UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

THESE EN CODIRECTION

présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de

L'Université de Lorraine

Ecole doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement

et

L'Université Libanaise

Faculté des Sciences 1

Spécialité : Sciences Agronomiques

Agromine associant plantes hyperaccumulatrice de nickel et légumineuse, comme service écosystémique des sols ultramafiques

par

Ramez SAAD

Soutenue et présentée publiquement le 3 novembre 2017

Membres du Jury :

Thierry LEBEAU	Professeur, Université de Nantes	**Rapporteur**
Michel-Pierre FAUCON	Maître de Conférences, UniLaSalle de Beauvais	**Rapporteur**
Olivier FAURE	Maître de Conférences, École des Mines de St-Étienne	**Examinateur**
Séverine PIUTTI	Maître de Conférences, Université de Lorraine	**Examinatrice**
Ahmad KOBAISSI	Professeur, Université Libanaise	**Co-directeur**
Emile BENIZRI	Professeur, Université de Lorraine	**Directeur**

THESE EN CODIRECTION

présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur de

L'Université de Lorraine

Ecole doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement

et

L'Université Libanaise

Faculté des Sciences 1

Spécialité : Sciences Agronomiques

Agromine associant plantes hyperaccumulatrice de nickel et légumineuse, comme service écosystémique des sols ultramafiques

par

Ramez SAAD

Soutenue et présentée publiquement le 3 novembre 2017

Membres du Jury :

Thierry LEBEAU	Professeur, Université de Nantes	**Rapporteur**
Michel-Pierre FAUCON	Maître de Conférences, UniLaSalle de Beauvais	**Rapporteur**
Olivier FAURE	Maître de Conférences, École des mines de St-Étienne	**Examinateur**
Séverine PIUTTI	Maître de Conférences, Université de Lorraine	**Examinatrice**
Ahmad KOBAISSI	Professeur, Université Libanaise	**Co-directeur**
Emile BENIZRI	Professeur, Université de Lorraine	**Directeur**

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse Emile Benizri tout d'abord pour m'avoir m'accueillir dans le laboratoire Sols et Environnement et puis pour le soutien qu'il m'a apporté tout au long de ces trois années de thèse, pour la qualité de nos échanges scientifiques et ses conseils avisés, mais aussi et surtout pour sa gentillesse et ses encouragements à persévérer et progresser.
Un grand merci également à mon co-directeur de thèse, Ahmad Kobaissi, pour le soutien qu'il m'a apporté pendant la thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ces années de thèse mais aussi pour les années de licence et de master !

Je souhaitais remercier Christophe Schwartz, Directeur du Laboratoire Sols et Environnement pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour le soutien et la bienveillance qu'il m'a accordés tout au long de la thèse. Je tiens aussi à remercier Guillaume Echevarria pour son aide et soutien pendant ces trois années de doctorat.

Ce travail de thèse repose en grande partie sur des dispositifs expérimentaux, mis en place à la fois en conditions contrôlées mais aussi en situation réelles au champ, en Espagne. Je voulais sincèrement remercier l'équipe technique du Laboratoire Sols et Environnement sans laquelle il m'aurait été impossible de conduire ces expérimentations. Je tiens, en particulier, à remercier très chaleureusement Lucas Charrois et Romain Goudon pour leur aide capitale tout au long de la thèse. En plus de leur sérieux et de leurs conseils techniques, ils m'ont permis de passer, dans une ambiance amicale et avec bonne humeur, les moments froids, pluvieux, venteux et parfois très chauds sous le soleil d'Espagne, lors dans campagnes de terrain. A tous les deux, j'adresse mes plus sincères remerciements ! Je n'oublie pas également d'exprimer ma gratitude aux autres membres de l'équipe technique qui ont participé activement à l'installation et à la récolte des expérimentations, en particulier Stéphane Colin, Adeline Bouchard et Jean-Claude Begin. Je n'oublierai pas également Alain Rakoto, pour son soutien en informatique durant ces trois années de thèse.

Mes vifs remerciements vont également à Petra Kidd et aux membres de son équipe technique à Saint-Jacques de Compostelle pour leur aide durant la mise en place et la récolte des expérimentations au champ. Je remercie aussi Xavier Goux et son équipe de recherche au Luxembourg pour leur aide dans les analyses de séquençage. Je remercie également

particulièrement Celestino Quintela Sabarís et Ángeles pour toute leur aide en Espagne. Je n’oublie pas Emanuel pour m’avoir apporté son aide lors de l’installation des parcelles expérimentales.

Un grand merci aux collègues du Laboratoire Sols et Environnement pour les bons moments que nous avons vécus ensemble et toute l’aide qu'ils m'ont apportée tout au long de cette thèse. Je remercie en particulier Marie Rue, Quentin Vincent, Séverine Lopez, Clémentine Lapie, Anne Blanchart, Khaled Brimo, Yannick Cazes, Robin Dagois, Marie-Laure Bonis et Amina Ameur. Je remercie chaleureusement Sylvia L’huillier et Laetitia Despouy, au-delà de leur aide, pour toutes les tracasseries administratives. Je n’oublierai pas Gaylord Machinet, Maxime Maire et Geneviève Villemin, de l’entreprise Microhumus, pour leur participation à certaines de mes expérimentations et leur aide pour l’analyse et l’interprétation de certains de mes résultats basés sur la microscopie électronique à transmission. Je remercie aussi Yves Le Roux pour son aide lors du traitement statistique de mes données, Aude Fauvet pour l’analyse de mes échantillons au TOC et Hugues Clivot pour toute son aide à l’optimisation des dosages enzymatiques du sol.

Je n'oublierai pas également Stéphane Désobry, Directeur de l’Ecole Doctorale RP2E et sa secrétaire Christine Fivet pour tout le soutien qu’ils m’ont apporté pendant toute la thèse. Je leur exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Thierry Lebeau et Michel-Pierre Faucon ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse ; Oliver Faure et Séverine Piutti ont bien voulu examiner mon travail. J'en suis honoré et je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements.

Merci à mes amis Ali Kanso, Hassan Hajj Ali, Hassan Moussa, Hamid Reza Zandi, Mohammad Wazne, Hussein Kanbar, Mostafa Shehadi pour toute votre aide et soutien le long de la thèse, ainsi que pour les beaux moments que nous avons vécus ensemble.

Merci à mes parents, mon frère et mes sœurs en particulier pour le soutien et la confiance qu'ils m'ont accordés durant toute ma scolarité ainsi que pour m'avoir donné l'opportunité de choisir ma voie. Merci à toute ma grande famille qui est dispersée entre le Liban, la France, la Grande-Bretagne, le Canada, les Etats-Unis et le Congo. Je tiens à remercier aussi mes beaux-parents et mes beaux-frères pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Enfin, mes plus grands remerciements, du fond du cœur, vont à ma fiancée Khadija, pour son soutien moral et ses encouragements amoureux, au quotidien, pendant ces dernières années et en particulier durant les derniers mois de cette thèse.

Sommaire

Sommaire .....
Liste des figures .....
Liste des tableaux .....
Liste des photographies .....
Introduction générale 3

Chapitre 1. Etat de l'art 9
1. Le sol : un compartiment complexe et dynamique 9
2. Les sols serpentiniques et leur flore naturelle 11
2.1. La phytoremédiation et les plantes hyperaccumulatrices 12
3. Les techniques de réhabilitation des sols : la phytoremédiation 14
3.1. Les mécanismes d'hyperaccumulation 14
3.1.1. Distribution des métaux dans les organes végétaux 15
3.1.2. Rôles des microorganismes dans la phytoextraction 16
4. Les limites de la phytoremédiation 17
5. De la phytoremédiation à l'agromine 18
5.1. Qu'est-ce l'agromine ? 18
5.2. Quels leviers pour améliorer et optimiser l'agromine ? 19
5.2.1. Amélioration de la fertilisation minérale ou organique des sols 20
5.2.2. Inoculation par des PGPR 21
5.2.3. Associations végétales 23
6. Vers de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine associant plante hyperaccumulatrice et légumineuse 24
6.1. Effet des légumineuses en lien avec les facteurs abiotiques et biotiques du sol 26
6.2. Modes d'insertion des légumineuses dans les systèmes culturaux 27
7. Quels indicateurs de la qualité des sols pour estimer l'efficience de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine ? 29
7.1. Notion de qualité des sols 29
7.2. Choix des indicateurs 30
7.3. Les indicateurs de la qualité physique du sol 31
7.4. Les indicateurs de la qualité chimique du sol 32
7.5. Les indicateurs de la qualité biologique du sol 32
Objectifs de la thèse 37

Chapitre 2. Matériel et méthodes 43
1. Dispositifs expérimentaux 44
1.1. Expériences en conditions contrôlées 44

1.1.1. Culture d'une Fabacée sur un sol artificiellement contaminé en nickel 44
1.1.2. Culture de Fabacées sur un sol naturellement riche en nickel 47
1.1.3. Mise en place de systèmes de culture associant des Fabacées et une plante hyperaccumulatrice de nickel en pot sur un sol naturellement riche en nickel 48
1.1.4. Impact du système de culture sur la structure du sol et l'architecture racinaire 55
1.2. Expériences en conditions de plein champ 62
1.2.1. Mise en place de systèmes de culture associant une Fabacée et une plante hyperaccumulatrice de nickel *in situ*, en conditions de plein champ, sur un sol naturellement riche en nickel 62
2. Analyses réalisées (communes aux différentes expérimentations en conditions contrôlées et *in situ*) 69
2.1. Analyses des sols 69
2.2. Analyses sur les plantes 74
2.3. Analyses microbiologiques 75
2.4. Analyses statistiques 84
2.5. Analyses géostatistiques 84
2.6. Analyses biostatistiques 85

Chapitre 3. La fixation atmosphérique de l'azote et la croissance de *Lens culinaris* sont affectées par la biodisponibilité du nickel : un prérequis à l'optimisation de l'agromine 89
Abstract 91
1. Introduction 92
2. Material and methods 94
2.1. Soil characteristics and experimental design 94
2.2. Plant analyses 96
2.3. Soil analyses 97
2.4. Statistical analyses 98
3. Results 98
3.1. Plant analyses 98
3.1.1. Shoot and root biomass 98
3.1.2. Carbon and nitrogen content in shoots and roots 99
3.1.3. Ni concentrations in shoots and roots 99
3.1.4. Pigments and nitrate reductase activity 100
3.1.5. Nodule number 101
3.1.6. N_2 fixation 101
3.2. Soil characteristics 102
3.2.1. Total Ni and DTPA-Ni 102
3.2.2. pH and CEC 103
3.2.3. Soil Nitrogen and Carbon 103

3.2.4. Ammonium and nitrate 104
4. Discussion 104
5. Conclusions 108
Acknowledgments 108
References 108

Chapitre 4a. Expérimentations préliminaires à la mise en place des expériences sur sol serpentinique : choix de la légumineuse. 117

Chapitre 4b. Développement de l'agromine associant *Alyssum murale* et une légumineuse : une expérimentation réalisée *in situ* sur un sol ultramafique, en Espagne 121
Abstract 123
1. Introduction 124
2. Materials and methods 126
2.1. Experimental site 126
2.2. Soil characteristics and experimental design 126
2.3. Plant analyses 127
2.4. Soil analyses 128
2.4.1. Soil physico-chemical analyses 128
2.4.2. Soil microbial analyses 129
2.5. Statistical analyses 131
3. Results 131
3.1. Plant biomass, Ni yields and C, N contents 131
3.2. Soil physico-chemical analyses 133
3.3. Microbial biomass, enzymatic activities and community-level physiological profiling 134
3.4. High-throughput 16S rRNA amplicon sequencing results 137
3.4.1. Alpha diversity 137
3.4.2. Bacterial diversity at phyla and subphyla level 137
3.4.3. Bacterial diversity at family level 138
3.4.4. Bacterial diversity at genus level 141
3.4.5. Non-metric multidimensional scaling at OTUs level 143
4. Discussion 144
5. Conclusions 151
Acknowledgments 151
References 152

Chapitre 5a. Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume 163

Abstract 163
1. Introduction 164
2. Materials and methods 166
2.1. Soil characteristics and experimental design 166
2.2. Plant analyses 167
2.3. Soil analyses 168
2.4. Geostatistical and statistical analyses 169
3. Results 170
3.1. Plant analyses 170
3.1.1. Biomass, Ni yields and C, N contents 170
3.1.2. Root architecture and spatial distribution 171
3.2. Soil characteristics 173
3.2.1. Spatial distribution of physicochemical properties 173
3.2.2. Grain size distribution and soil aggregation 177
4. Discussion 179
5. Conclusions 185
Acknowledgments 185
References 186

Chapitre 5b. Improving the structure and the biofunctioning of an ultramafic soil with agro-ecological agromining 193
Abstract 193
1. Introduction 194
2. Methods 196
2.1. Soil characteristics and experimental design 196
2.2. Plant analyses 197
2.3. Soil chemical analyses 197
2.4. Analyses of soil structure and biofunctioning 198
2.5. Statistical analyses 198
3. Results 199
3.1. Plant analyses 199
3.1.1. Biomass yields and Ni concentrations 199
3.2. Soil characteristics 200
3.2.1. Soil pH and available Ni 200
3.2.2. Total and organic C, N concentrations 201
3.2.3. Soil structure and biofunctioning 201
3.3. Principal Component Analysis 203
4. Discussion 204

5. Conclusions 209
Acknowledgments 209
References 209

Chapitre 5c. What is the influence of new agromining cropping systems on soil biological properties? 215
Abstract 215
1. Introduction 216
2. Materials and methods 218
2.1. Soil characteristics and experimental design 218
2.2. Soil analyses 219
2.2.1. Soil physico-chemical analyses 219
2.2.2. Soil microbial analyses 220
2.3. Statistical analyses 222
3. Results 222
3.1. Soil physico-chemical analyses 222
3.2. Soil microbial biomass and community-level physiological profiling 223
3.3. Soil enzymatic activities 225
3.4. High‑throughput 16S rRNA amplicon sequencing results 226
3.4.1. Bacterial diversity at phyla and subphyla levels 226
3.4.2. Bacterial diversity at family level 227
3.4.3. Non-metric multidimensional scaling at OTUs level 230
3.5. Global analysis 230
3.6. Alpha diversity indexes 232
4. Discussion 232
5. Conclusions 239
Acknowledgments 239
References 239

Discussion générale 249
1. De l'extraction minière à l'agromine : intérêts et limites 249
2. Vers de nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine avec insertion d'une légumineuse ? 252
3. Quels sont les intérêts des nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine ? 253
3.1. Une amélioration de la qualité physique et chimique des sols ? 253
3.2. Une amélioration de la qualité biologique des sols ? 257
3.3. Une amélioration de la diversité microbienne ? 263
3.4. Une amélioration des rendements en biomasse végétale et en nickel ? 266

3.5. Quelle faisabilité économique de nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine ? 271
3.6. Quels services écosystémiques des nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine ? 272

Conclusions et perspectives 279
Références bibliographiques 285
ANNEXES 311

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des sols serpentiniques (d'après Baker et Brooks, 1989) 11
Figure 2 : Les différentes étapes de l'agromine (http://theconversation.com/lagromine-ou-comment-produire-du-metal-a-partir-des-plantes-61496) 19
Figure 3 : Modes d'insertion de la légumineuse dans les systèmes de culture (d'après Jeuffroy. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables - Colloque 14 décembre 2015) 27
Figure 4 : Insertion des travaux de thèse dans la filière agromine : quels systèmes culturaux pour une agromine plus efficiente et durable ? 39
Figure 5 : Dispositif expérimental en pots en conditions contrôlées : « V » pour vesce, « R » pour rotation, « R-» pour témoin négatif de la rotation, « R+ » pour témoin positif de la rotation, « C » pour co-culture, « C- » pour témoin négatif de la co-culture, « C+ » pour témoin positif de la co-culture, « SN » pour témoin sol nu 51
Figure 6 : Evolution de la température, de l'arrosage et de la photopériode depuis le semis jusqu'à la récolte (les valeurs de la température sont les valeurs réelles enregistrées au cours de l'expérience) 52
Figure 7 : Stades de floraison du Colza (*Brassica napus*) (http://www.terresinovia.fr/) 55
Figure 8 : Localisation des parcelles 62
Figure 9 : Localisation des parcelles dans la zone ultramafique de Melide : le triangle en rouge correspond à la zone où les parcelles ont été mises en place (source : Censo Catastral Mineiro de Galicia, http://censomineiro.org/) 63
Figure 10 : Teneurs en Ni extractible au DTPA (mg.kg^{-1} de sol sec) dans la parcelle du Triangulo (Moyennes dans les horizons A-B) 64
Figure 11 : Dispositif expérimental montrant les 28 parcelles au champ 65
Figure 12 : Courbe standard de l'activité de l'uréase 76
Figure 13 : Courbe standard de la FDA 77
Figure 14 : Courbe standard de l'ACC deaminase 78
Figure 15 : Courbe standard de p-Nitrophénol 79
Figure 16 : Exemple d'indexation d'une plaque d'analyses à 96 puits 83
Figure 17 : Shoot (grey bars) and root (black bars) biomass (g plant^{-1}) of lentils in relation to Ni additions (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3) 98
Figure 18 : Total nitrogen (N: grey bars) and carbon (C: black bars) in shoots of lentils (g plant^{-1}) grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3) ... 99
Figure 19 : Total Ni concentration in shoots (S: grey bars) and roots (R: black bars) (mg kg^{-1} DW) of lentils in relation to Ni additions (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3) . 100
Figure 20 : Carotenoid (grey squares) and chlorophyll (black triangles) concentrations in leaves of lentils (mg g^{-1} FW) grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3) 100
Figure 21 : Variation of the nitrate reductase activity in the fresh leaves (µmol NO_2^- g^{-1} h^{-1}) of lentils grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval within columns followed by the same letter do not differ significantly according to Tukey's multiple range test (α=0.05) 101
Figure 22 : Nodule number (per plant) of lentils in relation to Ni addtions (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3) 101

Figure 23 : Shoot nitrogen fixed from the air (Ndfa, mg plant^{-1}) of lentils grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3)..... 102
Figure 24 : Total Nickel (Total-Ni) (black bars) and DTPA-extractable Nickel (DTPA-Ni) (grey bars) in the soil at the harvest (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3) . 103
Figure 25 : pH of the soil at the harvest. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at p<0.05 (Tukey's multiple range test), (n = 3)..... 103
Figure 26 : Sunray plot of plant parameters percentages. A value of 100% corresponds to the highest value for each variable. "Co", "FMo" and "NFMo" correspond to co-cropping, fertilized monoculture and non-fertilized–monoculture cultural systems, respectively. N, C and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively. Lower values are calculated by the following formula "Lower value / highest value x 100". Means for a same plant parameter followed by different letters are significantly different at p < 0.05 (Duncan's multiple range test), (n = 3)..... 132
Figure 27 : Potential biomass and Ni yield of the shoots (kg ha^{-1}). "Co", "FMo" and "NFMo" correspond to co-cropping, fertilized monoculture and non-fertilized–monoculture cropping systems, respectively. Means ± standard error followed by different letters are significantly different at p < 0.05 (Duncan's multiple range test), (n = 3) 133
Figure 28 : Principal Component Analysis (PCA) generated from Biolog EcoPlate profiles (31 substrates) after 5 days of incubation. (a) Points represent the coordinate means of different treatments ("Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively) and standard deviation of three replicate samples. Means with different letters have significantly different scores at p < 0.05 (Duncan's multiple range test), (n = 3). (b) Biolog Ecoplate substrates involved in the discrimination of samples..... 136
Figure 29 : Relative abundance of bacterial phyla identified in all samples (%). "Others" refer to *Candidate_division_OP3, Candidate_division_WS6, Chlamydiae, Chlorobi, Cloacimonetes, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, GOUTA4, Gracilibacteria, Hydrogenedentes, Kazan-3B-09 Latescibacteria, Lentisphaerae, Microgenomates, Omnitrophica, Parcubacteria, PAUC34f, Saccharibacteria, SHA-109, SM2F11, Spirochaetae, TA06, Thermotogae, TM6, WCHB1-60, WD272, ε-Proteobacteria* and *TA18*. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively..... 138
Figure 30 : Heatmap representing linear correlations of plant and soil parameters to bacterial families of phyla with relative abundances higher than 10%. Parameters correlated to the bacterial families are abbreviated as the following: shoot biomass (BSh), root biomass (BRo), shoot carbon content (CSh), root carbon content (CRo), shoot nitrogen content (NSh), root nitrogen content (NRo), shoot Ni content (NiSh), root Ni content (NiRo), microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), soil arylsulfatase activity (Ary), soil urease activity (Ure), soil β-glucosidase activity (Bgl), soil phosphatase activity (Pho), soil FDA activity (FDA), soil ACC deaminase activity (ACCd), substrate richness (R), Shannon's diversity index (H), substrate evenness (E) , average well color development (AWCD), sum index (Sum), soil total carbon concentration (tCs), soil total nitrogen concentration (tNs), soil organic matter concentration (OM), soil organic nitrogen concentration (Nor), soil soluble carbon concentration (Cso), soil soluble nitrogen concentration (Nso), soil pH (pH), soil Cation Exchange Capacity (CEC), soil conductivity (Con), percentage of soil DTPA Ni-extracted concentration to pseudo-total Ni concentration (%Nib), soil ammonium concentration (NH4), soil nitrate concentration (NO3) and soil exchangeable Ni concentration (Niex). Only significant correlations (p < 0.1) are represented. The colors of the scale bar

indicate the nature of the correlation with red indicating negative correlation and green indicating positive correlation 140
Figure 31 : Bacterial diversity at the genus level for phyla with relative abundances higher than 10%. (a) *β-Proteobacteria*, (b) *α-Proteobacteria*, (c) *Acidobacteria*, (d) *Actinobacteria*. UG refers to an unknown genus. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively 143
Figure 32 : Non-metric multidimensional scaling: distribution of the treatments according to their bacterial community. Points represent the coordinate means (based on 3 points for each treatment) of different treatments. Means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3). "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively 144
Figure 33 : Sunray plot of plant parameters percentages. A value of 100% corresponds to the highest value for each variable. Ro, Co and FMo correspond to the treatments of rotation, co-cropping and fertilized monoculture respectively. N, C and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel respectively. Lower values are calculated by the following formula "(lower value/highest value) x 100". Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3) 171
Figure 34 : Sunray plot of root architecture parameters percentages. A value of 100% corresponds to the highest value for each variable. Ro, Co and FMo correspond to the treatments of rotation, co-cropping and fertilized monoculture respectively. Lower values are calculated by the following formula "(lower value/highest value) x 100". Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3) 172
F**igure 35 :** Kriged maps of Root Surface Area (RSA, %). Co, Ro and FMo correspond to the treatments of co-cropping, rotation and fertilized monoculture, respectively 173
Figure 36 : Kriged maps of soil Ni-DTPA concentrations (mg kg^{-1}). Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively 175
Figure 37 : Kriged maps of soil porosity (%). Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively 176
Figure 38 : Kriged maps of soil pH. Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively 177
Figure 39 : Particle size distribution per treatment before (a) and after sonication (b). Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively. R and NR refer to rhizosphere and non-rhizosphere soil samples, respectively 179
Figure 40 : Dry weights of stems, leaves and roots of *Alyssum murale* at the harvest. *Ro*, *FMo* and *NFMo* correspond to rotation, fertilized monoculture and non-fertilized monoculture cultural systems, respectively. DW corresponds to dry weight. Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5) 199
Figure 41 : Ni concentrations in shoots, leaves and roots of *Alyssum murale* at the harvest. *Ro*, *FMo* and *NFMo* correspond to rotation, fertilized monoculture and non-fertilized monoculture cultural systems, respectively. DW and [Ni] correspond to dry weight and Ni concentrations (g kg^{-1}). Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5) 200
Figure 42 : Relative abundances of different organo-mineral associations in the rhizosphere soil from each treatment. *Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS* correspond to rotation, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bare soil, respectively 203

Figure 43 : Principal Component Analysis (PCA) generated from all measured soil parameters. (4a) Points represent the coordinate of different treatments (*Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS* refer to the treatments of the rotation, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bare soil respectively). (4b) Different soil parameters measured at the harvest and involved in the discrimination of samples. C, N and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively 204
Figure 44 : Microbial enzyme activities in the soil at the harvest. Values were normalized to bare soil values. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. For each enzymatic activity, means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5). 226
Figure 45 : Relative abundance of bacterial phyla and subphyla identified in all soil samples (%). "Others" refer to *Candidate_division_OP3, Candidate_division_WS6, Chlamydiae, Chlorobi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, GAL08, GOUTA4, Gracilibacteria, Hydrogenedentes, Kazan-3B-09, Latescibacteria, Omnitrophica, ε-Proteobacteria, TA18, SHA-109, SM2F11, Spirochaetae, Thermotogae, TM6, WCHB1-60, WD272* having a relative abundance <1%. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. 227
Figure 46 : Relative abundance of bacterial families per phyla and subphyla with relative abundances greater than 7% (*Acidobacteria* (a), *Actinobacteria* (b), *α-Proteobacteria* (c), *β-Proteobacteria* (d), *Chloroflexi* (e), *Gemmatimonadetes* (f)). CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. 229
Figure 47 : Non-metric multidimensional scaling: distribution of the treatments according to their bacterial community. Points ± standard error represent the coordinate means (based on 5 points for each treatment. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. 230
Figure 48 : Redundancy Analysis (RDA) performed between soil physico-chemical characteristics and relative abundancy of bacterial phyla for planted treatments. Points ± standard error represent the coordinate means based on 5 points for each treatment (5 replicates). Coordinates of soil parameters were multiplied by a factor of 2.5 in order to be clearer on the RDA graph. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro and NFCon-Ro correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. *Abbreviations:* Soil total carbon concentration (tCs), soil total nitrogen concentration (tNs), soil organic matter concentration (OM), soil organic nitrogen concentration (Nor), soil soluble carbon concentration (Cso), soil soluble nitrogen concentration (Nso), soil pH (pH), soil Cation Exchange Capacity (CEC), soil conductivity (Con), soil ammonium concentration (NH_4), soil nitrate concentration (NO_3). 231
Figure 49 : Alpha diversity indices (Chao1 and Shannon). CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro and NFCon-Ro correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. Means ± standard error

followed by different letters (from the same shape: lower- or uppercase) are significantly different at p < 0.05 (Duncan's multiple range test), (n = 5) 232
Figure 50 : Effet de la co-culture sur les propriétés physico-chimiques du sol. CEC, C, N et MO réfèrent à la capacité d'échange cationique, au carbone (total et soluble), à l'azote (total, organique et soluble) et à la matière organique du sol. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés 255
Figure 51 : Impacts de la co-culture sur la qualité physico-chimique du sol. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés..... 257
Figure 52 : Effets des systèmes de culture sur les propriétés biologiques du sol au champ. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse, les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers 260
Figure 53 : Effets des systèmes de culture sur les activités microbiennes du sol, en conditions contrôlées. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse, les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers . 262
Figure 54 : Impact de nos systèmes de culture en conditions contrôlées sur la diversité microbienne du sol. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers 266
Figure 55 : Facteurs affectant l'accumulation du Ni. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers..... 268
Figure 56 : Rendements de biomasses sèches de *Alyssum murale* pour la deuxième année de culture au champ en Espagne. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro et NFCon-Ro correspondent aux traitements de la co-culture, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture, rotation, témoin positif de la co-culture et témoin non fertilisé de la co-culture, respectivement. Les moyennes ± écart-types suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à p < 0.05 (Test de comparaisons multiples de Duncan), (n = 5) 269
Figure 57 : Rendements de Ni pour la deuxième année de culture au champ en Espagne. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro et NFCon-Ro correspondent aux traitements de la co-culture, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture, rotation, témoin positif de la co-culture et témoin non fertilisé de la co-culture, respectivement. Les moyennes ± écart-types suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à p < 0.05 (Test de comparaisons multiples de Duncan), (n = 5) 271
Figure 58 : Les services écosystémiques rendus par l'introduction de la légumineuse dans les systèmes de culture d'agromine 276
Figure 59 : Effets de l'insertion d'une légumineuse dans un système de culture dédié à l'agromine 281

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différentes espèces de légumineuses utilisées dans les systèmes agricoles classiques (Source : Chambre d'Agriculture Poitou-Charentes)..... 25
Tableau 2 : Opérations réalisées pour chaque traitement au cours de l'expérience en conditions contrôlées dès le semis jusqu'à la récolte..... 50
Tableau 3 : Opérations réalisées pour chaque traitement au cours de l'expérience en rhizotrons du semis jusqu'à la récolte..... 57
Tableau 4 : Opérations réalisées pour chaque traitement au cours de l'expérience au champ en Espagne dès le semis jusqu'à la récolte (« A » et « V » correspondent à *Alyssum* et Vesce, respectivement)..... 67
Tableau 5 : Typologie des différentes associations entre les particules minérales et organiques des fractions < 200 µm des sols..... 73
Tableau 6 : Composition du mix (25 µl) pour la première PCR..... 82
Tableau 7 : Composition du mix (50 µl) pour la deuxième PCR..... 83
Tableau 8 : Composition du mix (20 µl) pour la qPCR..... 84
Table 9 : Physico-chemical soil characteristics at the harvest. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" correspond to co-cropping, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. N, C and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil physicochemical analysis) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)..... 134
Table 10 : Microbial biomasses and enzymatic activities in the soil at the harvest. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" correspond to co-cropping, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil microbial analysis) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)..... 135
Table 11 : Community-level physiological profiling. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" correspond to co-cropping, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. Means ± standard error in a line (for each index) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)..... 135
Table 12 : Alpha diversity indices. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" correspond to co-cropping, fertilizedmonoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil index) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)..... 137
Table 13 : Descriptive statistics and geostatistical analysis of Root Surface Area percentage (RSA, %) measured for co-cropping (Co), rotation (Ro) and fertilized monoculture (FMo). SD, CV and *Q* refer to the standard deviation, the coefficient of variation and *Q* value, respectively..... 173
Table 14 : Descriptive statistics and geostatistical analysis of soil total nitrogen content (N total, %), concentration of Ni-DTPA (Ni-DTPA, mg kg^{-1}), soil porosity (Porosity, %) and soil pH (pH) determined for co-cropping (Co), rotation (Ro) and fertilized monoculture (FMo). Min, Max, SD and CV refer to the minimum value, the maximum value, the standard deviation and the coefficient of variation respectively..... 174
Table 15 : Soil physico-chemical characteristics at the harvest. *Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS* correspond to rotation, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bare soil, respectively. C, N and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively. Means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5)..... 200

Table 16 : Typologies of different associations between mineral and organic particles of soil fractions < 200 µm 202
Table 17 : Soil physico-chemical and microbial biomass characteristics at harvest. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. N, C, Ni, MBC and MBN correspond to nitrogen, carbon, nickel, microbial biomass carbon and microbial biomass nitrogen, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil parameter) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5) 224
Tableau 18 : Bilan azoté pour la première année de culture au champ. Co, FCon-CoC, NFCon-CoC et BS correspondent aux traitements de la co-culture, au témoin positif (fertilisé) de la co-culture, au témoin négatif (non fertilisé) de la co-culture et au sol nu, respectivement 256
Tableau 19 : Estimation du coût des différentes actions appliquées dans les systèmes de culture utilisés. Les prix sont issus : « du Barème d'entraide régional 2016 - Chambre d'Agriculture de la Meuse » et ceux des produis correspondent aux moins chers, trouvés en ligne, sur internet 272
Tableau 20 : Analyses de l'eau du réseau urbain 322
Tableau 21 : Composition d'une microplaque Biolog Ecoplate de 96 puits 324

Liste des photographies

Photographie 1 : Dispositif expérimental en tube de culture en phytotron (culture de lentille et de ray-grass sur sol contaminé ; culture de lentille sur sable contaminé et inoculée par une souche de *Rhizobium*)..... 46
Photographie 2 : Mise en place des 35 pots (co-culture, rotation *Alyssum murale* – vesce) en conditions contrôlées (Juin 2015) 51
Photographie 3 : Extraction de la solution de sol à l'aide des bougies poreuses (mini-rhizons) (mai 2016) 53
Photographie 4 : Etape intermédiaire dans la préparation des échantillons (filtration dans des boîtes Millipore)..... 54
Photographie 5 : Dispositif des rhizotrons avec scanners mis en place en chambre de culture 58
Photographie 6 : Mesures du pourcentage de la surface couverte par les racines (les racines sont en couleur rouge)..... 59
Photographie 7 : Mesures de la porosité (les pores sont en couleur rouge)..... 60
Photographie 8 : Maille crée pour la mesure du pH à l'aide du pH mètre de contact..... 61
Photographie 9 : Bruyères à balai arborescentes (*Erica scoparia*) avant le labour du champ. 63
Photographie 10 : Situation du champ après labour (Avril 2015)..... 64
Photographie 11 : Mise en place de 28 parcelles 66
Photographie 12 : a) culture en pots, b) pseudo fractionnement granulo-densimétrique des sols rhizosphériques tamisés à 2 mm après agitation contrôlée dans l'eau, c) sédimentation et prélèvement à 4 min 40 sec, d) fixation à l'osmium et déshydratation acétonique, e) inclusion dans une résine Epon, f) observation des coupes ultrafines en MET..... 73
Photographie 13 : Aspect de la lentille sur le sol serpentinique de la parcelle Triangulo (T) après 6 semaines de culture..... 117
Photographie 14 : Aspect de la lentille après 3 semaines de culture sur le sol serpentinique de la parcelle Triangulo (T), n'ayant reçu aucun amendement, amendé avec du gypse et dont les plantes ont reçu ou non une pulvérisation d'acide salycilique..... 118
Photographie 15 : Aspect de la lentille après 2 semaines de culture sur le sol serpentinique de la parcelle Triangulo (T), amendé avec du nitrate de calcium 118
Photographie 16°: Effet de doses croissantes de $CaSO_4$ (0, 100, 300, 600, 900 mg de Ca kg^{-1}) avec ajout ou non de 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4, sur le développement de la lentille 119
Photographie 17 : Effet de doses croissantes de $CaSO_4$ (0, 300 et 600 mg Ca kg^{-1} + 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4) sur le développement de différentes légumineuses (fève, haricot, pois et vesce)..... 120
Photographie 18 : Nos sept traitements juste avant la récolte pour la deuxième année de culture au champ en Espagne. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro et BS correspondent aux traitements de la co-culture, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture, rotation, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture et au sol nu, respectivement 270

Valorisation des travaux de recherche

Publications

Ramez Saad, Ahmad Kobaissi, Christophe Robin, Guillaume Echevarria, Emile Benizri, 2016. Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: a pre-requisite for optimization of agromining. *Environmental and Experimental Botany*, 131:1-9, June 2016, Doi:10.1016/j.envexpbot.2016.06.010.

Ramez F. Saad, Ahmad Kobaissi, Bernard Amiaud, Julien Ruelle, Emile Benizri. Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume. En cours de soumission.

Ramez F. Saad, Ahmad Kobaissi, Xavier Goux, Magdalena Calusinska, Guillaume Echevarria, Petra Kidd, Emile Benizri. Developing Ni-agromining by associating *Alyssum murale* with a leguminous plant: an *in-situ* experiment on an ultramafic site in Spain. En cours de soumission.

Ramez F. Saad, Ahmad Kobaissi, Gaylord Machinet, Geneviève Villemin, Guillaume Echevarria, Emile Benizri. Crop rotation of a hyperaccumulator plant and a legume: improving Ni-agromining, the structure and the biofunctioning of an ultramafic soil. Soumis dans Ecological Research.

Ramez F. Saad, Ahmad Kobaissi, Guillaume Echevarria, Petra Kidd, Magdalena Calusinska, Xavier Goux, Emile Benizri. What is the influence of new agromining cropping systems on soil biological properties? En cours de soumission.

Celestino Quintela-Sabarís, **Ramez Saad**, Emile Benizri, Petra S. Kidd, 2017. Improving Ni-phytomining with Mediterranean hyperaccumulators: the role of fertilization and co-cropping with legumes. Environmental and Experimental Botany. En cours de soumission.

Communications orales

Ramez Saad, Ahmad Kobaissi, Guillaume Echeverria, Petra Kidd and Emile Benizri. Developing Ni-agromining by associating *Alyssum murale* with a leguminous plant: an *in-situ* experiment on an ultramafic site in Spain. 9th International Conference on Serpentine Ecology (9th ICSE), 4-9/06/2017, Tirana-Pogradec, Albania.

Petra Kidd, Tania Pardo, José Luis Soto-Vázquez, **Ramez Saad**, Beatriz Rodriguez-Garrido, Ángeles Prieto-Fernández, Guillaume Echevarria and Emile Benizri. Implementing nickel agromining field trials in an ultramafic area of NW Spain. 9th International Conference on Serpentine Ecology (9th ICSE), 4-9/06/2017, Tirana-Pogradec, Albania.

Claire Hazotte, Baptiste Laubie, **Ramez Saad**, Marie Rue, Emile Benizri, Guillaume Echevarria, Jean Louis Morel, Petra Kidd and Marie-Odile Simonnot. Energy recovery from nickel hyperaccumulator plants. 9th International Conference on Serpentine Ecology (9th ICSE), 4-9/06/2017, Tirana-Pogradec, Albania.

Communications affichées

Tania Pardo, J.L. Soto-Vázquez, Á. Prieto-Fernández, B. Rodriguez-Garrido, **R. Saad**, M. Loureiro Viñas, G. Echevarria, E. Benizri and P.S. Kidd. Assessing the agromining potential

of Ni-hyperaccumulating plant species at field-scale in ultramafic soils of NW Spain. 14th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE), 16-20/07/2017, ETH Zurich, Switzerland.

Claire Hazotte, Baptiste Laubie, **Ramez Saad**, Emile Benizri, Guillaume Echevarria, Petra Kidd, Marie-Odile Simonnot. 2017. Caractérisation de plantes hyperaccumulatrices pour la production d'énergie et de sels de nickel. 16ème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), 11-13/07/2017, Nancy, France.

