques. Le stress salin perturbe également le fonctionnement métabolique des plantes. En condition de salinité élevée les variations en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  peuvent être très importantes. Les travaux de Hernandez *et al.* (2000) ont montré une accumulation de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  dans les feuilles de plantes soumises à un stress salin important. Cette accumulation était accompagnée d'une réduction des teneurs en  $\text{K}^+$ .

Le dérèglement de la nutrition minérale peut se traduire par les diminutions de productivité (biomasses) et de l'allongement racinaire. Ainsi nous mesurons une forte corrélation entre la toxicité des effluents sur la biomasse foliaire et l'accumulation de proline dans les feuilles d'orge ( $r = -0,936$ ) et de laitue ( $r = -0,823$ ). L'accumulation de proline est également corrélée à l'inhibition de la croissance racinaire des plants d'orge ( $r = -0,547$ ) et de laitue ( $r = -0,859$ ).

## IV.5. Conclusion

Les effluents MIOM, REFIOM et SCPb provoquent des impacts plus ou moins importants selon l'espèce végétale soumise aux traitements et le paramètre utilisé pour mesurer la toxicité. Il convient alors de proposer l'utilisation d'une batterie de test plus complète pour évaluer le niveau de phytotoxicité de chaque effluent et comparer les déchets entre eux. Chaque paramètre mesuré renseigne sur un aspect particulier de la toxicité des effluents. Le dosage de l'accumulation de proline permet de mettre en évidence un stress salin. Néanmoins cette mesure n'est pas suffisamment sensible pour des déchets à faible potentiel toxique. La mesure de l'allongement racinaire des plants d'orge est un bon indicateur du dérèglement métabolique du végétal. Les modifications des biomasses fraîches et sèches (foliaire et racinaire) permettent de considérer les perturbations métaboliques et hydriques des plantes. Elles nous offrent également la possibilité de comparer les intensités de phytotoxicité lorsque qu'elles sont réalisées sur deux plantes de sensibilité différente au stress.

## Synthèse et conclusions

---

Dans cette partie nous avons mis en évidence les effets directs (constatés à court terme et/ou au laboratoire) de contaminations chimiques complexes sur le sol, la flore ou la microflore bactérienne. Ces travaux ont également cherché à mettre en évidence le rôle du couvert végétal (composition floristique, colonisation racinaire) sur le comportement du sol (structuration) et le comportement des communautés bactériennes (effet rhizosphère) face aux perturbations chimiques. Les indicateurs utilisés et les techniques appliquées dans ce travail apportent des outils permettant de formuler un diagnostic intégré de la qualité du fonctionnement d'un écosystème prairial à la suite de l'apport de composés exogènes.

La première étape d'une telle étude d'impact est la détermination de la nature et l'évaluation du degré de la contamination. Nos résultats ont montré que les deux déchets étudiés au champ (MIOM et REFIOM) conduisent à une augmentation très significative des teneurs en sodium dans les sols contaminés. L'estimation de la contamination saline, principalement sodique, nous a conduit à étudier le comportement de divers paramètres chimiques, physiques, et biologiques, à différentes échelles spatio-temporelles :

- L'apport excessif et ponctuel en  $\text{Na}^+$  a induit des échanges ioniques importants. Ces échanges ont altéré les propriétés structurales des sols et modifiés leurs fonctionnements physico-chimiques. Nous avons ainsi mesuré une diminution importante de la porosité des sols 6 mois après les traitements et qui peut se maintenir à long terme, selon les situations. L'effondrement de la structure a pu être attribué à des mécanismes physiques tel que la

désagrégation (slaking), le gonflement (swelling), la dispersion et la floculation. Ces mécanismes, et leurs impacts qui se sont avérés dépendre du type de déchet et de la nature de la couverture végétale (composition spécifique et densité racinaire), sont bien connus des scientifiques qui étudient le comportement des sols salins (Abu-Sharar et al., 1987 ; McNeal et al., 1966 ; Frenkel et al., 1972; Amezketa & Aragues, 1995). Cependant, il a été rarement mis en évidence de tel dégradation de la structure d'un sol par l'apport d'effluents de compositions complexes et d'origine industriel.

- La réponse des plantes aux contaminations chimiques a également souligné les effets des fortes teneurs en sel des solutions. Globalement, le REFIOM n'a pas induits d'effets négatifs sur les plantes. Nos résultats ont cependant montré une augmentation de la production de matière végétale foliaire ou racinaire 6 mois après la contamination des prairies expérimentales. Ces effets même positifs peuvent avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement général de l'écosystème. Le MIOM s'est avéré potentiellement phytotoxique et a induit des effets qui se sont prolongés dans le temps.

Nos travaux mettent donc en évidence des réponses différentes selon le contexte expérimental (cultures en laboratoire ou essais au champ), selon l'espèce végétale considérée (sensibilité différentes des espèces) ou encore selon la nature des déchets et donc la composition de leurs effluents. L'accumulation de proline dans les feuilles indique un dérèglement de l'activité photosynthétique qui se traduit par la perturbation des mécanismes d'assimilation de l'azote.

- Le rôle essentiel des microorganismes bactériens dans les processus écologiques de base des écosystèmes terrestres est illustré par une abondante littérature. Ainsi l'étude de perturbations environnementales et/ou anthropiques sur les microorganismes bactériens telluriques présente deux intérêts (Poly, 2000) : (i) d'élargir les connaissances en écologie bactérienne par une meilleure compréhension de l'organisation et du fonctionnement des communautés bactériennes, (ii) de produire un diagnostic environnemental rapide et fiable afin de pouvoir assurer le maintien de la qualité des sols et une gestion durable des écosystèmes. Nos travaux ont associé des outils moléculaires permettant de mettre en évidence des perturbations à l'échelle des communautés microbiennes (globales et fonctionnelles), et des mesures d'activités potentielles considérant les impacts sur les fonctions des bactéries dans l'écosystème. Les modifications environnementales induites par les contaminations chimiques ou par la modification du couvert végétal, entraînent des

perturbations dans la structure de la communauté globale et de la communauté des fixateurs d'azote.

Les deux outils moléculaires (A-RISA et PCR/RFLP de *nifH*) se sont montrés suffisamment sensibles à la fois pour évaluer les impacts de perturbations chimiques complexes et différentes, mais également pour considérer l'influence du type de couverture végétale (composition floristique, colonisation racinaire et propriétés du sol) sur le comportement des communautés bactériennes face aux MIOM et REFIOM.

Les variations de structure globales et de structure fonctionnelle des communautés ont été comparées aux activités potentielles (fixation d'azote et dénitrification). Cette comparaison indique que les modifications des conditions environnementales induites par les traitements MIOM et REFIOM peuvent résulter, en partie, de perturbations dans les populations fonctionnelles.

---

## **Conclusions générales et perspectives**

---

## Conclusions générales et perspectives

Les effets de deux types de perturbations, une perturbation physique et une contamination chimique, ont été étudiés sur les fonctionnements physiques, chimiques et biologiques des sols prairiaux. La dégradation physique d'une pelouse alpine est provoquée par le terrassement nécessaire à l'installation d'une piste de ski. L'importance des travaux conduit à un bouleversement important de l'écosystème initial : la végétation pérenne est arrachée et la nature du sol totalement modifiée. Cette dégradation est suivie de plusieurs phases de réhabilitation utilisant la "végétalisation" comme principale technique de restauration du milieu. La dégradation chimique est engendrée par l'épandage d'effluents issus de déchets d'incinération sur une prairie de déprise agricole en Normandie (site du CERED). L'évaluation de l'écocompatibilité de déchets est basée sur une approche dite "en scénarios", c'est à dire de mise en situation des déchets de leur production à leur valorisation dans le milieu naturel. Parmi les déchets étudiés, nous trouvons les mâchefers d'incinération des ordures ménagères (MIOM), résidus ultimes du processus d'incinération, et les résidus d'épuration de fumées d'incinération des ordures ménagères (REFIOM). Les scénarios envisagés considèrent la valorisation des MIOM en technique routière et l'utilisation des REFIOM solidifiés à bases de liants hydrauliques et utilisés dans la construction d'un bassin de réserve d'eau sur un site industriel. Les travaux présentés dans ce travail ont permis : (i) d'évaluer la réponse des communautés bactériennes à des modifications importantes de leur milieu et (ii) de déterminer l'influence de l'hétérogénéité physico-chimique et structurale des sols sur la distribution des bactéries au cours du développement de ces activités.

Les indicateurs de la qualité des sols ont été choisis afin de fournir les résultats les plus pertinents en fonction de la nature de la dégradation. La démarche générale adoptée fut la même pour les deux modalités de perturbations : une étude comparative entre les états initiaux et les états perturbés, une analyse des propriétés physico-chimiques des sols suivie de l'étude du comportement des microorganismes bactériens telluriques en tenant compte de leur localisation spatiale dans le sol, et finalement une analyse des relations entre ces deux composantes.



Dans ces conclusions, avant d'aborder les avantages et les limites de la démarche et de déterminer la fiabilité des indicateurs utilisés dans l'évaluation de la qualité des sols, nous décrirons les effets des perturbations sur le comportement des communautés bactériennes et les propriétés édaphiques déterminantes dans la réponse de ces microorganismes.

### **Ecologie bactérienne des sols perturbés**

Les résultats de ce travail apportent de nouvelles données sur l'écologie des microorganismes bactériens telluriques des sols dégradés.

La technique A-RISA appliquée dans ce travail met en évidence différences et similitudes dans le comportement des communautés, selon le type de perturbations appliquées, et caractérise l'évolution de ces communautés au cours du temps.

Bien que différents par leur situation bio-géographique, par leur nature et leur fonctionnement général, par une structure initiale des communautés bactériennes, les sols non rhizosphériques sous prairies non perturbées, qu'ils soient alpins ou de plaine, **présentent des stratégies adaptatives microbiennes identiques**. Dans le sol alpin sous prairie climacique, ainsi que dans le sol sous la prairie indigène de Normandie (site du CERED) non perturbé par l'apport de lixiviat et le semis d'Agrostis, les bactéries Gram +, qui sont représentés dans les profils A-RISA par des RISA-types < 400 pb, constitueraient une composante majeure de la communauté bactérienne du sol. Les bactéries Gram + caractérisent les sols des milieux prairiaux stables possédant une végétation mature (Borneman et al., 1996 ; Sorensen, 1997).