Ramez Saad, Ahmad Kobaissi, Bernard Amiaud, Julien Ruelle, Emile Benizri. Changes in soil physicochemical characteristics and root architecture of *Alyssum murale* cropped with a legume on a serpentine soil. 9th International Conference on Serpentine Ecology (9th ICSE), 4-9/06/2017, Tirana-Pogradec, Albania.

Celestino Quintela-Sabarís, Serafín González-Prieto, **Ramez Saad**, Emile Benizri, Laurent Philippot and Petra Kidd. Improving Ni-agromining with Mediterranean hyperaccumulators: the role of fertilization and co-cropping with legumes. 9th International Conference on Serpentine Ecology (9th ICSE), 4-9/06/2017, Tirana-Pogradec, Albania.

Ramez Saad, Ahmad Kobaissi, Bernard Amiaud, Julien Ruelle, Emile Benizri. Changes in soil physicochemical characteristics and root architecture of *Alyssum murale*, a hyperaccumulator plant, cropped with a leguminous on a serpentine soil. 23rd International Scientific Conference of LAAS, 6-7/04/2017, Beirut, Lebanon.

Ramez Saad, Guillaume Echevarria, Ahmad Kobaissi, Emile Benizri, 2016. Assessment of ecosystem services rendered by agromining of nickeliferous soils: association of leguminous and hyperaccumulator. 19th Nitrogen Workshop, 27-29/06/2016, Skara, Sweden.

Ramez Saad, Ahmad Kobaissi, Christophe Robin, Guillaume Echevarria, Emile Benizri, 2016. Optimiser les services écosystémiques rendus par l'Agromine des sols serpentiniques : Association légumineuses et plantes hyperaccumulatrices. Séminaire de l'Ecole Doctoral RP2E 2016, 28/01/2016, Nancy, France.

Ramez Saad, Guillaume Echevarria, Ahmad Kobaissi, Emile Benizri, 2015. Assessment of ecosystem services rendered by agromining of nickeliferous soils: association of leguminous and hyperaccumulator. Rhizosphere 4, 21-25/06/2015, Maastricht, Netherlands.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Parmi les procédés de restauration des sols, les techniques industrielles de remédiation sont très onéreuses et peu respectueuses de l'environnement. Ainsi, le développement de méthodes utilisant des plantes pour dépolluer l'environnement présente un intérêt croissant ces dernières décennies. Dans ce cadre, la phytoremédiation - technique considérée comme étant respectueuse de l'environnement, avec un rapport coût-efficacité notable, et socialement acceptée - consiste en l'utilisation de plantes particulières, qualifiées d'hyperaccumulatrices de métaux, et de leurs microorganismes telluriques associés, afin de dépolluer des sols contaminés. Le succès de la phytoextraction est ainsi lié à la production d'une biomasse importante par les végétaux utilisés et à la capacité de ces plantes à extraire le métal depuis leurs racines jusque dans leurs parties aériennes, où ils seront accumulés.

L'agromine est l'ensemble de la filière qui consiste à coupler à la phytoextraction une métallurgie particulière adaptée aux biominerais ainsi récoltés (métaux biosourcés). Il s'agit d'une « technologie verte » qui est aussi bien écologique qu'esthétique, lorsqu'elle est convenablement implantée. Elle est, de plus, bien acceptée par le public et son avantage majeur reste son faible coût par rapport aux méthodes classiques de décontamination des sols ou d'extraction minière. De plus, elle présente l'avantage de préserver, voire restaurer, les fonctions écologiques des sols. Ainsi, en regard à ses nombreux atouts, l'agromine ne présente que peu de limitations : l'efficacité de cette technique est limitée, en particulier, par le climat ainsi que par la disponibilité des métaux dans les sols/substrats. La composition du couvert végétal apparaît également comme un facteur déterminant, car elle influence la diversité de la communauté microbienne rhizosphérique et est à l'origine de groupes fonctionnels microbiens telluriques plus diversifiés. Ainsi, l'association de différentes espèces végétales (hyperaccumulatrice et non accumulatrice) pourrait être une stratégie à envisager pour aboutir à une meilleure phytoextraction et optimiser l'agromine.

Les sols serpentiniques qui contiennent naturellement des quantités importantes en éléments traces comme le nickel, sont par contre pauvres en éléments nutritifs et en particulier en azote. Cette déficience limite la croissance et le développent des plantes hyperaccumulatrices et donc la production d'une biomasse végétale importante qui permettrait d'extraire des quantités élevées en métaux. Ainsi, l'agromine dont les objectifs sont de permettre un retour à des sols de « qualité » en vue de leur réhabilitation à des fonctions agronomiques classiques, peut voir, dans ces environnements pauvres, son intérêt limité.

Or, de nombreuses études, concernant des approches agronomiques classiques, ont montré l'intérêt de la mise en place de cultures intermédiaires ou de plantes compagnes, qui dans le

cas des légumineuses, améliorent notablement la fertilité des sols et par voie de conséquence, la croissance et le développement de la plante associée (culture de rente). Par ailleurs, l'importance de la fertilisation organique azotée sur les processus de phytoextraction, a été confirmée en termes de mobilité et de biodisponibilité des métaux dans le sol, améliorant également les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol.

Dans les systèmes de production agricole dans lesquels les légumineuses sont utilisées, il a été largement montré que la fixation atmosphérique de l'azote constitue une source d'azote alternative pour les légumineuses. Ceci explique pourquoi ces dernières ont été utilisées dans les systèmes agricoles depuis des décennies et montrent actuellement un regain d'intérêt. Lorsqu'elles ne sont pas récoltées, les légumineuses font partie des cultures intermédiaires présentes entre deux cultures de rente, ou de couverts accompagnant la culture de rente ; ceci correspondant à des développements agronomiques récents. En effet, utilisées sans usage marchand, ni exportation de la parcelle, les légumineuses constituent un intrant dans les systèmes de productions végétales. Elles sont à l'origine de plusieurs services écosystémiques, comme ceux de support et/ou de régulation avec, en particulier, une protection contre l'érosion, une prévention de la concurrence des adventices, un enrichissement du sol en éléments minéraux, tel l'azote issu de la fixation symbiotique, un stockage d'azote organique dans le sol, lorsqu'elles sont détruites et enfouies. Elles sont donc à l'origine d'une amélioration de la fertilité des sols en augmentant le stockage de l'azote. Elles améliorent la qualité de la matière organique du sol ainsi que l'activité et la diversité des communautés microbiennes. Corrélativement, elles permettent une réduction de l'utilisation d'intrants chimiques, tels les herbicides et insecticides. En effet, l'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture permet une réduction de l'apparition de maladies du fait de l'interruption des cycles des insectes et des agents pathogènes. De plus, la présence d'un couvert de légumineuse empêche les mauvaises herbes d'envahir les champs agricoles impliquant une application d'herbicides réduite. Concernant la qualité physico-chimique des sols, utilisées comme engrais vert et donc détruites et enfouies dans le sol, les légumineuses permettent de diminuer le compactage du sol grâce à une bonne structuration de celui-ci par la formation d'agrégats plus stables, ce qui conduit ainsi à une meilleure aération du sol. En outre, du fait de la nature de leurs exsudats racinaires, qui comprennent des acides organiques, il a été noté une meilleure disponibilité du phosphore et du potassium.

Ainsi, l'enjeu de cette thèse est de cerner si les intérêts largement démontrés de l'introduction de légumineuses dans les systèmes agricoles classiques pourraient être appliqués aux

méthodes de réhabilitation des sols ultramafiques, telle l'agromine, avec comme hypothèses scientifiques sous-tendues, une amélioration de la qualité biologique, physique et chimique de ces sols.

L'ensemble de ces travaux s'inscrit dans une stratégie de recherche menée au cours de ma thèse qui vise à répondre aux questionnements scientifiques suivants : quel(s) système(s) de culture (introduction d'une légumineuse en tant que culture intermédiaire ou comme plante compagne) :

- est (sont) plus efficient(s) en termes de rendement de biomasse végétale et de nickel,
- implique (ent) la mise en place d'une communauté bactérienne plus diversité en termes de génomes et de fonctions,
- favorise (ent) le retour à un sol « de qualité » avec une amélioration de la fertilité de ce dernier, permettant un retour à des fonctions agronomiques classiques du sol ultramafique.

Le **premier chapitre** correspond à une synthèse bibliographique qui présentera, dans un premier volet, les processus de la phytoremédiation et de l'agromine. Puis seront exposés les leviers qui permettent actuellement d'optimiser l'agromine. Nous nous intéresserons ensuite aux avantages que l'implantation des légumineuses peut fournir dans les systèmes de production agricoles classiques. Enfin, nous présenterons quels sont les principaux indicateurs de la qualité physico-chimique et biologique des sols qui sont actuellement utilisés dans la pratique agricole.

Les dispositifs expérimentaux mis en place, aussi bien en conditions contrôlées que *in situ*, au champ, ainsi que l'ensemble des méthodes utilisées, seront présentés dans le **second chapitre**. Nous aborderons ensuite les résultats obtenus à l'issue de ce doctorat. Ceux-ci seront présentés sous forme d'articles scientifiques.

La mise en place de systèmes de culture basés sur l'introduction d'une légumineuse nécessite de contrôler, dans un premier temps, que cette dernière est capable de se développer sur des sols riches en nickel et de former des nodules fonctionnels (**troisième chapitre)**.

Dans le **quatrième chapitre**, nous présenterons les résultats obtenus après mise en place au champ, d'un essai grandeur nature, dont l'objectif a été de cerner l'effet de l'association d'une légumineuse et d'une plante hyperaccumulatrice de nickel. Nous souhaitions appréhender, sur un cycle complet de culture, si ces nouveaux systèmes culturaux permettent d'améliorer la production de biomasse, la phytoextraction du nickel et la qualité biologique du sol ultramafique sur lequel l'essai a été implanté.

Au travers des **cinquième et sixième chapitres**, nous avons souhaité comprendre les impacts que peut avoir la mise en place de ces nouveaux systèmes culturaux sur la structure et les propriétés physico-chimiques d'un sol ultramafique, sur son biofonctionnement, ainsi que sur l'efficience de la phytoextraction du nickel par la plante hyperaccumulatrice. Pour cela, des expérimentations en conditions contrôlés ont été développées (cultures en pots et en rhizoboxes).

Le **septième chapitre**, s'intéressera à l'étude de l'impact de ces nouveaux systèmes de culture intégrant une légumineuse et dédiés à l'agromine sur la diversité bactérienne en lien avec les caractéristiques physico-chimiques d'un sol ultramafique. Cette étude reposait sur l'hypothèse qu'une diversité végétale accrue, du fait de l'association de deux espèces végétales, modifiait mais aussi augmentait la diversité bactérienne.

Les différents éléments de connaissance générés au cours de ce travail seront rassemblés et discutés dans la partie : **discussion générale**. Il s'agira de répondre aux questions et hypothèses énoncées en début de thèse et de définir, à partir de l'ensemble des résultats acquis, si ces nouveaux agro-écosystèmes associant une hyperaccumulatrice et une légumineuse sont viables et présentent une faisabilité technique et économique acceptables pour la filière de l'agromine.

Enfin, nous conclurons et proposerons plusieurs pistes de perspectives à ce travail, qui pourraient, de manière plus globale, permettre l'optimisation de l'agromine.

CHAPITRE 1. Etat de l’art

Chapitre 1. Etat de l'art

1. Le sol : un compartiment complexe et dynamique

Le sol, ou « couverture pédologique », est la couche la plus externe de la croûte terrestre. L'épaisseur de cette mince pellicule est en moyenne de 1 à 2 m. Le sol est une zone extrêmement dynamique, lieu d'un remaniement permanent de ses constituants. La partie superficielle du sol est la couche la plus fertile, c'est-à-dire les 5 à 30 premiers centimètres de profondeur. Elle correspond à la litière et à l'horizon organo-minéral de surface. La litière s'y transforme, la faune et la microflore y sont les plus actives et les végétaux s'y enracinent préférentiellement. Cette couche est le site principal d'absorption de l'eau et des éléments minéraux par les racines ; c'est aussi le lieu des réactions biochimiques de transformation des matières organiques par les microorganismes du sol.

Le sol est l'environnement le plus complexe sur la planète où s'interfèrent des notions de chimie, de microbiologie et de physique. Il se caractérise par une composition animale, végétale et microbiologique extrêmement diversifiée et influencée par de nombreux facteurs. Le sol remplit plusieurs fonctions essentielles telles que le support physique et chimique des couverts végétaux, de la mésofaune et de la microfaune. Il favorise aussi le stockage des nutriments et la filtration des eaux (Morel *et al.,* 2014). Les sols abriteraient près de 80% de la biomasse vivante de notre planète et l'abondance des microorganismes dans la couche arable, bien que variant selon le type de sol et les conditions climatiques, peut atteindre jusqu'à 20% du biote total de l'écosystème sol. Concernant les bactéries, il est possible d'en dénombrer jusqu'à 10^8-10^9 par gramme de sol et ce dernier constitue donc le principal réservoir en termes de nombre et de diversité. La microflore bactérienne tellurique a une importance considérable dans les cycles biogéochimiques, comme celui du carbone ou de l'azote. L'interface sol-racine, ou rhizosphère, est définie comme le volume de sol entourant les racines des plantes vivantes et influencé par l'activité racinaire (Hartmann *et al.*, 2008). Le volume de la rhizosphère peut varier à la fois spatialement et temporellement selon les espèces végétales et les propriétés physico-chimiques du sol (Hinsinger *et al.*, 2005). Les rhizobactéries présentes dans le sol rhizosphérique sont influencées par l'activité racinaire (Sessitsch et Puschenreiter, 2008 ; Weyens *et al.*, 2009). Par conséquent, la rhizosphère représente une zone unique et dynamique d'interactions plante-microbes où l'activité biologique intense et la rhizodéposition racinaire sont à l'origine de gradients, en particulier concernant les paramètres physico-chimiques et biologiques, plus on s'éloigne de la racine. Les plantes peuvent favoriser l'abondance de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère (Vessey, 2003 ; Thijs *et al.*, 2016). En effet, certaines bactéries, qualifiées de Plant Growth

Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Lugtenberg et Kamilova, 2009), ont reçues beaucoup d'attention en raison de leurs effets bénéfiques sur la croissance des plantes (Mendes *et al.*, 2013). Ainsi, en agriculture, certaines de ces bactéries d'intérêt peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique contre des parasites de végétaux (Lucy *et al.*, 2004) tout en montrant, par ailleurs, des effets bénéfiques sur la croissance de plantes. La capacité des bactéries hétérotrophes à dégrader une large variété de composés organiques est exploitée pour le traitement des sols pollués dans des stratégies de bioremédiation ou pour le traitement des eaux usées (Furukawa, 2003). D'autres bactéries, qualifiées d'endophytiques, colonisent les tissus internes des plantes vivantes et ensuite établissent une relation avec les plantes hôtes sans avoir d'effets négatifs sur leur croissance (Zheng *et al.*, 2016). Ainsi, la plante hôte fournit des exsudats et crée des habitats pour ces bactéries (Mendes *et al.*, 2013). Ces dernières influenceront la disponibilité des nutriments pour les végétaux tels que l'azote (N), le fer (Fe) ou le phosphore (P), (Rodríguez et Fraga, 1999 ; Vessey, 2003). Cependant, la majorité de ces bactéries ne sont actuellement ni identifiées ni caractérisées car elles ne peuvent être cultivées *in vitro* sur des milieux de culture (Rappé et Giovannoni, 2003). C'est pourquoi, à partir des techniques de microbiologie pasteurienne, il est difficile de caractériser et quantifier avec certitude la biomasse microbienne (Kabata-Pendias, 2011). Ces limites ont été à l'origine du développement d'approches permettant de s'en affranchir, comme en particulier, l'arrivée de la métagénomique dans les années 1990. Ceci a restreint l'étude des bactéries à leur ADN directement extrait de l'environnement (McHardy et Rigoutsos, 2007). L'ADN, alors collecté à partir d'échantillons environnementaux (le métagénome), peut être analysé par des techniques permettant de caractériser la structure et/ou la diversité d'une communauté bactérienne complexe (Ramette, 2009). Récemment les nouvelles techniques de séquençage d'ADN haut débit permettent d'obtenir des gigabases de données de séquences issues de bactéries non cultivables (Janda et Abbott, 2007).

Ainsi, le sol est un milieu structuré. Il offre une diversité d'abris de toutes tailles pour une multitude d'organismes vivants : microorganismes, animaux, végétaux. C'est un immense réservoir de la biodiversité microbienne et faunistique. Certains microorganismes sont indispensables à l'assimilation et au fonctionnement de l'écosystème naturel (formation du sol à partir de la roche-mère, chaînes trophiques, nutrition des plantes...).

2. Les sols serpentiniques et leur flore naturelle

D'une façon naturelle, le sol peut contenir des éléments traces métalliques (ETM) provenant de la roche-mère d'origine. La majorité des sols ultramafiques en sont naturellement riches. Il s'agit de sols issus de la dégradation de roches magmatiques ultrabasiques contenant des quantités importantes d'éléments traces métalliques dont le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le fer (Fe), le titane (Ti), le cobalt (Co) et le nickel (Ni). Ce dernier est généralement contenu dans des minéraux ferromagnésiens (Berazaín *et al.*, 2007 ; Chaney *et al.*, 2008).

Ces sols naturellement riches en métaux, communément qualifiés de sols bruns à serpentine, sont relativement répandus dans le monde (Krämer, 2010) et rencontrés en Espagne, Albanie, Grèce, Malaisie, Indonésie, Suède, Norvège, Finlande, dans l'archipel de Helgoland, le Royaume-Uni, l'Autriche, la République Tchèque, en Suisse, Italie, Portugal et en France (Figure 1). Par exemple, en Albanie, les sols serpentiniques occupent 100000 hectares des 700000 hectares du total des terres agricoles.

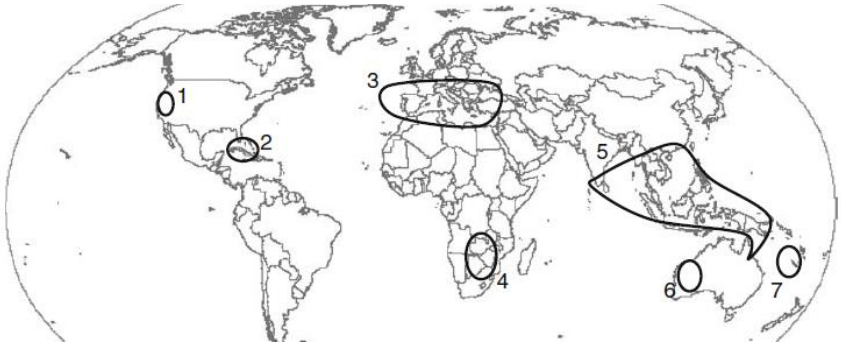


Figure 1 : Distribution des sols serpentiniques (d'après Baker et Brooks, 1989)

La teneur moyenne en nickel total de ce type de sol, plus communément appelé sol à serpentines, est comprise entre 1400 et 2000 mg de $Ni.kg^{-1}$ (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Le nickel est soit lié aux particules minérales et organiques du sol (Chardot *et al.*, 2007), soit sous forme échangeable. Ce nutriment, qui devient toxique au-delà de certaines concentrations, produit des effets néfastes sur la croissance et le développement des plantes (Chardot *et al.*, 2005). La disponibilité du nickel dans le sol est contrôlée par plusieurs facteurs comme la teneur en argile, le potentiel redox (Eh), le pH et le type de sol. Les faibles valeurs du Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux (Chardot *et al.*, 2005). En outre, lorsque le pH augmente, la fraction disponible du nickel diminue (Everhart *et al.*, 2006). Les sols serpentiniques présentent également des concentrations élevées en magnésium et une carence en éléments nutritifs comme N, P, K, Ca et Si (Shallari *et al.*, 1998 ; Boyd and Jaffré, 2009).

Du fait de leur nature chimique extrême, les sols serpentiniques montrent une flore épigée qui leur est caractéristique. Cette flore inclue des espèces qui tolèrent la présence des métaux et d'autres qui ont la capacité d'en accumuler de grandes quantités, surtout dans leurs parties aériennes (Bani *et al.*, 2009). En présence de métaux, les plantes réagissent ainsi différemment selon leur niveau de tolérance à ceux-ci. En dehors de plantes dites « normales », pour lesquelles une concentration excessive de métaux est toxique, il existe des plantes qui présentent un comportement particulier en présence d'une concentration importante de métal dans le sol (Baker et Brooks, 1989). Certaines tolèrent l'entrée du métal dans leurs racines et sont capables de l'extraire si la concentration du métal dans le sol est très importante, ce sont les excluantes, chez lesquelles le métal n'est pas transporté vers les tiges. Les bioindicatrices sont celles dont la teneur en métal dans leurs tissus est proportionnelle à la teneur en métal dans le sol (Krämer, 2010). Le terme de plantes hyperaccumulatrices a été proposé la première fois par Jaffré *et al.* (1976) lorsqu'ils ont observé l'accumulation de nickel dans *Sebertia acuminata* (*Sapotaceae*). Depuis, cela concerne des plantes qui tolèrent de très fortes concentrations de métaux et accumulent ceux-ci dans leurs parties aériennes avec des valeurs 100 à 1000 fois supérieures à celles trouvées chez les plantes non-hyperaccumulatrices. Il a été découvert 42 familles de plantes hyperaccumulant les métaux (principalement des Brassicacées). Parmi les 400 espèces appartenant à ces familles, 75 % hyperaccumulent le nickel (Krämer, 2010). Ainsi, un hyperaccumulateur de nickel est défini comme étant « une plante dans laquelle une concentration de nickel d'au moins 1000 $mg.kg^{-1}$ a été enregistrée dans la matière sèche des tissus aériens, dans au moins un spécimen poussant dans son habitat naturel », (Baker et Brooks, 1989 ; Reeves *et al.*, 1996).

2.1. La phytoremédiation et les plantes hyperaccumulatrices

La phytoremédiation est une technologie qui utilise des plantes dites hyperaccumulatrices possédant la capacité d'accumuler dans leurs tissus des concentrations très élevées de métaux lorsqu'elles se développent sur des sols contaminés ou naturellement riches en métaux (Abou-Shanab *et al.*, 2008). L'hyperaccumulation de nickel correspond à une concentration excédant 0,1 % de nickel de la biomasse sèche aérienne de la plante (Reeves *et al.*, 1996) et à un facteur de bioconcentration supérieur à 1 (Abou-Shanab *et al.*, 2003). La capacité à accumuler de telles quantités de nickel est due à une adaptation de ces plantes aux sols métallifères (naturels ou contaminés). Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la faculté de certaines espèces végétales à hyperaccumuler les métaux, c'est-à-dire à les stocker et les tolérer (Chardot *et al.*, 2007 ; Bani *et al.*, 2009). Ces plantes ont, en effet, mis en place des

mécanismes de tolérance aux métaux comme le transfert du métal absorbé vers des compartiments cellulaires d'activité physiologique faible et dans les organes caducs, telles les feuilles (Brooks *et al.*, 1998). Elles montrent également des mécanismes d'élimination des métaux prélevés (par lessivage ou par sénescence des feuilles). En outre, elles seraient adaptées à leur environnement biotique et abiotique, en montrant des mécanismes de défense vis-à-vis de stress biotiques (hypothèse la plus largement soutenue) et/ou des mécanismes adaptatifs vis-à-vis de paramètres environnementaux. En effet, l'accumulation de nickel dans les organes végétaux pourrait conférer une défense de la plante contre les herbivores (Boyd, 2004 ; Boyd et Jaffré, 2009). Par ailleurs, les fortes concentrations de nickel empêcheraient la pénétration et la propagation de ravageurs et d'agents pathogènes. Il apparait ainsi dans la littérature un consensus général autour de l'idée que les plantes hyperaccumulatrices ont développé des stratégies de défense élémentaire à la fois contre les herbivores et les agents pathogènes (Poschenrieder *et al.*, 2006). Concernant les paramètres environnementaux, elles sont adaptées aux sols secs et présentent une taille réduite par rapport aux individus de la même espèce se développant sur des sols non serpentiniques (métallophytes facultatives ou non-métallophytes) ; l'accumulation de nickel réduirait la transpiration cuticulaire (Boyd et Martens, 1998 ; Brooks *et al.*, 1998). Elles ont un système racinaire fortement développé, très certainement pour faciliter l'absorption de l'eau et des nutriments (Nascimento et Xing, 2006). Enfin, elles seraient à l'origine de l'enrichissement de la surface du sol en nickel, par le biais de leurs feuilles caduques, défavorisant ainsi le développement d'autres espèces, non-tolérantes aux métaux (Boyd et Martens, 1998 ; Brooks *et al.*, 1998). C'est le concept d'allélopathie élémentaire.

Alyssum murale (Waldst & Kit.), nouvellement rebaptisée *Odontarrhena muralis* Schur. (Španiel *et al.*, 2015) est une plante hyperaccumulatrice de nickel qui a reçu le plus d'attention en raison de sa capacité extraordinaire d'extraire ce métal des sols et de l'accumuler dans ses tissus. Du fait de cette capacité à prélever des quantités considérables de nickel à partir de sols, ces hyperaccumulateurs ont éveillé l'intérêt des scientifiques dont les travaux concernent la phytoremédiation (aussi plus généralement appelée phytoextraction). *Alyssum murale,* largement présente dans les zones ultramafiques du pourtour méditerranéen, est capable d'accumuler le nickel jusqu'à plus de 2% de son poids sec (Abou-Shanab *et al.*, 2008). La nécessité de gérer les sols pollués en nickel ou naturellement riches en cet élément, implique l'étude du comportement de cette plante dans des conditions *in situ*. Des études antérieures constatent clairement que le potentiel de phytoextraction de différentes populations de *Alyssum murale* peut varier en fonction du site (Chardot *et al.*, 2005). Parmi les facteurs sous-

tendant ces variations, la fertilité des sols peut affecter l'efficacité de la phytoextraction et l'apport d'une fertilisation minérale ou organique permet l'amélioration de son rendement (Bani *et al.*, 2007).

3. Les techniques de réhabilitation des sols : la phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation de plantes pour remédier des sites contaminés ou des zones délaissées, naturellement riches en éléments toxiques. L'idée d'utiliser des plantes pour extraire les métaux lourds du sol a été évoqué la première fois en 1983, mais le concept a été mis en œuvre dans une période plus récente (Henry, 2000).

La phytoremédiation apparait ainsi comme une technologie aussi bien écologique qu'esthétique, lorsqu'elle est convenablement implantée. Elle est, de plus, bien acceptée par le public et son avantage majeur reste son faible coût par rapport aux méthodes classiques de décontamination des sols. Par exemple, le coût de dépollution d'une acre de sol contaminé (environ 40 ares) sur 50 cm de profondeur est quatre à six fois plus faible lorsque ceci est envisagé avec des plantes que par excavation classique (Henry, 2000 ; Garbisu et Alkorta, 2001 ; Ghosh et Singh, 2005). Ainsi, la phytoremédiation se répand comme une alternative rentable aux méthodes conventionnelles à coût élevé. Elle est considérée comme une "révolution verte" dans le domaine des technologies innovantes (Chaney *et al.*, 1997).

La phytoextraction des métaux par l'utilisation de végétaux et ainsi la réduction de leur concentration à des niveaux environnementaux acceptables peut être également considérée comme un moyen de restauration de la qualité biologique des sols (Thomsen *et al.*, 2012). En effet, il a été constaté qu'à la suite de la mise en place du procédé de phytoremédiation, les activités enzymatiques microbiennes du sol, qui sont pour la plupart à la base des cycles biogéochimiques, augmentent. Par conséquent, la remédiation des métaux des sols serpentiniques permettrait de restaurer les fonctions écologiques des sols et le retour à des sols de « qualité » qui pourraient, à plus ou moins long terme, être réhabilités à des fins agricoles à grandes échelles, par les populations locales.

3.1. Les mécanismes d'hyperaccumulation

La phytoextraction est le processus par lequel les espèces végétales, qualifiées d'hyperaccumulatrices, donc d'hypertolérantes aux métaux (Krämer, 2010), transportent de grandes quantités de métaux du sol dans leurs racines puis vers les parties aériennes (Chaney *et al.*, 1997). Une phytoextraction efficace exige à la fois une plante avec une capacité génétique et agronomique optimale d'extraction des métaux du sol, mais aussi une capacité à

résister à leur toxicité (Gendre *et al.*, 2007). Les mécanismes utilisés par les plantes pour hyperaccumuler un métal consistent en trois étapes : l'absorption du métal par les racines, son transport dans les parties aériennes et enfin son stockage sous des formes non toxiques (Gendre *et al.*, 2007).

3.1.1. Distribution des métaux dans les organes végétaux

La voie principale d'assimilation de nickel est l'absorption par les racines. Elle concerne la forme ionique du métal. Après solubilisation du nickel au sein de la rhizosphère, l'absorption du Ni^{2+} par les racines peut se faire de deux manières : une diffusion passive à travers l'apoplasme ou un transport actif dans le symplasme (Yang *et al.*, 2005), selon la concentration et les espèces végétales (Ghosh et Singh, 2005 ; Jabeen *et al.*, 2009).

Après absorption, les métaux sont ensuite acheminés vers l'endoderme et cela toujours de deux manières, dans l'apoplasme (Eapen et D'Souza, 2005) et dans le symplasme grâce à des transporteurs spécialisés (Yang *et al.*, 2005). Sous contrainte des cadres de Caspary, le transport se fait ensuite uniquement par le symplasme et une fois dans le xylème, les métaux sont transportés par la sève brute (Eapen et D'Souza, 2005 ; Jabeen *et al.*, 2009).

Une fois absorbés, les ETM ne sont pas toujours transportés sous forme libre. Ils peuvent être, en effet, rapidement complexés dans le cytoplasme à des agents chélatants, comme l'acide citrique ou malique (Yang *et al.*, 2005 ; Nascimento et Xing, 2006) mais également l'histidine (Singer *et al.*, 2007 ; Richau *et al.*, 2009) et la nicotiamine (Verbruggen *et al.*, 2009), afin d'être convertis en formes moins toxiques. Les métaux peuvent ensuite se retrouver dans plusieurs compartiments cellulaires des parties aériennes comme le mésophylle, l'épiderme ou encore les trichomes (Eapen et D'Souza, 2005). Pour ce qui est du nickel, il se trouve généralement à 60-70% au niveau des parois cellulaires (Yang *et al.*, 2005), mais de façon plus générale, les ETM se trouvent en forte concentration au niveau des vacuoles car elles sont moins sensibles aux oxydations que les autres organites (Eapen et D'Souza, 2005 ; Yang *et al.*, 2005).

Le rapport de concentration en métal dans les parties aériennes sur celle dans les racines, appelé facteur de translocation (TF) (Lebeau *et al.*, 2008), doit être supérieur à 1 pour une phytoremédiation correcte (Nascimento et Xing, 2006). Ainsi, l'efficience de la phytoextraction est liée d'une part, à la production d'une biomasse importante par les végétaux utilisés et d'autre part, à leur capacité à absorber et à transporter le métal vers leurs parties aériennes (Ma *et al.*, 2011).

3.1.2. Rôles des microorganismes dans la phytoextraction

La rhizosphère contient de 10 à 100 fois plus de microorganismes par gramme de sol que le sol non rhizosphérique, du fait de la libération de composés carbonés et azotés, les rhizodépôts (Cunningham et Ow, 1996). Ainsi, les plantes interagissent étroitement avec les microbes rhizosphériques dont certains peuvent améliorer d'une part, leur croissance et leur développement en augmentant l'absorption des nutriments et d'autre part, leur résistance aux agents pathogènes telluriques et à différents stress (Lebeau *et al.*, 2008). Les organismes rhizosphériques peuvent également modifier la mobilité et la disponibilité des métaux présents dans le sol (Abou-Shanab *et al.*, 2003 ; Bani *et al.*, 2007 ; Lebeau *et al.*, 2008). Des processus tels que la transformation chimique, la chélation et la protonation conduiront à la mobilisation des ETM (Kidd *et al.*, 2009 ; Cabello-Conejo *et al.*, 2014). De plus, certaines bactéries produisent des acides organiques, capables de dissoudre les silicates, rendant ainsi les ETM plus disponibles (Khan, 2005 ; Lebeau *et al.*, 2008 ; Braud *et al.*, 2009). Par exemple, l'oxalate, le malate et le citrate sont quelques-uns des acides organiques les plus importants identifiés dans les exsudats microbiens (Jones *et al.*, 1996 ; Lipton *et al.*, 1987). Ainsi, les interactions entre plante et microbes influencent la mobilité et la disponibilité des ETM pour les plantes (Sessitsch *et al.*, 2013), favorisant le transfert des ETM de la rhizosphère à la plante (Whiting *et al.*, 2001) et donc la phytoextraction.

Bien que peu d'études se soient intéressées à la caractérisation de la diversité des communautés microbiennes présentes dans la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices se développant dans les sols contaminés et/ou naturellement riches en ETM, les métaux sont connus pour leurs effets toxiques sur la microflore tellurique influençant sa taille, sa diversité et ses activités. En effet, la présence de métaux peut réduire la biomasse microbienne (Wang *et al.*, 2007), affecter les activités enzymatiques microbiennes (Kandeler *et al.*, 2000 ; Lorenz *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007) et réduire la minéralisation de la matière organique des sols (Epelde *et al.*, 2012a). Ainsi, Kandeler *et al.* (2000) ont montré que les enzymes impliquées dans le cycle biogéochimique du carbone (cellulase, xylanase, β-glucosidase) sont moins affectées par la présence d'ETM, alors que les phosphatases et sulfatases le sont davantage ; les enzymes liées au cycle de l'azote (uréase) montrent une réponse intermédiaire. Ces résultats sont confirmés par ceux de Kuperman et Carreiro, (1997), qui montrent que la β-glucosidase est plus affectée que les activités de la phosphatase et de l'endocellulase. Enfin, l'arylsulphatase semble être plus sensible à la pollution par les métaux, alors que la phosphatase acide et l'uréase sont moins affectées (Alkorta *et al.*, 2003). Néanmoins, l'influence des ETM sur les activités microbiennes du sol varie selon le type de métal et le

type de sol. Doelman *et al.* (1985), qui ont examiné les effets de Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb et Zn sur les activités microbiennes du sol, ont montré que l'effet du Hg était le plus important et que celui du Pb était le moins significatif. Ces variations peuvent être attribuées aux différences de toxicité que présentent les métaux vis-à-vis des microorganismes mais aussi à la forme sous laquelle les métaux sont présents dans le sol.

Cependant, de tels effets toxiques ne sont pas toujours observés en raison d'une biodisponibilité limitée du métal dans le sol ou du développement de résistance aux métaux de la communauté bactérienne (Müller, 2001). Ainsi, Pessoa-Filho *et al.* (2015) ont mis en évidence que les activités des enzymes liées aux cycles C, P et S n'étaient pas affectées par des concentrations élevées de Ni. De plus, de nombreuses études mettent en évidence la présence de bactéries hautement résistantes aux métaux dans des sols serpentiniques, ce qui suggère une adaptation potentielle des populations bactériennes indigènes (Abou-Shanab *et al.*, 2008). Pal *et al.* (2005) ont ainsi montré que des bactéries isolées de sols ultramafiques étaient plus résistants au Ni que celles issues de zones périphériques.

Quoiqu'il en soit, la présence de métaux dans les sols est à l'origine d'une modification de la structure et de la diversité des communautés bactériennes, comme en témoignent de nombreux travaux (Sandaa *et al.*, 1999 ; Mengoni *et al.*, 2001 ; Idris *et al.*, 2004 ; Lopez *et al.,* 2017). De manière générale, quelles que soient les conditions environnementales, trois phyla sont prédominants : les *Proteobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Actinobacteria* (Roesch *et al.*, 2007 ; Delmont *et al.*, 2012) et les bactéries présentent au niveau de la rhizosphère des hyperaccumulateurs sont principalement Gram-positif, tels que *Arthrobacter, Microbacterium, Bacillus* et *Curtobacterium* et Gram négatif, tels que *Pseudomonas, Sphingomonas* et *Variovorax* (Mengoni *et al.*, 2001; Oline, 2006; Pal *et al.*, 2007).

4. Les limites de la phytoremédiation

Le développement de la phytoremédiation sur les sols ultramafiques se trouve être limité, en termes de biomasses produites, du fait de leurs propriétés physiques et chimiques extrêmes et surtout leur faible fertilité (Rajakaruna *et al.*, 2006). En effet, ces sols présentent une faible capacité de rétention en eau (Virmani *et al.*, 1982). Ils sont, en outre, généralement pauvres en éléments nutritifs, indispensables à une bonne croissance des plantes (Kabata-Pendias et Pendias, 2001 ; Khan, 2005). Il en résulte que ces sols sont donc peu aptes à supporter une production agricole rentable et même des couverts forestiers (Tumi *et al.*, 2012). Cette « stérilité » est causée non seulement par la présence de métaux, des carences en éléments élémentaires mais aussi du fait d'un rapport calcium/magnésium (Ca/Mg) très faible. Ce

rapport très faible (généralement < 1) est dû à la présence d'une grande quantité naturelle de magnésium dans les sols ultramafiques causant un stress salin important et un déséquilibre ionique (Bani *et al.*, 2007). En effet, l'équilibre ionique est un facteur essentiel du mécanisme de la tolérance aux éléments traces métalliques chez les plantes. Le calcium joue un rôle important dans les processus qui préservent l'intégrité structurelle et fonctionnelle des membranes cellulaires des plantes stabilisant les parois et régulant le transport de cations et les échanges d'ions. Ainsi, maintenir un approvisionnement suffisant de calcium dans les solutions de sol est un facteur important permettant de contrôler la toxicité de certains ions (Tuna *et al.*, 2007). Il a, en effet, été montré que ce stress peut être corrigé par l'utilisation, par exemple, de sulfate de calcium ($CaSO_4$), qui renforce la croissance des semis en conditions de stress salin (Manaa *et al.*, 2014).

5. De la phytoremédiation à l'agromine

5.1. Qu'est-ce l'agromine ?

L'agromine est une variante de la phytoextraction, basée sur l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices pour valoriser les métaux issus des sols contaminés (Morel, 2013). Elle est également envisagée pour des sols ultramafiques naturellement riches en Ni (van der Ent *et al.*, 2013). Elle consiste à coupler à la phytoextraction des métaux par des plantes hyperaccumulatrices, une métallurgie particulière adaptée aux biominerais ainsi récoltés et c'est pourquoi Morel (2013) a proposé d'adopter le terme "agromine" pour souligner le fait que la technologie repose sur un ensemble de procédés agronomiques et industriels, assemblés en filière. En effet, après récolte et incinération de la biomasse végétale récoltée, il est possible d'extraire et recycler dans l'industrie les métaux. Ce procédé a fait l'objet du brevet international déposé par Mercier et ses collaborateurs qui porte sur la production d'un sel cristallisé de nickel à partir de plantes hyperaccumulatrices (WO2012103651 sur www.inpi.fr). De plus, il est possible de valoriser l'énergie produite lors de la combustion des plantes (Figure 2).

L'agromine a également pour objectif de mettre en place un nouveau type d'agriculture dédié à des sols dégradés ou naturellement riches en métaux. Les buts principaux sont d'extraire les métaux du sol par l'implantation de systèmes de culture novateurs impliquant des plantes hyperaccumulatrices, de permettre un retour à des sols de qualité, mais aussi d'apporter un revenu complémentaire aux exploitants agricoles et populations locales.

Elle apparait, de plus, bien acceptée par le public et son avantage majeur reste son faible coût par rapport aux méthodes classiques de décontamination des sols ou d'extraction minière. Par ailleurs, elle présente également l'avantage de restaurer/préserver les fonctions écologiques des sols. Ainsi, en regard à ses nombreux atouts, l'agromine ne présente que peu de limitations : seuls le climat ainsi que la disponibilité variable des métaux dans les sols/substrats pourraient limiter l'efficacité de cette technique (van der Ent *et al.*, 2015) ainsi que la production plus ou moins importante de biomasse végétale.

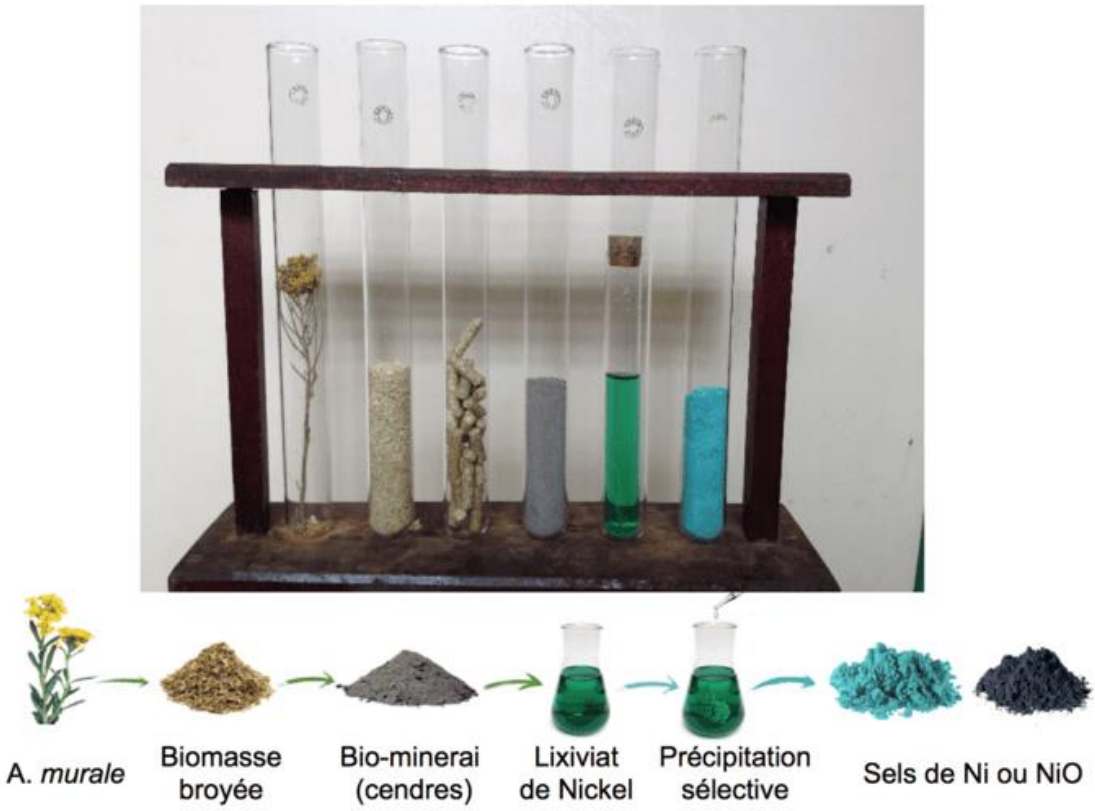


Figure 2 : Les différentes étapes de l'agromine (http://theconversation.com/lagromine-ou-comment-produire-du-metal-a-partir-des-plantes-61496)

D'un point de vue économique, l'agromine apparaît viable. En effet, une étude économique réalisée par Barbaroux (Barbaroux, 2010) fait état d'un bénéfice moyen supérieur à 8 millions de dollars canadiens par année, soit 6 M €, suite à la production sur une surface de 21600 ha d'une tonne de biomasse végétale par ha.

5.2. Quels leviers pour améliorer et optimiser l'agromine ?

Les sites contaminés ou naturellement riches en métaux présentent non seulement des concentrations en polluants pouvant être toxiques, mais sont également caractérisés par des propriétés physico-chimiques et nutritives (carence en nutriments, faibles taux de matière

organique) qui peuvent gravement limiter la croissance des plantes (Shallari *et al.*, 1998 ; Chaney *et al.*, 2007).

Plusieurs leviers sont alors envisageables pour améliorer, voire optimiser, la phytoremédiation.

5.2.1. Amélioration de la fertilisation minérale ou organique des sols

En vue d'optimiser l'efficience d'extraction de métaux par des plantes hyperaccumulatrices, plusieurs études ont eu pour objectif de tester différents régimes de fertilisation afin d'améliorer le développement des plantes hyperaccumulatrices et donc augmenter la phytoextraction de métaux lourds.

En raison des carences en macronutriments que présentent les sols ultramafiques, de nombreuses études ont mis en évidence l'effet positif de la fertilisation minérale sur la production de biomasse de plantes hyperaccumulatrices de Ni telle *Alyssum* spp. (Bani *et al.*, 2015 ; Kidd *et al.*, 2015 ; Álvarez-López *et al.*, 2016). Ces essais, réalisés sur des sols ultramafiques, ont en outre montré que l'application d'engrais minéraux permet également d'obtenir de meilleurs rendements en Ni (Li *et al.*, 2003). Ainsi, la teneur en Ni de *Berkheya coddii* est doublée suite à l'addition d'engrais azotés (Robinson *et al.*, 1997). Par ailleurs, des amendements de type N, P, K, couplés à des applications d'herbicides et à la gestion de l'irrigation, permettent l'obtention des rendements d'au moins 20 tonnes de biomasse sèche de *Alyssum* par hectare et de 400 kg Ni par hectare (Chaney *et al.*, 2007). De même, Kidd et Monterroso (2005) ont mis en évidence qu'une fertilisation minérale de 100 kg N ha^{-1}, 150 kg P ha^{-1} et 200 K kg ha^{-1} permet d'augmenter de dix fois les rendements en biomasse sèche de *Alyssum pintodasilvae* sur des sols contaminés. Par ailleurs, les rendements de biomasse d'un couvert spontané de *Alyssum murale* ainsi que ceux en Ni, en Albanie, ont été améliorés de 0,3 à 9,0 t de biomasse ha^{-1} et de 1,7 à 105 kg Ni ha^{-1}, après l'apport d'une fertilisation N, P et K de l'ordre de 120 kg N ha^{-1} et de 100 kg P, K ha^{-1}, ceci après 5 années d'expérimentation (Bani *et al.*, 2015). Le phosphore a un effet particulièrement important sur le rendement de la biomasse et l'absorption de Ni par les espèces hyperaccumulatrices lorsque celles-ci se développent sur des sols non fertilisés antérieurement (Shallari *et al.*, 2001 ; Chaney *et al.*, 2008). Néanmoins, il convient d'une part, de privilégier une application fractionnée de N afin de minimiser une lixiviation excessive de l'azote vers les eaux souterraines (Li *et al.*, 2003) et d'autre part, lors de récoltes annuelles, d'envisager une application régulière d'engrais afin de compenser les éléments nutritifs exportés par les récoltes précédentes de plantes

hyperaccumulatrices et de maintenir la production de biomasse sur plusieurs années (Kidd *et al.*, 2015 ; Nkrumah *et al.*, 2016).

L'ajout d'amendements organiques lors de la culture d'hyperaccumulateurs de Ni comme *Alyssum serpyllifolium* et *Alyssum bertolonii* montre des effets positifs sur les rendements de biomasse végétale (Álvarez-López *et al.*, 2016). Ces amendements organiques contiennent, en effet, des micro- et macronutriments essentiels à la croissance des plantes. Ainsi, leur utilisation est une pratique courante pour faciliter la revégétalisation des sols contaminés aboutissant de manière corrélative à une méthode viable de recyclage des déchets (Ruttens *et al.*, 2006). Les auteurs ont constaté, en outre, que les rendements en Ni étaient considérablement augmentés suite à la stimulation de la production de biomasse. L'augmentation de la production de biomasse pourrait être due à l'amélioration des propriétés physiques du sol, telles que la structure du sol, la porosité et la capacité de rétention en l'eau, mais aussi à une stimulation de l'activité microbienne. Ainsi, il semblerait que les amendements organiques apparaissent comme un levier pour améliorer l'agromine mais ceci doit être encore démontré dans des essais, à grande échelle, sur le terrain (Nkrumah *et al.*, 2016).

5.2.2. Inoculation par des PGPR

Différents types de microorganismes peuvent être trouvés dans la rhizosphère avec des effets divers selon leur type. De nombreuses bactéries commensales se multiplient sans que leur influence sur le développement des végétaux soit bien définie. Certaines ont une action pathogène qui conduit à une réduction plus ou moins marquée du développement des plantes. Enfin, d'autres sont qualifiées de symbiotiques et établissent, quant à elles, des relations spécifiques avec les plantes dans des associations à bénéfices réciproques.

Plus surprenant, il existe aussi des bactéries qui améliorent la croissance des végétaux. Elles agissent soit directement sur les racines, soit indirectement en limitant l'action des agents pathogènes. Ces bactéries, dont l'effet global provoque un bénéfice pour la plante, sont regroupées sous un vocable anglo-saxon : " Plant Growth-Promoting Rhizobacteria " (PGPR, rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes), (Kloepper *et al.*, 1989 ; Glick, 2014). Elles sont aussi regroupées sous le terme de Rhizobactéries qui Favorisent la Croissance des Plantes (RFCP). Elles représentent de 2 à 5% de la totalité des rhizobactéries (Antoun et Kloepper, 2001) et appartiennent à différents genres, tels que *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium, Rhizobium*... (Benizri *et al.*, 2001 ; Podile et Kishore, 2006).

Une bactérie qualifiée de PGPR présente trois caractéristiques principales, telles la production de métabolites bénéfiques à la croissance des plantes, la production de métabolites antagonistes aux agents pathogènes et enfin une capacité à coloniser efficacement le système racinaire. Les nombreux métabolites produits par ces souches peuvent être classés en fonction du type d'action qu'ils vont provoquer, direct ou indirect.

Par un mode d'action direct, les bactéries stimulent la croissance des plantes, même en absence d'agent pathogène. Elles vont agir sur le métabolisme et la physiologie de la plante et les mécanismes impliqués sont la production de phytohormones, telles que des composés auxiniques, des cytokinines et des gibbérellines (Tanimoto, 2005 ; Taghavi *et al.*, 2009), ce qui stimulent la croissance et le développement des plantes et permet ainsi une meilleure assimilation des éléments nutritifs (Glick, 1995). Elles peuvent également être à l'origine d'une diminution du niveau d'éthylène dans les tissus végétaux (Haas et Keel, 2003 ; Moënne-Loccoz et Défago, 2004). En effet, l'enzyme microbienne ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) est capable de métaboliser le précurseur de l'éthylène, l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), et ainsi de réduire le stress chez la plante par diminution de la quantité d'éthylène produite. La diminution de la biosynthèse endogène d'éthylène permet ainsi une meilleure croissance de la plante avec un système racinaire plus développé (Glick, 2014).

Le mode d'action indirect s'observe en présence d'un agent pathogène. Il conduit à une modification des équilibres microbiens dans la rhizosphère qui aboutira à une protection de la plante par suppression des microorganismes nuisibles (Glick *et al.*, 2007). Les mécanismes développés dans ce cas sont la compétition pour le fer *via* les sidérophores, la production de composés à action antibiotique, solubles ou volatils (Kidd *et al.*, 2009), la production d'enzymes. Par exemple, certaines bactéries PGPR ont la capacité de produire des hydrolases telles que des chitinases ou les glucanases, qui attaquent la paroi cellulaire des champignons pathogènes (Podile et Kishore, 2006 ; Compant *et al.*, 2010). Enfin, certaines souches bactériennes peuvent activer les mécanismes de défense des plantes ; un phénomène nommé résistance systémique induite (van Loon *et al.*, 1998).

L'idée d'utiliser de telles bactéries afin d'améliorer l'absorption des métaux par des plantes dans le cadre de stratégies de phytoremédiation est plus récente (Haslmayr *et al.*, 2014). Ainsi, l'inoculation d'espèces végétales non hyperaccumulatrices (*Brassica napus, Ricinus communis, Poa pratensis*, etc.) avec différentes PGPR (*Psychrobacter sp., Bacillus cereus, Achromobacter xylosoxidans, Pseudomonas jessenii*, etc.) permettait à la fois une meilleure disponibilité du nickel dans le sol, une stimulation de la croissance des plantes, mais aussi

améliorait l'accumulation de Ni dans les tissus végétaux (Rajkumar et Freitas, 2008 ; Ma *et al.*, 2009).

En ce qui concerne les espèces hyperaccumulatrices de Ni (*A. serpyllifolium* ssp. *Malacitanum*, *A. murale*) de nombreux travaux témoignent également de l'intérêt d'inoculer ces plantes avec des bactéries PGPR afin d'augmenter la disponibilité du Ni dans le sol et d'améliorer son accumulation (Abou-Shanab *et al.*, 2003 ; Rajkumar *et al.*, 2010 ; Becerra-Castro *et al.*, 2013 ; Durand *et al.*, 2016).

5.2.3. Associations végétales

De rares travaux ont étudié l'association de différentes plantes sur l'efficience d'extraction de polluants métalliques ou organiques avec comme hypothèse que ces couverts mixtes favorisaient la prolifération de la microflore. Ces recherches concernaient en particulier l'étude d'association de plantes cultivées. Seules quelques études ont porté sur l'effet de la combinaison de plantes hyperaccumulatrices de métaux avec d'autres espèces, comme par exemple *Sedum alfredii* + *Zea mays* (Wei *et al.*, 2011), *Sedum alfredii* + *Alocasia macrorrhiza* (Wu *et al.*, 2007), *Noccaea caerulescens* + *Lolium perenne* (Jiang *et al.*, 2010), *Brassica juncea* + *Brassica chinensis* (Liu *et al.*, 2007), *Brassica juncea* + *Festuca arundinacea* (Gao *et al.*, 2012) and *Noccaea caerulescens* + *Hordeum vulgare* + *Lepidium heterophyllum* (Gove *et al.*, 2002). La plupart de ces expériences ont montré que la co-culture avec des plantes non hyperaccumulatrices de métaux améliore la croissance de la plante hyperaccumulatrice et augmente l'extraction des métaux (Epelde *et al.*, 2012b). En outre, l'association de différentes espèces végétales permet d'une part, l'augmentation de la taille de la communauté microbienne de 15-20 % par rapport à la monoculture et corrélativement une stimulation de certaines fonctions de la communauté microbienne rhizosphérique associée et d'autre part, la mise en place d'une communauté microbienne complexe et des groupes fonctionnels microbiens plus diversifiés (Gao *et al.*, 2010, 2012).

Récemment, l'effet de couverts végétaux constitués de plusieurs espèces hyperaccumulatrices, sur l'efficacité de la phytoextraction de Ni, a été testé (Lucisine *et al.*, 2014). Il ressort que la nature de la couverture des plantes hyperaccumulatrices affecte la taille et la structure génétique des communautés bactériennes dans la rhizosphère. La coexistence de plusieurs hyperaccumulateurs améliore la production de biomasse par chaque espèce, favorise la biodisponibilité des métaux dans le sol et modifie les structures génétique et phénotypique des communautés bactériennes rhizosphériques (Lucisine *et al.*, 2014).

6. Vers de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine associant plante hyperaccumulatrice et légumineuse

La famille des légumineuses a une particularité unique et exceptionnelle : la capacité de fixer l'azote de l'air dans le sol. Cette capacité est due à la présence de bactéries symbiotiques fixatrices de N_2 et capables de convertir celui-ci sous une forme assimilable par la plante (De Antoni Migliorati *et al.*, 2015). Ainsi, les légumineuses, parce qu'elles sont capables de fixer l'azote de l'air grâce à la symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium* hébergées dans des nodosités racinaires, permettent de diminuer l'utilisation d'engrais minéraux à l'échelle de la rotation, et donc de réduire les émissions de gaz à effet de serre liées à la production et à l'utilisation de ces engrais (Voisin *et al.*, 2013).

Outre la réduction de l'utilisation d'engrais minéraux, de nombreuses études ont mis en évidence les autres avantages que présente l'insertion d'une légumineuse dans le système de culture, tels qu'une réduction de l'érosion, une limitation de la prolifération des mauvaises herbes et des maladies ainsi que la rupture du cycle des insectes ravageurs (O'Donovan *et al.*, 2007 ; Rodrigues *et al.*, 2015). Différentes espèces de légumineuses sont utilisées, présentant chacune des particularités dont il convient de tenir compte (Tableau 1**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Tableau 1 : Différentes espèces de légumineuses utilisées dans les systèmes agricoles classiques (Source : Chambre d'Agriculture Poitou-Charentes)

Couvert	Lentille	Féverole de printemps	Nyger	Cameline
Avantages	Croissance rapide Culture étouffante pour les adventices ; bonne production de biomasse Restitution d'azote au printemps	Enracinement très performant : pivot qui engendre une bonne structuration du sol Restitution d'azote	Plantes très gélives Restructuration du sol	Effet allélopathique sur les adventices
Inconvénients	Graines nécessitent d'être bien enterrées et le sol rappuyé	Sensible aux conditions sèches, levée difficile Bien recouvrir les graines 4 à 5 cm Graines de grandes tailles, mélange devient délicat	Installation délicate : semis peu profond (1 cm), sur un lit fin et bien rappuyé Peu concurrentiel des adventices Forts besoins en chaleur	Même famille que le colza Concurrentiel pour le colza si semé à forte densité Destruction par le gel difficile : recours à un désherbant chimique
Gélivité	-3°C	-2°C	-1°C	-10°C
Port de la plante	Etalé, couverture de sol efficace	Dressé, faible couverture du sol	Dressé, couverture non totale du sol	Dressé, mais plante étouffante
Appétence pour les limaces	Faible	Faible	Moyenne à bonne	
Risque sclérotinia	Espèce hôte	Espèce hôte	Espèce hôte	Espèce hôte + risque hernie du chou
Densité de semis	25 à 30 Kg/ha	100 à 115 kg/ha	20kg/ha	1 Kg/ha à utiliser en mélange
Coût semences *(tarif 2012)*	1, 95€/kg soit 50 à 60 €/ha	0,80 €/kg soit 80 à 95€/ha	3,70 €/kg Soit 75 €/ha	11,90 €/Kg Soit 35€/ha

Couvert	Sarrasin	Pois de printemps	Trèfle d'Alexandrie
Avantages	Destruction par le gel aisée, dès les premières gelées Résiste bien au manque d'eau Enracinement profond : bonne restructuration du sol Forte concurrence avec les adventices : étouffement et effet allélopathique	Bonne croissance automnale : fort pouvoir concurrentiel des adventices Permet une bonne restructuration du sol Quantité d'azote restituée importante (60% de l'azote piégé)	Plante annuelle de cette famille Facile à détruire Développement rapide Restructuration du sol grâce à son système racinaire fasciculé-pivotant
Inconvénients	Montée à graine rapide Pas de fixation symbiotique de l'azote	Plante agressive (peut représenter une gêne pour le colza en cas de forte croissance) Nécessité de recouvrir les graines Semences onéreuses Taille des graines (grosses graines qui rendent le mélange difficile pour un semis homogène)	Pouvoir concurrentiel moyen des adventices Sensibilité à la sècheresse
Gélivité	0°C	-2°C	-1°C
Port de la plante	Dressé	Dressé mais plante plus ou moins couvrantes	Dressé
Appétence pour les limaces	Non	Faible	Bonne
Risque sclérotinia	Non	Espèce hôte	Espèce hôte
Densité de semis	30 à 40 kg/ha	50 à 70 Kg/ha	15 kg/ha
Coût semences *(tarif 2012)*	1,90€/Kg Soit 57 à 76 €/ha	1,30€/kg Soit 65 à 90 €/ha	2,60 €/Kg Soit 40 €/ha

Couvert	Gesse cultivée	Fenugrec	Vesce commune de printemps	Luzerne annuelle (medic)
Avantages	Bonne résistance à la sécheresse Restructuration du sol par sa racine pivotante Bonne couverture du sol et développement rapide	Développement rapide Plante peu exigeante en eau (résistante à la chaleur et au sec Peu encombrante Restitution d'azote	Bonne couverture de sol si associée à la vesce pourpre Restitution azotée possible	Bonne couverture du sol Restitution azotée possible
Inconvénients	Développement hétérogène : besoin d'associer cette espèce (lentille, féverole ou fenugrec) Semences onéreuses	Attire le gibier du fait de l'odeur qu'elle dégage	Nécessité de destruction pour les variétés non-gélives (seuil = -10°C)	Doit être implantée en surface pour germer Sensibilité à la sécheresse
Gélivité	-7°C	-7°C	-2°C	-3°C
Port de la plante	Etalé	Dressé	Etalé	Etalé
Appétence pour les limaces	Moyenne		Faible	Faible
Risque sclérotinia	Espèce hôte	./	Espèce hôte	./
Densité de semis	25 kg/ha en association	10 Kg/ha en association	20 Kg/ha	3 à 5 Kg/ha
Coût semences *(tarif 2012)*	1,90 €/Kg Soit 50 €/ha (gesse uniquement)	1,70 €/kg Soit 17 €/ha (fenugrec uniquement)	1,40 €/kg Soit 28 €/ha	6,70 €/kg Soit 20 à 35 €/ha

6.1. Effet des légumineuses en lien avec les facteurs abiotiques et biotiques du sol

L'intérêt premier de l'insertion des légumineuses dans les systèmes de culture est la meilleure nutrition azotée de la culture de rente. Par exemple, l'introduction de soja à la place d'un maïs dans une monoculture de maïs permet de réduire les apports d'azote sur le maïs suivant de 30 à 50 unités par hectare (Schneider et Huyghe, 2015). En conséquence, l'insertion de légumineuses dans les systèmes de culture permettrait une réduction des engrais azotés. Il a été ainsi estimé, en France, qu'une augmentation jusqu'à 7 % de la part des légumineuses dans l'assolement de la sole nationale permettrait d'économiser environ 216000 T d'engrais minéraux par an, soit 10% de la consommation annuelle (Commissariat Général au Développement Durable 2009). Mais il a été également montré que la présence des légumineuses améliore la qualité du sol, augmente sa porosité, diminue sa densité apparente, augmente la stabilité des agrégats et diminue la résistance à la pénétration des racines et permet donc une meilleure prospection du sol par ces dernières. Par ailleurs, il a été montré que les systèmes de culture avec légumineuses ont tendance à moins utiliser d'eau que leur équivalent sans légumineuse (Miller *et al.*, 2003 ; Nolot et Debaeke, 2003).

Il est également admis que lorsqu'une culture de rente et une légumineuse ont leurs racines entremêlées, les communautés microbiennes rhizosphériques de cette association peuvent être différentes de celles trouvées en cultures pures, avec des conséquences sur les transferts de nutriments entre les deux espèces végétales (St. Luce *et al.*, 2015). Cette association favoriserait le développement des microorganismes telluriques bénéfiques qui peuvent améliorer l'absorption des nutriments par les plantes (Lupwayi et Kennedy, 2007 ; St. Luce *et al.*, 2015). Il y aurait ainsi une amélioration de l'état sanitaire des sols, suite à une modification de la structure et de l'activité biologique de ces derniers (Stevenson et Kessel,

1996 ; Evans *et al.*, 2003 ; St. Luce *et al.*, 2015). En effet, des chercheurs ont montré que l'abondance et la disponibilité de substrats riches en énergie et azote, issus de la décomposition de la légumineuse, constituent un environnement favorisant la diversité et les activités microbiennes (Lupwayi *et al.*, 1998 ; Biederbeck *et al.*, 2005 ; Lupwayi et Kennedy, 2007 ; Lupwayi *et al.*, 2015). En effet, dans les systèmes de culture intégrant une légumineuse, les résidus aériens et racinaires, résultant de sa destruction, constitueront une quantité de carbone restitué au sol non négligeable, pouvant augmenter ainsi le stock de carbone du sol jusqu'à 0,6 t/ha/an (Kuo *et al.*, 1997).

6.2. Modes d'insertion des légumineuses dans les systèmes culturaux

Différents modes d'insertion des légumineuses sont envisageables, comme le montre la Figure 3.

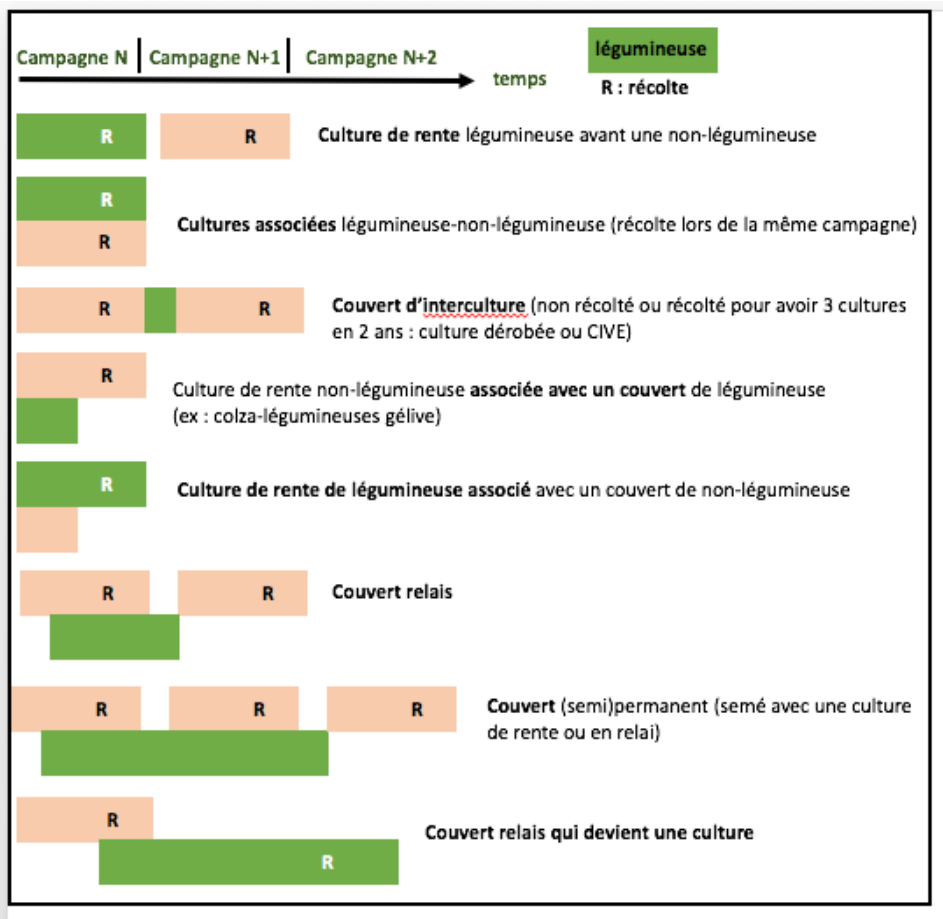


Figure 3 : Modes d'insertion de la légumineuse dans les systèmes de culture (d'après Jeuffroy. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables - Colloque 14 décembre 2015)

La co-culture (couverts associés) caractérisée par la présence simultanée de deux espèces végétales peut engendrer des relations de compétition, comme c'est souvent le cas pour

l'accès à la lumière ou à l'azote minéral, ou de facilitation entre les espèces lorsqu'une espèce améliore les conditions environnementales de développement de l'espèce associée (température, ombre, disponibilité des ressources…) (Justes *et al.*, 2014 ; Shili-Touzi, 2009). Par exemple, dans le cas d'association entre légumineuses et graminées, la plante compagne ayant la capacité de fixer l'azote atmosphérique de l'air peut rendre la quasi-totalité de l'azote minéral disponible pour les plantes associées. Rühlemann et Schmidtke (2015) ont montré lors d'une co-culture entre le seigle (*Secale cereale* L.) et une légumineuse, que le seigle peut épuiser les sources d'azote disponibles dans le sol pour les adventices, réduisant ainsi leur croissance et stimulant l'augmentation de la fixation symbiotique du N_2 par les légumineuses. Concernant la production de biomasse de la culture de rente, les résultats sont variables. Certains travaux confirment néanmoins l'intérêt de ces systèmes pour améliorer la productivité agricole. En effet, les rendements des associations sont parfois systématiquement supérieurs ou égaux aux rendements moyens des cultures « pures ». Ceci a été observé aussi bien dans le cas des mélanges blé dur – pois d'hiver, blé dur – féverole d'hiver que blé tendre – pois d'hiver, indiquant ainsi une meilleure efficacité des mélanges plurispécifiques pour l'utilisation des ressources du milieu (eau, lumière et nutriments dont l'azote) (Snapp *et al.*, 1998 ; Zhao *et al.*, 2015). Concernant le colza, lorsque ce dernier est associé à une légumineuse, la quantité d'azote absorbée passe en moyenne à environ 60 unités, ce qui représente de 20 à 30 unités supplémentaires par rapport à une culture où le colza serait conduit seul. Si les légumineuses fixent sans doute une part d'azote atmosphérique, il faut également prendre en compte l'absorption de l'azote du sol, mieux prospecté grâce à une couverture plus efficace que quelques pieds de colza au mètre carré. Plus surprenant, en présence de légumineuses, le colza absorbe lui-même beaucoup plus d'azote dès le démarrage : 10 à 15 unités supplémentaires sont absorbées par ce dernier, traduisant l'effet globalement bénéfique de l'association. Les légumineuses, contrairement aux adventices, ne font pas concurrence au colza mais exercent le rôle de booster. Mais l'action des légumineuses ne se limite pas à la fixation d'azote : elles ont également un rôle de déclenchement de l'activité biologique, qui est sans doute responsable d'une meilleure nutrition des plantes (Altieri, 1999).

Les couverts d'interculture (que nous qualifierons de rotation), dans lesquels la légumineuse n'est pas récoltée, constituent également une pratique importante pour le maintien de la fertilité des sols. En effet, la présence d'une légumineuse modifie les performances agronomiques de la culture de rente qui la suit : son rendement et la qualité des produits

récoltés sont améliorés en comparaison à la même culture ayant eu un autre précédent (Schneider, 2015). Les phénomènes explicatifs sont en partie liés à l'azote, avec différents processus qui se conjuguent comme la minéralisation de l'azote organique des résidus aériens et souterrains de la légumineuse (Snapp *et al.*, 1998 ; Scalise *et al.*, 2015), une meilleure répartition de l'accès aux ressources, une meilleure structuration du sol et un meilleur état sanitaire de ce dernier avec moins de maladies d'origine tellurique du fait de l'alternance de famille botaniques. Ainsi, O'donovan *et al.* (2014) ont montré qu'en moyenne, les rendements du colza sont augmentés de 10% lorsqu'un pois ou de la lentille précédaient son implantation, par rapport à un blé de printemps. De même, l'introduction du pois comme précédent à la culture du blé entraine des gains de rendement pour la céréale de l'ordre de 8 $q.ha^{-1}$ en moyenne (Stevenson et Kessel, 1996). En outre, les économies en azote sont en moyenne de 20 kg ha^{-1}, ce qui permet de réduire sensiblement la consommation d'énergie fossile et les émissions de gaz à effet de serre.

Ainsi, il serait possible d'envisager la mise en place de systèmes culturaux dédiés à l'agromine avec insertion d'une légumineuse en culture associée ou intermédiaire, mais il conviendra d'appréhender l'efficience de ces nouveaux systèmes de culture, au travers, en particulier, d'indicateurs rendant compte de la qualité des sols.

7. Quels indicateurs de la qualité des sols pour estimer l'efficience de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine ?

7.1. Notion de qualité des sols

La notion de qualité du sol est complexe voire subjective. Si la fertilité des sols est définie et étudiée depuis longtemps, car répondant à la fonction première de production des sols recherchée en agronomie, il a fallu attendre les années 1990 pour qu'une première définition de la qualité des sols soit établie par Larson et Pierce (1991). A travers une telle définition, les auteurs évoquaient clairement les bénéfices que peuvent apporter les sols à leur environnement extérieur et l'ensemble des fonctions et des services rendus par les sols aux sociétés humaines, bien au-delà de la seule fonction de production. De plus, ces auteurs soulignaient que de par la diversité des types de sols et des écosystèmes, l'unicité de la qualité du sol n'existe pas. En 1994, Doran et Parkin en ont proposé une version plus précise intégrant la diversité des usages du sol, le maintien de la qualité environnementale, de la productivité biologique, et de la santé des plantes, des animaux et de l'humanité (Doran et

Parkin, 1994). Dix ans plus tard, Eijsackers (2004) a défini la qualité des sols comme leur capacité à maintenir un fonctionnement correct grâce à une diversité de processus et d'organismes qui réalisent ces processus. La qualité des sols est donc présentée comme l'état de santé d'un système écologique complexe.

Concernant les indicateurs de la qualité des sols, Larson et Pierce (1991) ont proposé quelques propriétés physico-chimiques à examiner pour déterminer la qualité d'un sol. Doran et Parkin (1994), puis Doran et Safley (1997), ont proposé de rajouter quelques propriétés biologiques comme le carbone microbien ou la respiration du sol. Des indicateurs biologiques rendant compte de l'état et du fonctionnement biologique des sols, basés sur l'étude des communautés de faune du sol comme les lombricidés, les collemboles ou encore les nématodes ont été par la suite considérés. Par la suite, de nombreux chercheurs, comme en particulier Zornoza *et al.* (2007) ont tenté de mettre au point un outil global, prenant en compte la dimension physique, chimique et biologique des sols afin de rendre compte d'une qualité globale des sols. Bien qu'utiles, ces indicateurs globaux sont loin de quantifier la réalisation par les sols d'un service ou d'une fonction particulière. Ainsi, Andrews *et al.* (2004) puis Velasquez *et al.* (2007) ont tenté d'affecter chaque variable à une fonction particulière remplie par les sols afin de pouvoir calculer un indice spécifique de qualité qui rend compte de la réalisation de cette fonction. Puis à partir du calcul d'un ensemble de sous-indicateurs spécifiques, correspondant chacun à un service rempli par les sols, ils ont proposé un indicateur général de qualité du sol (GISQ) basé sur la fourniture par les sols de services.

Toutefois, même si actuellement de nombreux indicateurs sont utilisés pour qualifier la qualité biologique, physique ou chimique d'un sol, ces indicateurs ne sont pas encore directement applicables à tous les types de sol et modes d'utilisation des terres, en raison de l'absence de valeurs seuils de référence. Par ailleurs, le nombre de mesures à réaliser pour, par exemple, aboutir à l'estimation de l'indicateur général de qualité du sol (GISQ) est très important (plus de 50 variables à mesurer) et nécessite ainsi du temps. De plus, certaines mesures sont complexes à réaliser, ce qui limite le nombre d'échantillons analysés.

7.2. Choix des indicateurs

Le sol se caractérise par la coexistence de différentes ressources : des composants inertes et des organismes vivants (Gobat *et al.*, 2010). Les composants inertes sont des constituants minéraux. Cette fraction minérale provient de la désagrégation et de l'altération des roches sous-jacentes. Concernant les constituants organiques, ils sont souvent issus de la végétation, mais aussi la solution du sol, une eau enrichie en ions et en molécules minérales et

organiques, et enfin l'atmosphère du sol constituée de gaz libres et dissous, souvent riche en CO_2. Le sol est vivant et se caractérise par la coexistence de nombreux êtres vivants qui constituent la composante organique vivante des sols : il s'agit de la microflore (bactéries, champignons, algues) et de la faune du sol (protozoaires, nématodes, gastéropodes, arthropodes, annélides, mammifères, etc.). Le sol contient ainsi plus d'espèces inconnues que toutes les autres parties de la biosphère terrestre, constituant ainsi un véritable enjeu pour la recherche sur la biodiversité. C'est en partie cette diversité qui rend le comportement du système sol difficile à prédire car plusieurs fonctions essentielles du sol, et certaines de ses propriétés physico-chimiques, dépendent de l'action des organismes qui le peuplent (Gobat *et al.*, 2010).