La stratégie démographique des populations bactériennes vivants dans ces milieux stables serait alors une stratégie de stabilité, de climax (type  $k$ ) (Dommergues et Mangenot, 1970). Les stratèges  $k$  des habitats stables sont des espèces d'équilibre qui possèdent un développement lent, qui sont peu productifs en terme d'utilisation de l'énergie disponible et qui occupent en général des niches écologiques spécialisées (Cole, 1954). Vis à vis de ces populations, un changement des conditions environnementales se traduit par un nouveau contexte sélectif. La capacité de la population à réaliser une adaptation par un brassage génétique important et rapide joue un rôle essentiel dans le développement de nouvelles populations. Nos observations démontrent que l'émergence de populations bactériennes à

croissance rapide et à reproduction fréquente est favorisée par les dégradations appliquées sur les sols des prairies étudiées. Les changements relevés dans la structure des communautés bactériennes traduisent alors **une adaptation des populations bactériennes en faveur d'espèces zymogènes**. Ces dernières sont habituellement caractérisées comme la vague primaire de la colonisation bactérienne dans les sols (Alexander, 1964).

Les profils A-RISA obtenus à partir du sol nu (dégradation physique), des sols des prairies indigènes contaminées par le MIOM ou le REFIOM, et des sols des prairies d'Agrostis non contaminées ont montré une diminution très significative des RISA-types correspondants aux bactéries Gram + et une apparition de RISA-types où l'on trouve majoritairement des protéobactéries. Nos résultats vont dans le sens de nombreux travaux qui observent une diminution des Gram + corrélée à une augmentation des Gram – sous l'effet de perturbations chimiques (Ranjard et al., 1997 ; Torsvik et al., 1998). **Les deux perturbations ont provoqué le développement des espèces opportunistes ou pionnières**. Ces espèces avec un taux de multiplication rapide caractérisent une stratégie démographique exponentielle (type *r*), et sont considérées comme peu spécialisées (Dommergues et Mangenot, 1970). **Cette diminution de la spécialisation des populations se traduit dans nos résultats par la diminution de la diversité catabolique dans les sols alpins dégradés**. Ces espèces stratégiques *r* caractérisent les stades précoces du développement des écosystèmes (Cole, 1954). Il apparaît ainsi que les modifications environnementales induites par les perturbations envisagées dans nos travaux : le terrassement d'une piste de ski, l'épandage des effluents MIOM et REFIOM et la suppression de la végétation indigène pour la préparation des prairies Agrostis, **entraîne dans tous les cas et à court terme un rajeunissement du fonctionnement microbien au sens strictement écologique du terme**.

La mise en place d'une prairie monospécifique (prairies Agrostis), dans le cadre des essais de contamination chimique, a nécessité le décapage des premiers centimètres du sol conduisant à une modification des teneurs en matière organique et une diminution de la porosité du sol. Ce travail préalable induit une perturbation initiale des communautés bactériennes. L'épandage des effluents MIOM et REFIOM sur ces prairies qui présentent des communautés bactériennes se rapprochant d'un sol sous culture, se traduit par des profils A-RISA similaires au sol des prairies initiales indigènes, c'est à dire un enrichissement des RISA-types où l'on trouve majoritairement des bactéries Gram +. Les contaminations causées par les traitements **constitueraient une perturbation secondaire, succédant à celle**

**engendrée par le remaniement du sol de ces prairies** (Poly, 2000). Les bactéries zymogènes, en phase de plein développement, donc particulièrement sensibles aux modifications de leur environnement, seraient alors fortement affectées au profit de communauté initialement présentes dans les sols non perturbés. La dynamique de succession des populations bactériennes est fonction du temps séparant les deux perturbations (1 mois) par rapport à la durée de vie des espèces constitutives des communautés (Lévêque, 2001). Ainsi, seules les espèces à cycle de reproduction rapide (stratégies *r*) recolonisent rapidement le milieu, alors que les espèces à cycle lent (stratégies *k*) n'ont aucune chance de le coloniser si l'intervalle entre les deux perturbations est inférieur à la durée de leur cycle vital. L'hypothèse la plus probable expliquant ces observations serait que la seconde perturbation (traitements chimiques) **provoquerait le développement d'espèces Gram + possédant une stratégie adaptative de type *r*, différentes de celles initialement présentes de type *k***. Ces observations restent d'une portée très générale et ne permettent pas de connaître les espèces bactériennes mises en cause dans ce fonctionnement particulier des sols dégradés. Nous atteignons par conséquent **les limites de précision de la technique A-RISA** dans l'étude des modifications des communautés bactériennes globale telluriques.

### **Evolution de la structuration physique du milieu et du fonctionnement bactérien des sols sous l'influence des perturbations**

L'hétérogénéité du milieu, déterminée à la fois par les propriétés physico-chimiques et structurales du sol, et par la structure et la dynamique de la végétation, influence considérablement la réponse des microorganismes aux perturbations physiques et chimiques. Afin de rendre compte des comportements bactériens en relation avec les modifications de leurs habitats, nous avons abordé les microorganismes associés à différents microenvironnements (agrégats et rhizosphère).

Les modifications survenues dans les profils A-RISA et les profils de restriction des pools de gènes *nifH*, confirment un rôle important des propriétés structurales et de la colonisation des racines, dans l'adaptation et la stratégie démographique des communautés bactériennes.

**Les effets des perturbations physiques** sur le fonctionnement biologique des sols dégradés (sols alpins et prairies *Agrostis*) sont la **conséquence d'une modification directe des**

**propriétés physiques des sols et du couvert végétal.** L'apport excessif et brutal de **solutions salines** perturbe le fonctionnement biologique des sols contaminés par **un effet toxique direct** sur le métabolisme des cellules bactériennes et/ou par **une modification indirecte de leurs habitats.**

La dégradation mécanique de la structure des sols (écrasement des agrégats, abrasion des couches superficielles riches en carbone) se traduit par une modification de la distribution des tailles d'agrégats et par des changements de leurs propriétés physico-chimiques. Les résultats obtenus sur l'étude des populations bactériennes mettent en évidence que les teneurs en colloïdes, **matières organiques et argiles**, des différents microhabitats bactériens (agrégats de tailles différentes et sol rhizosphérique) sont les principales propriétés édaphiques influençant les changements dans la structure de ces populations des sols dégradés alpins. L'augmentation de l'activité potentielle de fixation d'azote dans les sols dégradés peut être, en partie, la conséquence d'une diminution de l'oxygénation due à la compaction des sols.

Les résultats montrent **une reconstitution de la structure** des sols dès la première année de végétalisation des sols de pistes de ski. Elle se traduit par la formation de complexes argilo-humiques de plus en plus stables au cours du temps. L'accroissement de la stabilité des agrégats a été corrélé avec l'augmentation des teneurs en carbone et en argiles dans ces sols. La reconstitution des propriétés structurales proches des propriétés initiales (en terme de stabilité des agrégats du sol non perturbé), liée à l'augmentation des teneurs en argile et en carbone, est vraisemblablement, le principal facteur qui contribue à la restauration de la structure des communautés bactériennes totales et fonctionnelles.

En ce qui concerne les cas de contaminations chimiques, la dégradation de la structure du sol par dispersion des agrégats sous l'influence du  $\text{Na}^+$  en excès, peut modifier la circulation des fluides gazeux et/ ou liquides, accentuer les contacts des microorganismes avec la phase aqueuse et donc avec les solutés. L'effondrement de la structure à la suite d'importants échanges ioniques dans les sols contaminés pourrait accroître les contacts entre les bactéries et les solutés toxiques, et donc accentuer indirectement l'impact des traitements MIOM et REFIOM.

Les effets à court terme des traitements MIOM et REFIOM sur la structure des communautés bactériennes des colonnes expérimentales de sol nu ou enherbé (chapitre II partie III), et les effets à long terme des deux perturbations, physique (chapitre II partie II) et chimique (chapitre III partie II) sur la structure des communautés rhizosphériques et non rhizosphérique mettent en évidence :

1. **L'influence du couvert végétal** (nature et dynamique de la végétation) sur le comportement des communautés globales et fonctionnelles face à la contamination chimique des sols du site du CERED et sur la colonisation des bactéries dans les sols réhabilités des pistes de ski.
2. Un comportement différent des communautés bactériennes (globales et fixatrices d'azote) selon leur **proximité avec les racines** des plantes, face aux perturbations chimiques.

Dans le premier cas, les résultats montrent que la couverture végétale protège les bactéries telluriques et leurs activités contre une contamination chimique ponctuelle. Cette protection peut résulter soit de processus de phytoréhabilitation qui implique l'absorption par les plantes de certains composés toxiques, soit de l'immobilisation des substances toxiques notamment par la matière organique de l'horizon de surface. Les travaux réalisés en collaboration avec Perrodin *et al.* (2002) (annexe 1) confirment la bioaccumulation par les plantes de certains éléments toxiques des effluents tels que le cuivre et le sodium.

L'influence du couvert végétal s'est également avérée très importante dans la sélection des communautés bactériennes totales et fixatrices d'azote, mais aussi dans l'efficacité de l'activité de fixation potentielle au cours de la réhabilitation des sols alpins. La colonisation bactérienne dans ces sols dégradés est principalement influencée par le développement du système racinaire. Celui-ci contribue à augmenter la diversité des habitats de part son rôle sur la structure du sol et ses apports importants en substrats organiques. L'augmentation considérable de l'activité de fixation dans les stades les plus avancés de la réhabilitation confirme que la rhizosphère, grâce aux sources d'énergie qu'elle fournit sous la forme d'exsudats, est un lieu privilégié de la fixation.

Dans le deuxième cas, les différences initiales entre les communautés bactériennes globales associées ou non à la rhizosphère des plantes peuvent expliquer les réponses différentes après un temps de contact assez court avec les polluants. A plus long terme, les différences observées entre les communautés sous la prairie indigène du CERED peuvent être attribuées au dérèglement physiologique des plantes et donc de leur fonctionnement rhizosphérique. Ce dérèglement physiologique a été identifié par l'utilisation de tests de phytotoxicité. Ces derniers ont montré une accumulation de proline dans les organes foliaires et racinaires de certaines plantes contaminées (laitue et agrostis). L'accumulation de proline met en évidence un stress salin qui provoque une diminution de la biomasse racinaire et un dysfonctionnement de l'assimilation de l'azote. Poly (2000) rapporte une influence identique de la rhizosphère sur la structure des communautés rhizosphériques des fixateurs d'azote initialement peu différente des communautés non rhizosphériques. Il précise que les impacts des traitements MIOM et REFIOM sont plus importants, 15 mois après la contamination, sur la communauté rhizosphérique que sur celle qui n'est pas associée aux racines des plantes. Ces résultats confortent l'hypothèse des effets indirects des traitements MIOM et REFIOM par l'intermédiaire d'un dysfonctionnement physiologique des plantes et plus particulièrement de leur système racinaire.