L'évaluation de la qualité d'un sol doit permettre d'appréhender les fonctions essentielles du sol et nécessite l'utilisation d'indicateurs physiques, chimiques et/ou biologiques pertinents.

7.3. Les indicateurs de la qualité physique du sol

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. Ceci renvoie à la notion de stabilité. En effet, la stabilité des agrégats du sol et leur résistance aux facteurs externes, tels que l'intensité des précipitations et la présence de cultures est considérée comme un indicateur utile de la qualité physique des sols. Elle est impliquée dans le maintien de fonctions écosystémiques importantes comme l'accumulation de carbone organique, la capacité d'infiltration et de stockage de l'eau et l'activité à la fois des racines mais aussi des communautés microbiennes.

L'agrégation peut ainsi être utilisée pour mesurer la résistance des sols à l'érosion et aux changements de gestion du travail du sol (Arias *et al.*, 2005 ; Moebius *et al.*, 2007).

Dans un sol bien structuré, l'air, l'eau et les éléments nutritifs peuvent traverser les vides (pores) contenus dans les agrégats et entre ceux-ci. 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. Ainsi, la porosité et la distribution de la taille des pores sont fortement liées à la qualité physique du sol.

La densité apparente est, quant à elle, régulièrement évaluée dans les systèmes agricoles pour caractériser l'état de la compacité du sol (Bengough *et al.*, 1997 ; Håkansson et Lipiec, 2000). Elle est considérée comme un indicateur utile pour l'évaluation de la fertilité des sols en ce qui concerne les fonctions du sol telles que l'aération et l'infiltration (Pattison *et al.*, 2008).

Ainsi, 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.

7.4. Les indicateurs de la qualité chimique du sol

Le pH du sol est considéré comme l'un des indicateurs chimiques dominants de la fertilité du sol, en identifiant les tendances du changement pour une gamme de fonctions biologiques et chimiques du sol comme l'acidification et la salinisation, la disponibilité des éléments nutritifs et l'activité biologique (Allen *et al.*, 2011).

La conductivité électrique du sol est considérée comme un indicateur fiable et facile à mesurer de la qualité / fertilité du sol (Arnold *et al.*, 2005). Elle peut informer les tendances de la salinité, de la performance des cultures, du cycle des nutriments (en particulier les nitrates) et de l'activité biologique (Arnold *et al.*, 2005).

La capacité de sorption et la capacité d'échange cationique (CEC) sont considérées comme des déterminants importants de la qualité chimique des sols, en particulier la rétention des principaux cations nutritifs Ca, Mg et K et l'immobilisation des cations Al et Mn, potentiellement toxiques. Ces propriétés peuvent donc être des indicateurs utiles de la fertilité des sols, qui informent la capacité d'un sol à absorber les nutriments, ainsi que les pesticides et les produits chimiques (Allen *et al.*, 2011).

Dans l'identification des propriétés fondamentales du sol pour répondre aux exigences des indicateurs de qualité du sol, Doran *et al.* (1999) ont considéré les nutriments disponibles pour les plantes comme l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) comme une indication de la capacité d'un sol à soutenir la croissance des plantes. En outre, cet indicateur peut identifier des valeurs critiques ou seuils pour l'évaluation des pertes en nutriments ou des risques pour l'environnement (Allen *et al.*, 2011).

7.5. Les indicateurs de la qualité biologique du sol

La qualité biologique des sols fait référence à l'abondance, la diversité et l'activité des organismes vivants qui participent au fonctionnement du sol (Chaussod, 1996). En effet, les organismes du sol sont responsables, directement ou indirectement, de nombreuses fonctions clés du fonctionnement du sol, telles la décomposition des résidus animaux et végétaux, la transformation et le stockage des nutriments, la formation et la stabilisation de la structure du sol, la synthèse des composés humiques (Kennedy, 1998 ; Alkorta *et al.*, 2003).

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 (Kennedy, 1998). Les microorganismes bactériens sont fréquemment utilisés comme indicateurs de la qualité biologique des sols. Ce sont ces derniers que nous utiliserons dans nos travaux pour évaluer le fonctionnement biologique des sols ultramafiques.

Pour juger du caractère durable d'un système de culture, la plupart des auteurs s'accordent à privilégier des indicateurs globaux plutôt qu'une approche réductionniste (Chaussod, 1996 ; Doran et Parkin, 1994). Ces indicateurs globaux sont généralement reliés plus ou moins directement à la matière organique, dont les stocks et les entrées annuelles ont une grande importance pour la qualité des sols, surtout pour les écosystèmes fragiles (Kennedy, 1998 ; Alkorta *et al.*, 2003). La matière organique du sol comprend une vaste gamme de composants vivants et non vivants. En effet, elle se répartit en trois groupes :

- les Matières Organiques Vivantes (MOV) = la totalité de la biomasse en activité (racines, vers de terres, microflore du sol...),
- les Matières Organiques Fraîches = les débris d'origine végétale (résidus végétaux, exsudats), animale (déjections, cadavres), fongique et microbienne (cadavres, exsudats). Associées aux composés organiques, elles composent les MO facilement décomposables,
- des composés organiques stabilisés (MO stable) = les matières humiques ou humus, provenant de l'évolution des matières précédentes. La partie humus représente 70 à 90 % du total.

Ainsi, il est largement reconnu que la matière organique des sols est l'une des composantes les plus complexes et les plus hétérogènes des sols, dont les propriétés et les fonctions varient d'un sol à un autre (Carter, 2002). La matière organique du sol est considérée comme un indicateur important de la qualité du sol en raison des nombreuses fonctions qu'elle fournit. La matière organique est une source de C et N et influence le cycle du phosphore et du soufre. En outre, elle possède la capacité à se complexer avec des ions multivalents et des composés organiques. Par ailleurs, elle fournit aussi des habitats microbiens et fauniques. La matière organique a un effet sur la stabilité des agrégats, la rétention d'eau et les propriétés hydrauliques des sols (Carter, 2002).

Deux paramètres microbiologiques sont communément mesurés pour évaluer la réponse des microorganismes à des changements de leur milieu. Il s'agit de mesures globales tels que la taille de la population bactérienne (dénombrement sur milieu gélosé) et la mesure de la biomasse microbienne (carbonée et/ou azotée) des sols. Les techniques de dénombrement

sous-estiment la taille de la communauté bactérienne dans la mesure où, du fait de leur trop grande sélectivité et de la cultivabilité des microorganismes, seule une faible fraction de la communauté microbienne est cultivable (0,1 à 10 % selon Ward *et al.*, 1990). Concernant la biomasse bactérienne, il s'agit d'un indicateur sensible d'une diminution à long terme des teneurs en matière organique (Weigand *et al.*, 1995) et de nombreux articles font référence à cet indicateur (Vance *et al.*, 1987 ; Houot et Chaussod, 1995 ; Weil et Magdoff, 2004).

Les mesures d'activités enzymatiques globales sont des indicateurs importants de la qualité et de la fertilité du sol et viennent compléter les mesures de dénombrement et de biomasse microbienne dans l'évaluation de la réponse des microorganismes à des changements affectant la taille de la communauté. Les activités enzymatiques du sol sont étroitement liées aux cycles biogéochimiques des nutriments et à la biologie des sols (activités uréase, -glucosidase, phosphatase acide et alcaline, arylsulfatase…). Elles sont faciles à mesurer et intègrent des informations sur le statut microbien et les conditions physico-chimiques du sol. Elles montrent aussi une réponse rapide aux changements dans les sols (Aon et Colaneri, 2001 ; Acosta-Martínez *et al.*, 2008 ; Lagomarsino *et al.*, 2009).

Le développement de nouvelles techniques relevant de la biologie moléculaire et cellulaire au cours de ces quinze dernières années, permet aujourd'hui d'accéder précisément à la structure et à la diversité des communautés bactériennes et ainsi de mieux cerner les facteurs biotiques mais aussi abiotiques agissant sur le déterminisme de la structure et de la diversité de ces communautés (Maron *et al.*, 2011 ; Lemanceau *et al.*, 2015). Ainsi, par exemple, la biomasse microbienne moléculaire (qPCR 16S ou qPCR 18S) apparait comme un indicateur sensible au statut organique du sol avec des valeurs significativement plus élevées dans les situations amendées par rapport au témoin. Cet indicateur est également suffisamment sensible pour discriminer d'une part, différentes situations amendées en fonction de la qualité biochimique des intrants organiques apportés et de leur efficacité à stimuler la vie microbienne et d'autre part, des pratiques tels que le labour et le semis direct (Marstorp *et al.*, 2000 ; Leckie *et al.*, 2004). Plusieurs autres approches sont également utilisées comme l'étude de la structure des communautés par établissement d'empreintes chimiques, telle par exemple la technique PFLA (Phospho Lipid Fatty acid Analysis) basée sur la présence d'acide gras des phospholipides dans les membranes de toutes les cellules vivantes (Zelles *et al.*, 1992). D'autres correspondent à l'étude de la structure des communautés par l'établissement d'empreintes métaboliques (Degens et Harris, 1997) ou enfin, l'étude de la structure des communautés par l'établissement d'empreinte génétiques (Ranjard *et al.*, 2001 ; Baudoin *et al.*, 2003, 2002). Mais l'utilisation de ces bioindicateurs restent encore actuellement difficiles,

car bien que sensibles, fiables et faciles à utiliser, il est essentiel de connaître leur gamme de variations afin d'interpréter les valeurs mesurées et de diagnostiquer l'état biologique d'un sol. Des recherches sont ainsi encore nécessaires pour la normalisation des procédures pour la construction de systèmes référentiels et leur application aux analyses biologiques des sols et pour ainsi évaluer l'impact de différentes situations environnementales sur d'une part, l'abondance et la diversité des communautés microbiennes et d'autre part, les activités de ces communautés, le fonctionnement biologique des sols et les services écosystémiques fournis (Lemanceau *et al.*, 2015).

Objectifs de la thèse

Parmi les procédés de restauration des sols, les techniques industrielles de remédiation sont très onéreuses et peu respectueuses de l'environnement. Ainsi, le développement de méthodes utilisant des plantes pour dépolluer l'environnement présente un intérêt croissant ces dernières décennies. Dans ce cadre, la phytoremédiation - technique considérée comme étant respectueuse de l'environnement et des sols, avec un rapport coût-efficacité notable, et socialement acceptée - consiste en l'utilisation de plantes et de leurs microorganismes telluriques associés, pour dépolluer des sols contaminés ou naturellement riches en éléments traces métalliques, en extrayant les métaux du sol et en les séquestrant dans les parties aériennes des plantes où ils sont accumulés. Le succès de la phytoextraction est donc lié à la production d'une biomasse importante par les végétaux utilisés et à la capacité des plantes à extraire le métal depuis leurs racines jusque dans leurs parties aériennes.

Les sols serpentiniques qui contiennent naturellement des quantités importantes en éléments traces comme le nickel, sont par contre pauvres en éléments nutritifs et en particulier en azote. Cette déficience limite la croissance et le développent des plantes hyperaccumulatrices et donc la production d'une biomasse végétale importante. Ceci peut donc limiter l'extraction de quantités élevées en métaux. Ainsi, l'agromine, véritable filière dont les objectifs à plus ou moins long terme, sont de permettre un retour à des sols de « qualité », peut voir, dans ces environnements pauvres, son intérêt limité.

Or, de nombreuses études, relevant des sciences agronomiques, ont montré l'intérêt de la mise de systèmes culturaux intégrant la culture d'une légumineuse, avec pour objectif d'améliorer notablement la fertilité des sols et par voie de conséquence, la croissance et le développement de la plante associée.

Ainsi, l'objectif global de ce doctorat est l'optimisation de l'agromine. Il s'agit d'imaginer et de développer, sur la base d'approches agronomiques, de nouveaux systèmes culturaux innovants, afin de compenser, en particulier, la carence en azote des sols ultramafiques. En effet, de nombreuses études ont montré l'intérêt de l'introduction de couverts à base de légumineuses dans les systèmes agricoles classiques aboutissant à une réduction de l'érosion des sols, du développement des mauvaises herbes et des maladies, tout en favorisant la rupture des cycles des insectes ravageurs. C'est pourquoi, l'installation de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine et basés sur l'association de légumineuses avec des plantes hyperaccumulatrices pourrait conduire à améliorer d'une part, le processus de phytoextraction et d'autre part à améliorer *in fine* la fertilité des sols ultramafiques. De plus, il est connu que

la fertilisation organique azotée favoriserait les processus de phytoextraction, en termes de mobilité et de biodisponibilité des métaux dans les sols, en améliorant également les propriétés physico-chimiques et microbiologiques de ces derniers. Par ailleurs, ces nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine permettraient une limitation des applications d'engrais minéraux, qui bien qu'ayant montré leurs efficacités en termes d'augmentation des rendements de biomasse et de quantités de nickel extraites, peuvent également être à l'origine de la pollution des nappes phréatiques et favoriser la consommation d'énergie fossile liée à leur fabrication.

L'enjeu de cette thèse est donc de développer et de démontrer l'intérêt éventuel de la mise en place de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine du nickel, basés sur l'insertion de légumineuse. Il s'agit de proposer une nouvelle voie de l'agromine, par la mise en place d'agro-écosystèmes destinés à réhabiliter les sols ultramafiques à des fonctions agronomiques, en alliant génie du végétal, génie pédologique et microbiologique (Figure 4).

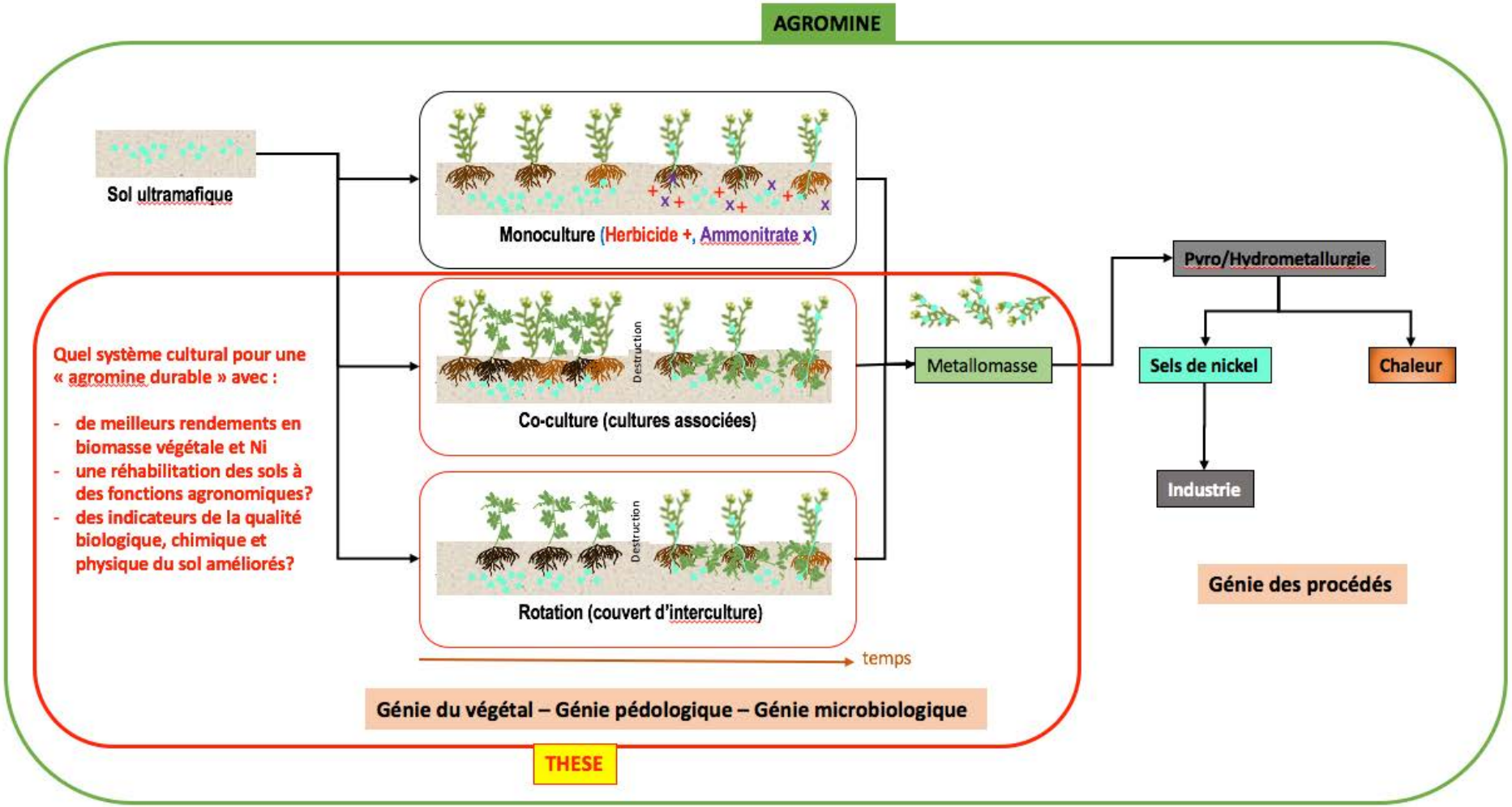


Figure 4 : Insertion des travaux de thèse dans la filière agromine : quels systèmes culturaux pour une agromine plus efficiente et durable ?

CHAPITRE 2. Matériel et méthodes

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Afin d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés dans le cadre de ce doctorat, les travaux ont été réalisés à partir de différents dispositifs expérimentaux, couplant des expérimentations effectuées en laboratoire, en conditions contrôlées et d'autres *in situ*, en conditions de plein champ.

La première étape a eu pour objectif de cerner si la Fabacée pouvait se développer, croître et former des nodosités sur un sol enrichi en nickel et donc supporter les teneurs en nickel classiquement trouvées dans un sol serpentinique.

L'étape suivante a consisté à tester deux systèmes de culture (co-culture et rotation), associant une plante hyperaccumulatrice de nickel et une légumineuse, en conditions réelles au champ. Nous avons pour cela mis en place de parcelles expérimentales, *in situ*, dans une région dont le sol est un sol ultramafique. La région de Melide, en Espagne, a été choisie. Mais, plusieurs pré-expérimentations ont été nécessaires à ce travail. En effet, il convenait de s'assurer que la légumineuse testée au préalable était à même de se développer sur un sol naturellement riche en nickel et dans le cas contraire, de tester d'autres Fabacées.

Par la suite, des expérimentations en conditions contrôlées, mais aussi en laboratoire, ont été réalisées. Dans ce cadre, ont été mises en place, en chambre phytotronique, d'une part, la co-culture d'une plante hyperaccumulatrice et d'une plante non-accumulatrice (une Fabacée) et d'autre part, la rotation qui correspond à la culture de la Fabacée suivie par celle de la plante hyperaccumulatrice. Cette expérimentation, basée sur la culture des plantes en pots, a été suivie par une autre expérimentation pour laquelle les plantes étaient cultivées en rhizoboxes. Les objectifs ici étaient d'étudier l'effet de l'introduction de la légumineuse sur la diversité bactérienne des sols, sur les propriétés physico-chimiques des sols et sur le développement du système racinaire d'*Alyssum murale* mais aussi sur le biofonctionnement de ces sols.

Différentes analyses et mesures ont été envisagées pour chaque expérimentation suivant les objectifs scientifiques de chacune. Ainsi, des analyses ont été faites à la fois sur les plantes, le sol mais aussi sur la microflore de ces sols, afin d'étudier l'impact de l'introduction de la légumineuse dans ces nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine du nickel.

1. Dispositifs expérimentaux

1.1. Expériences en conditions contrôlées

1.1.1. Culture d'une Fabacée sur un sol artificiellement contaminé en nickel

1.1.1.1. Objectifs

En vue de mettre en place un système de culture associant une plante hyperaccumulatrice et une Fabacée, il convenait dans un premier temps de cerner si la Fabacée était à même de se développer sur un sol artificiellement contaminé par différentes teneurs en nickel et de produire des nodosités fonctionnelles. Ainsi, une première expérience a consisté à contaminer un sol agricole avec du sulfate de nickel ($NiSO_4$, $7H_2O$) en envisageant 6 concentrations différentes (0, 10, 20, 30, 60 et 90 $mg.kg^{-1}$ de sol sec de nickel). Ces concentrations ont été définies sur la base des teneurs en nickel biodisponible (extractible au DTPA) connues pour les sols ultramafiques, qualifiés de « naturellement riches » en nickel (soit 30 mg de Ni par kg de sol, dans le cas d'un sol serpentinique en Espagne).

1.1.1.2. Choix de la Fabacée

Concernant la Fabacée, notre choix s'est porté sur la lentille fourragère noire (*Lens culinaris* var. Beluga). En effet, la lentille fourragère diffère de ses cousines alimentaires par un développement végétatif plus exubérant. Ce développement végétatif permet un bon contrôle des adventices grâce à une couverture du sol importante et un bon démarrage. Elle est bien adaptée à l'utilisation en couvert végétal estival grâce à sa résistance naturelle aux températures élevées et à la sécheresse. Sa destruction est facilitée par sa résistance moyenne au froid (résistant au gel jusqu'à -5°C). La lentille fait partie des légumineuses les plus performantes en terme de production de biomasse et d'azote : avec une teneur en azote égale à 4% de la matière sèche (MS) et un potentiel de production supérieure à 3000 voire 4000 kg de $MS.ha^{-1}$, elle est capable de fixer plus de 120 $kg.ha^{-1}$ après 3 à 4 mois de croissance.

En outre, celle-ci a un port plutôt vertical à la différence, par exemple, du trèfle dont le développement est rampant. En effet, les plantes ne sont pas très hautes mais ramifient bien et assurent ainsi une bonne couverture du sol. Ce point nous est paru important car il convenait que ce couvert ne pénalise pas le développement de la plante hyperaccumulatrice, en particulier dans le cas de la mise en place d'un système de culture de type co-culture. Les semences ont été fournies par Sem-Partners (Lenti-Fix, http://www.sem-partners.com).

1.1.1.3. Choix du substrat de culture

Le sol utilisé dans cette expérience était un sol agricole, collecté à la profondeur de 10 à 20 cm sur la Ferme Expérimentale de « La Bouzule » de l'Université de Lorraine (48°44'22.27''N, 6°19'19.85''E, Meurthe et Moselle, France). Il s'agissait d'un sol à précédent pois contenant naturellement des *Rhizobium leguminosarum*. Après collecte et tamisage à 5 mm, diverses analyses physico-chimiques ont été réalisées (Annexe 1). Il ressort que la quantité de nickel extractible au DTPA était de 1,8 $mg.kg^{-1}$ sol sec et le contenu en Ni pseudo-total était de 67,5 $mg.kg^{-1}$ sol sec. Les pourcentages en argiles, limons et sables étaient respectivement de 36,7, 51,5 et 7,2%. Le pH était de 6,4, le rapport C/N de 9,2 et le rapport de Mg/Ca de 0,08. Le contenu en P disponible (P Olsen) était de 63 $mg.kg^{-1}$.

1.1.1.4. Dispositif expérimental et traitements

Le dispositif expérimental adopté est un dispositif en bloc avec randomisation totale. Pour chaque traitement, trois blocs ont été envisagés (Photographie 1). Trois traitements ont été considérés :

- culture de la lentille sur sol agricole artificiellement contaminé (6 concentrations différentes de $NiSO_4$, $7H_2O$),
- culture de la lentille sur sable inoculé par une souche de *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* et artificiellement contaminé (6 concentrations différentes de $NiSO_4$, $7H_2O$),
- culture de ray-grass sur sol agricole artificiellement contaminé (6 concentrations différentes de $NiSO_4$, $7H_2O$).

Le sol ainsi que le sable de rivière utilisé (préalablement lavé par une solution d'acide chlorhydrique (N/3) pendant 12 heures afin de minéraliser toutes les résidus organiques puis rincé 3 fois avec de l'eau distillée) ont été contaminés par différentes concentrations de nickel (0, 10, 20, 30, 60 et 90 mg Ni kg^{-1} sol sec) apporté sous forme de ($NiSO_4$, $7H_2O$). Après contamination, chaque lot a été incubé durant 15 jours avant la mise en place de la culture.

Des tubes en PVC (tubes cylindriques en chlorure de polyvinyle) de 4,7 cm de diamètre et 22 cm de hauteur ont été remplis, soit :

- par 416,2 g de sol sec préalablement contaminé. Puis une graine de lentille ou de ray-grass a été semée par tube. Les plants de ray-grass (*Lolium multiforum* L. *italicum*, France) correspondent au témoin négatif, non-fixateur d'azote atmosphérique. Les graines de ray-grass ont été fournies par Drillaud (www.jouffray-drillaud.com),
- par 393,02 g de sable préalablement contaminé. Avant le semis, les graines de lentille ont été désinfectées par l'immersion dans de l'éthanol (95%) pendant 30 secondes, puis par

immersion dans du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, 3%). Enfin, elles ont été lavées 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Puis, les semences de lentilles ont été inoculées par une souche de *Rhizobium* (*Rhizobium leguminosarum biovar viciae* souche 1435 ; Becker Underwood, Canada) à partir d'une formulation qui permet d'apporter au moins 10^9 cellules viables par gramme de semences en se basant sur le rapport de 1,2 kg de la formulation pour 600 kg de graines, selon les instructions du fournisseur. Ces plants de lentille correspondaient au témoin positif, fixateur d'azote atmosphérique, ce qui permettra de quantifier le N_2 atmosphérique fixé par la méthode d'abondance naturelle du ^{15}N.

Photographie 1 : Dispositif expérimental en tube de culture en phytotron (culture de lentille et de ray-grass sur sol contaminé ; culture de lentille sur sable contaminé et inoculée par une souche de *Rhizobium*)

1.1.1.5. Suivi de la culture

Les tubes de culture ont été arrosés trois fois par semaine durant toute la durée de la culture (2 mois) par ajustement à 70% de la capacité de rétention en eau du sol et du sable avec de l'eau distillée. Les conditions de culture étaient les suivantes : la photopériode était 16h avec une température nocturne de 18°C et une température diurne de 22°C. L'humidité relative était de 70% et l'intensité lumineuse (PPFD) de 350 µmol m^{-2} s^{-1}.

1.1.1.6. Variables mesurées

Différents paramètres abiotiques (physico-chimiques) et biotiques ont été mesurés (au semis et à la récolte).

a. Paramètres abiotiques

Le pH, l'humidité du substrat de culture (%), la CEC ($cmol^{+}.l^{-1}$) et les cations échangeables ($mg.kg^{-1}$), le carbone et l'azote solubles ($mg.kg^{-1}$), totaux et organiques (%), les ions ammonium et nitrate ($mg.kg^{-1}$), le nickel biodisponible du sol extractible au DTPA ($mg.kg^{-1}$) et les teneurs en nickel pseudo-total ($mg.kg^{-1}$) ont été mesurés.

Les protocoles détaillés figurent dans la partie 2.1. de ce chapitre.

b. Paramètres biotiques

Concernant les plantes, la biomasse sèche de la lentille ($g.plante^{-1}$), les éléments majeurs et mineurs (par mise en solution à l'eau régale, $mg.kg^{-1}$), le carbone et l'azote totaux ($g.plante^{-1}$) et les teneurs en nickel total ($mg.kg^{-1}$), ont été mesurés pour les parties aériennes et racinaires. De plus, le pourcentage d'azote atmosphérique fixé a été quantifié pour la lentille par la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N. Par ailleurs, afin de cerner l'effet du nickel sur la physiologie dans la lentille, les contenus en chlorophylle totale et caroténoïdes ont été estimés dans la biomasse aérienne fraiche, de même que l'activité potentielle de la nitrate réductase.

Les protocoles détaillés figurent dans la partie 2.2 de ce chapitre.

1.1.2. Culture de Fabacées sur un sol naturellement riche en nickel

Plusieurs essais (avec 3 répétitions par traitements) ont été conduits afin de cerner si différentes Fabacées étaient à même de se développer et survivre sur un sol naturellement riche en nickel (sol serpentinique provenant de la région de Melide, 42°49'54.5"N, 8°00'13.5"W, Agolada, Pontevedra, Espagne, Annexe 2), pauvre en éléments nutritifs tels que le potassium et le phosphore et caractérisé par un rapport molaire calcium/magnésium très faible.

Le premier essai a tout d'abord consisté en la mise en place d'une culture de lentille sur le sol serpentinique retenu (essai de 6 semaines). Pour le second essai, d'une part, le sol a été amendé avec du sulfate de calcium dihydraté (le gypse : $CaSO_4$, $2H_2O$, 300 mg de Ca kg^{-1} de sol sec) pour équilibrer le rapport Ca/Mg et d'autre part, une pulvérisation des plantes avec de l'acide salicylique ($C_7H_6O_3$, 1 mM, Wang *et al.*, 2009) a été réalisée (essai de 4 semaines). Le troisième essai a consisté à amender le sol avec du nitrate de calcium ($Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$, 300 mg de Ca kg^{-1} de sol sec) (essai de 2 semaines). Lors d'un quatrième essai, nous avons amendé le sol avec des doses croissantes de sulfate de calcium (0, 100, 300, 600, 900 mg de Ca kg^{-1} sol sec), (essai de 6 semaines). Enfin, le dernier essai nous a permis de tester plusieurs légumineuses (vesce, pois, haricot, fève, luzerne, lentille) avec trois doses de calcium sous

forme de sulfate de calcium (0, 300 et 600 mg Ca kg^{-1} sol sec) et avec l'ajout d'une fertilisation P, K (fertilisation de 0-52-34 NPK, soit 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4 équivalent à 122.5 kg de phosphore et 156,2 kg de potassium à l'hectare).

Toutes les expériences précédentes nous ont permis de définir quels amendements et quelles légumineuses seront retenus dans la suite de la thèse, à la fois pour l'expérimentation en pots mais aussi en parcelles, *in situ*. Nous avons retenu la vesce, pour l'expérience en pots en conditions contrôlées et pour l'expérience réalisée au champ. Concernant la fertilisation, des amendements en sulfate de calcium et en phosphate de potassium seront réalisés pour l'expérience en pot et en parcelles, aux doses respectivement de 600 et 300 mg Ca kg^{-1} sol sec et de 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4.

1.1.3. Mise en place de systèmes de culture associant des Fabacées et une plante hyperaccumulatrice de nickel en pot sur un sol naturellement riche en nickel

1.1.3.1. Objectifs

Une expérience en conditions contrôlées a été mise en place dans le but d'évaluer, sur un cycle de culture complet (d'une durée de 11 mois), quel système de culture (co-culture *versus* rotation) associant une plante hyperaccumulatrice (*Alyssum murale*) et une Fabacée (la vesce) permet d'améliorer l'efficience d'extraction du nickel naturellement présent dans le sol ultramafique utilisé.

1.1.3.2. Choix des espèces végétales

La plante hyperaccumulatrice retenue était *Alyssum murale* Waldst. & Kit. (récemment rebaptisée *Odontarrhena muralis*, (Španiel *et al.*, 2015). Les graines ont été récoltées dans la région de Trigona, en Grèce (N 39°47'17,5"" E 21°25'19,1") en août 2014.

Les graines de vesce (*Vicia sativa* var. Prontivesa) ont été fournies par Semillas Batlle (Espagne, www.semillasbatlle.es).

1.1.3.3. Choix du substrat de culture

Le sol utilisé dans cette expérimentation était un sol ultramafique collecté dans la région de Melide en Espagne (42°49'54.5"N, 8°00'13.5"W, Agolada, Pontevedra, Espagne). Une fois collecté (1000 kg équivalent sec), le sol a été envoyé en France à la Station Expérimentale du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GIFSI) localisée à Homécourt

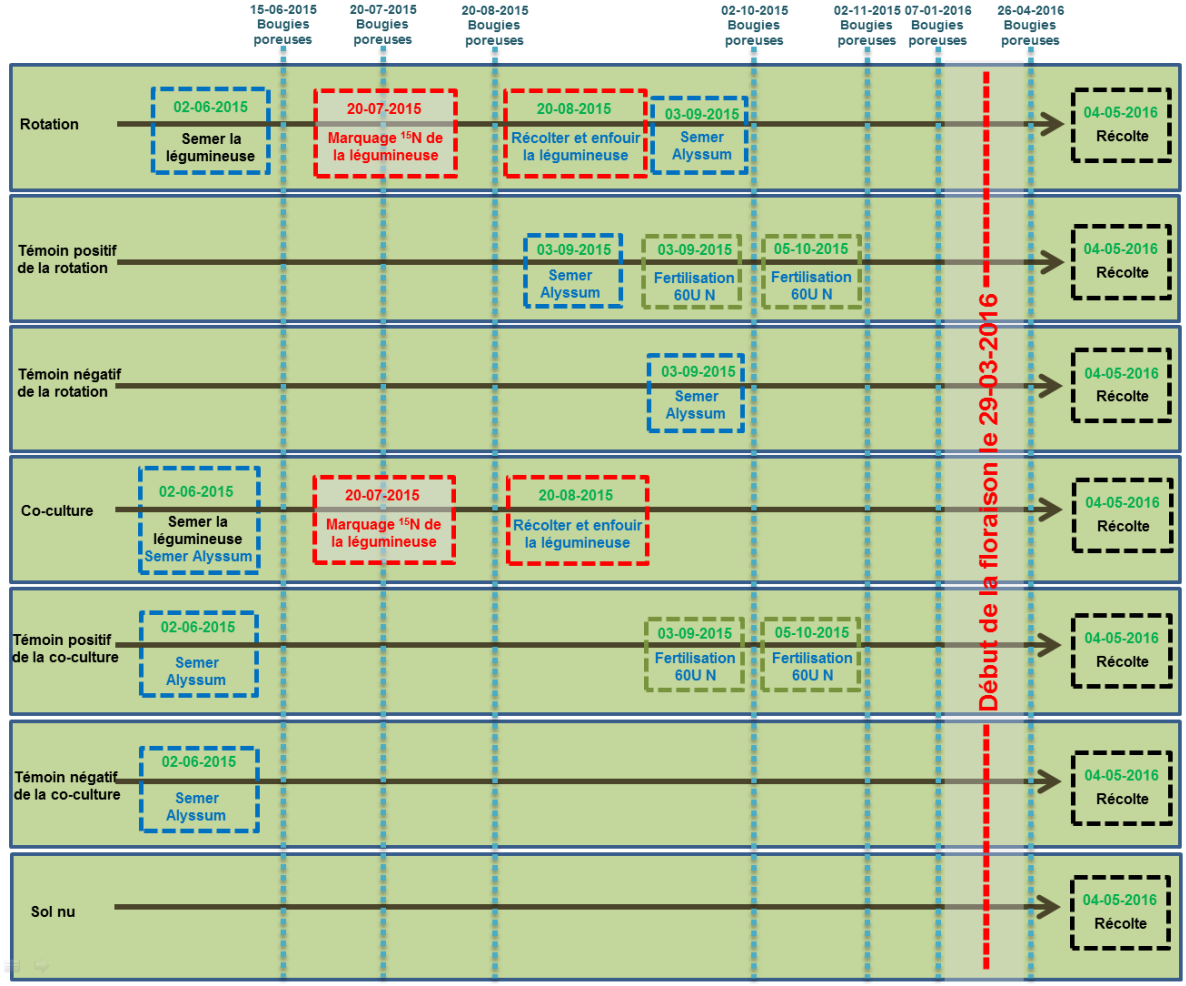
(Meurthe et Moselle, 54) pour être séché à l'air et tamisé à 5 mm. Puis le sol a été amené au Laboratoire Sols et Environnement (LSE) situé à Nancy où il a été amendé avec d'une part, une dose de 600 mg de Ca kg^{-1} de sol sec (sous forme de $CaSO_4$, $2H_2O$), équivalent à 4,5 tonnes à l'hectare et d'autre part, avec du KH_2PO_4 (fertilisation de 0-52-34 NPK, soit 152,52 $mg.kg^{-1}$ de sol sec, équivalent à 122,5 kg de phosphore et 156,2 kg de potassium à l'hectare). Cet amendement a été réalisé par séries de sacs contenant chacun 10 kg de sol sec et les doses de fertilisants nécessaires ; chaque sac étant fermé hermétiquement et agité manuellement pendant 10 minutes. Les analyses physicochimiques de ce sol avant amendements ont été faites par le Laboratoire d'Analyses des Sols (LAS) de l'INRA d'Arras (France). La quantité de nickel biodisponible extractible au DTPA était 24,8 $mg.kg^{-1}$ de sol sec et le contenu en Ni pseudo-total de 861 $mg.kg^{-1}$ de sol sec. Les pourcentages en argiles, limons et sables étaient respectivement de 17,5, 30,6 et 51,9 %. Le pH était de 5,76, le rapport de C/N de 13,9 et le rapport de Mg/Ca de 2,79. Le contenu en phosphore disponible (P Olsen) était de 23 $mg.kg^{-1}$ de sol sec (Annexe 2).

1.1.3.4. Dispositif expérimental et traitements

Le dispositif expérimental adopté est un dispositif en bloc avec randomisation totale. Pour chaque traitement, cinq répétitions ont été envisagées. Sept traitements ont été considérés (Tableau 2) :

- la rotation : culture de la Fabacée (vesce), puis, après destruction de la Fabacée, mise en place de la culture de *Alyssum murale*,
- le témoin positif de la rotation (culture de *Alyssum murale* dans la deuxième partie de l'expérience avec apport d'une fertilisation minérale de 120 kg N à l'hectare apportée sous forme d'ammonitrate (la quantité a été apportée en 2 fois),
- le témoin négatif de la rotation (culture de *Alyssum* seule dans la deuxième partie de l'expérience),
- la co-culture : culture de la Fabacée (vesce) conjointement à la mise en place de la culture de *Alyssum murale*,
- le témoin positif de la co-culture (culture de *Alyssum murale,* seule, avec implantation dès le début de l'expérimentation puis apport d'une fertilisation minérale de 120 kg N à l'hectare apportée sous forme d'ammonitrate (la quantité a été apportée en 2 fois),
- le témoin négatif de la co-culture (culture de *Alyssum murale,* seule, avec implantation dès le début de l'expérimentation),
- le témoin sans plante (sol nu).

Tableau 2 : Opérations réalisées pour chaque traitement au cours de l'expérience en conditions contrôlées dès le semis jusqu'à la récolte



Des pots en PVC d'un volume de 7 litres (diamètre de 17,6 cm, hauteur de 30 cm et surface de 243,16 cm^2) ont été remplis par 3957,2 g de sol (équivalent sec) amendé ou non. Sur la base des densités de semis préconisées pour la Fabacée à l'hectare (30 kg de semences $hectare^{-1}$ pour la vesce), deux graines de Fabacée ont été semées par pot. Deux graines d'*Alyssum murale* ont également été semées par pot. Le nombre total des pots était 70 (Photographie 2 et Figure 5).

Photographie 2 : Mise en place des 35 pots (co-culture, rotation *Alyssum murale* – vesce) en conditions contrôlées (Juin 2015)

Ventilation

Bloc 1	R+ V 1	C V 1	C- V 1	R- V 1	SN V 1	R V 1	C+ V 1
Bloc 2	C- V 2	C+ V 2	R- V 2	C V 2	R V 2	R+ V 2	SN V 2
Bloc 3	R- V 3	C+ V 3	C- V 3	R+ V 3	C V 3	R V 3	SN V 3
Bloc 4	C+ V 4	SN V 4	R+ V 4	C V 4	C- V 4	R- V 4	R V 4
Bloc 5	C- V 5	C V 5	R+ V 5	R- V 5	R V 5	SN V 5	C+ V 5

Porte

Figure 5 : Dispositif expérimental en pots en conditions contrôlées : « V » pour vesce, « R » pour rotation, « R-» pour témoin négatif de la rotation, « R+ » pour témoin positif de la rotation, « C » pour co-culture, « C- » pour témoin négatif de la co-culture, « C+ » pour témoin positif de la co-culture, « SN » pour témoin sol nu

1.1.3.5. Suivi de la culture

L'expérience a duré 11 mois. Dans la mesure où le semis de *Alyssum murale* n'a pas eu lieu au même moment suivant le système de culture étudié (co-culture *versus* rotation ; semis décalé de 13 semaines), il a été décidé de tenter d'initier la floraison de cette plante hyperaccumulatrice afin, en fin d'expérimentation, de pouvoir comparer des plantes ayant atteint le même stade phénologique. Ainsi, au cours des 11 mois de cultures, les paramètres climatiques (photopériode, arrosage, températures nocturne et diurne) ainsi que l'arrosage (apport d'eau du réseau urbain) ont été modulés, tentant de simuler un hiver, puis un printemps avec reprise de végétation et un début d'été avec floraison.

Durant 23 semaines, la photopériode était 16h, la température nocturne de 18°C, la température diurne de 22°C jour, l'humidité relative de 70% et l'intensité de la lumière (PPFD) de 350 µmol m^{-2} s^{-1}. Les pots étaient arrosés 3 fois par semaine par ajustement (par pesée de chaque pot) de la capacité de rétention du sol en eau à 70%, avec de l'eau du réseau urbain (Annexe 3). Puis durant 8 semaines, nous avons diminué progressivement certains paramètres climatiques : la température a été diminuée à 13°C le jour et 7°C la nuit, la photopériode était de 8h et la capacité de rétention en eau du sol a été réduite à 60%. Ensuite, nous avons encore réduit l'arrosage durant 3 semaines avec ajustement des pots à une capacité de rétention en eau du sol de 55% tout en maintenant la température aux valeurs précédentes (13°C le jour et 7°C la nuit). Puis durant 4 semaines, nous avons augmenté la capacité de rétention du sol en eau à 60% et la photopériode a été réajustée à 16h avec une température de 19°C le jour et de 16°C la nuit. Après cette période et jusqu'à la fin de l'expérience (8 semaines) la capacité de rétention en eau était de 65%, la photopériode fixée à 16h et la température a été augmentée progressivement jusqu'à atteindre 25°C le jour et 20°C la nuit, afin de simuler les conditions climatiques d'un début d'été. La Figure 6 présente l'ensemble des paramètres climatiques ainsi que les quantités d'eau apportées lors de la culture. Ainsi, il a été possible, de préciser (pour la première fois) les conditions de culture permettant l'obtention, en conditions contrôlées, de la floraison de *Alyssum murale*. Il convient néanmoins de noter que le phytotron utilisé a montré un disfonctionnement en semaine 34, se traduisant par une augmentation, non souhaitée, de la température.

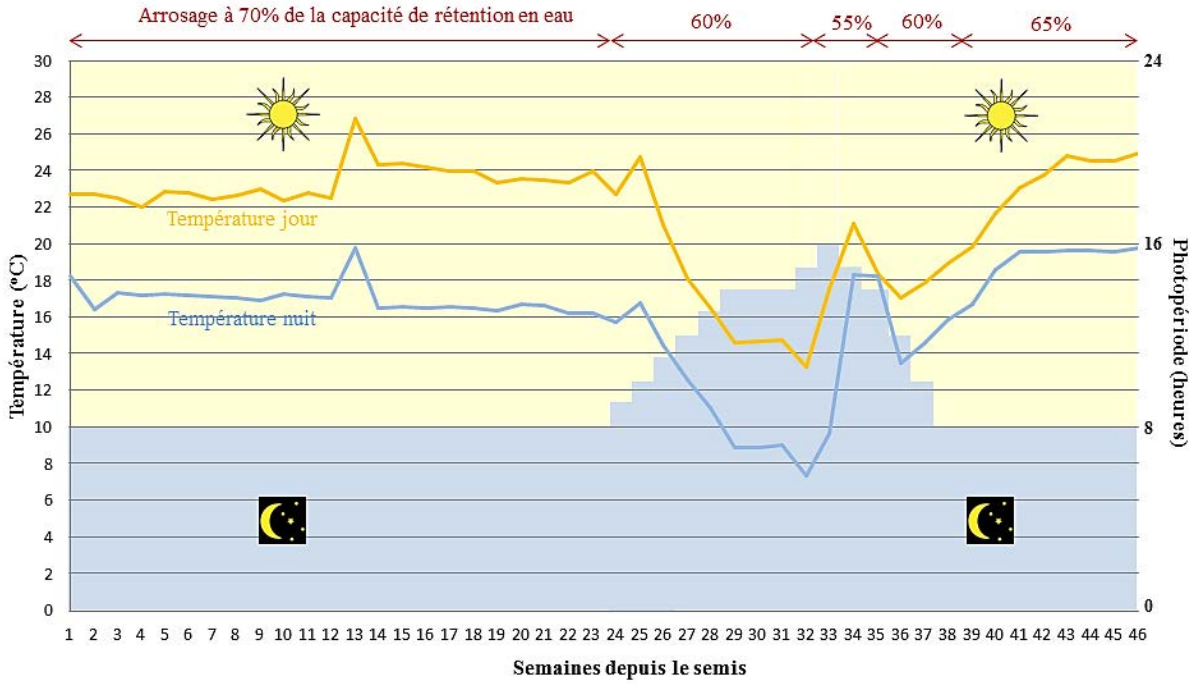


Figure 6 : Evolution de la température, de l'arrosage et de la photopériode depuis le semis jusqu'à la récolte (les valeurs de la température sont les valeurs réelles enregistrées au cours de l'expérience)

1.1.3.6. Variables mesurées

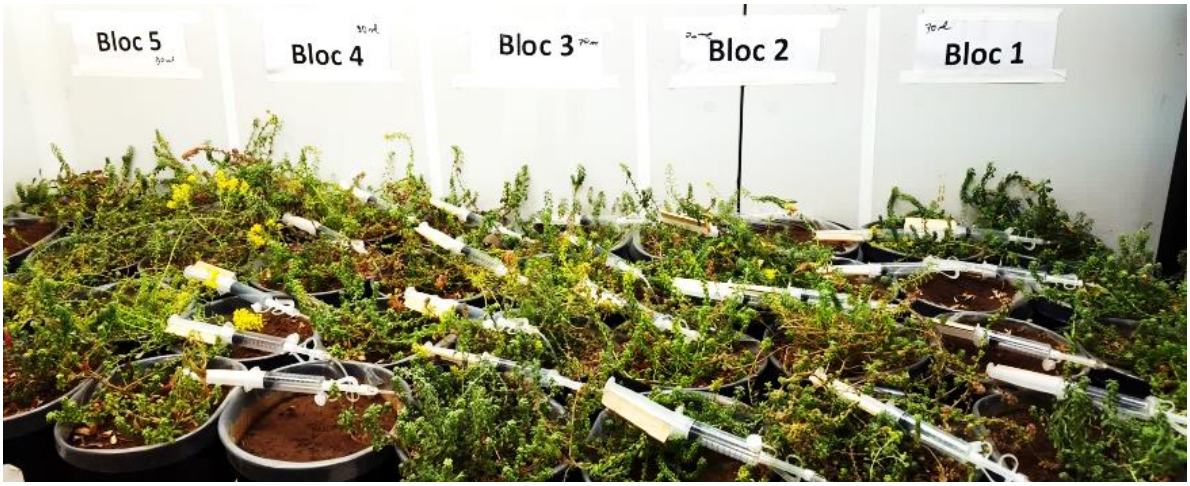
Différents paramètres ont été mesurés au semis mais aussi à la récolte, qui a été réalisée à la floraison des plantes de *Alyssum murale*, après 11 mois de culture.

a. Paramètres abiotiques

A la récolte, après avoir fait sécher en étuve (40°C) une partie du sol de chaque pot, le pH, l'humidité (%), la CEC ($cmol^{+}.l^{-1}$) et les cations échangeables ($mg.kg^{-1}$), le carbone et l'azote solubles ($mg.kg^{-1}$), totaux et organiques (%), les ions ammonium et nitrate ($mg.kg^{-1}$), le nickel biodisponible extractible au DTPA et le nickel pseudo-total du sol ($mg.kg^{-1}$) ont été mesurés (T=11 mois). Ces mesures avaient également été faites au semis (T=0).

Les protocoles détaillés figurent dans la partie 2.1 de ce chapitre.

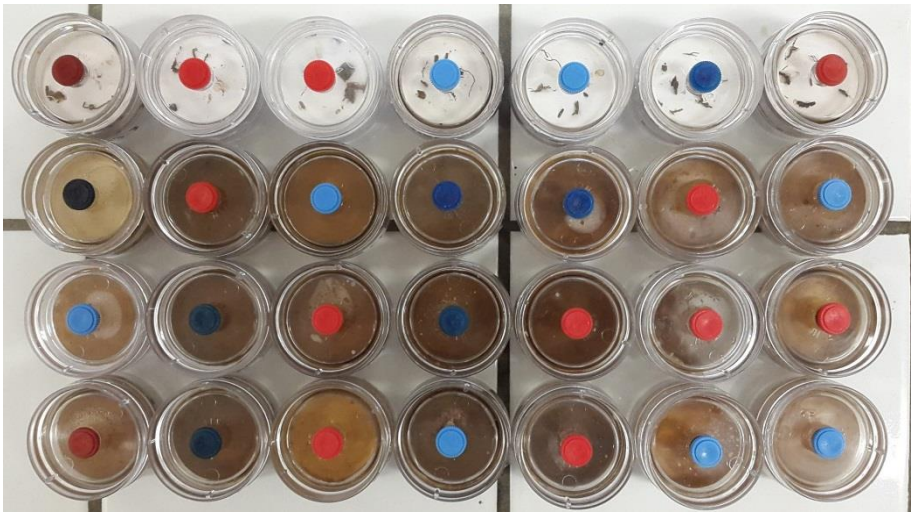
Des bougies poreuses (mini-rhizons, 0.45 µm, SDEC, France) ont été également insérées dans les pots (dès le semis) et la solution du sol a été extraite régulièrement (semaines 2, 7, 11, 16, 21, 25, 29 après le semis et enfin la semaine 44 juste avant la récolte) afin de doser le carbone et l'azote dissous, les concentrations en anions et en cations majeurs ainsi que les concentrations en métaux (Photographie 3).



Photographie 3 : Extraction de la solution de sol à l'aide des bougies poreuses (mini-rhizons) (mai 2016)

Nous avons également envisagé de caractériser et de comparer la structure et le biofonctionnement des sols de chaque traitement. Pour cela, il a été réalisé un fractionnement granulo-densimétrique sans destruction préalable des matières organiques, puis par des observations en microscopie électronique à transmission (MET), il a été réalisé une caractérisation de la répartition des différents types d'agrégats minéraux, organo-minéraux et bactériens dans les fractions argiles/limons fins/limons grossiers et des matières organiques

(Photographie 4). Ceci s'est inscrit dans le cadre de collaborations avec l'entreprise « MICROHUMUS Laboratoire » à Nancy.



Photographie 4 : Etape intermédiaire dans la préparation des échantillons (filtration dans des boîtes Millipore)

b. Paramètres biotiques

A la récolte, les racines et les parties aériennes ont été collectées. Les racines, lavées avec de l'eau distillée, ont été mises à sécher en étuve à 70ºC pendant 72h tout comme les parties aériennes.

Environ 200 g de sol ont été placés à 4°C en chambre froide pour les analyses microbiologiques et deux eppendorfs (environ 2 x 1,5g de sol frais) ont été placés au congélateur (-20°C) pour les analyses moléculaires (caractérisation de la diversité des communautés bactériennes des sols).

A l'approche du stade de la floraison des plants d'*Alyssum murale*, la phénologie a été suivie en prenant comme référence les stades repères de la floraison chez le colza (*Brassica napus*), (Figure 7) établis par le Centre Technique « Terres Innovia » (http://www.terresinovia.fr/). Le colza a été choisi comme plante de référence dans la mesure où il appartient à la même famille botanique qu'*Alyssum murale* : les Brassicacées. Un stade était considéré atteint, lorsque 50% des plantes avaient atteint ce stade.

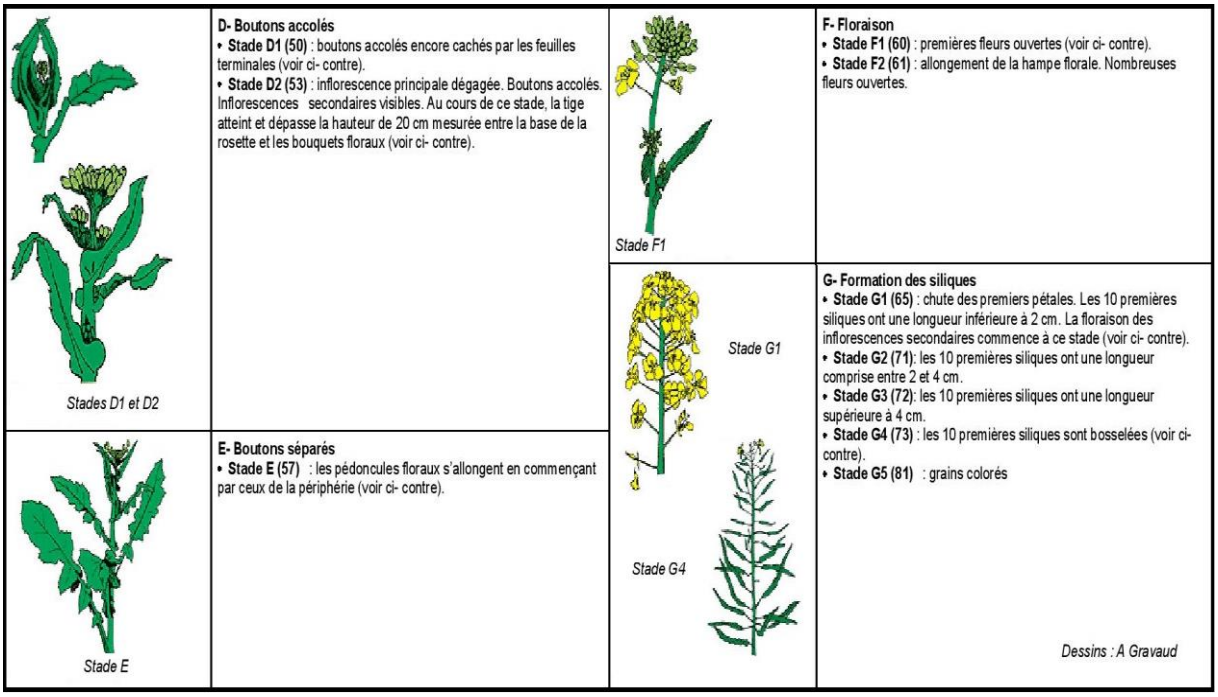


Figure 7 : Stades de floraison du Colza (*Brassica napus*) (http://www.terresinovia.fr/)

Enfin, à la récolte des plantes, la biomasse sèche (g), les éléments majeurs et mineurs (par mise en solution à l'eau régale, $mg.kg^{-1}$), le carbone et l'azote totaux (%) et les teneurs en en nickel pseudo-total ($mg.kg^{-1}$) ont été mesurés pour les parties aériennes et racinaires des plantes.

Concernant la microflore tellurique, la biomasse microbienne carbonée ($mg\ C.kg^{-1}$) et azotée $mg.N\ kg^{-1}$) (fumigation-extraction), différentes activités enzymatiques microbiennes (uréase, phosphatase, β-glucosidase, arylsulfatase, FDA, ACC deaminase), la diversité catabolique des communautés bactérienne (Biolog Ecoplate^{TM}), et la diversité et structure génétiques des communautés bactérienne (approche de séquençage haut débit) ont été caractérisées. Les approches de séquençage (diversité bactérienne) s'inscrivent dans le cadre de collaborations avec le Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) du Luxembourg.

Les protocoles détaillés figurent dans la partie 2.3 de ce chapitre.

1.1.4. Impact du système de culture sur la structure du sol et l'architecture racinaire

1.1.4.1. Objectifs

L'association d'une légumineuse avec une plante d'intérêt agronomique (colza, blé) est connue pour améliorer la structure du sol et modifier l'architecture du système racinaire de la plante d'intérêt. Ainsi, une expérimentation en conditions contrôlées a été mise en place en

utilisant des rhizotrons (bacs de culture avec l'un des côtés constitué d'une vitre spéciale antireflet, permettant de visualiser le système racinaire). L'objectif était de cerner, sur une courte période, l'effet de la co-culture et de la rotation sur des paramètres physico-chimiques du sol et sur l'architecture du système racinaire de *Alyssum murale*.

1.1.4.2. Choix du support de culture

Le sol utilisé dans cette expérience était le même que celui utilisé pour l'expérimentation en pots et provenait de Melide. Des rhizotrons en PVC de dimensions 30x15x5 cm ont été remplis chacun avec 2239 g de sol (équivalent sec). Ce sol a été amendé par 600 mg de Ca kg^{1} de sol sec (équivalent à 4,5 tonnes de gypse à l'hectare) et 155,2 mg de KH_2PO_4 (fertilisation de 0-52-34 équivalente à 122,5 kg de phosphore et à 156,2 kg de potassium à l'hectare). Deux graines de vesce et une seule graine d'*Alyssum murale* ont été semées par rhizotron et la durée totale de l'expérience a été fixée à 3,5 mois du fait de la taille relativement réduite des rhizotrons. Les graines de la vesce (*Vicia sativa* var. Prontivesa) ont été fournies par Semillas Batlle (Espagne, www.semillasbatlle.es) et les graines d'*Alyssum murale* utilisées avaient été récoltées dans la région de Trigona (Grèce) en août 2014.

1.1.4.3. Dispositif expérimental et traitements

Cette expérimentation a été mise en place le 15 mars 2016 et la récolte a eu lieu le 30 juin 2016. Le dispositif expérimental était un dispositif en bloc avec randomisation totale et en considérant trois répétitions pour chaque traitement. Les traitements envisagés étaient les suivants :

- la rotation (culture de la vesce puis semis de *Alyssum murale*),
- la co-culture (semis de la vesce et de *Alyssum murale* conjointement),
- un témoin positif (*Alyssum murale* et fertilisation minérale de 60 kg N à l'hectare ajoutée sous forme d'ammonitrate),
- un témoin négatif (*Alyssum murale* seule),
- un témoin sol nu (sans plante).

1.1.4.4. Suivi de la culture

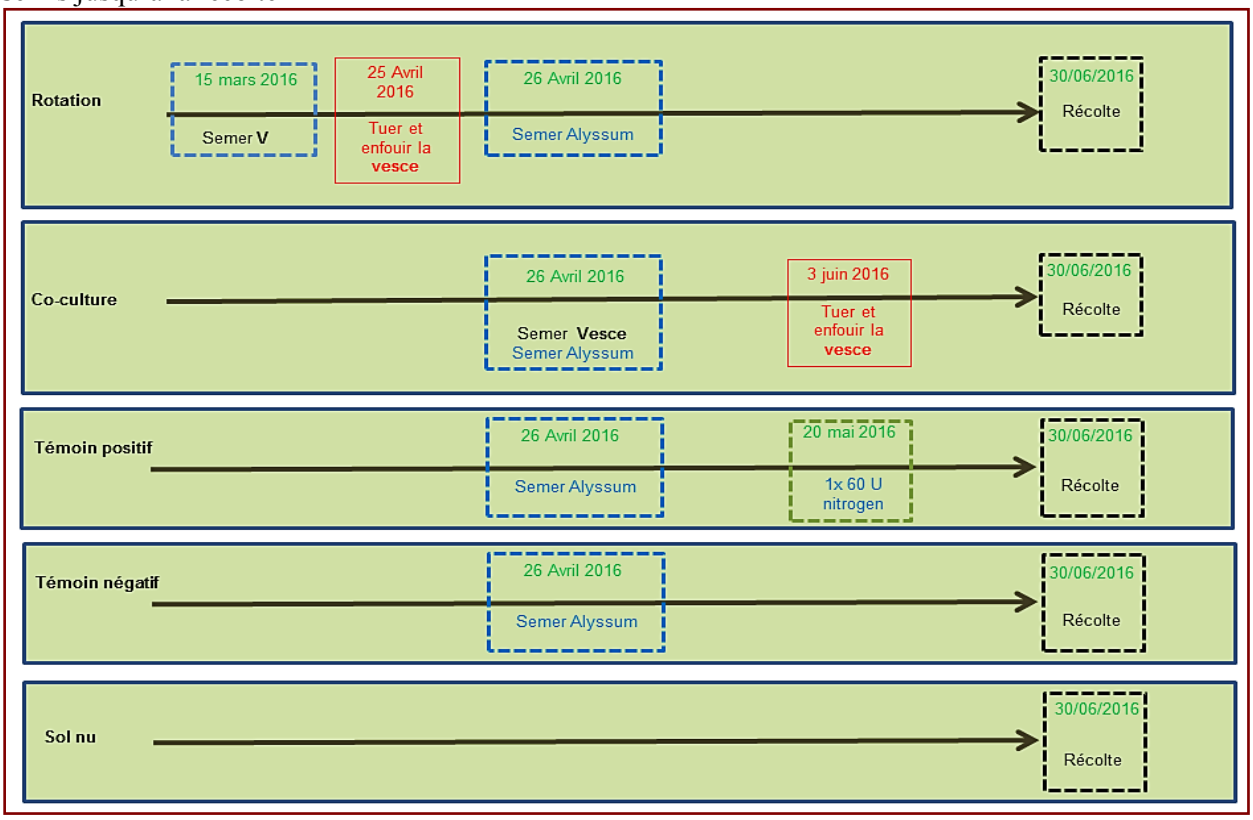
Les rhizotrons, placés en phytotron, ont été arrosés 3 fois par semaine avec de l'eau du réseau urbain (Annexe 3). Les conditions de culture étaient les suivantes : une photopériode de 16h, une température nocturne de 18°C et une température diurne de 22°C jour, une humidité relative de 70% et une intensité lumineuse (PPFD) de 350 µmol m^{-2} s^{-1}.

Dans le cas de l'association de *Alyssum murale* avec la légumineuse (co-culture), cette dernière a été détruite après un mois de culture du fait du volume limité des rhizotrons. Pour cela, les parties aériennes de la légumineuse ont été récoltées, séchées, pesées, broyées, puis enfouies dans les deux premiers centimètres sous la surface du sol. Dans le cas de la rotation, la vesce a été aussi détruite après un mois de culture (avant de semer *Alyssum*). Les parties aériennes ont été détruites, puis ces dernières ont été séchées, pesées, broyées et enfouies dans les deux premiers centimètres de la surface du sol du rhizotron.

La fertilisation minérale azotée a été apportée pour le traitement « témoin positif » en respectant la concentration de 60 kg N à l'hectare, un mois après le semis des graines d'*Alyssum murale*.

L'ensemble des opérations réalisées est résumé dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Opérations réalisées pour chaque traitement au cours de l'expérience en rhizotrons du semis jusqu'à la récolte



1.1.4.5. Variables mesurées

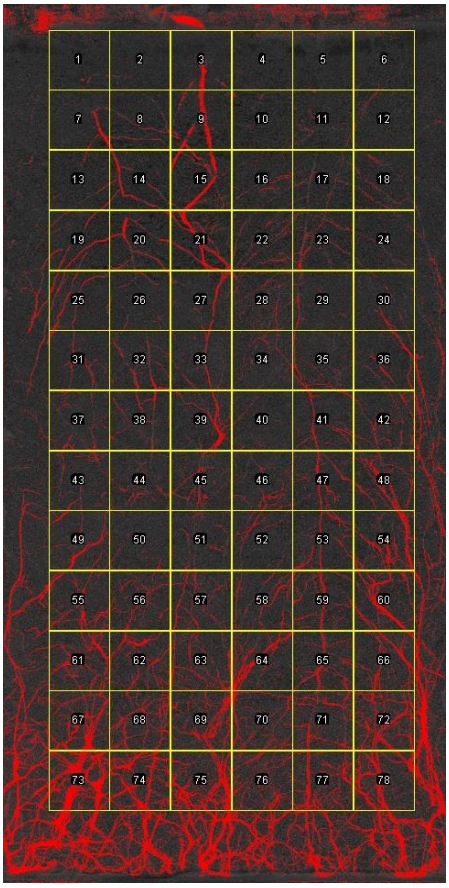
Différents paramètres biotiques et abiotiques ont été étudiés.

a. Paramètres biotiques

L'étude du développement et de l'interaction entre les deux systèmes racinaires de la légumineuse (la vesce) et *Alyssum murale* a été effectuée par la mise en place de 5 scanneurs (1 scanneur par traitement) EPSON V750 Perfection Pro. Chaque jour, du semis à la récolte, la face transparente des rhizotrons, qui permet de visualiser les systèmes racinaires, a été scannée afin d'avoir un suivi de leurs développements (Photographie 5).

Photographie 5 : Dispositif des rhizotrons avec scanners mis en place en chambre de culture

A la récolte, la dernière image du scan a été traitée avec le logiciel Image J (Wayne Rasband, National Institues of Health, USA, http://imagej.nih.gov/ij). Une maille électronique a été créée par un script automatique afin d'estimer le pourcentage de la surface couverte par les racines des images créées à partir des scanneurs EPSON. Ce script consistait à mesurer le pourcentage de la couleur prédéfinie dans des carrés de surface de 2 cm^2 des images (Photographie 6).



Photographie 6 : Mesures du pourcentage de la surface couverte par les racines (les racines sont en couleur rouge)

De plus, également à la récolte, l'architecture du système racinaire a été étudiée à l'aide du logiciel WhinRhizo (Regent Instruments, Québec, Canada). Cette approche permettait pour chaque traitement de définir la surface racinaire, le diamètre moyen des racines, la longueur totale du système racinaire et le nombre d'apex.

La biomasse sèche (g) des parties aériennes et racinaires de la plante hyperaccumulatrice, les éléments majeurs et mineurs (par mise en solution à l'eau régale, $mg.kg^{-1}$), le carbone et l'azote totaux (%) et les teneurs en nickel pseudo-total ($mg.kg^{-1}$) ont été mesurés pour les parties aériennes et racinaires.

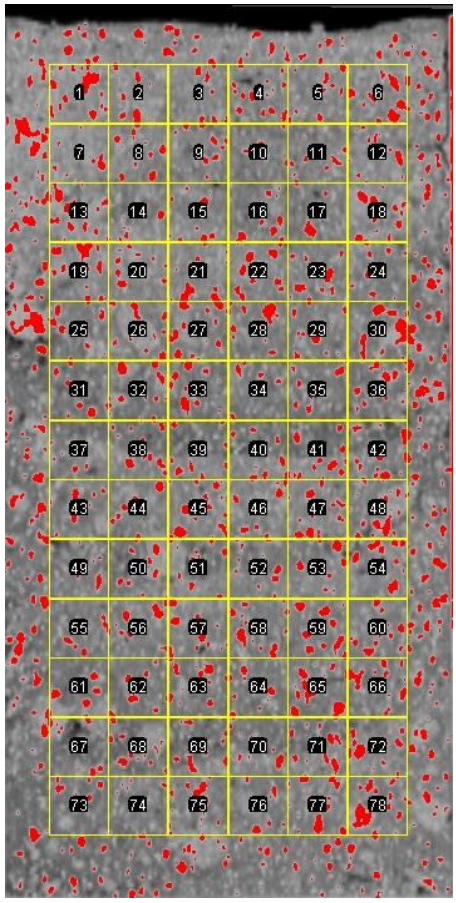
b. Paramètres abiotiques

La texture et les caractéristiques physico-chimiques du sol au temps T0 a été déterminée par le Laboratoire d'Analyses des Sols (LAS) de l'INRA situé à Arras, France (Annexe 2).

L'étude de la structure porale des sols a été réalisée, à la récolte, par tomographie à rayon X et analyses d'images, afin de cerner l'impact du système de culture (co-culture *versus* rotation) sur le réseau poral. Cette technique consiste à scanner la surface vitrée du rhizotron par imagerie par résonance magnétique (IRM), utilisée en diagnostic médical. A partir de chaque

image créée, une sous-image a été sélectionnée afin d'éviter les artefacts dus aux bordures en PVC des rhizotrons. Puis cette sous-image a été traitée avec le logiciel Image J (Wayne Rasband, National Institues of Health, USA, http://imagej.nih.gov/ij). Les approches par tomographie s'inscrivent dans le cadre de collaborations avec l'INRA de Champenoux, UMR 1092 AgroParisTech INRA, Laboratoire d'Etude des Ressources Forêt Bois "LERFoB", Plate-forme Technique Xylosciences.

A la récolte, une maille électronique a été créée par un script automatique afin d'estimer d'une part, le pourcentage de pores des images créées suite à la tomographie. Ce script consistait à mesurer le pourcentage de la couleur prédéfinie dans chaque carré de surface de 2 cm^2 des images (Photographie 7).



Photographie 7 : Mesures de la porosité (les pores sont en couleur rouge)

La variation du pH à la surface du sol à proximité des systèmes racinaires a été étudiée à l'aide d'un pH-mètre de contact (SoilStik™ pH Meter, Field Scout®) après enlèvement de la vitre transparente et de la fabrication d'une maille en fil d'aluminium pour mesurer le pH dans chaque carré défini de 2 cm^2 (Photographie 8).

De plus, afin d'étudier les variations de la biodisponibilité du Ni (Ni extractible au DTPA) et les teneurs en carbone et azotes totaux et organiques à la surface du sol contre la vitre, 5 g de sol ont été prélevés dans chaque carré de 2 cm^2 et séchés.

Photographie 8 : Maille crée pour la mesure du pH à l'aide du pH mètre de contact

L'ensemble de ces données (la porosité, le pH, la surface couverte par les racines, le Ni extractible au DTPA, le carbone et azote totaux et organiques du sol), a été ensuite traité à l'aide du logiciel de géostatistique GeoR version 1.6-17 sous R version 2.8.1 pour Windows® (Gamma design Software) afin de réaliser des « cartes » sur lesquelles a été spatialisé l'ensemble des paramètres étudiés.

De plus, à la récolte, la distribution des particules en volume a été étudiée à l'aide de la granulométrie à diffraction laser. Cette technique utilise le principe de diffraction et de diffusion d'un faisceau laser frappant une particule de sol et permet de cerner d'éventuels changements au niveau des particules et donc de la structuration (agrégation) du sol. La distribution granulométrique a été déterminée en utilisant un « Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer » (Patrica LA-950 V2 Horiba). Le procédé de mesure repose sur la base de la théorie de diffusion de Mie, avec une gamme variant entre 0,01 et 3000 µm en utilisant une sonde à ultrasons avec une période de 20 s et une fréquence de 20 kHz. L'appareil est équipé d'un système optique de deux sources de lumière, une diode laser de l'ordre de 1,6 mW

(650 nm) et une diode de lumière électroluminescente de l'ordre de 0,3 mW (450 nm). L'image de diffraction obtenue est transformée en utilisant un modèle optique et une procédure mathématique appropriés. Le résultat final est illustré sous forme de courbe semi-logarithmique (Mie, 1976).

1.2. Expériences en conditions de plein champ

1.2.1. Mise en place de systèmes de culture associant une Fabacée et une plante hyperaccumulatrice de nickel *in situ*, en conditions de plein champ, sur un sol naturellement riche en nickel

1.2.1.1. Objectifs

Suite à l'établissement d'une collaboration entre notre Laboratoire (LSE) et le Groupe IIGA-CSIC (Instituto de Investigacións Agrobiolóxicas de Galicia (IIAG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), situé à Saint Jacques de Compostelle (N-W Espagne) et animé par le Dr. Petra Kidd, des parcelles expérimentales ont été implantées, en Espagne, sur une zone où le sol est naturellement riche en nickel. En outre, ce dispositif expérimental s'intègre aux projets ANR-10-LABX-21—LABEX RESSOURCES21 et ANR-14-CE04-0005 "Agromine". Les objectifs de cette expérimentation étaient de tester « en situation réelle », *in situ*, sur un cycle de culture complet, quel système de culture (co-culture *versus* rotation) associant une plante hyperaccumulatrice (*Alyssum murale*) et une Fabacée (la vesce) permettait d'améliorer l'efficience d'extraction du nickel naturellement présent dans le sol et d'aboutir à une agromine la plus efficiente.

1.2.1.2. Choix de la zone de culture

Les parcelles ont été mises en place à proximité de Melide, en Galice, au Nord-Ouest de l'Espagne (N 42°49'55,08'' O 8°00'14,60'') (Figure 8).

Figure 8 : Localisation des parcelles

Cette zone se caractérise par la présence de sols ultramafiques (Figure 9). Elle a fait par le passé l'objet d'une activité agricole et pastorale importante, puis a été abandonnée et a été colonisée par une végétation typique des sols serpentiniques avec le développement de bruyères à balai arborescentes telle *Erica scoparia*. Ces dernières se présentent sous la forme d'arbrisseaux pouvant atteindre près de 3 m de hauteur (Photographie 9).

Photographie 9 : Bruyères à balai arborescentes (*Erica scoparia*) avant le labour du champ

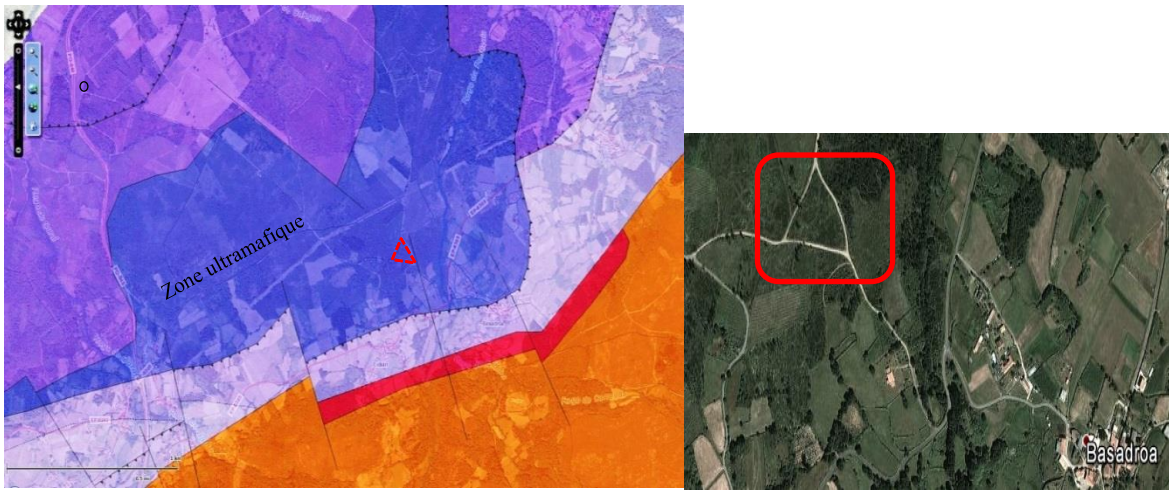


Figure 9 : Localisation des parcelles dans la zone ultramafique de Melide : le triangle en rouge correspond à la zone où les parcelles ont été mises en place (source : Censo Catastral Mineiro de Galicia, http://censomineiro.org/)

Au niveau de cette région, une parcelle de forme triangulaire, baptisée « Triangulo » a été choisie, en accord avec les agriculteurs locaux. Des pré-analyses ont permis de mettre en évidence des teneurs en nickel biodisponible (extractible au DTPA) varient entre 14 et 73 $mg.kg^{-1}$ de sol sec (Figure 10).

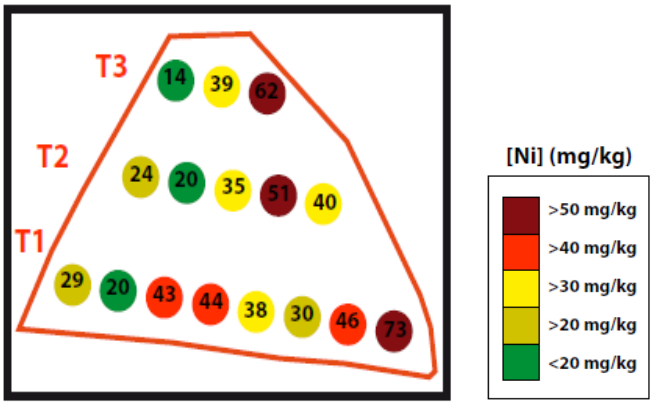


Figure 10 : Teneurs en Ni extractible au DTPA (mg.kg^{-1} de sol sec) dans la parcelle du Triangulo (Moyennes dans les horizons A-B)

1.2.1.3. Dispositif expérimental et traitements

Le dispositif expérimental a été mis en place sur 644 m^2 dans la zone de la parcelle où les teneurs en Nickel biodisponible étaient les plus élevées (partie Sud-Est de la parcelle).