### **Pertinence des démarches et des indicateurs retenus pour l'évaluation de la qualité des sols**

La finalité de l'ensemble de ces travaux est de proposer une démarche et des indicateurs pertinents de la qualité des sols qui sont soumis à différents types de perturbations ponctuelles.

Ainsi, pour une évaluation valable des modifications de la qualité des sols, les travaux ont été effectués en tenant compte du facteur temps (effets à court, moyen et long terme), en intégrant différentes échelles spatiales et en sollicitant différentes situations expérimentales (travaux *in situ* et/ou expérimentations en laboratoire). En écologie, une des tâches les plus difficiles consiste à réunir les observations et résultats expérimentaux en un tout homogène et intégrant les différentes échelles pertinentes pour la compréhension des processus que l'on souhaite décrire. En conséquence, 3 échelles temporelles et 4 échelles spatiales ont été abordées. Chaque échelle s'est avérée pertinente, puisqu'elle a permis de fournir des informations originales et différentes.

*Echelles temporelles d'observation abordées dans ce travail :*

- **A court terme** (de quelques heures à quelques dizaines de jours), la réponse des microorganismes à des modifications brutales de leur environnement, ont révélé des impacts directs sur leur métabolisme. Le comportement physico-chimique du sol a également été modifié dans des échelles de temps très courtes. Les échanges ioniques provoqués par l'apport excessif et brutal de composés exogènes chimiques en solution se réalisent en quelques seconde. Leurs conséquences sur la structure du sol ont été mises en évidence et mesurées en laboratoire après une heure de contact avec les contaminants. La phytotoxicité des effluents agit en quelques jours sur la production primaire et le métabolisme azoté des plantes.

- **A moyen terme** (de quelques dizaines de jours à quelques centaines de jours), les perturbations des activités microbiennes se sont avérées être la résultante des modifications dans la structure des populations bactériennes. La contamination sodique a induit des modifications des propriétés structurales des sols mesurées 180 jours après l'épandage des effluents.

- **A long terme** (de quelques centaines de jours à plus d'une dizaine d'années), nous avons observé que les modifications du fonctionnement biologique des sols sont en relation directe avec la structuration physique de l'écosystème. L'influence du couvert végétal sur la résilience des propriétés structurales du sol et sur la sélection des communautés bactériennes est observée pour les deux modalités de perturbations.

*Echelles spatiales d'observation abordées dans ce travail:*

- Les deux **régions bio-géographiques** étudiées présentent des différences de fonctionnement microbien considérables dans les sols non perturbés. Les résultats ont mis en évidence un modèle de fonctionnement bactérien spécifique des sols prairiaux climaciques d'altitude qui est déterminé par une faible activité fixatrice, une faible diversité catabolique et des structures génétiques des communautés bactériennes globales et fixatrices différentes de celles identifiées dans un luvisol de plaine. **Malgré ces différences, les stratégies adaptatives adoptées par ces communautés sont identiques faces aux différents types de perturbations.**

- L'hétérogénéité naturelle ou induite **des parcelles** étudiées nécessite une stratégie adaptée de prélèvement des échantillons de sol. L'hétérogénéité est due à la topographie dans le cas du terrassement des pistes de ski. La présence ou non d'un couvert végétal, et l'état initial de la porosité des sols, créent un autre type d'hétérogénéité dans la contamination chimique des sols qu'il est nécessaire de prendre en compte.

- **A l'échelle décimétrique**, on a observé une influence très marquée d'un système racinaire mature sur la sélection de bactéries Gram +, sur la protection des communautés face à une contamination chimique et sur la formation de "hotspot" d'activité de fixation d'azote. L'étude de la stabilité et de la distribution des agrégats, de la porosité totale, des teneurs en carbone et en argile, ont permis de mettre en évidence et de quantifier des impacts de chaque perturbation sur les propriétés physico-chimiques et structurales des sols (dégradation de la structure, contamination sodique, dispersion des argiles).

- Une technique de fractionnement physique du sol nous a permis d'appréhender **l'échelle micrométrique**. Cette dernière vise à séparer des compartiments fonctionnels, entités de constituants minéraux et organiques ayant un sens dans l'organisation structurale des différents horizons du sol. Les résultats ont montré un cloisonnement des communautés fixatrices d'azote de différents microhabitats, ceci même après la dégradation et la reconstitution de la structure du sol. Les communautés bactériennes globales répondent spécifiquement à la perturbation du milieu en fonction de leur localisation dans des agrégats de tailles différentes.

L'ensemble de ces observations indique qu'il est nécessaire d'intégrer plusieurs échelles d'observation dans la démarche d'évaluation de la qualité des sols. Les résultats permettent également de suggérer l'utilisation d'indicateurs multiples pour appréhender les modifications de cette qualité des sols et estimer leurs répercussions sur le fonctionnement des écosystèmes terrestres. L'évaluation de l'impact de composés exogènes (effluents de déchets ou autre composés chimiques) sur le fonctionnement biologique du sol tel qu'il peut se produire en conditions naturelles, peut se réaliser par des tests de laboratoire en prenant toute fois les précautions nécessaires pour conserver l'intégrité fonctionnelle des microcosmes (couverture végétale identique, conditions édaphiques non perturbées).



Les indicateurs utilisés dans une démarche d'évaluation d'une perturbation d'un écosystème prairial peuvent être choisis en conséquence du type de perturbation. Cependant, à la lumière de nos résultats certains de ces indicateurs communs aux deux perturbations se sont avérés particulièrement pertinents et indispensables dans une démarche intégrée et en relation avec les différentes fonctions du sol décrites dans la première partie de ce manuscrit :

- **La dynamique du système racinaire** (production primaire) permet d'aborder l'influence de la végétation dans un grand nombre de processus physiques (structure du sol, phytoréhabilitation, comportements hydrodynamiques...) et biologiques (apport de carbone, habitat microbien...). Cet indicateur informe également sur la dynamique, donc sur la santé du couvert végétal qui dépend directement de la qualité du sol et qui répond à une fonction essentielle de celui-ci : la production végétale.
- **La structure du sol**, lorsque son étude inclut la détermination de sa granulométrie et de sa teneur en matière organique, est un indicateur particulièrement sensible à toutes les formes de dégradation et qui régit de nombreux processus physiques et biologiques du fonctionnement des sols (particulièrement bactériens). La nature de la structure du sol dépend en grande partie de la taille, de la forme et de la disposition des pores (vides) et des particules solides (mottes de sable, de limon et d'argile). C'est en effet dans les différentes catégories de vides ménagés par cet assemblage que l'eau, les solutés et les gaz circulent ou sont stockés et que les êtres vivants peuvent se développer et les racines des plantes coloniser le sol.
- **L'étude du fonctionnement bactérien du sol** pour être pertinent doit associer des mesures d'activités microbiennes et des mesures plus précises des modifications des communautés bactériennes. Les techniques moléculaires utilisées dans ce travail (A-RISA et RFLP de *nifH*) ont permis d'accéder aux variations de la structure globale et de la structure fonctionnelle des communautés à la suite de perturbations anthropiques et dans des microenvironnements différents (sol rhizosphérique, non rhizosphérique, agrégats de tailles variables). Cependant, ces techniques qui peuvent être utilisées pour évaluer des modifications de la qualité des sols à une échelle microscopique, ne rendent pas toujours compte des impacts sur les individus. De plus, les modifications mises en évidence dans des groupes fonctionnels qui accomplissent des fonctions essentielles dans le sol, apportent des informations sur le fonctionnement à l'échelle de l'écosystème.

**La précision et la complexité de cette démarche multi-critère et multi-échelle engendrent toutefois une difficulté pour une utilisation courante dans le cadre par exemple d'un réseau de surveillance de la qualité des sols qui supposerait des protocoles simples et rapides.**

Toutefois, ces travaux proposent une démarche intégrée pour évaluer la qualité de sols soumis à des dégradations d'origines variées. Ils constituent donc un élément fondamental pour la prévision de l'évolution de la qualité d'un sol. Ce ne sont que des données préliminaires qui suscitent des perspectives intéressantes dans l'étude du fonctionnement des écosystèmes perturbés. Au regard des résultats et des réflexions qui ont accompagné l'interprétation du fonctionnement des sols étudiés, ce travail pourrait être complété par une étude approfondie des deux modalités de perturbations et des risques environnementaux liés à la modification de la qualité des sols concernés.

- Le terrassement des pistes de ski conduit à l'augmentation de la proportion des éléments grossiers. La fracturation de la roche mère contribue à la formation d'argiles primaires par des processus d'altérations chimiques et biologiques. Le rôle des argiles dans la reconstitution des complexes argilo-humiques, donc du fonctionnement biologique et général des sols, est considérable. Il serait par conséquent intéressant d'approfondir ces processus d'altérations dans différentes conditions expérimentales (roches différentes, rôle de la végétation, conditions climatiques variables et contrôlées). Le rôle d'une graminée annuelle dans la stabilisation de la structure au cours des premières étapes de la réhabilitation de ces pistes de ski pourrait être complété par des essais comparatifs au champ ou en laboratoire. Un travail parallèle à celui-ci cherche à mettre en évidence le rôle de la faune du sol sur l'évolution des propriétés structurales et des stocks de matières organiques dans les sols alpins.

- Les résultats obtenus dans le cadre des perturbations chimiques pourraient être complétés par l'étude de l'influence de la localisation des cellules bactériennes dans différents microenvironnements du sol (agrégats de tailles différentes) sur l'amplitude de la réponse des communautés à l'apport de composés exogènes.

- D'un point de vue plus général, il serait intéressant de compléter l'étude du comportement des communautés bactériennes en précisant les espèces bactériennes affectées par chacune des perturbations et en déterminant leur implication dans le fonctionnement du sol. L'identification peut se réaliser avec une précision variable par clonages et séquençages des fragments caractéristiques des perturbations étudiées, tant dans la communauté des fixateurs (Poly et al., 2001), que dans la communauté bactérienne globale du sol (Ranjard et al., 2000).

Dans la perspective d'une poursuite de l'étude à des fins de modélisation, seuls quelques critères simples et les plus pertinents devront être considérés et les variables fréquemment retenues à titre d'indicateurs devront tenir compte du caractère évolutif non linéaire des sols.

---

## Références bibliographiques

---

## Références bibliographiques

- Abu-Sharar TM, Bingham FT, Rhoades JD (1987)** Reduction in hydraulic conductivity in relation to clay dispersion and disaggregation. *Soil Science Society of American Journal*, 51:342-346.
- Adu JK, Oades JM (1978)** Physical factors influencing decomposition of organic matter in soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry* 10:89-115.
- Alexander M (1994)** Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego.
- Allan DL, Adriano DC, Bezdizek DF, Cline RG, Coleman DC, Doran JW, Haberern J, Harris RG, Juo ASR, Mausbach GA, Peterson GA, Schuman GE, Singer MJ, Karlen DL (1995)** SSSA statment on soil quality. p.7. June 1995. In *Agronomy news*, ASA, Madison, WI.
- Almansouri M, Kinet J M, Lutts S (2001)** Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil* 231:243-254.
- Aly S, Letey J (1990)** Physical properties of sodium-treated soil as affected by two polymers. *Soil Science Society of American Journal* 54:501-504.
- Amezketta E, Aragues R (1995)** Hydraulic conductivity, dispersion and osmotic explosion in arid-zone soils leached with electrolyte solutions. *Soil Science* 159:287-293.
- Anderson JA, Domsch KH (1985)** Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 17:197-203.
- Anderson TH, Domsch KH (1993)** The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25:393-395.
- Andren O, Balandreau J (1998)** Biodiversité et fonctionnement du sol : où en sommes nous aujourd'hui?. 16ème congrès mondial de science du sol, symposium11, Montpellier, 20-26 Août 1998.
- Angers DA, Caron J (1998)** Plant induced-changes in soil structure: processes and feedbacks. *Biogeochemistry* 42:55-72.
- Angers DA, Samson N, Légère A (1993)** Early changes in water stable aggregation induced by rotation and tillage in a soil under barley production. *Canadian Journal of Soil Science* 73:51-59.
- Aringhieri R, Giachetti M (2001)** Effect of sodium adsorption ratio and electrolyte concentrations on the saturated hydraulic conductivity of clay-sand mixtures. *European Journal of Soil Science* 52:449-458.
- Aronson J, Le Floch E (1996)** Vital landscape attributes: missing tools for restoration ecology. *Restoration Ecology* 4:377-387.
- Arshad MA, Lowery B, Grossman B (1996)** Physical tests for monitoring soil quality. In: *Methods for assessing soil quality* (eds JW Doran & AJ Jones), pp. 123-142. SSSA Spec. Publ. 49, SSSA, Madison, WI.
- Atlas R M, Horowitz A, Krichevsky M, Bej A K (1991)** Responses of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology* 22:249-256.
- Balesdent J, Guillet B (1984)** Les datations par le 14C des matières organique des sols: contributions à l'étude de l'humification et du renouvellement des substances humiques. *Science du sol* 2:93-112.
- Balks MR, Bond WJ, Smith CJ (1998)** Effects of sodium accumulation on soil physical properties under an effluent-irrigated plantation. *Australian Journal of Soil Research* 36:821-830.

- Bardgett RD, Lovell RJ, Hobbs PJ, Jarvis SC (1999)** Temporal dynamics of soil microbial communities in grassland soils along a fertility gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1021-1030.
- Barna R, Rehty Z, Imyim A, Perrodin Y, Moszkowicz. P, Tiruta-Barna L (2000)** Environmental behaviour of a construction made of a mixture of hydraulic binders and air pollution control residues from Municipal Solid Waste Incineration. Part 1. Physico-chemical characterisation and modelling of source term. *Waste Management* 20:741-750.
- Bartoli F, Philippy R, Doirisse M, Niquet S, Dubuit M (1991)** Structure and self-similarity in silty and sandy soils : the fractal approach. *Journal of Soil Science* 42:167-185.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973)** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Physiology* 39:205-213.
- Bengough AG, Croser C, Pritchard J (1997)** A biophysical analysis of root growth under mechanical stress. *Plant and Soil* 189:155-164.
- Bengtsson J (1998)** Wich species? Wath kind of diversity? Wich ecosystem fonction? Somes problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* 10:191-199.
- Bergkvist B (1987)** Soil solution chemistry and metal budget of spruce forest ecosystems in sweden. *Water Air Soil Pollution* 33, 131-154.
- Birkeland PW (1984)** *Soils and geomorphology*. Oxford University Press, New York.
- Blake GR, Hartge KH (1986)** Particle density. In : *Methods of soil analysis*. Part 1, 2nd edn (ed A Klute), pp. 377-382. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Blum WEH (2000)** Soil quality indicators based on soil functions. III International Congress ESSC, Valencia, Spain, March 2000.
- Boehn MM, Anderson DW (1997)** A landscape-scale study of soil quality in three prairie farming systems. *Soil Science Society of American Journal* 61:1147-1159.
- Bolton HJr, Fredrickson JK, Elliott LF (1992)** Microbial ecology of the rhizosphere. In : *Soil Microbial Ecology* (ed FB Jr Metting), pp. 27–63. Marcel Dekker Inc., New York.
- Bond WJ (1998)** Effluent irrigation – an environmental challenge for soil science. *Australian Journal of Soil Research* 36:543-555.
- Bornman JP, Skroch PW, O'Sullivan KM, Palus JA, Rumlanek NG, Jansen JL, Neinhuis J, Triplett EW (1996)** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied Environmental Microbiology* 62:1935-1943.
- Borneman J, Triplett EW (1997)** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonian : evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied Environmental Microbiology* 63:2647-2653.
- Bouma J (1997)** Soil environmental quality : A european perspective. *Journal of Environmental Quality* 26:26-31.
- Bouwman AF (1990)** Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. In: *Soils and the Greenhouse Effect* (ed AF Bouwman), pp. 61-67. Wiley Chichester, England.
- Bowen GD, Rovira AD (1991)** The rhizosphere. In: *Plant roots. The hidden half*. (eds Y. Waisel, et al.), pp. 641-669. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
- Bowman WD, Theodose TA, Schardt JC, Conant RT (1993)** Constraints of nutrient availability on primary production in two alpine tundra communities. *Ecology* 74:2085-2097.

- Bradshaw AD (1997)** What do we mean by restoration? In : Restoration Ecology and sustainable development (eds KM Urbanska, NR Webb, PJ Edwards), pp. 8-4. Cambridge University Press, Cambridge.
- Braun-Blanquet J (1928)** Pflanzensozologie. Grundzüge der vegetationskunde. Verlage von Julius Springer, Berlin, 330 p.
- Brewer R (1964)** Fabric and Mineral Analysis of Soils. John Wiley & Sons, New York.
- Brimecombe MJ, De Leij FA, Lynch JM (2001)** The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In : The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface (ed Pinto et al.), pp. 95-141. Marcel Dekker, Inc., NY.
- Brohon B, Delolme C, Gourdon R (2001)** Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* 33:883-891.
- Calderón FJ, Jackson LE, Scow KM, Rolston DE (2000)** Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1547-1559.
- Cambardella CA, Elliot ET (1994)** Carbon and nitrogen dynamics of soil organic matter fractions from cultivated grassland soils. *Soil Science Society of American Journal* 58:123-130.
- Campbell R, Greaves MP (1990)** Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: The rhizosphere. (ed JM Lynch), pp 11-34. John Wiley & Sons, Ltd, New York.
- Carter MR, Gregorich EG, Anderson DW, Doran JW, Janzen HH, Pierce FJ (1997)** Concepts of soil quality and their significance. In : Soil quality for crop production and ecosystem health. (eds Gregorich EG, Carter MR), pp. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Netherlands.
- Cenni R, Janisch B, Spliethoff H, Hein KR (2001)** Legislative and environmental issues on the use of ash from coal and municipal sewage sludge co-firing as construction material. *Waste Management* 21:17-31.
- Chan KY, Bowman AM, Smith W, Ashley R (2001)** Restoring soil fertility of degraded hardsetting soils in semi-arid areas with different pastures *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41:507-514.
- Chassin P, Baize D, Cambier P, Stechman T (1996)** Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. Impacts à moyen et à long terme. *Etude et Gestion des sols* 3:297-306.
- Chaudri A, McGrath SP, Giller KE (1992)** Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii from soil contaminated by past applications of sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 24:625-632.
- Chaudry TM, Hayes WJ, Khan AG, Khoo CS (1998)** Phytoremediation: Focusing on accumulation plants that remediate metals contaminated soil. *Australian Journal of Ecotoxicology* 4:37-51.
- Chaussod R (1996)** La qualité biologique des sols : évaluation et implication. *Etude et Gestion des Sols* 3:261-278.
- Cheshire MV, Greaves MP, Mundie CM (1974)** Decomposition of soil polysaccharide. *Journal of Soil Science* 30:315-326.
- Chen C, Thomas DM, Green RE, Wagenet RJ (1993)** Two-domain estimation of hydraulic properties in macropore soils. *Soil Science Society of America Journal* 57:680-686.
- Chenu C (1989)** Influence of a fungal polysaccharide, scleroglucan, on clay microstructures. *Soil Biology and Biochemistry* 21:299-305.
- Chenu C (1993)** Clay of polysaccharide associations as model for interface between microorganisms and soil : water related properties and microstructure. *Geoderma* 56:43-156.