Dans un premier temps, la parcelle a été nettoyée (arrachage des bruyères) puis labourée (Photographie 10).

Photographie 10 : Situation du champ après labour (Avril 2015)

Le dispositif expérimental adopté est un dispositif en bloc avec randomisation totale. Pour chaque traitement, quatre répétitions ont été envisagées. Sept traitements ont été considérés :

- la rotation : culture de la Fabacée (vesce) puis après destruction de la Fabacée, mise en place de la culture de *Alyssum murale*,
- le témoin positif de la rotation (culture de *Alyssum murale* dans la deuxième partie de l'expérience avec apport d'une fertilisation minérale de 120 kg N à l'hectare apportée sous forme d'ammonitrate (la quantité a été apportée en 2 fois),

- le témoin négatif de la rotation (culture de *Alyssum* seule dans la deuxième partie de l'expérience),

- la co-culture : culture de la Fabacée (vesce) conjointement à la mise en place de la culture de *Alyssum murale*,

- le témoin positif de la co-culture (culture de *Alyssum murale,* seule, avec implantation dès le début de l'expérimentation puis apport d'une fertilisation minérale de 120 kg N à l'hectare apportée sous forme d'ammonitrate (la quantité a été apportée en 2 fois),

- le témoin négatif de la co-culture (culture de *Alyssum murale,* seule, avec implantation dès le début de l'expérimentation),

- le témoin sans plante (sol nu).

Ainsi, le dispositif comprenait 28 parcelles de 10 m² chacune (5 x 2 m) (Figure 11). Un espace de 50 cm a été laissé autour de chaque parcelle. Dans la mesure où la zone d'étude montre une légère pente, d'une part, certaines zones à proximité des parcelles fertilisées ont été laissées vides et d'autre part, un film plastique a été enterré à 50 cm de profondeur pour délimiter les parcelles fertilisées et éviter la lixiviation horizontale (du fait de la légère pente) de l'azote après fertilisation. En outre, un canal a été creusé dans la partie haute de la zone étudiée afin de canaliser le surplus d'eau de pluie, provenant de l'écoulement de la route.

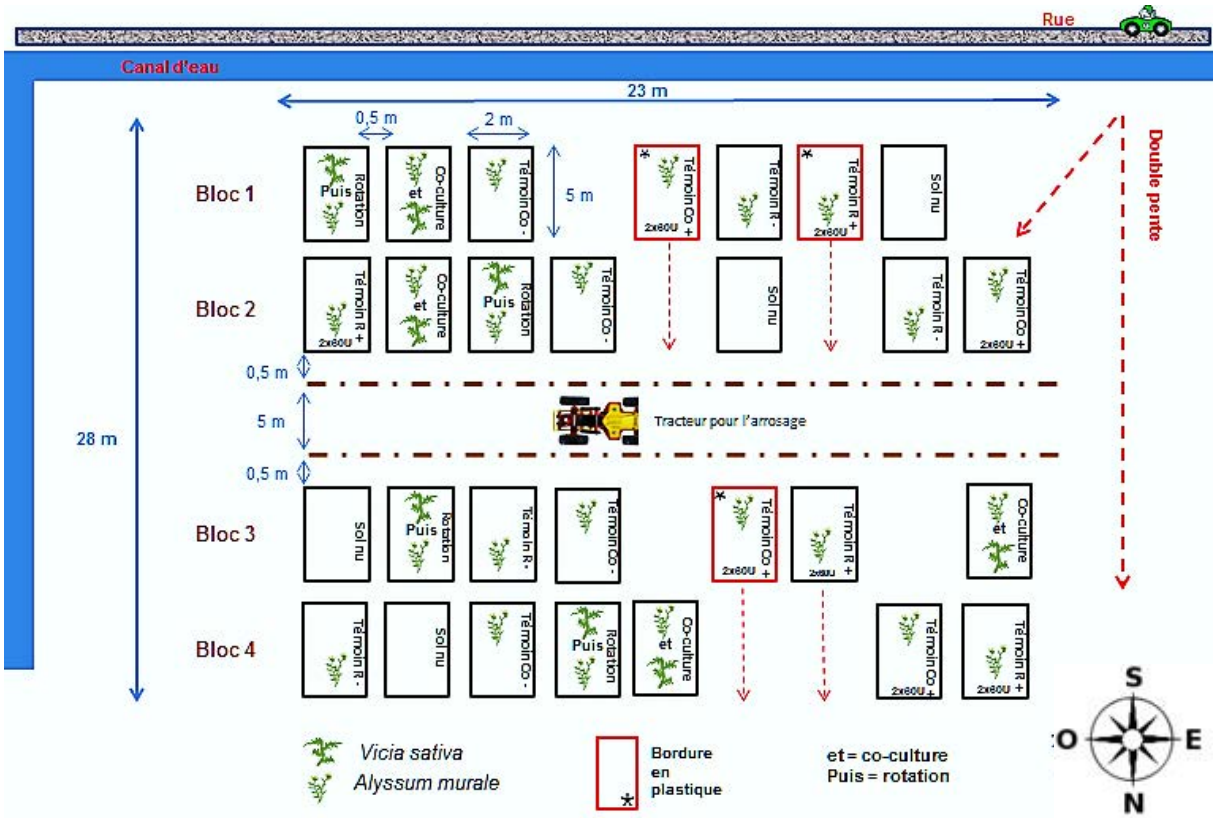


Figure 11 : Dispositif expérimental montrant les 28 parcelles au champ

1.2.1.4. Suivi de la culture

Cette expérimentation a été mise en place fin juin 2015 après la préparation de la parcelle et ajout d'un fertilisant (KH_2PO_4 : 544,25 kg à l'hectare) et de gypse ($CaSO_4$, $2H_2O$: 4,5 tonnes à l'hectare).

L'objectif était d'aboutir à une densité de semis de la vesce de 30 g par parcelle (10 m^2) et de 40 plantes d'*Alyssum murale* par parcelle de 10 m^2, soit 4 plants par m^2.

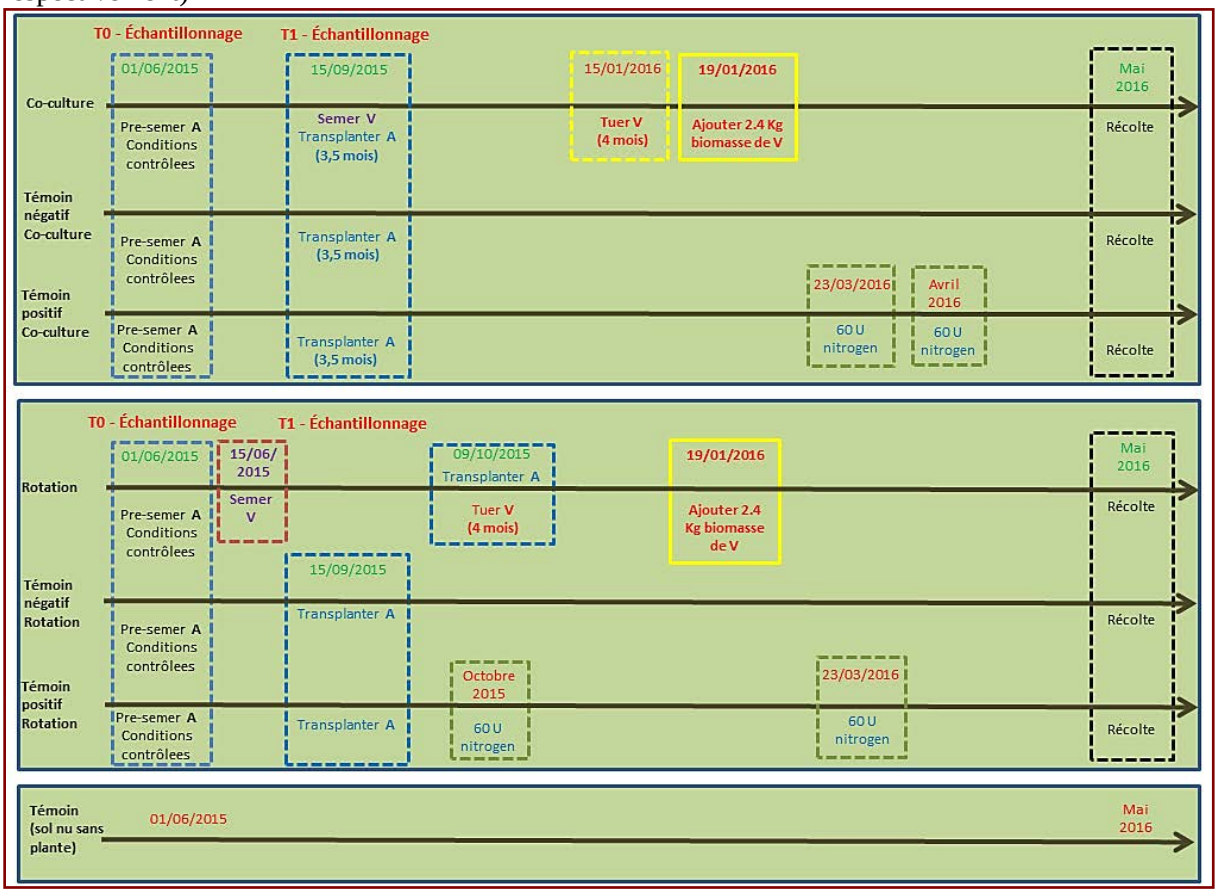
Concernant la vesce, le semis a été réalisé dans le cas de la rotation le 15 juin 2015 et dans le cas de la co-culture le 15 septembre 2015. Pour *Alyssum murale*, les graines ont été semées en plaques de germination remplies avec le même sol que celui de la parcelle. Ce sol a été tamisé à 8 mm et amendé avec les mêmes doses de gypse et de KH_2PO_4 que celles mises dans les parcelles. Dans les plaques de germination, *Alyssum murale* a été semée à raison de 3 graines par alvéole, mais une seule plantule a été conversée après germination. Ces plaques ont été placées durant 14 semaines en serre, puis les jeunes plantes ont été transplantées au champ (le 15 septembre 2015 dans le cas de la co-culture et le 9 octobre 2015 dans le cas de la rotation, (Photographie 11).

Photographie 11 : Mise en place de 28 parcelles

Les différentes opérations réalisées tout au long de la culture sont résumées dans le Tableau 4. Nous avons rencontré des problèmes concernant d'une part, la germination de la légumineuse (la vesce) et d'autre part, son développement. En effet, après le semis des graines de vesce pour les deux systèmes de culture (rotation et co-culture), peu de graines ont germées du fait d'une période de sécheresse en juillet pour la rotation et des précipitations importantes en septembre pour la co-culture. Afin de palier à ce problème de mauvais développement de la vesce, nous avons décidé d'apporter sous forme de biomasse sèche, une quantité donnée de vesce, cultivée dans un autre champ, à Mélide. Pour définir les quantités à apporter, nous avons d'abord estimé la biomasse sèche de la vesce présente au champ et complété celle-ci par un apport de vesce séchée. Pour définir les quantités à apporter, nous nous sommes basés

sur la biomasse sèche de vesce récoltée, pour les deux systèmes de culture, lors de l'expérimentation en pot, conduite sur le même sol. Ainsi, la biomasse sèche de vesce a été broyée avant d'être incorporée au sol, au champ, pour chaque système de culture. Ceci n'a pu être fait qu'au mois de janvier 2016, du fait de conditions très pluvieuses auparavant, à savoir relativement tardivement pour la rotation, mais à la bonne période pour la co-culture. Cette solution de « secours » n'est bien évidemment que partiellement satisfaisante dans la mesure où cet apport exogène de biomasse sèche de vesce ne remplace pas la présence de la plante (et de son système racinaire) durant les mois précédant l'apport.

Tableau 4 : Opérations réalisées pour chaque traitement au cours de l'expérience au champ en Espagne dès le semis jusqu'à la récolte (« A » et « V » correspondent à *Alyssum* et Vesce, respectivement)



1.2.1.5. Variables mesurées

Des mesures, concernant à la fois des variables abiotiques liées au sol, des variables liées aux plantes mais aussi à la microflore du sol, ont été réalisées à l'implantation de la culture (juin 2015), avant l'hiver (septembre 2016) puis à la récolte (mai 2016).

a. Paramètres abiotiques

A la récolte, dans chaque parcelle, 200 g de sol ont été prélevés et tamisés à 5 mm sur place. Puis le sol a été conservé à 4ºC avant d'être ramené en France pour analyses.

Après avoir séché en étuve (40°C) une partie du sol issu de chaque parcelle, le pH, l'humidité (%), la CEC ($cmol^+ l^{-1}$) et les cations échangeables ($mg\ kg^{-1}$), le carbone et l'azote solubles ($mg\ kg^{-1}$), totaux et organiques (%), les ions ammonium et nitrate ($mg.kg^{-1}$), le nickel biodisponible extractible au DTPA du sol et les teneurs en nickel pseudo-total ($mg.kg^{-1}$) ont été mesurés.

Les protocoles détaillés figurent dans la partie 2.1 de ce chapitre.

b. Paramètres biotiques

A la récolte, les parties végétales ont été nettoyées sur place avec de l'eau du robinet pour éliminer les éventuelles particules de sol puis de nouveau, avec de l'eau distillée, au Laboratoire en France, avant d'être séchées à 70ºC pendant 72h.

Après avoir sécher les plantes, la biomasse sèche (g), les éléments majeurs et mineurs (par mise en solution à l'eau régale, $mg.kg^{-1}$), le carbone et l'azote totaux (%) et les teneurs en en nickel pseudo-total ($mg.kg^{-1}$) ont été mesurés pour les parties aériennes et racinaires.

Environ 100 g de sol ont été placés à 4°C en chambre froide pour les analyses microbiologiques et deux eppendorfs (environ 2 x 1,5g de sol frais) ont été placés au congélateur (-20°C) pour les analyses moléculaires (caractérisation de la diversité des communautés bactériennes des sols).

Concernant la microflore tellurique, la biomasse microbienne carbonée ($mg\ C.kg^{-1}$) et azotée $mg\ N.kg^{-1}$) (méthode de fumigation-extraction), différentes activités enzymatiques microbiennes (uréase, phosphatase, β-glucosidase, arylsulfatase, FDA, ACC deaminase), la diversité catabolique des communautés bactérienne (Biolog Ecoplate^{TM}) et la diversité et structure génétique des communautés bactérienne (approche de séquençage haut débit) ont été caractérisées. Les protocoles détaillés figurent dans la partie 2.3 de ce chapitre.

2. Analyses réalisées (communes aux différentes expérimentations en conditions contrôlées et *in situ*)

2.1. Analyses des sols

Mesures du pourcentage d'humidité du sol, de la capacité de rétention en eau, du pH et de la CEC

L'humidité des sols a été déterminée après mise en étuve à 105°C d'échantillons de sols jusqu'à la stabilité de leur poids (minimum 48h).

Le pourcentage d'humidité est calculé pour chacun des bacs selon la formule :

$$\mathrm{H}\ (\%) = \frac{(\text{pds frais} - \text{pds sec})\ x\ 100}{\text{pds sec}}$$

La capacité de rétention du sol en eau a été mesurée par la technique de la presse à membrane (Labotest 11500 et 11600). Des échantillons préalablement saturés en eau sont déposés à la surface d'une plaque en céramique poreuse saturée en eau et disposée dans une presse à pression contrôlée à 0,1 bar. Après 24h d'équilibrage, les échantillons sont ajustés à un potentiel matriciel et leur teneur en eau pondérale est alors mesurée (même calcul que pour l'humidité).

Le pH des sols est mesuré à l'eau à partir de la norme NF ISO 10390. Vingt-cinq ml d'eau distillée sont ajoutés à 5 g de sol (rapport sol:eau = 1:5) préalablement séchés à 40°C pendant 24 h et tamisés à 2 mm. Après 1h d'agitation et 2h de repos, le pH de la suspension de sol est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Hach HQ440d multi).

La Capacité d'Echange Cationique (CEC) est estimée selon la norme ISO 23470. Brièvement, 5 g de sol sec tamisés à 2 mm ont été extraits dans 25 ml de trichlorure de cobaltihexammine 0,016 M $Co(NH_3)6Cl_3$. Après agitation pendant une heure, les solutions obtenues ont été filtrées (0,45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada) puis, la CEC a été mesurée avec un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD) à 475 nm. Ensuite, les ions échangeables ont été analysés dans les solutions extraites à l'aide de l'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, Liberty II, Varian).

Dosage des éléments pseudo-totaux du sol

Une minéralisation de 0,5 g de sol broyé et tamisé à 200 µm a été réalisée à l'acide, en utilisant 2 ml de HNO_3 concentré (69 %) et 6 ml de HCl (12 M) dans le but de quantifier les éléments majeurs et mineurs (traces). Les solutions obtenues ont été filtrées (0,45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada) puis complétées à 50 ml avec de l'eau distillée. La

concentration en Ni ([Ni]) a été déterminée sur ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, Liberty II, Varian).

Dosage des éléments extractibles du sol

Il s'agit de déterminer la fraction de chaque élément en trace du sol qui est disponible pour les plantes hyperaccumulatrices, c'est-à-dire la phytodisponibilité de différents éléments tels : Cr, Cu, Zn, Fe, Pb, Cd, Mn, Al, Ni, Co. Pour se faire, les éléments en traces sont extraits à partir d'une solution tamponnée d'acide diéthylène tri-amine penta-acétique (DTPA) selon la méthode de Lindsay et Norvell (1978). Elle consiste en l'ajout d'une solution de DTPA à du sol (rapport de 1:2) préalablement séché et tamisé à 2 mm. Ainsi, 10 g de sol sec et tamisé à 2 mm ont été extraits dans 20 ml de DTPA-TEA (0.005 M Diéthylène Triamine Pentaacetic Acid, DTPA, 0,01 M $CaCl_2$, 0,1 M triéthanolamine, pH 7,3). Après agitation (2h à 17 rpm), les suspensions obtenues ont été filtrées (0,45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada) et les éléments traces dont le Ni ont été dosés par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, Liberty II, Varian).

Dosage du carbone et de l'azote

Le contenu en carbone et azote totaux des sols a été analysé par combustion à 900°C de 75 mg du sol sec et broyé mis dans des capsules en étain en utilisant un Analyseur C,N (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH). Pour analyser le carbone et l'azote organiques avec le même analyseur, un excès d'acide chlorhydrique (4M) a été ajouté à 75 mg de sol sec et broyé et mis dans des capsules en argent. Après 4h d'attente à la température ambiante, le contenu des capsules a été séché à 60°C pendant 16h. Puis, le carbone et azote organiques ont été analysés par combustion à 900°C.

Le carbone et l'azote soluble dans le sol ont été déterminés par l'extraction de 5 g de sol frais dans 25 ml de $CaCl_2$ (1mM) avec agitation à 5 rpm pendant 24h. Le mélange est ensuite filtré sur filtre Whatman (membrane en nylon, 0,45 µm) et le carbone et l'azote solubles ont été analysés à l'aide de l'analyseur TOC (TOC-VSCN equipment, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Dosage des ions nitrate et ammonium

Les ions nitrate et ammonium ont été dosés suite à l'extraction de 15 g de sol frais dans 75 ml de KH_2PO_4 (0,016 M) et agitation pendant 30 minutes à 17 rpm. La suspension de sol a été centrifugée pendant 20 min à 5800 g avant d'être filtrée sur filtre Whatman (membrane en nylon, 0,45µm, DigiFILTER, SCP science, Canada). La quantification des ions nitrate et

ammonium a été faite par Chromatographie Ionique (Dionex 1500i with an AS 4 ASC column; Sunnyvale, USA).

Caractérisation de la structure et du biofonctionnement des sols par microscopie électronique à transmission

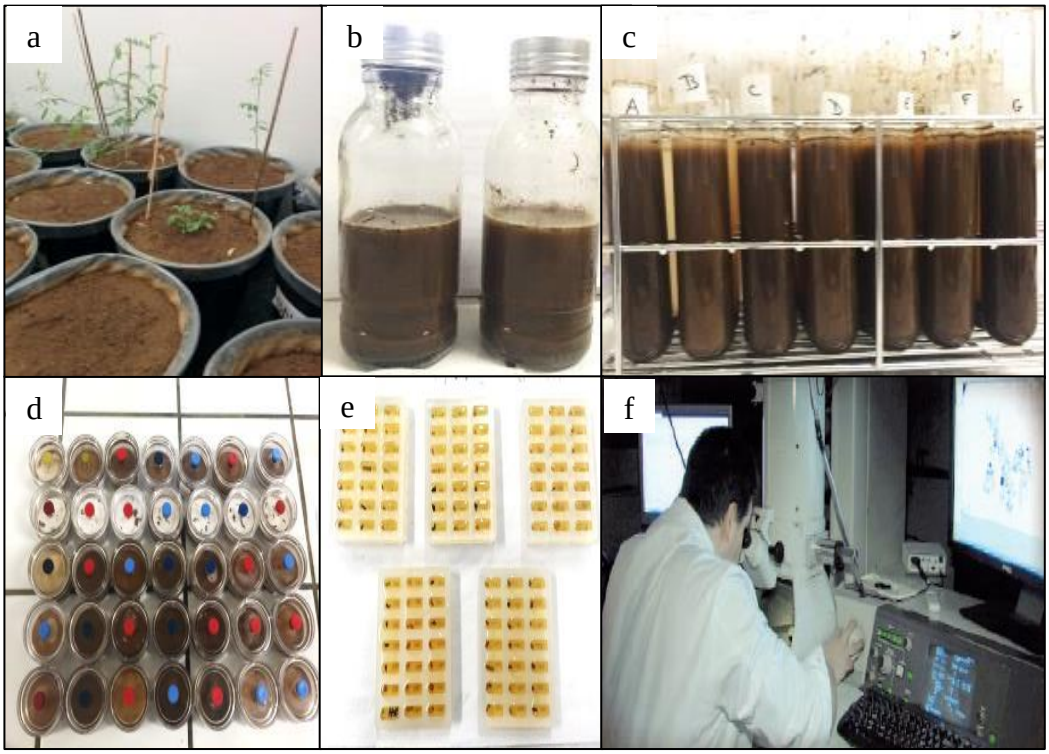
La structure est le mode d'assemblage des constituants solides du sol, minéraux ou organiques. Elle dépend de la texture, c'est-à-dire de la distribution des particules minérales en fonction de leur taille : sables grossiers (200 µm à 2 mm), sables fins (50-200 µm), limons grossiers (20-50 µm), limons fins (2-20 µm) et argiles (0-2 µm). Elle dépend aussi de la teneur et de la nature des matières organiques, ainsi que des êtres vivants (macrofaune, mésofaune et microflore) et de leur activité. La structure détermine également la porosité en air et en eau du sol. Si la texture est peu variable dans le temps, la structure varie à court terme en fonction de l'ensemble des processus physiques, chimiques et biologiques ayant lieu au sein des sols, ainsi que des conditions environnementales. Ainsi, la structure révèle l'état du sol et son comportement lors de toute modification. Dans le cadre de l'expérimentation réalisée en conditions contrôlées et en pots, nous avons caractérisé puis comparé la structure et le biofonctionnement des sols de différentes modalités.

La méthode utilisée vise au suivi des associations organo-minérales de taille comprise entre 0 et 200 µm. En effet, la bibliographie met en évidence l'importance de la fraction des micro-agrégats (0-200 µm), considérée comme une des fractions les plus réactives du sol (Ladd *et al.*, 1996 ; Mummey *et al.*, 2006). En effet, cette fraction est une des fractions les plus riches en carbone dans de nombreux sols et elle comprend la majorité des microorganismes du sol (Ladd *et al.*, 1996). De plus, les matières minérales et organiques s'associent sous forme d'agrégats en fonction de différentes forces de liaisons. Ceci assure au sol une stabilité plus ou moins forte lui permettant, par exemple, de résister ou non aux aléas climatiques, tels qu'une pluie battante. La méthode se propose d'évaluer la stabilité des micro-agrégats en soumettant les sols à une désagrégation à l'eau selon une méthodologie contrôlée : agitation de 25 g de sol dans 167 mL d'eau à 15 rpm pendant 1h.

Après agitation dans l'eau, la suspension de sol sédimente. Cette sédimentation permet de séparer d'une part, les matières organiques flottant à la surface et d'autre part, les différentes associations organo-minérales de la taille des sables grossiers (200 µm à 2 mm), sables fins (50-200 µm), limons grossiers (20-50 µm), limons fins (2-20 µm) et argiles (0-2 µm). Une partie aliquote des micro-agrégats (0-200 µm) est prélevée et traitée en vue de leur

observation *in situ* en microscopie électronique à transmission (MET). La séquence des étapes de la préparation à l'observation est la suivante (Photographie 12) :

- Prélèvements des sols rhizosphériques issus du bloc 5
- Tamisage à 2 mm
- Pseudo fractionnement granulo-densimétrique après agitation contrôlée dans l'eau, sans destruction préalable des matières organiques. Ce fractionnement permet la désagrégation contrôlée des sols dans l'eau. Il s'agit ensuite de récupérer les fractions < 20 µm des sols ainsi que les matières organiques figurées libres pour les caractériser en MET. Cette étude de caractérisation morphologique a été réalisée selon une adaptation de la méthodologie de caractérisation des bio-micro-agrégats développée par Microhumus (Watteau *et al.*, 2012). Pour des raisons de confidentialité et de propriété intellectuelle, la méthodologie spécifique allant de la prise en charge des échantillons jusqu'à l'obtention des résultats n'est pas complètement détaillée dans ce manuscrit.
- Après 4 min et 40 secondes de sédimentation, les fractions < 200 µm et les matières organiques figurées libres sont prélevées pour leur caractérisation en MET (Photographie 12b et 12c). Trois répétitions ont été faites par modalité. Les fractions < 200 µm et les matières organiques figurées libres sont fixées à l'osmium puis déshydratées dans l'acétone (Photographie 12d) avant d'être inclues dans une résine Epon et mises en blocs (Photographie 12e). Des coupes ultrafines (80-100 nm) ont été réalisées avec un ultramicrotome (Leica UltracutS) puis mises sur des grilles de Cu ou de Ni. Les coupes ultrafines ont été ensuite colorées pour les observations en microscopie électronique (MET) avec de l'acétate d'uranyle (Valentine, 1961) et du citrate de plomb (Reynolds, 1963) et examinées avec un microscope électronique à transmission du modèle JEOL 1200 EMXII (fonctionnant à 80 kV).



Photographie 12 : a) culture en pots, b) pseudo fractionnement granulo-densimétrique des sols rhizosphériques tamisés à 2 mm après agitation contrôlée dans l'eau, c) sédimentation et prélèvement à 4 min 40 sec, d) fixation à l'osmium et déshydratation acétonique, e) inclusion dans une résine Epon, f) observation des coupes ultrafines en MET

Une typologie des différentes associations entre les particules organiques et minérales a été définie (Tableau 5) et pour chaque modalité, un minimum de 200 particules minérales et/ou organiques a été comptabilisé afin d'avoir une typologie représentative des associations organo-minérales des fractions < 200 µm des sols.

Tableau 5 : Typologie des différentes associations entre les particules minérales et organiques des fractions < 200 µm des sols

Particules minérales faiblement agrégées (sous forme de petits paquets phylliteux et de quartz)	**Microagrégats organo-minéraux** (association MO figurées/particules minérales)	**Matières organiques non agrégées** (faiblement associées aux minéraux)	**Microagrégats bactériens** (association bactéries/particules minérales)	**Bactéries libres** (non associées aux minéraux)

La proportion existante entre ces cinq types permet d'apporter des informations sur le biofonctionnement des sols. Par exemple, une proportion majoritaire de microagrégats minéraux met en évidence la fragilité de la structure du sol pouvant entrainer un lessivage des particules fines et également un manque de matières organiques minéralisables. Au contraire,

lorsque les microagrégats organo-minéraux et les microagrégats bactériens sont dominants, ils révèlent une bonne activité biologique du sol.

2.2. Analyses sur les plantes

Biomasses sèches parties aériennes (PA) et racinaires (PR) des plantes

Après prélèvement des végétaux, les PA sont placées à l'étuve pendant 72h à 70°C puis pesées, afin de déterminer leur biomasse sèche. Les PR sont rincées à l'eau et mises à l'étuve à 70°C pendant 72h, afin d'estimer ensuite également leur biomasse sèche (balance de précision au 10ème de milligramme).

Les biomasses sèches des fleurs, tiges, feuilles et racines ont été déterminées.

Dosages dans les PA et PR

Pour évaluer la quantité d'éléments en traces (Ni, Cr, Cu, Zn, Fe, Pb, Cd, Mn, Al) et d'éléments majeurs (N, P, K, Ca, Mg) dans les végétaux, la méthode DigiPrep est utilisée. Cette méthode vise à mettre en solution les éléments dans les échantillons de végétaux en vue de leur dosage, par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, Liberty II, Varian).

Au préalable, les végétaux séchés sont broyés finement à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch MM 400). La minéralisation est ensuite réalisée par une attaque des échantillons à l'acide nitrique (HNO_3) à 69% (dans 2,5 ml) suivie de l'ajout de 5 ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30%. Enfin, les échantillons sont chauffés dans un bloc en graphite thermostaté (95°C). Les solutions finales ont été filtrées (0,45 µm DigiFILTER) et complétées à 25 ml avec de l'eau distillée. Les minéralisats ainsi obtenus sont analysés par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, Liberty II, Varian).

Dosage des pigments dans les PA et de l'activité nitrate réductase

La chlorophylle totale, les concentrations en caroténoïdes et l'activité de la nitrate réductase (NRA) dans les feuilles ont été évaluées comme indicateurs des effets du Ni sur la physiologie des plantes. Ceci n'a été réalisé que dans le cas de l'expérience consistant en la culture d'une Fabacée sur un sol artificiellement contaminé en nickel (partie 1.1.1.). La chlorophylle et les caroténoïdes ont été extraits après incubation des feuilles dans de l'acétone (80 %) pendant 24h, suivie par des mesures de densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD ; longueurs d'onde de 663, 645 et 440 nm pour la chlorophylle a, b et les caroténoïdes, respectivement). Les

concentrations des caroténoïdes (crt) et des chlorophylles a et b et les chlorophylles totales (chla, chlb et chlt, respectivement) ont été calculées selon le protocole de Arnon (1949) basé sur les formules suivantes :

$$crt\left(mg.g^{-1}\right) = (4,7\,A_{440} - (1,38\,A_{663} + 5,48\,A_{645})$$
$$chlt\left(\mu g.mL^{-1}\right) = 20,2*(A_{645}) + 8,02*(A_{663})$$
$$chla\left(\mu g.mL^{-1}\right) = 12,7*(A_{663}) - 2,69*(A_{645})$$
$$chlb\left(\mu g.mL^{-1}\right) = 22,9*(A_{645}) - 4,68*(A_{663})$$

L'activité potentielle de la NRA a été estimée à partir de 0,5 g de feuilles fraîches placés dans 2,5 ml de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,5), 2,5 ml de KNO_3 30 mM et 2,5 ml d'isopropanol 5% à 28°C, pendant 2h. Après incubation, 0,4 ml du mélange ont été prélevés sur lesquels 0,3 ml de sulfanilamide (1%) et 0,3 ml de naphthyléthylène diamine hydrochloride (NED-HCl, 0,02%) ont été rajoutés. Après 20 min d'incubation à la température ambiante (pour un développement maximal de la couleur), le volume a été complété à 5 ml avec de l'eau distillée et une mesure de la densité optique est réalisée avec un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD) à 540 nm (Jaworski, 1971). Le blanc consistait en un mélange de 0,3 ml de sulfanilamide (1%), 0,3 ml de NED-HCl (0,02%) et 4,4 ml d'eau distillée. Pour, calculer l'activité de la NRA, une courbe étalon a été préparée avec des concentrations allant de 0 à 25 nmol (0-2,5-5-10-15-20-25) de nitrite de sodium. Ensuite l'activité de la NRA a été calculée selon la formule suivante et exprimée en nmol NO_2^- $g^{-1}.H^{-1}$ et est donnée par la formule suivante :

Activité de la NRA = concentration en nitrite x V x 12,5m x T, où V est le volume total de l'extrait (7,5 ml), 12,5 est le facteur de dilution, m le poids de feuilles fraîches et T est le temps d'incubation (2h).

Carbone et azote des plantes

Le contenu en carbone et azote dans les plantes a été analysé par combustion des biomasses séchées et broyées à 900°C en utilisant un Analyseur C,N (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH).

2.3. Analyses microbiologiques

Activités enzymatiques microbiennes

L'activité de l'uréase a été mesurée selon la méthode de Tabatabai et Bremner (1972). Cinq grammes de sol frais (tamisé 5 mm) par échantillon sont placés dans un flacon de contenance

125 ml, puis 2,5 ml de solution d'urée (80 mM) et 20 ml de tampon borate (pH = 10,74 mM) ont été ajoutés. Les flacons sont ensuite bouchés et incubés 2h à 37 °C. Après incubation, 30 ml de solution de KCl (2 M) sont ajoutés et les piluliers ont été de nouveau agités pendant 30 minutes. La suspension qui en résulte est filtrée à travers des filtres exempts d'azote (0,45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada) pour éviter une contamination du filtrat. Pour réaliser les blancs, l'urée est remplacée par 2,5 ml d'eau distillée et la solution d'urée n'a été ajoutée qu'après l'incubation et immédiatement avant l'addition de KCl. Pour déterminer la teneur en ammonium dans les filtrats, un ml a été mis dans un flacon de contenance 40 ml. Neuf ml d'eau distillée, 5 ml de solution de salicylate de sodium/NaOH/H_2O distillée (0,3 M) et 2 ml de la solution de dichloroisocyanide de sodium (3,91 mM) sont ajoutés. Après agitation à vitesse rapide (vortex), les tubes ont été laissés 30 minutes à température ambiante avant de mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 690 nm avec un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD). Pour calculer la concentration en ammonium, une courbe standard a été réalisée (Figure 12).

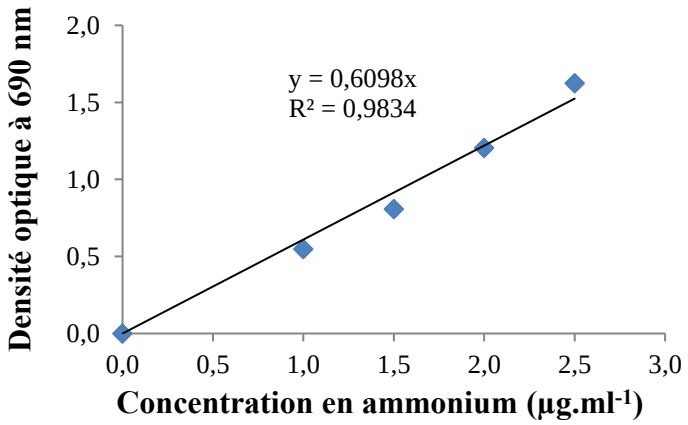


Figure 12 : Courbe standard de l'activité de l'uréase

Ensuite l'activité de l'uréase a été calculée selon la formule suivante et exprimée en µg NH_4-N. g^{-1} de sol sec. h^{-1} :

$$\text{Activité de l'uréase} = \frac{\text{concentration en ammonium x V x 10}}{\text{5 x m x T}}$$

où V est le volume total de l'extrait (52,5 ml), 10 est le facteur de dilution et g de sol sec est le poids sec d'un gramme de sol frais, 5 le poids de sol utilisé dans l'essai et T le temps d'incubation (2h).

L'activité de la fluorescéine diacétate (FDA) a été mesurée selon la méthode d'Adam et Duncan (2001). Deux g de sol frais (tamisés à 5 mm) ont été mis dans un tube Falcon de

contenance 50 ml. Quinze ml du tampon KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH = 7,6) et 0,2 ml de FDA (3'6'-diacetyl-fluoresein, Sigma-Aldrich préparé à 0,1 % dans de l'acétone) ont été ajoutés. Les tubes ont été ensuite agités à 37°C pendant 1,75h. Puis 20 ml d'un mélange acétone/H_2Od (1:1) sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 5 min à 4300 g. Pour réaliser le blanc, la solution de FDA a été remplacée par 0,2 ml de H_2O distillée. Après l'agitation, les suspensions ont été filtrées (0,45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada), puis la densité optique a été mesurée à 490 nm avec un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD). Pour calculer la concentration en sel de fluorescéine de disodium, une courbe standard a été préparée (Figure 13).

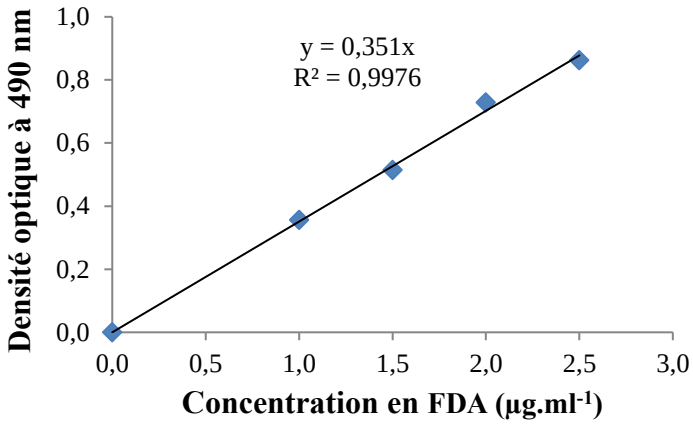


Figure 13 : Courbe standard de la FDA

Ensuite l'activité de la FDA a été calculée selon la formule suivante et exprimée en µg FDA. g^{-1} de sol sec. h^{-1} :

$$\text{Activité de la FDA} = \frac{\text{concentration en FDA x V}}{\text{g de sol sec x 2 x T}}$$

où V est le volume total de l'extrait (35,2 ml), g de sol sec est le poids sec d'un gramme de sol frais, 2 le poids de sol utilisé dans l'essai et T le temps d'incubation (1,75h).