- Chenu C, Puget P, Balesdent J (1998)** Clay-organic matter in soils : microstructure and contribution to soil stability. XVI congrès mondial de science du sol, Montpellier.
- Chotte JL, Ladd JN, Amato M (1998)** Sites of microbial assimilation and turnover of <sup>14</sup>C soluble and particulate substrates decomposing in a clay soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30:205-218.
- Chotte JL, Schwartzmann A, Bally R, Jocteur Monrozier L (2002)** Changes in bacterial community and Azospirillum diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 and 19 years of natural fallow. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1083-1092.
- Christensen BT (1992)** Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advance Soil Science* 20:2-76.
- Chun S, Nishiyama M, Matsumoto S (2001)** Sodic soils reclaimed with by-product from flue gas desulfurisation : corn production and soil quality., *Environmental Pollution* 114:453-459.
- Cihacek LJ, Ulmer MG (1995)** Estimated soil organic carbon losses from long-term-crop-fallow in the northern Great Plains of the USA. In : *Advances in soil science: Soil management and greenhouse effect.* (eds R Lal et al.), pp. 85-92. Lewis publishers, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Clijsters H, Van Asshe F, Gora L (1991)** Physiological responses of higher plants to soil contamination with metals. In : *Ecological responses to environmental stresses.* (eds J Rosema, JAC Verkleij), pp. 32-39. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Concaret J (1967)** Etude des mécanismes de la destruction des agrégats de terre au contact de solutions aqueuses. *Annales Agronomiques* 18:65-90.
- Copley J (2000)** Ecology goes underground. *Nature* 406:452-454.
- Crescimanno G, Iovino M, Provenzano G (1995)** Influence of salinity and sodicity on soil structural and hydraulic characteristics. *Soil Science Society of American Journal* 59:1701-1708.
- Curtin D, Stephun H, Selles F (1994)** Structural stability of chernozemics soils as affected by exchangeable sodium percentage, and electrolyte concentration. *Canadian Journal of Soil Science* 74:157-164.
- Darmody RG, Thorn CE (1997)** Elevation, age, soil development, and chemical weathering at Storbreen, Jotunheimen, Norway *Geography Annals* 79:215-222.
- Darmody RG, Thorn CE, Harder RL, Schlyter JPL, Dixon JC (2000)** Weathering implications of water chemistry in an arctic-alpine environment, northern Sweden. *Geomorphology* 34:89-100.
- De Leij FAAM, Whipps JM, Lynch JM (1994)** The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbial Ecology* 27:81-97.
- Degenhardt B, Gimmler H, Hose E, Hartung W (2000)** Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, distribution and transport in plant roots. *Plant and Soil* 225:83-94.
- Degens BP, Harris JA (1997)** Development of a physiological approach to measuring the metabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 29:1309-1320.
- Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Vojvodic-Vukovic M (2000)** Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 32:189-196.
- Dick RP (1997)** Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In : *Biological indicators of soil health.* (eds C. Pankurst et al.), pp. 121-156. CAB International, New York.
- Dieter Jeschke W, Hartung W (2000)** Root-shoot interactions in mineral nutrition. *Plant and Soil* 226:57-69.
- Dinger F (1997)** Végétalisation des espaces dégradés en altitude. Cemagref, Grenoble.



- Dommergues Y, Mangenot (1970)** Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris.
- Doran JW, Parkin TB (1994)** Defining and assessing soil quality. In : Defining soil quality for a sustainable environment. (eds Doran JW et al.), pp. 3-22. SSSA Spec. Publ. 35, Madison, WI.
- Doran JW, Linn DM (1994)** Microbial ecology of conservation management systems. In : Soil Biology: effect on soil quality. (eds JL Hatfield, BA Stewart). pp. 1-27. Lewis Publ., Boca Raton, FL.
- Doran JW, Safley M (1997)** Defining and assessing soil health and sustainable productivity, In : Biological indicators of soil health. (eds Pankhurst CE, Doube BM, Gupta WSR), pp. 1-28. CAB International, NY.
- Doran JW, Zeiss MR (2000)** Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Applied Soil Ecology 15:3-11.
- Doran JW, Coleman DC, Bezdiceck DF, Stewart BA (1994)** Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA special publication no. 35. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 224 p.
- Doran JW, Sarrantonio M, Liebig MA (1996)** Soil health and sustainability. Advance Agronomy 56:2-54.
- Doran JW, Liebig M, Santana D (1998)** Soil health and global sustainability. 16th World Congress of Soil Science, symposium 26, Montpellier, France, August 1998.
- Dorioz JM, Robert M, Chenu C (1993)** The role of roots, fungi and bacteria on clay particle organisation: An experimental approach. In: Workshop on methods of research on soil structure / Soil biota interrelationships. (eds L. Brussaard & M.J. Kooistra), pp. 179-193. Geoderma, 56.
- Dormaar JF (1988)** Effect of plant roots on chemical and biochemical properties of surrounding discrete soil zones. Canadian Journal of Soil Science 68:233-242.
- Duchaufour P (1977)** Pédologie, pédogenèse et classification. Masson, Paris, 477 p.
- Duchaufour P (1997)** Abrégé de pédologie : sol, végétation, environnement. Masson, Paris, 5ème édition.
- Ebbs SD, Kochian LV (1997)** Toxicity of zinc and copper to brassica species implications for phytoremediation. Journal of Environmental Quality 26:776-781.
- Edgerton DL, Harris JA, Birch P, Bullock P (1995)** Linear relationship between aggregate stability and microbial biomass in three restored soils. Soil Biology and Biochemistry 27:1499-1501.
- Eijsackers H (1982)** Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. Environmental Monitoring Assessment 3:307-316.
- Eikelboom RT, Ruwiel E, Goumans JM (2001)** The building materials decree: An example of a Dutch regulation based on the potential impact of materials on the environment. Waste Management 21:295-302.
- Elliot ET (1986)** Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. Soil Science Society of America Journal 50:627-633.
- Elliot LF, Lynch JM (1994)** Biodiversity and soil resilience. In : Soil resilience and land use. (eds Greenland DJ, Szaboles I), pp. 353-364. CAB International, UK.
- Emerson WW, Foster RC, Oades JM (1986)** Organo-mineral complexes in relation to soil aggregation and structure. In : Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. (eds PM Huang, M Schnitzer), pp. 521-548. SSSA Special publication number 17, Soil Science Society of America, Inc. Madison, USA.
- Emerson WW (1967)** A classification of soil aggregates based on their coherence in water. Australian Journal of Soil Research 5:47-57.

- Ernst WHO, Nelissen HJM, Ten Bookum WMT (2000)** Combination toxicology of metal enriched soils : physiological responses of a Zn- and Cd-resistant ecotype of silene vulgaris on polymetallic soils. *Environmental and Experimental Botany* 43:55-71.
- Faure A (1981)** A new conception of the plastic and liquid limits of clay. *Soil and Tillage Research* 1:97-105.
- Felske A, Wolterink A, Van Lis R, Akkermans ADL (1998)** Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soil (the Netherlands). *Applied Environmental Microbiology* 64:871-879.
- Filip Z (2002)** International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88:169-174.
- Fisher MM, Triplett EW (1999)** Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied Environmental Microbiology* 65:4630-4636.
- Frenkel H, Goetzen JO, Rhoades JD (1972)** Effect of clay type and content, exchangeable sodium percentage, and electrolyte concentration on clay dispersion and hydraulic conductivity. *Soil Science Society of America Journal* 42:32-39.
- Fuchs B, Track C, Lang S, Gimmler HJ (1997)** Salt effects of processed municipal solid waste incinerator bottom ash on vegetation and underground water. *Journal of Applied Botany Angewandte Botanik* 71:154-163.
- Gale WJ, Cambardella CA, Bailey TB (2000)** Root-derived carbon and the formation and stabilization of aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 64:201-207.
- Garcia C, Hernandez T, Roldan A, Martin A (2002)** Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. *Soil Biology and Biochemistry* 34:635-642.
- Gee GW, Bauder JW (1986)** Particle size analysis. In : *Methods of soil analysis, part 1, 2nd edn.* (ed A Klute), pp. 383-411. *Agronomy Monograph 9.* ASA and SSSA, Madison, WI.
- Gerrard J (1992)** *Soil geomorphology: an integration of pedology and geomorphology.* Chapman & Hall, London.
- Giller KE, McGrath SP, Hirsch PR (1989)** Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long- term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective Rhizobium. *Soil Biology and Biochemistry* 21:841-848.
- Ginnochio R (2000)** Effect of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. *Chemosphere* 41:15-23.
- Giusquiani PL, Pagliai M, Gigliotti G, Bisinelli D, Benetti A (1995)** Urban waste compost: Effects on physical, Chemical, and biochemical soil properties. *Journal of Environmental Quality* 24:175-182.
- Gobat JM, Aragno M, Matthey W (1998)** *Le sol vivant.* Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- Goldberg S, Suarez DL, Glaubig RA (1988)** Factors affecting clay dispersion and aggregate stability of arid-zone soils. *Soil Science* 146:317-325.
- Gorres JH, Savin MC, Amador JA (2001)** Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Soil Biology and Biochemistry* 33:1881-1887.
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC (1998)** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30:369-378.
- Greenway H, Munns R (1980)** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31:149-190.

- Gregorich EG, Kachanoski RG, Voroney RP (1989)** Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregates disruption. *Journal of Soil Science* 40:649-659.
- Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, Dobson G (1999)** Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31:145-153.
- Grime JP, Campbell BD (1991)** Growth rate, habitat productivity, and plant strategy as predictors of stress responses. In : Responses of plants to multiples stresses. (eds HA Mooney, WE Winner, EJ Pell), pp 143-159. Academic Press, Inc., San Diego, CL.
- Gros R (1999)** Ecocompatibilité de déchets d'incinération vis à vis du milieu récepteur "sol". Mémoire de DEA, Université de Savoie, 74p.
- Gros R, Poly F, Jocteur Monrozier L, Trosset L, Faivre P (2002)** Search for floristic and microbial indicators revealing the impact on the soil of solutions resulting from incineration waste. In : Proceedings Book of the Third International Congress "Man and Soil at the Third Millennium". (eds J.L. Rubio, R.P.C. Morgan, S. Asins & V. Andreu), pp. 929-944. Valencia (Spain), 28 March – 1 April, 2000. Geoforma Ediciones, Logroño (Spain).
- Guckert A (1973)** Contribution à l'étude des polysaccharides dans les sols et leur rôle dans les mécanismes d'agrégation. Thèse Fac. Sciences, UER STMCM, Nancy, 124p.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968)** The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation-laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43:1185-1207.
- Hattori T (1988)** Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Biology Fertility of Soils* 6:189-203.
- Haynes RJ, Swift RS (1990)** Stability of soil aggregates in relation to organic constituent and soil water content. *Journal of Soil Science* 41:73-83.
- Haynes RJ, Francis GS (1993)** Changes in microbial biomass C, soil carbohydrate composition and aggregate stability induced by growth of selected crop and forage species under field conditions. *Journal of Soil Science* 44:665-675.
- Henin S, Monnier G, Combeau A (1958)** Méthode pour l'étude de la stabilité structurale des sols. *Annales Agronomiques* 9:73-92.
- Henin S, Gras R, Monnier G (1969)** le profil cultural: l'état physique du sol et ces conséquences agronomiques. Masson et Cie, Paris, 332 p.
- Hernandez S, Deleu C, Larher F (2000)** Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, série III* 323:551-557.
- Hess GR, Cambell CL, Fiscus DA, Hellkamp AS, MacQuaid BF, Munster MJ, Peck SL, Shafer SR (2000)** A conceptual model and indicators for assessing the ecological condition of agricultural lands. *Journal of Environmental Quality* 29:728-737.
- Hicks RJ, Stotzky G, van Voris P (1990)** Review and evaluation of the effects of xenobiotic chemicals on microorganisms in soil. *Advances in Applied Microbiology* 35:195-253.
- Hitner L (1904)** Uber neuere erfahrungen und probleme auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonder berücksichtigung der gründung und brache. *Arb. Dstch Landwrit. Ges* 98:59-78.
- Holden PA, Firestone MK (1997)** Soil microorganisms in soil cleanup : how can we improve our understanding ?. *Journal of Environmental Quality* 26:32-40.
- Huddleston JH (1984)** Development and use of soil productivity ratings in the United States. *Geoderma* 32:297-317.

- Ibáñez R, Andrés A, Viguri JR, Ortiz I, Irabien JA (2000)** Characterisation and management of incinerator wastes. *Journal of Hazardous Materials* 79, 215-227.
- Jacot KA, Lüscher A, Nösberger J, Hartwig UA (2000)** The relative contribution of symbiotic N<sub>2</sub> fixation and other nitrogen sources to grassland ecosystems along an altitudinal gradient in the Alps. *Plant and Soil* 225:201-211.
- Jaeger CH, Monson RK, Fisk MC, Schmidt SK (1999)** Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology* 80:1883-1891.
- Jastrow JD, Miller RM, Lussenhop J (1998)** Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregates stabilization in restored prairie. *Soil Biology and Biochemistry* 30:905-916.
- Jensen MA, Webster JA, Straus N (1993)** Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified DNA spacer polymorphism. *Applied Environmental Microbiology* 59:945-952.
- Jocteur Monrozier L, Ladd JN, Fitzpatrick RW, Foster RC, Raupach M (1991)** Components and microbial biomass content of size fraction in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* 49:37-62.
- Johnson CA, Kaeppli M, Brandenberger S, Ulrich A, Baumann W (1999)** Hydrological and geochemical factors affecting leachate composition in municipal solid waste incinerator bottom ash; Part II. The geochemistry of leachate from Landfill Lostorf, Switzerland. *Journal of Contaminant Hydrology* 40:239-259.
- Kabata Pendias A and Pendias H 1992** Traces Elements in Soils and Plants. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kabir M, Chotte JL, Rahman M, Bally R, Jocteur Monrozier L (1994)** Distribution of soil fractions and location of soil bacteria in a vertisol under cultivation and perennial grass. *Plant and Soil* 163:243-255.
- Kanazawa S, Filip Z (1986)** Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microbial Ecology* 12:205-215.
- Kandeler E, Stemmer M, Klimanek E-M (1999)** Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 31:261-273.
- Kandeler E, Tschierko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung W (2000)** Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of heavy metal polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32:390-400.
- Karlen D, Eash NS, Unger PW (1992)** Soil and crop management effects on soil quality indicators. *American Journal of Alternative Agriculture* 7:48-55.
- Karlen DC, Mausbach MJ, Doran JW, Clire RG, Harris RF, Schuman GE (1997)** Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. *Soil Science Society of American Journal* 61:4-10.
- Kay BD (1990)** Rates of changes of soil structure under different cropping systems. *Advance of Soil Science* 12:1-52.
- Kemper WD, Kock EJ (1966)** Aggregate stability of soils from western United States and Canada. USDA Tech. Bull. No.1355. U.S. Govt. Print. Off., Washington, DC.
- Kemper WD, Rosenau RC (1986)** Aggregate stability and size distribution. In : *Methods of Soil Analysis, part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Agronomy monograph 9, 2nd ed. (ed. A. Krute). American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, pp. 425-442.
- Keren R (2000)** Salinity. In: *Handbook of Soil Science* (ed M. E. Sumner), pp. G-3 – G-26. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Kilbertus G (1980)** Etudes des microhabitats contenus dans les agrégats du sol, leur relation avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents. *Revue d'Ecologie Biologie des Sols* 17:543-557.

- Kincannon DF, Gaudy AF (1968)** Response of biological waste treatment systems to changes in salt concentrations. *Biotechnology Bioengineer* 10:483-496.
- Kladivko EJ (2001)** Tillage systems and soil ecology. *Soil Tillage Research* 61:61-76.
- Klingebiel AA, Montgomery PH (1973)** Land capability classification. Agriculture handbook No 210. Soil Conservation Service USDA, Washington, DC.
- Kozdroj J (1995)** Microbial responses to single or successive soil contamination with Cd or Cu. *Soil Biology and Biochemistry* 27:1459-1465.
- Kozdroj J, Van Elsas JD (2000)** Response of the bacterial community to roots exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approach. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1405-1417.
- Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H, Matsumoto S (2001)** Characterisation of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *European Journal of Soil Biology* 37:95-102.
- Kuperman RG, Carreiro MM (1997)** Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 29:179-190.
- Ladd JN, Foster RC, Skjemstad JO (1993)** Soil structure: Carbon and nitrogen metabolism. *Geoderma* 56:401-434.
- Lafond J, Angers DA, Laverdière MR (1992)** Compression characteristics of a clay soil as influenced by crops and sampling dates. *Soil Tillage Research* 22:233-241.
- Larcher W (1995)** Physiological plant ecology. Springer-Verlag, Berlin.
- Larson WE, Pierce FJ (1994)** The dynamique of soil quality as a measure of a sustainable management. In : *Defining soil quality for a sustainable environment.* (ed Doran JW et al.), pp. 37-52. SSSA Spec. Publ. 35, Madison, WI.
- Lavelle P (1987)** Interactions, hiérarchies et régulation dans le sol : à la recherche d'une nouvelle approche conceptuelle. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 24:219-229.
- Lavelle P, Spain AV (2001)** Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Le Bissonnais Y (1996)** Aggregate stability and assessment of soil crustability and erodability: I. Theory and methodology. *European Journal of Soil Science* 47:425-437.
- Leconte P (1995)** Les sites pollués : Traitements des sols et des eaux souterraines. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 178 p.
- Lensi R, Clays-Josserand A, Jocteur Monrozier L (1995)** Denitifiers and denitrifying in size fractions of a mollisol under permanent pasture or continuous vegetation. *Soil Biology and Biochemistry* 27:61-69.
- Lévêque C (2001)** Ecologie: de l'écosystème à la biosphère. Dunod, Paris.
- Levy GL, Rosenthal A, Tarchitzky J, Chen Y (1999)** Soil hydraulic conductivity changes caused by irrigation with reclaimed waste water. *Journal of Environmental Quality* 28:1658-1664.
- Ley RE, Lipson DA, Schmidt SK (2001)** Microbial biomass in barren and vegetated high altitude talus soils. *Soil Science Society of American Journal* 65:111-117.
- Lieffering RE, McLay CDA (1996)** The effect of strong hydroxide solutions on the stability of aggregates and hydraulic conductivity of soil. *European Journal of Soil Science* 47:43-50.
- Low AJ (1955)** Improvements in the structural state of soils under leys. *Journal of Soil Science* 6:179-199.
- Lynch JM, Wipps JM (1990)** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129:1-10.

- Lynch JM, Elliot LF (1997)** Bioindicators: perspectives and potential value for landusers, researchers and policy makers. In : Biological indicators of soil health. (eds CE Pankhurst, BM Doube, WSR Gupta), pp 79-96. CAB international, London.
- Mace JE, Amrhein C (2001)** Leaching and reclamation of soil irrigated with moderate waters. Soil Science Society of American Journal 65:199-204.
- Macnaughton S, Stephen JR, Chang YJ, Peacock A, Flemming CA, Leung KT, White DC. (1999)** Characterization of metal-resistant soil eubacteria by polymerase chain reaction--denaturing gradient gel electrophoresis with isolation of resistant strains. Can J Microbiol 45:116-24.
- Macura J (1968)** Physiological studies of rhizosphere bacteria. In : the ecology of soil bacteria (eds Gray F, Parkinson J), pp. 379-395. Liverpool University Press.
- Magné C, Larher F (1992)** High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. Analytic Bio-chemistry 200:115-118.
- Maloney PE, van Bruggen AHC, Hu S (1997)** Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizosphere and in bulk soil. Microbial Ecology 34:109-117.
- Mamedov AI, Levy GL (2001)** Clay dispersivity and aggregates stability effects on seal formation and erosion in effluent-irrigated soils. Soil Science 166:631-639.
- Mamedov AI, Shainberg I, Levy GJ (2001)** Irrigation with effluents: Effects of prewetting rate and clay content on runoff and soil loss. Journal of Environmental Quality 30:2149-2156.
- Mangialardi T, Paolini AE, Polettini A, Sirini P (1999)** Optimization of the solidification/stabilization process of MSW fly ash in cementitious matrices. Journal of Hazardous Material 70:53-70.
- Marshall TJ, Holmes JW, Rose CW (1996)** Soil physics, 3rd edn. Cambridge University Press, NY.
- Mathieu C (1996)** Structure et programme de la normalisation "qualité des sols". Etude et Gestion des Sols 3:125-134.
- Mausbach MS, Tugel A (1997)** Soil quality : A multitude of approaches. Kearney Foundation Symposium. California Soil Quality : from critical research to sustainable management. Berkeley, California, March 25.
- Mazoyer M, Roudart L (1997)** Histoire des agriculture du monde : du néolithique à la crise contemporaine. Edition du seuil, Paris, 533p.
- McGrady-Steed J, Harris PM, Morin PJ (1997)** Biodiversity regulates ecosystem predictability. Nature 390:162-165.
- McGrath SP, Chaudri AM, Giller KE (1995)** Long-term effects in sewage sludge on soils, microorganismes and plants. Journal of Industrial Microbiology 14:94-104.
- McLean EO (1982)** Soil pH and lime requirement. In: Methods of soil analysis. Part 2. 2nd edition. (eds A.L. Page et al.), pp. 1999-224. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- McNeal BL, Norvell WA, Coleman NT (1966)** Effect of solution composition on the swelling of extracted clays. Soil Science Society of American Journal 30:313-317.
- Meenner JC, McLay CDA, Lee R (2001)** Effects of sodium-contaminated wastewater on soil permeability of two New Zealand soils. Australian Journal of Soil Research 39:877-891.
- Mendes IC, Bottomley PJ (1998)** Distributioj of a population of rhizobium leguminosarum bv. Trifolii among different size classes of soil aggregates. Applied Environmental Microbiology 64:970-975.
- Merrick MJ, Edwards RA (1995)** Nitrogen control in bacteria. Microbiological Review 59:604-622.