L'activité de l'ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) a été mesurée selon la méthode de Honma et Shimomura (1978). Un g de sol frais (tamisé à 5 mm) a été mis dans un tube Falcon de 15 ml avec 4,775 ml de tampon Tris (pH 8,5) et 225 µL de solution d'ACC (0,5 M) (les blancs ne comprennent que du tampon Tris). Le tout a été mis à incuber à 30°C avec agitation (20 rpm) durant 24h. Après 24h et pour lyser les cellules, afin de libérer l'ACCd intracellulaire, 100 µL de toluène sont ajoutés suivis d'une incubation de 10 min avant passage au vortex. Les blancs sont réalisés en parallèle. Ils diffèrent simplement par l'absence d'ACC qui a été remplacée par du tampon Tris. Deux ml de surnageant ont été

centrifugés 3 min à 9000 g, puis 1 ml du surnageant a été prélevé et additionné à 1,8 ml d'HCl (0,56 M) et 300 µL de solution réactionnelle (HCl 2 M à 0,2% de 2-4 DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine)). L'échantillon a été mis en agitation à 30°C durant 15 min puis la révélation de l'activité ACCd se fait après ajout de 2 ml de NaOH (2 M). La lecture des absorbances a été réalisée à 540 nm avec un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD). En parallèle, une gamme étalon allant de 0 à 1 mM d'α-kétobutyrate a été réalisée (Figure 14).

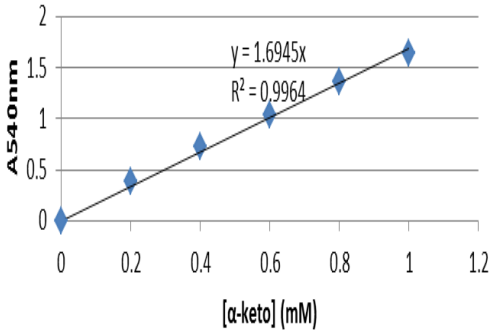


Figure 14 : Courbe standard de l'ACC deaminase

Les résultats sont exprimés en nmol d'α-kétobutyrate.g^{-1} de sol sec.h^{-1} selon l'équation :

$$\text{Activité ACCd} = \frac{\text{Concentration en α–kéto (mmol.l}^{-1}) \times \frac{\text{Volume milieu de lecture(ml)}}{\text{Volume prise d'essai(ml)}}}{\text{Masse de sol sec (g)}} \times 10^6$$

Les activités enzymatiques de l'arylsulfatase, la β-glucosidase et la phosphatase alcaline ont été évaluées en utilisant 5 mM pNP-sulfate, 5 mM pNP-β-D-glucopyranoside et 5 mM pNP-phosphate, respectivement (Sigma- Aldrich, France). Les substrats de l'arylsulfatase et la β-glucosidase ont été préparés dans un tampon d'acétate de sodium (0,5 M, pH 5,8). Par contre, le substrat de la phosphatase alcaline a été préparé dans du Tris HCl (0,1 M, pH 8). Quatre g de sol frais ont été incubés avec 0,5 ml de toluène pendant 10 minutes avant ajouter 50 ml d'eau distillée. Le mélange a été homogénéisé au polytron pendant 25 secondes (vitesse 22). Quatre cents µl ont été immédiatement prélevés et mis dans un microtube de contenance 2 ml. Puis 1 ml du substrat adéquat a été ajouté avant d'être incubé à 37°C pendant 2h. Après incubation, 250 µl de NaOH (1M) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Pour réaliser les blancs, le substrat n'a été ajouté qu'après l'incubation et après l'ajout du NaOH. Ensuite, les microtubes ont été centrifugés pendant 2 min à 13000 g et 200 µl ont été transférés dans une microplaque à fond plat pour lire l'absorbance à 400 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Dick, 2013, modifié). Pour, calculer les activités enzymatiques, une courbe étalon a été

préparée avec des concentrations allant de 0 à 25 mg.l^{-1} (0-1-2-5-10-15-20-25) de p-Nitrophénol (Figure 15).

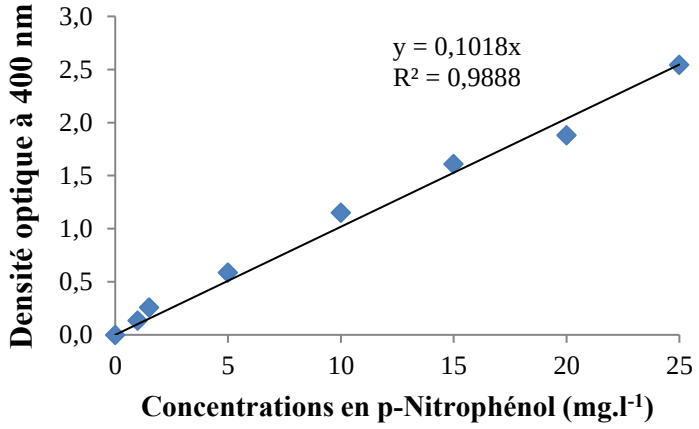


Figure 15 : Courbe standard de p-Nitrophénol

Les activités sont exprimées en µg de p-nitrophénol. g^{-1} de sol sec. h^{-1} et sont données par la formule :

$$activité\ (\mu g/g\,.\,h\,) = \frac{\text{Concentration}\,.\,\text{Volume total}}{0{,}0317\text{g sol frais}\,.\,\text{g sol sec. temps d'incubation}}$$

où C est la concentration de p-nitrophénol en µg/ml de filtrat, V le volume total de la suspension de sol en ml (1,65 ml), 0,0317g sol frais : 4 g sol frais dans 50,5 ml (eau + toluène) donc 0,0317 g sol frais dans 400 µl de suspension après homogénéisation au polytron, g de sol sec le poids sec de 1 g de sol frais et le temps d'incubation en heure (2h).

Biomasses microbiennes carbonées et azotées

Les biomasses microbiennes carbonée et azotée ont été mesurées selon la méthode de fumigation-extraction de Jenkinson et Ladd (1981) et Brookes *et al.* (1985). Une première étape de pré-extraction a été réalisée pour tous les échantillons (Fumigé = F et non-fumigé = NF) : 20 ml de K_2SO_4 (0,05 M) sont ajoutés à 10 g de sol dans des piluliers de 125 ml. Après 45 min d'agitation à 17 rpm, la suspension de sol a été filtrée sur papier Whatman N°42 et le pilulier est rincé (au-dessus du filtre) avec 20 ml de K_2SO_4 (0,05 M). Le filtre et le sol sont placés dans un pilulier de 125 ml et les échantillons NF sont fermés et stockés à 4°C. Afin de réaliser la fumigation, le sol et le filtre des échantillons (F) sont placés dans un bécher de 50 ml. En parallèle, un dessiccateur a été préparé en disposant 3 cm d'eau distillée dans le double fond ainsi que 2 béchers de 50 ml contenant respectivement de la chaux sodée en granules et 30 ml de chloroforme en présence de billes de verre (billes propres). Le tout a été placé sous hotte pour éliminer les vapeurs de chloroforme. Les échantillons ont été placés dans le dessiccateur et additionnés de 3 gouttes de chloroforme afin d'initialiser la fumigation. Le

dessiccateur a été fermé hermétiquement à l'aide de graisse de silicone puis le vide a été fait à l'aide d'une pompe. Cette dernière a été arrêtée lorsque le chloroforme bout depuis 2 min, le bouchon du dessiccateur a été fermé puis le dispositif a été placé à l'obscurité pendant 24h à 25ºC. Après incubation, le dessiccateur a été ouvert sous la hotte puis, afin d'éliminer les vapeurs de chloroforme, deux cycles de vide/rupture du vide ont été réalisés. L'ensemble sol/filtre des échantillons F a été alors transféré en pilulier. L'ensemble des échantillons F et NF ont été additionnés de 40 ml de K_2SO_4 à 0,5 M puis placés dans un agitateur orbital pendant 45 min à 17 rpm. La suspension a été filtrée sur papier Whatman 42. Enfin les filtrats ont été récupérés en pilulier puis conservés à 4ºC, avant analyse du carbone et de l'azote organiques solubles à l'aide de l'analyseur TOC (TOC-VSCN equipment, Shimadzu, Kyoto, Japan).

La biomasse microbienne carbonée (BM-C) a été alors calculée à partir de l'équation : BM-C=EC/0,45 (Jenkinson et Ladd, 1981), où EC est la différence entre le carbone organique soluble des échantillons fumigés et celui des échantillons non fumigés. De la même façon, la biomasse microbienne azotée a été calculée selon la formule : BM-N=EN/0,54, avec EN la différence entre l'azote organique soluble des échantillons fumigés et celui des échantillons non fumigés (Brookes *et al.*, 1985).

Structure phénotypique des communautés bactériennes

Le système Biolog Ecoplate™ est une plaque possédant 3 x 33 puits pré-remplis de différents substrats. Ce procédé permet de tester l'oxydation bactérienne de 32 sources carbonées (Annexe 4). Le violet de tétrazolium utilisé comme colorant d'oxydo-réduction permet d'évaluer colorimétriquement l'utilisation, par voie oxydative, de la source de carbone.

Les analyses Biolog Ecoplate™ (Biolog Inc., Hayward, CA) ont été utilisées pour étudier la structure phénotypique des communautés microbiennes. Trois g du sol frais ont été homogénéisés dans 30 ml du tampon phosphate salin PBS (KH_2PO_4 1,54 mM, NaCl 155,17 mM et Na_2HPO_4-$7H_2O$ 2,7 mM, pH 7,2) par agitation pendant 30 min à 17 rpm. Après agitation, 1 ml de la suspension de sol a été prélevé sous hotte stérile et mis dans un tube Sigma contenant 9 ml PBS stérile (dilution 10^{-1}). Après une agitation rapide (vortex) également sous hotte, 1 ml du premier tube a été prélevé et mis dans un nouveau tube Sigma contenant 9 ml de PBS (dilution 10^{-2}). Puis le tube a été versé dans un rack stérile et les plaques Biolog ont été inoculées par 150 µl de suspension de sol (10^{-2}) avec une pipette multicanaux. Ensuite, les plaques ont été incubées pendant 5 jours à 25ºC à l'obscurité. Deux

lectures ont été faites l'une à 48 h et une deuxième mesure à 5 jours à l'aide d'un lecteur de plaques (Biotek Instruments, Synergy HT) à 590 nm.

A partir de ces mesures, plusieurs variables pourront être calculées comme l'AWCD (Average Well-Color Density) de la plaque qui correspond à la moyenne des DO lues après correction par le puits A1 (blanc), mais aussi des indices tels l'indice de Shannon, la richesse (Richness : nombre de substrats oxydés), l'équitabilité (Eveness).

Extraction de l'ADN du sol

Afin d'extraire l'ADN des sols, nous avons utilisé le kit « FastDNA™ SPIN kit for Soil ».

Cinq cents mg de sol conservés au congélateur (-20°C) ont été pesés et placés dans un tube Lysing Matrix E, puis 978 µL de Sodium Phosphate Buffer ont été ajoutés. Le tube a été vortexé durant 10 à 15 secondes puis 122 µL de MT Buffer ont été ajoutés avant agitation vigoureuse. Après avoir vortexé pendant 10 à 15 secondes, le tube a été agité au broyeur à billes (Retsch MM 400), sans ajout de billes, pendant 40 secondes à la vitesse maximale. Ensuite, le tube a été centrifugé pendant 10 minutes à 14000 g. Puis, le surnageant (600 µL) a été récupéré dans un eppendorf de 2 ml et 250 µL de PPS ont été ajoutés. Le tube a été mélangé à la main en retournant 10 fois puis laissé à incuber 10 min à température ambiante. Huit cents µL de surnageant ont été transférés, après avoir centrifugé le tube 5 min à 14000, dans un nouvel eppendorf de 2 ml. Huit cents µl de Binding Matrix ont été ajoutés, puis l'eppendorf est agité doucement manuellement durant 5 minutes. 750 µL de la solution ont été prélevés et transférés dans un SPIN™ Filter tube. Après une centrifugation pendant 5 minutes à 14000 g, l'éluât a été éliminé. Cette étape a été répétée deux fois. 500 µL de SEWS-M ont été ajoutés sur le filtre et le tube est agité manuellement doucement. Le tube a été centrifugé deux fois pendant 5 minutes à 14000 g : la première fois pour éliminer l'éluât et la deuxième fois pour éliminer les résidus d'éthanol. Ensuite, le filtre a été transféré sur un catch tube de 2 ml et séché durant 5 minutes à l'air. 100 µL de DES ont été ajoutés sur le filtre suivi d'une incubation pendant 5 minutes à 55°C dans un bain-marie pour augmenter le rendement d'extraction de l'ADN. Enfin, les tubes ont été centrifugés pendant 2 min à 14000 g pour éluer l'ADN. La concentration en ADN ($ng.\mu l^{-1}$) a été estimée en triplicats suite à une dilution de l'extrait (1/10 dans de l'eau ultrapure) à l'aide d'un spectrophotomètre (SmartSpec Plus spectrophotomètre, BIO-RAD).

Analyse électrophorétique des acides nucléiques

Les électrophorèses d'ADN ont été réalisées en gel d'agarose 1% (p/v) préparé dans un tampon tris-borate-EDTA (TBE) 1X. Aux échantillons est ajouté un tampon de charge 6X (bleu de bromophénol 0.25 %, xylène cyanol 0.25 %, Ficoll 400 15 %). La migration est effectuée dans du tampon TBE 1X à voltage constant (110 V) pendant 40 minutes. Les molécules d'ADN sont révélées suite à un bain dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) pendant 10 min, puis lavage de quelques secondes dans de l'eau et visualisation sous rayonnement UV à 254 nm (Imageur BET EBOX VX2, COM).

Préparation de banques d'amplicons d'ARNr 16S et séquençage à haut débit

Dans notre étude, les bactéries du sol ont été ciblées. Les concentrations des solutions d'ADN ont été ajustées à 1,66 ng.µl^{-1} avec de l'eau ultrapure stérile à l'aide d'un robot (epMotion P5073, Eppendorf) dans des microplaques à 96 puits. Une paire d'amorces (B4Ft (48) (SD-Bact-0909-aS-18, 5'-ACT CAA AKG AAT WGA CGG-3') et le B4Rt (49) (S-*-Univ-1392-a-A-15, 5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3'), ciblant environ 484 paires de bases de la région V6-V8 du gène 16S d'ARNr bactérien ont été utilisées (Goux *et al.*, 2016).

Les amplicons ont été générés en utilisant la Q5 ADN-polymérase (High-Fidelity Hot Start, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA). La PCR est composée des phases suivantes : 98ºC pendant 30 secondes, 22 cycles à 98ºC pendant 5 secondes, 58ºC pendant 30 secondes et 72ºC pendant 30 secondes et une dernière étape de 72ºC pendant 2 minutes. La composition du mélange de la première PCR est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition du mix (25 µl) pour la première PCR

Réactif	Volume
Q5 polymérase (2X)	12,5 µl
BSA	2,5 µl
Amorce F (10 µM)	1 µl
Amorce R (10 µM)	1 µl
ADN (1.66 ng.µl^{-1})	1 µl
H_2O ultra-pure stérile	7 µl

Cette étape a été réalisé trois fois afin d'obtenir un volume suffisant pour pouvoir continuer l'analyse. Pour chaque PCR, la qualité de l'ADN a été évaluée par une électrophorèse avec migration sur un gel d'agarose à 3% (p/v) (à 100 volts pendant 20 minutes). Ensuite, les produits des trois PCR ont été mélangés et l'ADN a été purifié avec des billes magnétiques AMpure (Agencourt, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). La quantité d'ADN purifié a été

évaluée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Les amplicons quantifiés ont été dilués à la concentration de 1.66 ng.µl^{-1} avec de l'eau ultrapure stérile à l'aide d'un robot (epMotion P5073, Eppendorf) dans des nouvelles microplaques à 96 puits. Les indexes Nextera XT® nécessaires pour la deuxième PCR ont été ajoutés à chaque amplicon dilué (Nextera XT Index Kit v2 Set A et Nextera XT Index Kit v2 Set B, Illumina Inc., San Diego, USA). La séquence Nextera XT® a été ajoutée pour augmenter la diversité nucléotidique et codifier les échantillons (chaque échantillon avait un mélange-code unique) (Figure 16).

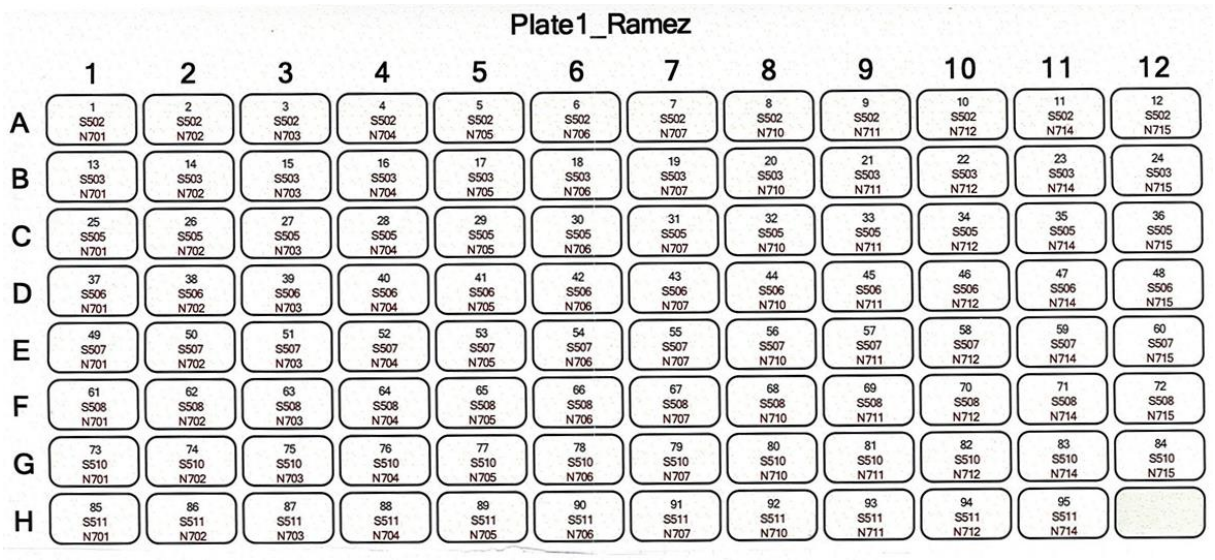


Figure 16 : Exemple d'indexation d'une plaque d'analyses à 96 puits

La deuxième PCR a été réalisée avec les phases suivantes : une première étape de 98°C pendant 30 secondes puis 8 cycle de 98°C pendant 10 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes et une dernière étape de 72°C pendant 2 minutes en utilisant le kit Nextera XT Index (Illumina Inc., San Diego, USA). La composition du mélange de la deuxième PCR est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition du mix (50 µl) pour la deuxième PCR

Réactif	Volume
Q5 polymérase (2X)	25 µl
Index 1	5 µl
Index 2	5 µl
ADN (1.66 ng.µl^{-1})	1 µl
H_2O ultra-pure stérile	14 µl

La purification des produits résultants de la deuxième PCR a été réalisée avec des billes magnétiques AMpure (Agencourt). Les solutions obtenues et purifiées ont ensuite été rassemblées et la concentration finale du pool a été déterminée avec le KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA). La qPCR a été réalisée avec les phases suivantes : une première étape de 95°C pendant 5 minutes puis 35 cycles de 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 45 secondes. La composition du mélange de la deuxième PCR est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Tableau 8 : Composition du mix (20 µl) pour la qPCR

Réactif	Volume
H_2O ultra-pure stérile	3,6 µl
Low rox	0,4 µl
Kapa mix	12 µl
ADN (1.66 ng.µl^{-1})	4 µl

Les solutions ont été mélangées avec des banques de contrôle de gDNA PhiX générées par Illumina (5%) et séquencées sur le système MiSeq d'Illumina avec le kit MiSeq Reagent Kit V3-600 cycles (Illumina Inc., San Diego, USA).

2.4. Analyses statistiques

Pour la plupart des variables abiotiques et biotiques des expériences, des analyses statistiques ont été faites sur les résultats. Des analyses de variance ont été réalisées sur toutes les données à l'aide de « one-way ANOVA » (test de Tukey ou Duncan, α = 5 %). Des tests de normalité et de comparaison des variances « k samples » ont été également effectués. Certaines données ont été utilisées pour réaliser des Analyses en Composantes Principales (ACP, Spearman, α = 5 %). Des corrélations entre différents paramètres mesurés ont été réalisées selon le test de Pearson. Ces analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT (XLSTAT, Ecology version 18.07, http://www.xlstat.com).

2.5. Analyses géostatistiques

Les paramètres physico-chimiques et biologiques du sol pour l'expérience « Impact du système de culture sur la structure du sol et l'architecture racinaire » dans les rhizotrons ont été analysés en calculant un semi-variogramme pour tous les paramètres, en utilisant la formule suivante: $\gamma(h) = 1/2N(h)\sum[z(xi + h) - z(xi)]^2$ où γ (h) est la valeur expérimentale du semi-variogramme à l'intervalle de distance h, N (h) est le nombre de paires d'échantillons dans l'intervalle de distance h et z (xi) et z (xi + h) sont les valeurs

d'échantillonnage à deux points séparés par l'intervalle de distance h. Toutes les paires de points séparés par une distance h (lag h) ont été utilisées pour calculer le semi-variogramme expérimental. Différents modèles ont été adaptés aux semi-variogrammes empiriques. Les modèles de semi-variogrammes, basés sur le calcul de la semi-variance, fournissent l'information nécessaire pour l'interpolation des données aux points non échantillonnés de chaque rhizotron. Les paramètres Nugget, semi-variance, gamme et seuil ont été déterminés. La semivariance de Nugget est la variance à la distance zéro, le seuil est la valeur constante du variogramme lorsque les variables ne s'influencent pas et la gamme est la distance à laquelle la valeur d'une variable devient spatialement indépendante d'une autre. Un indice de dépendance spatiale a été utilisé dans l'analyse : la valeur Q, (= seuil / seuil + nugget). La valeur Q varie entre 0 et 1. Lorsqu'elle est proche de 0, aucune structure spatiale n'est détectée. Lorsque la valeur Q s'approche de 1, la variation spatiale peut être expliquée par le modèle de semi-variogramme utilisé. Des cartes ont ensuite été réalisées en utilisant l'interpolation ordinaire pour évaluer les modèles régionaux de variation plutôt que les détails locaux. Le logiciel géostatistique GeoR version 1.6-17 sous R version 2.8.1 pour Windows® (Gamma design Software) a été utilisé.

2.6. Analyses biostatistiques

Les séquences obtenues ont été soumises à différentes étapes telles les étapes de Demultipexing (éliminer les séquences non comprises entre 200 et 1000 pb et possédant des bases ambigües) et Denoising (diminuer le nombre de séquences en éliminant les erreurs caractéristiques de séquençage) et l'assignement à un seuil de 97% d'homologie. Ces différentes étapes ont été réalisées avec le pipeline Usearch (v7.0.1090_win64). L'affiliation de la taxonomie ou la table d'OTU (Unités Taxonomiques Opérationnelles) a été réalisée avec la base de données SILVA (Silva.nr_v123, https://www.arb-silva.de/). Les diversités alpha et bêta ont été étudiées en utilisant le logiciel QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version 1.8.0). Les abondances relatives et des Heatmaps ont été générées en utilisant le logiciel XLSTAT (XLSTAT, Ecology version 18.07, http://www.xlstat.com).

CHAPITRE 3. La fixation atmosphérique de l'azote et la croissance de *Lens culinaris* sont affectées par la biodisponibilite du nickel : un prérequis à l'optimisation de l'agromine

Chapitre 3. La fixation atmosphérique de l'azote et la croissance de *Lens culinaris* sont affectées par la biodisponibilité du nickel : un prérequis à l'optimisation de l'agromine

Dans l'objectif de développer de nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine, avec en particulier l'introduction d'une légumineuse associée à la plante hyperaccumulatrice de nickel, *Alyssum murale*, il convient dans un premier temps de s'assurer que la Fabacée peut croitre, former des nodosités et assurer la fixation atmosphérique de l'azote sur un sol contenant du nickel. Ainsi, dans ce chapitre, une expérimentation en mésocosme est réalisée en utilisant un sol agricole enrichi avec différentes concentrations de nickel (0-90 mg Ni kg^{-1}). Différents paramètres biotiques (abondance ^{15}N naturelle, nombre de nodosités, concentrations en nickel, carbone et azote, biomasse végétale…) et abiotiques (concentrations totales de Ni, carbone et azote et concentrations en nickel biodisponible) sont mesurés.

R. SAAD, A. KOBAISSI, C. ROBIN, G. ECHEVARRIA, E. BENIZRI

Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining

Ces travaux ont été publiés dans la revue « Environmental and Experimental Botany » (2016) 131, 1–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.06.010

Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: a pre-requisite for optimization of agromining

R. Saad[abc] · A. Kobaissi[c]

C. Robin[de] · G. Echevarria[ab] · E. Benizri[ab*]

[a] Université de Lorraine, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[b] INRA, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[c] Université Libanaise, Laboratoire « Biologie Végétale et Environnement », Faculté des Sciences 1, Beyrouth, Lebanon.

[d] Université de Lorraine, Laboratoire « Agronomie et Environnement » Nancy-Colmar, UMR 1121, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[e] INRA, Laboratoire « Agronomie et Environnement » Nancy-Colmar, UMR 1121, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[*]Corresponding author, Tel.: +33(0)383595848, Fax: +33(0)383595791, emile.benizri@univ-lorraine.fr

Abstract

Low soil fertility in ultramafic soils limits the efficiency of nickel phytoextraction. Developing more efficient cropping systems for agromining can be achieved by the association of a hyperaccumulator with a legume by enhancing soil fertility. However, legume crops can result sensitive to ultramafic soil conditions, including nickel Ni availability. We assessed here whether *Lens culinaris* is adapted to ultramafic environments by growing on soils displaying a wide range of Ni concentrations and consequently producing functional nodules. The soil was enriched with different Ni concentrations ([Ni]) (0-90 mg Ni kg^{-1}). Natural ^{15}N abundance was used to assess N_2 fixation (%Ndfa). Biotic parameters were investigated (nodule number, Ni, carbon and nitrogen concentrations, plant biomass…). Soil parameters were investigated (total [Ni], DTPA-extractable Ni, C and N concentrations…). Most of the physicochemical and biological parameters were significantly affected by the increased soil [Ni]. Nodule numbers per plant was lower under high [Ni] than control (soil

without Ni). Nodules lost their capacities to fix N_2 under high Ni addition (90 mg Ni kg^{-1}). For many parameters, there were no significant differences between control and treatments up to 60 mg of Ni kg^{-1} added to the soil. Lentil is able to grow on a soil containing amounts of Ni-DTPA similar to those generally found in serpentine soils. It could be used in association with a hyperaccumulator plant as a nitrogen provider in order to optimize Ni agromining.

Keywords: nitrogen fixation . *Lens culinaris* . soil fertility . agromining . nickel.

1. Introduction

Serpentine soils (i.e. ultramafic soils) are derived from ultramafic rocks and contain significant amounts of metallic trace elements (MTE) including copper, chromium, iron, titanium, cobalt and nickel (Berazaín *et al.*, 2007; Chaney *et al.*, 2008). The average total content of nickel (Ni) in these soils under temperate to Mediterranean conditions can range between 1400 and 3500 ppm (Kabata-Pendias, 2000; Bani *et al.*, 2014). Ultramafic soils are also characterized by high Mg concentrations and a deficiency in N, P, K and Ca (Kabata-Pendias, 2000; Boyd and Jaffré, 2009). As a result of the presence of heavy metals, very high Mg:Ca ratio (Bani *et al.*, 2007) and deficiencies, serpentine soils are entirely ill-suited to profitable agricultural production and even forests (Tumi *et al.*, 2012). Their low-fertility and low-productivity make them unattractive for traditional agriculture and many of these areas are slowly abandoned by farmers, with rural exodus and landscape closure. However, serpentine outcrops in Europe cover over 10,000 km^2 and these ultramafic landscapes have potential to provide multiple ecosystem services and contribute to Europe's goals towards insuring production of renewable raw materials and renewable energy (Echevarria *et al.*, 2015). The idea of phytomining metals emerged in the 90s (Chaney *et al.*, 2007) and the goal was to cultivate plants able to accumulate trace metals from metal-rich soils and transport them to the shoots (>1%), which could then be harvested as a bio-ore to recover highly valuable metals, e.g. nickel (Ni). Nickel-hyperaccumulating plants are considered ideal candidates for agromining, which is a non-destructive approach to the recovery of high value metals (e.g. Ni) from metal-enriched soils and ores (van der Ent *et al.*, 2013, 2015). In Europe, about 40 endemic taxa of Ni-hyperaccumulators from two families (*Brassicaceae* and *Asteraceae*) can be found. The process involves root uptake of trace metals from soils, as well as their active transport to the shoots where they can be extracted after harvest (Chaney *et al.*, 2008). Phytomining was proven to be efficient in the 2000's and became a real market opportunity in 2007 (Chaney *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2012). Few works described the

implementation of agroecosystems which can lead to better soil resource efficiency and to offer fully integrated, new phytomining agriculture that could cover thousands of km^2 in Europe and benefit local communities with sustainable rural development (Bani *et al.*, 2007, 2015a, 2015b). The recent development of the phytomining concept led to the definition of "agromining" (van der Ent *et al.*, 2015) as a way to provide multiple ecosystem services, such as provisioning services (e.g. metal, fuel-biomass) and supporting services (e.g. amelioration of the fertility of ultramafic soils over time). In this context, the use of the Ni-hyperaccumulator *Alyssum murale* was proven to be economically feasible in Europe (Albania) based on successful field experiments (Bani *et al.* 2007; 2015a, b). However, several bottlenecks have been identified and need to be solved before agromining fully develops in Europe. In particular, ultramafic soils showed low-fertility and low-productivity, thus fertilizer amendments such as N, P and K must be considered to significantly improve crop growth and phytoextraction yield (Bani *et al.*, 2015a; Kidd *et al.*, 2015). Moving towards agromining would result in a more resource-friendly agriculture, i.e. agro-ecological practices should be introduced as a substitute to conventional fertilization and pest-control practices.

As shown with cereal food crops, forage, silvo-pastoral, agroforestry and horticultural systems, the inclusion of a legume in inter-cropping or co-cropping provides nitrogen inputs in the cultural system in addition to producing valuable yields (Lizarazo *et al.*, 2015; Peoples *et al.*, 2015). Indeed, it is known that legumes, used in either inter-cropping or co-cropping, influence the N-economy of a system in two ways: they fix part of their N-requirement from atmospheric N_2 and, therefore, deplete available soil-N lesser than non-legumes, and also provide part of the fixed-N upon mineralization of decaying plant residues to the non-leguminous crop (Nyagumbo *et al.*, 2015; Peoples *et al.*, 2015). Moreover, in traditionnal agronomy, legume cover crops are used to reduce or prevent erosion, produce biomass and add organic matter to the soil, attract beneficial insects and they can break weed-, disease- and insect-cycles. Therefore, inter-cropping or co-cropping hyperaccumulator plants with legumes could improve phytoextraction yield through the enrichment of ultramafic soils with nitrogen fixed from the air. A part of the N fixed being usually transferred to companion plants (Rodrigues *et al.*, 2015), the hyperaccumulator could benefit from this biological process, while reducing fertilizer inputs and pesticides to the field. The combination of a legume species with a hyperaccumulator plant could be an innovative strategy for agromining; if the legume tolerates high metal concentration, it could lead to higher hyperaccumulator biomass and reduce the amount of fertilizer supplied, combining higher economic performance and lower environmental impact (Scalise *et al.*, 2015; St. Luce *et al.*, 2015). Thus, N biological

fixation can act as a primary N source (biofertilizer) and provide an ecosystem service, thereby complementing or replacing fertilizer inputs (Fustec *et al.*, 2010; Mokgehle *et al.*, 2014).

Among the factors that reduce plant growth and crop yield in ultramafic soils (i.e. the Serpentine syndrome) we can list (Whittaker 1954; Proctor and Woodell 1975; Brooks 1987): Mg excess over Ca; K, P and Ca deficiency; Ni toxicity. Growing non-adapted legumes in ultramafic conditions could then result in a reduction of beneficial effect of co-cropping because of these factors. Specific amendments can help the plant face the nutrient unbalances. But the presence of metals (in our case Ni) in soil could limit the growth of non-hyperaccumulator species and stimulate the production of ethylene in plants (Abeles *et al.*, 1992; Glick, 2005; Glick, 2014), which affects root growth and nodule formation in legumes such as beans, peas, clovers and vetches (Ligero *et al.*, 1991; Lee and Larue, 1992; Hirsch and Fang, 1994).

Hence, our objective was to investigate whether *Lens culinaris*, a legume, could be used in inter- or co-cropping with a hyperaccumulator plant, on a natural ultramafic Ni-rich soil, in order to improve Ni phytoextraction by the hyperaccumulator plant without any chemical fertilizer inputs. The first step is to confirm if this legume can grow and form nodules on a soil containing varied Ni concentrations. We assessed whether these nodules fix nitrogen in the presence of Ni. This study is a prerequisite for using *Lens culinaris* in inter- or co-cropping with a hyperaccumulator plant, on a natural ultramafic Ni-rich soil, in order to improve Ni phytoextraction. Our strategy was to grow lentils on soil artificially enriched with Ni and then to estimate nitrogen fixation by natural ^{15}N abundance because using a serpentine soil does not allow assessing the effect of each of the factors that generate the serpentine syndrome. We chose an agricultural Ni-enriched soil in which we carefully added Ni in order to reach the same DTPA-available concentrations of Ni than those we currently found in the ultramafic soils (e.g. Albania) where we pretend to crop *L. culinaris* + *A. murale*. Then, we will be able to estimate if lentil will be a good candidate for co-cropping or rotation with a hyperaccumulator plant.

2. Material and methods

2.1. Soil characteristics and experimental design

We performed a two month microcosm study in controlled conditions (photoperiod 16 h, temperature 18°C night and 22°C day, relative humidity 70%, PPFD: 350 µmol m^{-2} s^{-1}) based

on three treatments: lentil sown in soil with increasing Ni concentrations, ryegrass sown in soil with increasing Ni concentrations and lentil sown in sand also with increasing Ni concentrations. The soil used in this experiment was an agricultural topsoil, collected from the surface layer (10-20 cm), originating from "La Bouzule" Experimental Farm of Université de Lorraine (48°44'22.27''N, 6°19'19.85''E, Meurthe et Moselle, France) and previously cultivated with nodulated pea, thus naturally containing *Rhizobium leguminosarum*. Immediately after collection, the soil was sieved to <5 mm to remove coarse fragments and stored at 4°C for less than 7 days until soil physicochemical analyses were carried out. Soil physicochemical properties were determined by the Soil Analysis Laboratory of INRA (Arras, France). It contained 36.7, 51.5 and 7.2%, clay, silt and sand respectively had a C/N ratio of 9.2, a Mg/Ca ratio of 0.08 and an available phosphorus content (Olsen P) of 63 $mg \cdot kg^{-1}$. Soil pH was 6.4 and was similar (less than 1 unit difference) with the ultramafic soils targeted for field implementation of agromining with legume co-cropping in Albania and Northwestern Spain (pH range from 6.0 to 7.0). Total Ni and available Ni (DTPA-extractable) contents were respectively 67.5 mg Ni kg^{-1} and 1.8 mg $Ni \cdot kg^{-1}$. We artificially enriched the soil with nickel sulfate ($NiSO_4$, $7H_2O$) with six different concentrations (0, 10, 20, 30, 60 and 90 mg Ni kg^{-1} dry soil). The soil was then incubated for 15 days prior to sowing plants to avoid major changes in Ni availability during plant growth and have them occur before. Our goal was to keep the gradient of available Ni in a range that included 30 mg Ni kg^{-1}, which is the value that was measured on two field sites where legumes will be grown together with *Alyssum murale*. Microcosms (Polyvinyl chloride tubes, 4.7 cm diameter and 22 cm height) were filled with 416.2 g of soil (on the DW basis). One lentil or ryegrass seed was sown in each microcosm. Lentil seeds were provided by Sem-Patners (*Lens culinaris* var. Beluga, France) and ryegrass seeds by Forum (*Lolium multiforum* L. *italicum*. France). A set of microcosms were filled with sand, previously enriched with the six nickel sulfate concentrations. Lentils cultivated on sand and inoculated with a *Rhizobium* strain, were used as controls for quantification of N_2 fixation (see below). Seeds on sandy substrate were disinfected by immersion in ethanol 95 % for 30 seconds, followed by immersion for 10 minutes in a hydrogen peroxide solution (H_20_2, 3%). The seeds were then rinsed at least five times with sterile distilled water. Before enriched with nickel sulfate, the sand was washed with hydrochloric acid (N/3, incubation for 12 hours followed by several rinses with distilled water) in order to mineralize the organic matter residues. Then, each sandy microcosm was inoculated with a *Rhizobium* strain. We used the self-adhering peat-based inoculant for Lentil (Becker Underwood, Canada). This product contains at least 10^9 viable cells of *Rhizobium*

leguminosarum biovar *viciae* strain 1435 per gram and we brought 1.2 kg per 600 kg seed, in accordance with manufacturer's instructions.