- Misra RK, Dexter AR, Alston AM (1986)** Penetration of soil aggregates of finite size II plant roots. *Plant and Soil* 107:11-18.
- More MI, Herrich VL, Silva MC, Ghiorse WC, Madsen EL (1994)** Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Applied Environmental Microbiology* 60:1572-1580.
- Morel R (1989)** Les sols cultivés. Lavoisier, Paris.
- Muller S (1995)** Les bioindicateurs végétaux de pollution. ANPP, Colloque International Marqueurs Biologiques de Pollutions, Chinon 21-22 sept. 1995, 227-238.
- Muller S, Dutoit T, Alard D, Grevilliot F (1998)** Restoration and rehabilitation of species-rich grassland ecosystems in France: a review. *Restoration Ecology* 6:94-101.
- Munshower FF (1994)** Practical handbook of disturbed land revegetation. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
- Murat M (1981)** Valorisation des déchets et des sous produits industriels. Masson, Paris.
- Naeem S, Thompson LJ, Lawler SP, Lawton JH, Woodfin RM (1994)** Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature* 368:734-737.
- Neumann G, Römheld V (2001)** The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.* (eds R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri), pp. 41-94. Marcel Dekker Inc, New York, Basel.
- Newman EI (1985)** The rhizosphere: carbon sources and microbial populations. In : *Ecological interactions in soil.* (eds Fitter AH et al.), pp. 107-121. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Normand P, Pansonnet C, Nesme X, Neyra T, Simonet P (1996)** ITS analysis of procaryotes. In: *Molecular Microbiology Ecological Manual.* (eds Akkermans et al.), pp 1-12. Kluwer, Dordrecht, The Netherland.
- Oades JM (1993)** The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* 56:377-400.
- Ohtonen R, Fristze H, Pennanen T, Jumpponen A, Trappe J (1999)** Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. *Oecologia* 119:239-246.
- O'Neill RV, Angeles DE, Waide DL, Allen JB (1986)** A hierarchical concept of ecosystems. Princeton University Press, Princeton.
- Orsini L, Rémy JC (1976)** Utilisation du chlorure de cobaltihexamine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols. *Science du Sol* 4:269-275.
- Ovreas L, Torsvik V (1998)** Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 36:303-315.
- Pagliai M, De Nobili M (1993)** Relationships between soil porosity, root development and soil enzyme activity in cultivated soils. *Geoderma* 56:243-256.
- Pankhurst C, Doube BM, Gupta VVSR (1997)** Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford.
- Papendick RI, Campbell GS (1981)** Theory and measurement of water potential. In : *Water potential relations in soil microbiology.* (ed Soil Science Society of America), pp. 1-22. SSSA Special Publication Number 9, Madison, Wisconsin, USA.
- Park S, Choi KS, Joe KS, Kim WH, Kim HS (2001)** Variations of landfill leachates properties in conjunction with treatment process. *Environmental technology* 22:639-645.

- Parr JF, Papendick SB, Hornick SB, Meyer RE (1992)** Soil quality: attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture *American Journal of Alternative Agriculture* 7:5-11.
- Paul EA (2000)** Soil Biology and Biochemistry. In : *Handbook of Soil Science* (ed Summer ME), pp. C1-C9. CRC Press, Boca Raton.
- Perrodin Y, Gobbey A (1998)** Ecocompatibilité des déchets. *Ecotoxicologie des sols et des déchets : Enjeux réglementaires, normes et recherche. Séminaire ADEME, 4/12/1998, Paris, ADEME édition*, pp. 91-110.
- Perrodin Y, Gobbey A, Grelier-Volatier L, Canivet V, Fruget J F, Gibert J, Texier C, Cluzeau D, Gros R, Poly F, Jocteur Monrozier L (2002)** Waste ecocompatibility in storage and reuse scenarios: global methodology and detailed presentation of the impact study on the recipient environments. *Waste Management* 22:215-228.
- Philips CJ, Harris D, Dollhopf SL, Gross KL, Prosser JI, Paul E (2000)** Effects of Agronomic Treatments on Structure and Function of Ammonia-Oxidizing Communities. *Applied Environmental Microbiology* 66:5410-5418.
- Pitchel JR, Hayes JM (1990)** Influence of fly ash on soil microbial activity and populations. *Journal of environmental quality* 19:593-597.
- Poljakoff-Mayber A, Lerner HR (1994)** Plants in saline environments. In : *Handbook of plant and crop stress*. (ed Pessaraki M), pp. 65-96. Marcel Dekker Inc., New York.
- Poly F (2000)** Réponses des communautés bactériennes telluriques à des perturbations chimiques complexes : activités potentielles et empreintes génétiques. Thèse de l'Université Lyon 1, 159 p.
- Poly F, Bally R, Jocteur Monrozier L (2001a)** Improvement of the RFLP procedure to study the diversity of the nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152:95-103.
- Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, Jocteur Monrozier L (2001b)** Comparison of nifH pools between soils and between soil microenvironments of contrasting properties. *Appl Environ Microbiol* 67:2255-2262.
- Pupisky H, Shainberg I (1979)** Salt effects on the hydraulic conductivity of a sandy soil. *Soil Science Society of American Journal* 43:429-433.
- Quirk JP, Schofield RK (1955)** The effect of electrolyte concentration on soil permeability. *Journal of Soil Science* 6:163-178.
- Ranjard L (1999)** Réponse des communautés bactériennes telluriques à un apport de mercure inorganique: influence de la localisation des bactéries. Thèse Université Lyon 1, 170 p.
- Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A and Nazaret S (1999)** A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fraction of soil suitable for PCR based assays of bacterial. *European Journal of Soil Biology* 34:89-97.
- Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, Thioulouse J, Nazaret S (2000a)** Heterogeneous Cell density and genetic structure studies of bacterial pools associated with various soils microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbial Ecology* 39:263-272.
- Ranjard L, Brothier E, Nazaret S (2000b)** Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied Environmental Microbiology* 66:5334-5339.
- Ranjard L, Poly F, Nazaret S (2000c)** Monitoring complexe bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research Microbiology* 151:167-177.



- Ranjard L, Richaume A (2001)** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152:707-716.
- Rapport DJ, McCullum J, Miller MH (1997)** Soil health : its relationship to ecosystem health. In : *Biological indicators of soil health*. (eds Pankhurst et al.), pp. 29-48. CAB International, NY.
- Reganold JP, Papendick RI, Parr JF (1990)** Sustainable agriculture. *Scientific American* 262:72-79.
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wichman GS, Pace NR (1992)** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 58:695-700.
- Richards (1960)** Advances in soil physics. 7<sup>th</sup> International Congress of Soil Science 1:67-79.
- Richaume A, Steinberg C, Jocteur Monrozier L, Faurie G (1993)** Difference between direct and indirect enumeration of soil bacteria: influence of soil structure and cell location. *Soil Biology and Biochemistry* 25:641-643.
- Richnow HH, Seifeert J, Kastner M, Mahro B, Mickaelis W (1993)** Metabolite of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environment. *Advances in Organic Geochemistry* 22:671-681.
- Riviere JL (1998)** Evaluation du risque écologique des sols pollués. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 230 p.
- Robert M (1996)** Le sol: Interface dans l'environnement, ressources pour le développement. Masson, Paris, Milan, Barcelone.
- Robert M, Chenu C (1992)** Interactions between soils minerals and microorganisms. In: *Soil Biochemistry* (eds Stotzky G, Bollag JM), pp. 307-404. Marcel Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong.
- Robert M, Juste C (1997)** Stocks et flux d'éléments traces dans les sols du territoire. Actes des journées techniques des 5 et 6 juin 1997, ADEME, Paris, "épandage de boues résiduaires : aspects sanitaires et environnementaux".
- Romig DE, Garlynd RF, Harris RF, McSweeney K (1995)** How farmers assess soil health and quality. *Journal of Soil Water Conservation* 50:229-236.
- Roose-Amsaleg E, Garnier-Sillam M, Harry T (2001)** Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18:47-60.
- Ross M (1994)** Toxic metals in soil – plant systems. John Wiley & Sons, Chichester, 469 p.
- Rosset M, Montani M, Tanner M, Fuhrer J (2001)** Effects of abandonment on the energy balance and evapotranspiration of wet subalpine grassland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 86:277-286.
- Rozema J, Werkleij JAC (1991)** Ecological responses to environmental stresses. Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Ruppel S (1989)** Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of triticum eastivum and Ammophila arenaria. In: *Interrelationships between microorganisms and plant in soil*. (eds Vancura V, Kunc F), pp. 253-262. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokio.
- Salim S, Tessier D (1998)** Evolution des propriétés physiques et physico-chimiques des sols salés de la basse vallée de l'Euphrate (Syrie). *Etude et Gestion des Sols* 5:277-288.
- Salve R, Allen-Diaz B (2001)** Variations in soil moisture content in a rangeland catchment. *Journal of Range Management* 54:44-51.
- Sanchez-Maranon M, Soriano M, Delgado G, Delgado R (2002)** Soil quality in Mediterranean mountain environments: effects of land use. *Soil Science Society of American Journal* 66:948-958.

- Šantrůčková H, Heinemeyer O, Kaiser EA (1993)** The influence of soil compaction on microbial biomass and organic carbon turnover in micro- and macroaggregates. In : *Int. Workshop on methods of research on soil structure / Soil biota interrelationships* (eds L. Brussaard & M.J. Kooistra), pp. 587-598. Geoderma, 56.
- Sauve S, Dumestre A, McBride M, Gillet JW, Berthelin J, Hendershot W (1999)** Nitrification potential in field-collected soils contaminated with Pb and Cu. *Applied Soil Ecology* 12:29-39.
- Schipper LA, Degens BP, Sparling GP, Duncan LC (2001)** Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. *Soil Biology and Biochemistry* 33:2093-2103.
- Schmitt HW, Sticher H (1991)** Heavy metal compounds in the soil. In : *Metals and their compounds in the environment*. (ed Merian E), pp. 311-331. VCH, Weinheim.
- Selby MJ (1993)** *Hillslope materials and processes*-2nd ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeller E (2001)** Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertiliser field experiment. *Applied Environmental Microbiology* 67:4215-4224.
- Seybold CA, Mausbach MJ, Karlen DL, Rogers HH (1997)** Quantification of soil quality. In : *Soil processes and the carbon cycle* (eds Lal et al.), pp. 387-404. CRC Press, Boca Raton.
- Seybold CA, Herrick JE, Brejda JJ (1999)** Soil resilience: A fundamental component of soil quality. *Soil Science* 164:224-234.
- Seybold CA, Herrick JE (2001)** Aggregate stability kit for soil quality assessments. *Catena* 44:37-45.
- Shainberg I, Rhoades JD, Prather RJ (1981)** Effect of low electrolyte concentration on clay dispersion and hydraulic conductivity of a sodic soil. *Soil Science Society of American Journal* 45:273-277.
- Shainberg I, Levy GJ, Rengasamy P, Frenkel H (1992)** Aggregate stability and seal formation as affected by drops' impact energy and soil amendments. *Soil Science* 154:113-119.
- Shipper LA, Sparling GP (2000)** Performance of soil condition indicators across taxonomic groups and land uses. *Soil Science Society of American Journal* 64 :300-311.
- Sims JT, Cunningham SD, Summer ME (1997)** Assessing soil quality for environmental purposes : Roles and challenges for soil scientists. *Journal of Environmental Quality* 26:20-25.
- Sims PL, Coupland RT (1979)** Producers. In : *Grassland ecosystems of the world: analyses of grassland and their uses*. (ed Coupland RT), pp. 49-72. Cambridge University Press, Cambridge.
- Singer MJ, Ewing S (2000)** Soil Quality. In : *Handbook of soil science* (ed Summer ME), pp. G-271-G298. CRC Press, Boca Raton.
- Singer MJ, Warkentin BP (1996)** Soils in an environmental context : an american perspective. *Catena* 27:179-189.
- Snakin VV, Krchetov PP, Kuzovnikova TA, Alyabina IO, Gurov AF, Stepichev AV (1996)** The system of assessment of soil degradation. *Soil Technology* 8:331-343.
- Soil Survey Staff (1994)** *Keys to soil taxonomy*, sixth edition. USDA, Washington.
- Sojka RE, Upchurch DR (1999)** Reservations regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of American Journal* 63:1039-1054.
- Shoji S, Nanzyo M, Dahlgren R. (1993)** *Volcanic ash soils : genesis, properties and utilisation*. Elsevier, Amsterdam, Netherland.
- Soltner D (1981)** *Les bases de la production végétale*. Tome 1: le sol. Angers, 456 p.

- Sommerfeldt TG, Chang C (1985)** Change in soil properties under annual applications of feedlot manure and different tillage practices. *Soil Science Society of American Journal* 49:983-987.
- Sorensen J (1997)** The rhizosphere as a habitat for soil microorganism. In : *Modern soil microbiology*. (eds van Elsas et al.), pp. 21-45. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Soulas G (1999)** Techniques d'évaluation de l'écotoxicité de substances xénobiotiques vis à vis de la microflore du sol. *Ingénierie* 19 :57-66.
- Sparling GP (1995)** The substrate-induced respiration method. In : *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. (eds Alef K, Nannipieri P), pp. 397-404. Academic Press, London.
- Staben ML, Bezdicek DF, Smith JL, Fauci MF (1997)** Assessment of soil quality in conservation reserve program and wheat fallow soils. *Soil Science Society of American Journal* 61, 124-130.
- Steer J, Harris JA (2000)** Shifts in microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biology and Biochemistry* 32:869-878.
- Stewart JB, Moran CJ, Wood JT (1999)** Macropore sheath: quantification of plant root and soil macropore association. *Plant and Soil* 211:59-67.
- Sumner ME (1993)** Sodics soils : new perspectives. *Australian Journal of Soil Research* 31:683-750.
- Tamm CO (1990)** Nitrogen in terrestrial ecosystems: Question of productivity, vegetational changes and ecosystem stability. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York.
- Tessier D, Bruand A, Lebissonais Y, Dambrine E (1996)** Qualité chimique des sols : Variabilité spatiale et évolution. *Etude et Gestion des Sols* 3:229-244.
- Tessier D, Bigorre F, Bruand A (1999)** La capacité d'échange : un outil de prévision des propriétés physiques des sols. *Compte Rendu Académie Agriculture Française* 85:37-46.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JM (1997)** ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* 7:75-83.
- Thomas GW (1984)** Exchangeable cations. In : *Methods of soil analysis. Part 2, chemical and micro-biological properties* 2nd edn. (eds Page et al.), pp. 159-165. Series Agronomy n°9, SSSA and ASA, Madison, Wis., USA.
- Tiedje J (1998)** In : *Biology of anaerobic microorganisms*. (ed Zehnder AJB), pp 179-244. Wiley, New-York.
- Tisdall JM, Oades JM (1982)** Organic matter and water stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science* 33:141-163.
- Tisdall JM, Oades JM (1979)** Stabilization of soil aggregates by root systems of rye-grass. *Australian Journal of Soil Research* 17:429-441.
- Tisdall JM, Cockroft B, Uren NC (1978)** The stability of soil aggregates as affected by organic materials, microbial activity and physical disruption. *Australian Journal of Soil Research* 16 :9-17.
- Tramblay-Boeuf V (1995)** Influences des contraintes mécaniques sur l'exudation racinaire du maïs. Thèse doctorat 3ème cycle, INPL, Nancy, 138 pages.
- Troll W, Lindsey J (1954)** A photometric method for determination of proline. *Journal Biology Chemistry* 215:655-660.
- Turco RF, Kennedy AC, Jawson MD (1994)** Microbial indicators of soil quality. In : *Defining soil quality for a sustainable environment*. (eds Doran et al), pp 73-90. SSSA/ASA, Special Publication 35.

- Turner AP (1994)** The responses of plants to heavy metals. In : Toxic metals in soil-plant systems. (ed Ross SM), pp. 153-188. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Turner GL, Gibson AH (1980)** Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In : Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. (ed Bergersen F), pp 111-138. John Wiley & Sons, Chichester.
- Tyler G, Balsberg Pahlsson AM, Bengtsson G, Baath E, Tranvik L (1989)** Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates: a review. *Water Air Soil Pollution* 47:189-215.
- Ulehlova B (1988)** The nitrogen cycle. In : Soil Microbial Associations — Control of Structure and Functions. (eds Vancura V, Kunc F), pp 406-469. Elsevier, Amsterdam.
- Urbanska KM (1995)** Biodiversity assessment in ecological restoration above the timberline. *Biodiversity and Conservation* 4: 679-695.
- Urbanska KM, Fattorini M (2000)** Seed Rain in High-Altitude Restoration Plots in Switzerland. *Restoration Ecology* 8:74-79.
- US Salinity Laboratory Staff (1954)** Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA Handbook 60. Disponible à <http://www.ussl.ars.usda.gov/hb60/hb60.htm> (vérifié le 2 mai 2002).
- USDA (1996)** Indicators for soil quality evaluation. USDA Natural Resources Conservation Service, April 1996. [www.nssc.nrcs.usda.gov](http://www.nssc.nrcs.usda.gov)
- USDA (1998)** Soil quality resource concerns : Soil biodiversity. USDA Natural Resources Conservation Service, January 1998. [www.nssc.nrcs.usda.gov](http://www.nssc.nrcs.usda.gov)
- van Andel J, van Baalen J, Rozijn NAMG (1991)** Population ecology of plant species in disturbed forest and grassland habitats. In : Ecological responses to environmental stresses. (eds Rosema J, Verkleij JAC), pp. 136-149. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- van Bruggen AHC, Semenov AM (1999)** In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15:13-24.
- Van der Sloot HA, Kosson DS, Hjelmar O (2001)** Characteristics, treatment and utilization of residues from municipal waste incineration. *Waste Management* 21:753-765.
- Van Genuchten MT, Wierenga PJ (1976)** Mass transfer studies in sorbing porous media. I. Analytical solutions. *Soil Science Society of America Journal* 40 :473-480.
- van Gestel M, Ladd JN, Amato M (1991)** Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: Influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biology and Biochemistry* 23:313-322.
- van Gestel M, Merckx R, Vlassek K (1996)** Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. *Soil Biology and Biochemistry* 28:503-510.
- Vancura V (1988)** Microorganisms, their mutual relations and functions in the rhizosphere. In : Soil Microbial Associations — Control of Structure and Functions. (eds Vancura V, Kunc F), pp 193-. Elsevier, Amsterdam.
- Visser S, Parkinson D (1992)** Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7:33-37.
- Wagenet RJ, Huston JL (1997)** Soil quality and its dependence on dynamic physical processes. *Journal of Environmental Quality* 26:41-48.
- Wander MM, Bollero A (1999)** Soil quality assessment of tillage impacts in Illinois. *Soil Science Society of American Journal* 63:961-971.

- Ward DM, Weller R, Bateson MM (1990)** 16 rRNA sequences reveal numerous uncultured micro-organisms in natural community. *Nature* 345:63-65.
- Wardle DA, Nicholson KS (1996)** Synergistic effects of grassland species on soil microbial biomass and activity: implications for ecosystem-level effects of enriched plant diversity. *Functional Ecology* 10:410-416.
- Wardle DA, Bonner KL, Barker GM, Yeates GW, Nicholson KS, Bardgett RD, Watson RN, Ghani A (1999)** Plant removal in perennial grassland: vegetation dynamics, decomposers, soil biodiversity and ecosystem properties. *Ecological Monographs* 69:535-568.
- Wardle DA, Giller KE, Barker GM (1999)** The regulation and functional significance of soil biodiversity in agrosystems. In : *Agrobiodiversity characterisation, utilization and management*. (eds Wood D, Lenne J), pp. 87-121. CAB International, Wallingford, UK.
- Weigand S, Auerwld K, Beck T (1995)** Microbial biomass in agricultural topsoils after 6 years of bare fallow. *Biology Fertility of Soils* 19:129-134.
- Wiles CC (1996)** Municipal solid waste combustion ash : state-of-the-knowledge. *Journal of Hazardous Material* 47:325-344.
- WRB Soil Classification (1999)** FAO, ISRIC and AISS.
- Yang CH, Crowley DE (1999)** Rhizosphere microbial community structure in relation to roots location and plant iron nutritional status. *Applied Environmental Microbiology* 66:345-351.
- Young RA (1984)** A method of aggregate stability under water drop impact. *Transaction of the American Society of Agricultural Engineers* 27:1351-1353.
- Young IM, Ritz K (2000)** Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil Tillage Research* 53:201-213.
- Yoder RE (1936)** A direct method of aggregate analysis of soils and a study of physical nature of erosion losses. *Journal of American Society of Agronomy* 28:337-351.
- Zak JC, Willig MR, Moorhead DL, Wilfmand HG (1994)** Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1101-1108.
- Zangh XC, Norton LD (2002)** Effect of exchangeable hydraulic conductivity, disaggregation and clay dispersion for disturbed soils. *Journal of Hydrology* 260:194-205.
- Zeller V, Bardgett RD, Tappeiner U (2001)** Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. *Soil Biology and Biochemistry* 32:639-649.
- Zelles L, Bai Q, Beck T, Beese F (1992)** Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24:317-323.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996)** DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology* 62:316-322.