The experiment had a randomized complete block design with three replicates of the following treatments: lentil and ryegrass cultivated on the Ni-enriched agricultural soil and lentil (inoculated with *Rhizobium*) cultivated on Ni-enriched sand. The Ni-contaminated agricultural soils were adjusted three times per week to 70% of soil water holding capacity with distilled water. Lentils on sand were irrigated with a nutrient solution without nitrogen (pH 6.98) (Munns, 1977).

2.2. Plant analyses

After 2 months of culture, plant roots, stems and leaves were collected and separated. Fresh roots were carefully washed with deionized water and the nodule number per plant was counted by microscopic observations. Then, roots and shoots parts were oven-dried at 70ºC for 72 h and dry weights recorded. Subsamples (0.5 g) of dry and ground plant tissue were acid-digested at 95ºC in 2.5 ml of concentrated HNO_3 and 5 ml of H_2O_2 (30 %). The final solutions were filtered (0.45 µm DigiFILTER) and completed up to 25 ml with deionized water. [Ni] in the solution was measured with an Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES, Liberty II, Varian).

Metals are known to cause severe toxicity to various metabolic activities of legumes, including physiological processes like synthesis of chlorophyll pigments (Bibi and Hussain, 2005; Ahmad *et al.*, 2008) and protein synthesis (Brahima *et al.*, 2010). Heavy metals are known for their inhibition of nitrate reductase activity (NRA) (Fatnassi *et al.*, 2014). Consequently, total chlorophyll, carotenoid concentrations and nitrate reductase activity in the leaves were assessed as indicators of the Ni effects on plant physiology. Chlorophyll and carotenoids were extracted by incubation of leaves in acetone (80%) for 24 h followed by measurements of optical density using a SmartSpec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD (wave lengths of 663, 645 and 440 nm for chlorophyll a, b and carotenoids, respectively). The respective concentrations of chlorophyll a and b were calculated according to Arnon (1949). The potential NRA was estimated in fresh leaves by incubation in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5), 30 mM KNO_3, and 5% isopropanol at 28ºC for 2 h, followed by the addition of sulfanilamide 3 M HCl and 0.02% naphthylethylene diamine hydrochloride (NED HCl). The mixture was left for 20 min for maximum color development prior to optical density measurement with a spectrophotometer (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD) at

540 nm (Jaworski, 1971). The total C and N in the plant parts were analyzed by combustion at 900ºC with an analyzer C, N (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH).

We used the ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}N$) technique (Kerley and Jarvis, 1999) to estimate the proportion of N (%Ndfa) in lentils derived from biological nitrogen fixation (BNF). We used ryegrass (*Lolium perenne* L.) grown in pots contaminated with Ni in the same way as the lentils, as non-legume (non-fixing) control plants to estimate $\delta^{15}N$ of the N uptake from soil. Finally, we used lentils grown on sandy substrate and inoculated with a *Rhizobium* strain to estimate the $\beta^{15}N$ of the legume when fixing 100% of N_2 (Amarger *et al.*, 1979; Högberg, 1997). The %Ndfa was calculated using the following equation:

$$\%\text{Ndfa} = \frac{(\delta 15\text{N of Ryegrass} - \delta 15\text{N Lentil})}{(\delta 15\text{N of Ryegrass} - \beta 15\text{N Lentil on sand})} \text{ x } 100$$

Then, the amount of Ndfa per plant was calculated by multiplying the %Ndfa by the lentil biomass for each plant. Nitrogen originating from the seeds was quantified, by measuring total N and $\delta^{15}N$.

2.3. Soil analyses

Soil moisture was determined by heating subsamples to 105ºC until a constant weight was achieved. Subsamples (0.5 g) of dry soil were acid-digested in 2 ml of concentrated HNO_3 and 6 ml of concentrated HCl for quantification of major and trace elements. The final solutions were filtered (0.45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada) and completed up to 50 ml with deionized water. [Ni] in the solution was measured with an Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES, Liberty II, Varian). Available Ni in soil samples from each microcosm was extracted with a DTPA–TEA solution (0.005 M Diethylene Triamine Pentaacetic Acid, DTPA, 0.01 M $CaCl_2$, 0.1 M triethanolamine, pH 7.3) according to Lindsay and Norvell (1978) and the [Ni] in solutions was measured with an ICP-AES (Liberty II, Varian). The CEC was measured according to international ISO standard 23470. Soil pH was measured using a pH meter in a soil–water suspension (soil:water ratio= 1:5).

Total and organic C and N were quantified with the C, N Analyzer. Soluble C and N were determined on 5 g of dried soil extracted with 25 ml of $CaCl_2$ (1mM) by agitation at 5 rpm for 24 h. The mixture was then filtered through a Whatman filter (nylon membrane, 0.45 µm) and soluble C and N of $CaCl_2$ solutions were then analyzed with a TOC analyzer (TOC-VSCN equipment, Shimadzu, Kyoto, Japan). Nitrate and ammonium ions were quantified on 15 g of fresh soil mixed to 75 ml of 0.016 M KH_2PO_4 and stirred for 30 minutes at 17 rpm. The soil

suspension was then centrifuged (20 min at 5800 g) and filtered through a Whatman filter (nylon membrane, 0.45µm) before analysis by Ion Chromatography (Dionex 1500i with an AS 4 ASC column; Sunnyvale, USA).

2.4. Statistical analyses

Variance analysis was carried out on all data using one-way ANOVA (Tukey test with a confidence interval of 95%). Also, normality tests and k-sample comparison of variances were analyzed. These statistical analyses were carried out on XLSTAT software (XLSTAT 2015.2.01.16520, http://www.xlstat.com). Furthermore, all the parameters studied were submitted to PCA using StatBox software (Grimmersoft, Paris, France, http://www.statbox.com).

3. Results

3.1. Plant analyses

3.1.1. Shoot and root biomass

Lentils from treatment without Ni (0 mg Ni kg^{-1}) had the greatest shoot dry biomass (1.19 g) when compared to other treatments (Figure 17). There was no significant difference for the shoot dry biomass from 0 (control) up to 30 mg Ni kg^{-1}. Treatment with 90 mg Ni kg^{-1} showed the smallest shoot biomass (0.32 g), significantly lower than that of the control. The root dry weight was not affected by Ni addition.

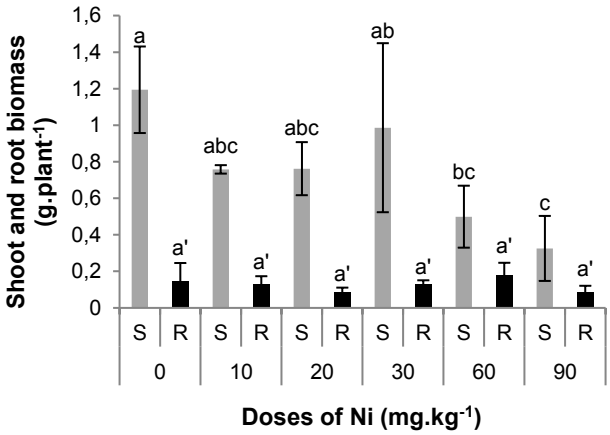


Figure 17 : Shoot (grey bars) and root (black bars) biomass (g $plant^{-1}$) of lentils in relation to Ni additions (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.1.2. Carbon and nitrogen content in shoots and roots

Total N and C in plant shoots were similarly affected by increasing soil [Ni] (Figure 18). The control treatment had the highest values (0.02 and 0.54 g plant^{-1} of total N and total C, respectively) and the 90 mg Ni kg^{-1} treatment the lowest values (0.01 and 0.14 g plant^{-1} of total N and total C, respectively). There were no significant differences among other treatments. There was no significant effect of soil [Ni] on total N in the roots (data not shown). The treatment with 60 mg Ni kg^{-1} showed the highest amount of total C in roots (0.12 g plant^{-1}) with a significant difference to all other treatments (data not shown).

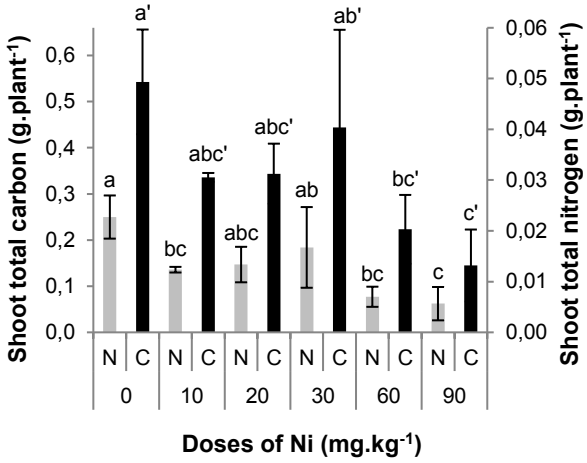


Figure 18 : Total nitrogen (N: grey bars) and carbon (C: black bars) in shoots of lentils (g plant^{-1}) grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.1.3. Ni concentrations in shoots and roots

The total Ni concentrations in lentil shoots and roots significantly increased when soil Ni-concentrations increased (Figure 19). [Ni] was 34 mg Ni kg^{-1} DW in shoots for the highest soil [Ni] of 90 mg Ni kg^{-1}. Unsurprisingly, roots accumulated much more Ni than the shoots, with 172 mg Ni kg^{-1} in the soil treatment contaminated with 60 mg Ni kg^{-1}. There was no detectable Ni in the control shoots, although roots did accumulate small quantities (15.1 mg Ni kg^{-1}).

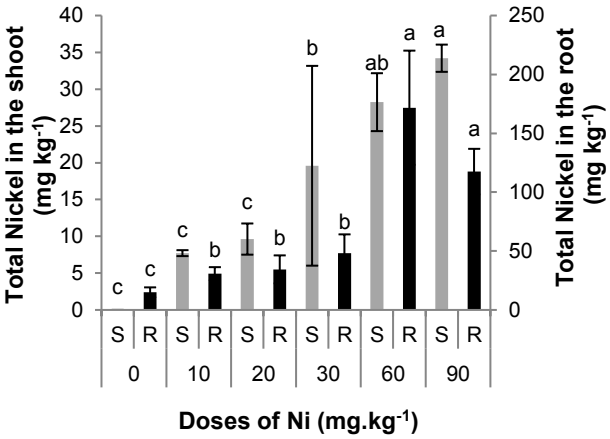


Figure 19 : Total Ni concentration in shoots (S: grey bars) and roots (R: black bars) (mg kg^{-1} DW) of lentils in relation to Ni additions (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.1.4. Pigments and nitrate reductase activity

A significantly higher chlorophyll concentration (1.19 mg g^{-1} FW) was observed in leaves of plants grown under high Ni addition (90 mg Ni kg^{-1} in comparison with the other treatments). The control was not different from other treatments (Figure 20). The carotenoid concentration in leaves was not affected significantly by soil [Ni], but it followed the same trend as the chlorophyll getting somehow higher with the increase of [Ni] (Figure 20). NRA decreased slightly when [Ni] in the soil increased (Figure 21). Plants growing on soils contaminated with 30 to 90 mg Ni kg^{-1} had significantly lower NRA (0.70, 0.71 and 0.68 µmol $NO_2^-.g^{-1}.h^{-1}$, respectively) than the control (0.87 µmol $NO_2^-.g^{-1}.h^{-1}$).

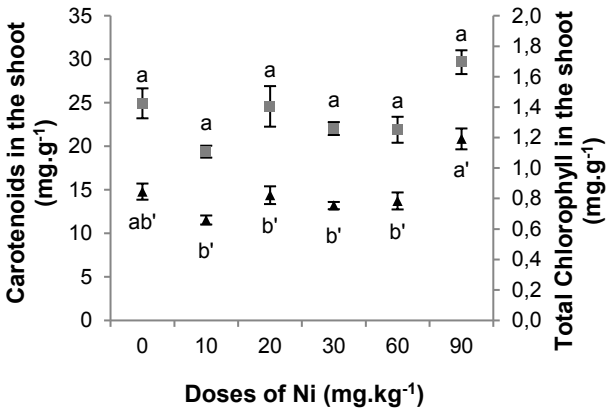


Figure 20 : Carotenoid (grey squares) and chlorophyll (black triangles) concentrations in leaves of lentils (mg g^{-1} FW) grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

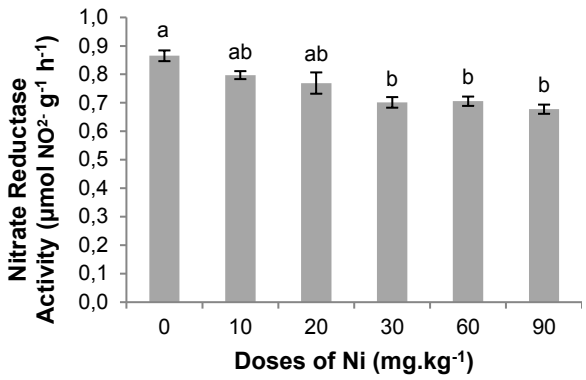


Figure 21 : Variation of the nitrate reductase activity in the fresh leaves (µmol NO_2^- g^{-1} h^{-1}) of lentils grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval within columns followed by the same letter do not differ significantly according to Tukey's multiple range test (α=0.05)

3.1.5. Nodule number

Lentil plants growing on soil with 90 mg Ni kg^{-1} had significantly fewer nodules than the control (0 mg Ni kg^{-1}) (Figure 22). No significant difference was observed for this parameter for the lowest [Ni].

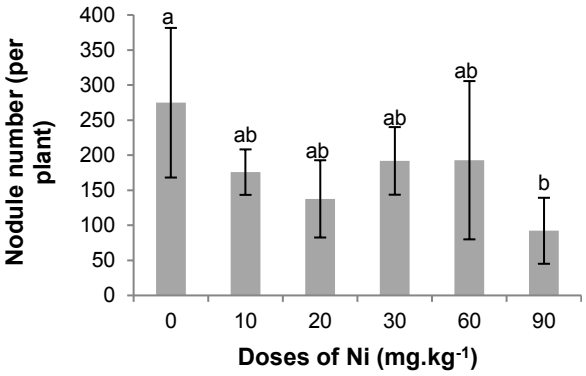


Figure 22 : Nodule number (per plant) of lentils in relation to Ni addtions (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.1.6. N_2 fixation

The amount of nitrogen fixed from the air (Ndfa) decreased when soil [Ni] increased (Figure 23). Control soils had significantly greater Ndfa (12.2 mg $plant^{-1}$) in comparison to all other treatments. The highest [Ni] completely cancelled Ndfa (0 mg $plant^{-1}$). No significant differences were shown among other [Ni] of 10, 20, 30 and 60 mg Ni kg^{-1}.

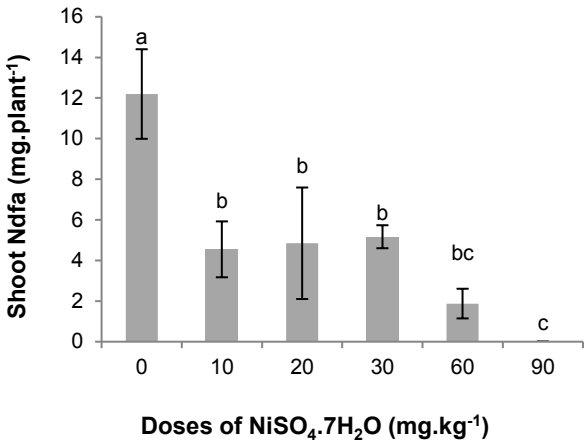


Figure 23 : Shoot nitrogen fixed from the air (Ndfa, mg plant^{-1}) of lentils grown on soil contaminated with Ni. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.2. Soil characteristics

3.2.1. Total Ni and DTPA-Ni

Soil [Ni] supplied at the beginning of the experiment strongly structured the distribution of total Ni and DTPA-extractable nickel among the gradient of soils (Figure 24). The total [Ni] quantified in the soil at harvest is proportional to the [Ni] supplied in the soil and reached a maximum of 138.8 mg Ni kg^{-1} with the addition of 90 mg Ni kg^{-1}. DTPA-extractable Ni showed the same trend as the total Ni in the soil (also measured after harvest) and was comprised between 50-55% of Ni added and the highest addition (i.e. 90 mg Ni kg^{-1}) led to a final DTPA concentration of 49.73 mg Ni kg^{-1} (Figure 24). The targeted concentrations observed in field conditions for further implementation of legumes (i.e. ≈ 30 mg kg^{-1}) were thus comprised in the range tested here.

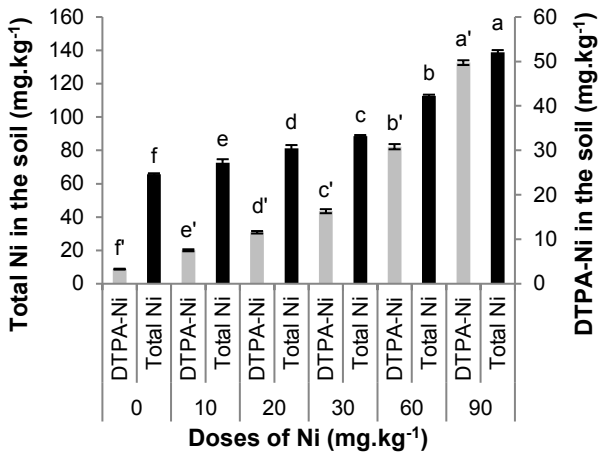


Figure 24 : Total Nickel (Total-Ni) (black bars) and DTPA-extractable Nickel (DTPA-Ni) (grey bars) in the soil at the harvest (mg kg^{-1}). Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.2.2. pH and CEC

Regardless of soil treatment, soil pH at harvest was significantly lower by 0.13 to 0.22 pH units than the control soil (6.63) for the 60 and 90 mg Ni kg^{-1} treatments, respectively (Figure 25). In the same way, the treatment with [Ni] at 90 mg kg^{-1} had the lowest CEC, the difference with all other treatments being significant (data not shown).

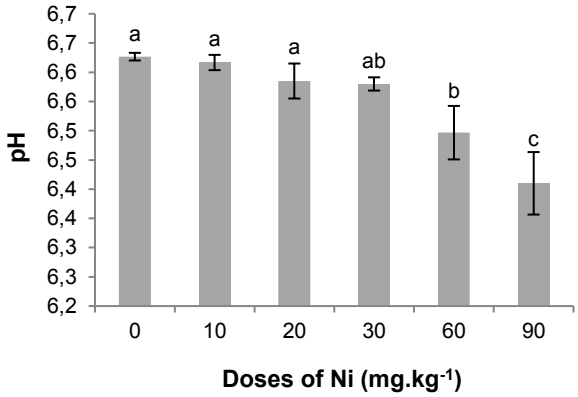


Figure 25 : pH of the soil at the harvest. Means ± confidence interval followed by different letters are significantly different at $p<0.05$ (Tukey's multiple range test), (n = 3)

3.2.3. Soil Nitrogen and Carbon

No significant differences were observed between any of the treatments for the percentage of total and organic soil N and C (data not shown). Similarly, no significant difference was detected for soluble C in soils (data not shown). The soluble N concentration in soils at harvest was the highest (58.8 mg kg^{-1}) with addition of 90 mg kg^{-1}, compared to

control and other treatments (between 20.4 and 27.5 mg kg^{-1}). There was no significant difference between control and treatments with additions from 10 to 60 mg Ni kg^{-1}.

3.2.4. Ammonium and nitrate

No ammonium was detected in soils at harvest for all treatments (data not shown). In contrast, high nitrate concentrations were measured, without significant difference among all treatments, except a higher, but non-significant, nitrate concentration for the addition of 90 mg kg^{-1} (59.7 mg kg^{-1}) compared to the control (34.6 mg kg^{-1}) (data not shown).

4. Discussion

Hyperaccumulators are considered to be ideal candidates for application in agromining, a non-destructive approach for the recovery of high value metals (e.g. Ni) from metal-enriched soils. However, agromining should focus on species showing the highest levels of hyperaccumulation. Unfortunately, the annual biomass production of some hyperaccumulator species is not sufficiently high. Therefore, high biomass yield and metal hyperaccumulation are both required in order to make agromining a commercially viable alternative (Zhang *et al.*, 2014; van der Ent *et al.*, 2015).

As shown in classic agricultural systems, the inclusion of a legume in inter-cropping or co-cropping provides nitrogen inputs in the cultural system in addition to producing valuable yields (Lizarazo *et al.*, 2015). So, our objective was to investigate whether *Lens culinaris* could be used in inter- or co-cropping with a hyperaccumulator plant in order to improve Ni phytoextraction by hyperaccumulator plants without any chemical fertilizer input. But it is necessary to control if this legume can grow and form functional nodules within the range of natural Ni concentrations displayed by ultramafic agricultural soils. Indeed, there are numerous reports where elevated amounts of trace metals have been found to limit the growth of both rhizobia and their host legumes (Heckman *et al.* 1987; Broos *et al.* 2005) and concomitantly reduce crop yields. But, it is also known that the degree of tolerance of plants (including legumes) to trace metals have been divided into three categories: hypotolerance, basal tolerance, and hypertolerance (Ernst *et al.* 2008), and that some legumes can be found in different habitats polluted by excess heavy metals. For example, *Anthyllis vulneraria* can be found naturally in ultramafic soils and is able to fix 80% of its total nitrogen from atmosphere. The study of serpentinophytes in North-Est Portugal revealed that some families, such as legumes, showed high tolerance to serpentine soils (Menezes de Sequeira and Pinto da Silva, 1992). Different species of *Trifolium* (*T. Bocconei, T. cherleri, T. strictum*), *Anthyllis*

sampaiana, *Lotus tenuis* are common in these serpentine environments. The same occurs in ultramafic soils of Albania where species of *Trifolium* (*T. nigriscens, T. campestre, T. angustifolium*) and of *Lotus* (*L. corniculatus and L. angustissimus*) are common species or can even be dominating species and display extremely high Ni concentrations in shoots, e.g. *T. nigrescens* (Bani *et al.*, 2007, 2013).

In our study, lentil which was nevertheless adversely affected by the increase of soil [Ni], tolerated a moderate availability of Ni, from 7,5 to 30.8 mg Ni-DTPA kg^{-1} (corresponding to additions of 10 to 60 mg Ni kg^{-1}) based on results of plant biomass weight, C and N content, physiological parameters and nodule numbers. Trace metals contaminated soils severely affects the survival of *Rhizobium* strains as described by Gusmão *et al.* (2005). *Rhizobia* strains isolated from *Lens culinaris* revealed the lowest resistance to trace metals, in comparison to other strains isolated from different nodulated legumes (*Vicia faba*, *Cicer arietinum* and *Sulla coronaria*), when tested on culture media enriched with trace metals (Cd, Pb, Zn and Cu) (Fatnassi *et al.*, 2014). This fact explains the reduced atmospheric N_2 fixation in our study that could be related to a decreased symbiotic activity of the microbes at the highest soil Ni availability. These outcomes affected various parameters such as the Ndfa, but also the shoot biomass, which was also negatively correlated to Ni additions to the soil. Moreover, shoots and roots of enriched treatments accumulated greater [Ni], which was also positively correlated to Ni-DTPA concentrations, total and exchangeable Ni in soils at harvest. Such accumulation of Ni in plant parts is known to cause a reduction of the plant biomass (Ahmad *et al.*, 2012) and roots stored a higher amount of Ni than shoots, as reported by previous studies on legumes (Roy *et al.*, 2009). As a result of the decreased Ndfa, the ^{15}N excess in lentil and the proportion of nitrogen content in lentil coming from the seed (data not shown) increased when [Ni] rose from 0 to 90 $mg.kg^{-1}$. At the latter concentration, there was absolutely no more N input to the system from atmospheric N_2 fixation, thus making the potential association with hyperaccumulators non-profitable in terms of N budget (competition for N absorption between both species).

Physiologically and more precisely, [Ni] showed direct and indirect toxic effects on the various plant processes, which were monitored in this study. We followed the effect of [Ni] on pigments concentrations in leaves, but we eventually found that carotenoids were not significantly affected by the increase of [Ni] in the soil. However, Ni had a contradictory effect on chlorophyll content in leaves. It is known that trace metals have a negative effect on chlorophyll content in plants (Zengin and Munzuroglu, 2005; Fatoba *et al.*, 2008). Our hypothesis regarding the increase of the chlorophyll content in fresh leaves at highest Ni

concentrations was that reduction of plant biomass results in a mechanical concentration of chlorophyll in leaves (Krupa *et al.*, 1993; Prasad and Freitas, 2003). Nickel added to the soil deleteriously affected nitrate reductase activity (NRA) in shoots. Reduction of NRA, due to the inhibition of nitrate translocation from roots to shoots by Ni, has also been reported in many previous studies (e.g. Kevrešan *et al.*, 1998; Sharma and Subhadra, 2010). Consequently, decreased amounts of leaf nitrate implied lower NRA levels (Kevrešan *et al.*, 1998), which were also affected by the photosynthetic process (Bazzigalupi *et al.*, 1992). Metabolites issued from the photosynthetic metabolism are essential to nitrate reduction. Therefore, photosynthesis, related at the same time to leaf size and chlorophyll quantities, was limited, thus decreasing both the uptake and reduction of nitrate (Bazzigalupi *et al.*, 1992).

Nitrogen and carbon in the shoots were also significantly reduced by the Ni concentrations in the soil. Strong positive correlations linked C and N contents in shoots to shoot biomass and to Ndfa in shoots (Pearson correlations, 0.982 and 0.878, respectively; data not shown). It is known that high concentrations of metals limit nutrient and water uptake from the soil and thus reduce biomass production and dry matter accumulation in shoots and roots. Furthermore, the photosynthesis, carbohydrate and protein synthesis are also reduced due to the induced oxidative stress by the heavy metal (Ahmad *et al.*, 2012). Both, nitrogen fixed from the air and nitrate assimilation from the soil, reported to be reduced by the heavy metal toxicity, to diminish nitrogen content in both shoots and roots (Ahmad *et al.*, 2012).

No ammonium concentrations were detected in our soil. This was due to the main conversion of ammonia in soil into nitrate through nitrification (Robertson 1997). In general, ammonium is found in lower amounts in soils than nitrate (Burger and Jackson 2003).

Soil pH and CEC decreased with increasing soil-Ni concentrations and this was probably due to the complexation of Ni^{2+} to soil surface sites and to the Ni^{2+} exchange with other cations from CEC, in both cases releasing surface H^+ ions. Furthermore, the stability of Ni sorbed onto organic particles and the polymerization of cation-bound organic matter diminished the CEC in the soil at high Ni concentrations (Violante *et al.*, 2010). The soluble N pool in the soil and nitrate ions were reversely affected by increasing concentrations of Ni due to the reduced ability of the lentils to absorb nutrients at higher Ni concentrations (Ahmad *et al.*, 2012). On one hand, we agree with this comment but on the other hand, it is never possible to assess one single factor in studying serpentine stress by using serpentine soils which combine all stresses in one. This is why we based the study on DTPA-Ni on a soil that we anticipated thinking that it had a pH value close to neutrality to avoid any pH effect. Indeed, the pH values after cropping were slightly higher (which by the way might explain the

slight decrease in DTPA-Ni) but comprised between 6.5 and 6.7 (considered as neutral pH). Our interest was the level of DTPA-Ni the plant was exposed to having all chemical fertility parameters in optimal conditions, so that we could have an idea of what the Ni stress is on the legume. The level of stress was still significant, although many serpentine soils may exceed this DTPA-Ni value in topsoils. So, we can question that idea that Ni in serpentine is not the stressing factor. We agree, but here we used an agricultural soil which is normally fertile and all studied parameters confirm the phytotoxic effect of Ni on lentil even if the soil pH was neutral.

In natural ultramafic soils stresses to crop plants are linked to i) the low fertility of these soils, ii) the toxicity of Ni and, iii) the high ratio of Mg:Ca (Whittaker, 1954; Proctor and Woodell 1975; Brooks, 1987). The two last stresses can be overcome by an adapted chemical fertilization pattern, but it is more difficult to change Ni availability, even with limestone additions (Kukier *et al.*, 2004). Our experience is that DTPA-Ni and water-soluble Ni in temperate ultramafic soils are still high enough to cause toxicity symptoms to non-adapted plants at pH values below 8.0. This is because the mineral phases that bear Ni are moderately sensitive to pH at this range of values, i.e. below 8.0 (Massoura *et al.*, 2006; Bani *et al.*, 2014; Raous *et al.*, 2013). Raising the pH value of 1 unit by liming to substantially decrease Ni availability cannot be achieved without any negative side effect on P and K availability and requires further fertilizer input, thus becoming an economic issue. Although liming has been proven to be beneficial to Ni phytoextraction yield by *A. murale* (Kukier *et al.*, 2004), it can be expensive and can increase Ca concentrations in shoots, thus increasing the cost of hydrometallurgical treatment of the biomass for Ni recovery (Zhang *et al.*, 2016).

We demonstrated that lentils can tolerate strong concentrations of Ni-DTPA in the soil and it was previously reported that lentils are able to tolerate high concentrations of trace metals, such as copper, lead and cadmium (Fatnassi *et al.*, 2014). The lentils can withstand a wide range of DTPA-Ni concentrations in the soil (up to 30 mg Ni kg^{-1}) that are at least one order of magnitude above acceptable levels for most crops (L'huillier and Edighoffer, 1996). This range of concentrations is frequently observed in naturally rich ultramafic soil although slightly lower than many ultramafic soils (Bani *et al.*, 2009; Bani *et al.*, 2013). Therefore, the naturally ultramafic soils, which will be used in further experiments to test the association of *Lens culinaris* with a hyperaccumulator plant under co-cropping or in rotation, display DTPA-Ni concentrations which are comprised in our tested range and the plant should be successfully cropped in field conditions provided that Ca, K and Mg fertility issues are managed.

5. Conclusions

Our study confirmed that lentils can tolerate relatively high concentrations of available nickel in the soil (i.e. 6 times higher than background values found in non-ultramafic soils), although a physiological stress is induced with additions of Ni above 60 mg kg^{-1}. Lentils can still produce nodules that fix nitrogen from the air for most of the range of Ni additions tested although the number of nodules is strongly affected by Ni additions. Nitrogen fixation is also affected in the same way and becomes null when available concentrations of Ni reach 49.7 mg kg^{-1} DTPA-Ni. The quantity of available Ni found in the serpentine soil, which will be used in the future work, is within the range of the concentrations investigated in this experiment (i.e. 30 mg.kg^{-1} Ni-DTPA). Our upcoming work will be to test *Lens culinaris* in inter- or co-cropping with a hyperaccumulator plant to enhance its biomass production by providing nitrogen and to allow this hyperaccumulator to extract more Ni, however, the potential association with hyperaccumulators will become non-profitable in terms of N budget (competition for N absorption between both species) if we exceed a value of 30 mg.kg^{-1} Ni-DTPA.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the technical team of "Laboratoire Sols et Environnement" for their help and support and the technical assistance of the joint research unit Forest Ecology and Ecophysiology (UMR 1127 INRA, EEF, Champenoux), and especially Christian HOSSANN for the isotopic analysis of ^{15}N. This work was supported by the French National Research Agency through the national "Investissements d'avenir" program, reference ANR-10-LABX-21 - LABEX RESSOURCES21 and through the ANR-14-CE04-0005 project "Agromine". Finally, we are thankful to the Association of Specialization and Scientific Guidance (ASSG) for funding the PhD scholarship of Ramez Saad.

References

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, Jr. M.E. ,1992. Chapter 4 - Regulation of ethylene production by internal, environmental, and stress factors. In: Saltveit, Jr. ME. (ed). Ethylene in plant biology (Second Edition). Academic Press, New York, pp. 56-119. doi: 10.1016/B978-0-08-091628-6.50010-2

Ahmad, M.S.A., Hussain, M., Ijaz, S., Alvi, A.K., 2008. Photosynthetic performance of two mung bean (*Vigna radiata*) cultivars under lead and copper stress. International Journal of Agriculture and Biology 10, 167‑172

Ahmad, E., Zaidi, A., Khan, M., Oves, M., 2012. Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. In: Zaidi, A., Wani, P.A., Khan, M.S. (eds). Toxicity of

heavy metals to legumes and bioremediation. Springer, Vienna, pp. 29‑44. doi: 10.1007/978-3-7091-0730-0-2

Amarger, N., Mariotti, A., Mariotti, F., Durr, J.C., Bourguignon, C., Lagacherie, B., 1979. Estimate of symbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in ^{15}N Natural abundance. Plant and Soil 52, 269‑280. doi: 10.1007/BF02184565

Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris.* Plant Physiology 24, 1‑15

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). Plant and Soil 293, 79‑89. doi: 10.1007/s11104-007-9245-1

Bani, A., Echevarria, G., Mullaj, A., Reeves, R.D., Morel, J.L., Sulçe, S., 2009. Nickel hyperaccumulation by *Brassicaceae* in serpentine soils of Albania and Northwest Greece. Northeastern Naturalist 16, 385‑404

Bani, A., Imeri, A., Echevarria, G., Pavlova, D., Reeves, R.D., Morel, J.L., Sulçe, S., 2013. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. Fresenius Environmental Bulletin 22, 1792‑1801

Bani, A., Echevarria, G., Montargès-Pelletier, E., Gjoka, F., Sulçe, S., Morel, J.L., 2014. Pedogenesis and nickel biogeochemistry in a typical Albanian ultramafic toposequence. Environmental Monitoring and Assessment 186, 4431‑4442. doi: 10.1007/s10661-014-3709-6

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., 2015a. Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. International Journal of Phytoremediation 17, 117‑127. doi: 10.1080/15226514.2013.862204

Bani, A., Echevarria, G., Zhang X., Benizri E., Laubie B., Morel, J.L., Simonnot M.O., 2015b. The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with *Alyssum murale* in Albania. Australian Journal of Botany 63, 72‑77

Bazzigalupi, O., Deroche, M.E., Lescure, J.C., Bachelier, C., Tardif, S., 1992. Activité nitrate réductase *in vitro* de jeunes plantules de blé (*Triticum aestivum* L.) cultivées dans les conditions de détermination de la faculté germinative et après amélioration de la nutrition et de l'éclairement. Agronomie. 12, 711‑721

Bibi, M., Hussain, M., 2005. Effect of copper and lead on photosynthesis and plant pigments in black gram (*Vigna mungo* L.). The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 74, 1126‑1133. doi: 10.1007/s00128-005-0698-8

Berazaín, R., 2007. Nickel localization in tissues of different hyperaccumulator species of *Euphorbiaceae* from ultramafic areas of Cuba. Plant and Soil. 293, 99‑106. doi: 10.1007/s11104-007-9227-3

Boyd, R.S., Jaffré, T., 2009. Elemental concentrations of eleven New Caledonian plant species from serpentine soils: elemental correlations and leaf-age effects. Northeastern Naturalist 16, 93‑110. doi: 10.1656/045.016.0508

Brahima, S., Jokea, D., Ann, C., Jean-Paul, N., Marjo, T., Arja, T., Sirpac, K., Frank, V., Karen, S., Jaco, V., 2010. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. Journal of Plant Physiology 167, 247‑254. doi: 10.1016/j.jplph.2009.09.015

Broos, K., Beyens, H., Smolders, E., 2005. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil Biology and Biochemistry 37, 573‑579

Brooks, R.R., 1987 . Serpentine and its vegetation: A multiclisciplinary approach. Discoides Press, Kent, UK.Burger, M., Jackson, L.E., 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. Soil Biology and Biochemistry 35, 29‑36. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00233-X

Chaney R.L., Angle J.S., Broadhurst C.L., Peters C.A., Tappero R.V., Sparks D.L., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. Journal of Environmental Quality 36, 1429‑1443

Chaney, R.L., Chen, K.Y., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 2008. Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. Plant and Soil 311, 131‑140. doi: 10.1007/s11104-008-9664-7

Echevarria, G., Baker, A.J.M., Bani A., Benizri, E., Houzelot, V., Laubie, B., Kidd, P.S., Morel, J.L., Pons, M.N., Simonnot, M.O**.,** van der Ent, A., Zhang, X. 2015. Agromining for nickel: a complete chain that optimizes ecosystem services rendered by ultramafic landscapes. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE) July 12–16, 2015

Ernst, W.H.O., Krauss, G.J., Verklej, J.A.C., Wesenberg, D., 2008. Interaction with heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. plant cell and environment 31, 123‑143

Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Jebara, M., Jebara, S.H., 2014. Bacteria associated with different legume species grown in heavy-metal contaminated soils. International Journal of Agricultural Policy and Research 2, 460‑467. doi: 10.15739/IJAPR.018

Fatoba, P.O., Udob, P.O., Emem, G., 2008. Effects of some heavy metals on chlorophyll accumulation in *Barbula lambarenensis.* Ethnobotanical Leaflets. 12, 776‑783

Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. Agronomy for Sustainable Development A review 30, 57‑66. doi: 10.1051/agro/2009003

Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiology Letters 251, 1‑7. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.030

Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169, 30‑39. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009

Gusmão, L.A.I., Figueira, E., De Almeida, M.P., Pereira, S.I.A., 2005. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. Canadian. Journal of Microbiology 51, 7‑14

Heckman, J.R., Angle, J.S., Chaney, R.L., 1987. Residual effects of sewage sludge on soybean II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. Journal of Environmental Quality 16, 117‑124

Hirsch, A.M., Fang, Y.W., 1994. Plant hormones and nodulation - whats the connection. Plant. Molecular Biology 26, 5‑9. doi: 10.1007/bf00039514

Högberg, P., 1997. Tansley Review No. 95 ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. New Phytologist 137, 179‑203. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x

Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications 43, 1274‑1279

Kabata-Pendias, A., 2000. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, USA. 432 pp.

Kerley, S.J., Jarvis, S.C., 1999. The use of nitrogen-15 natural abundance in white clover (*Trifolium repens* L.) to determine nitrogen fixation under different management practices. Biology and Fertility of Soils 29, 437‑440. doi: 10.1007/s003740050578

Kevrešan, S., Petrović, N., Popović, M., Kandrač, J., 1998. Effect of heavy metals on nitrate and protein metabolism in sugar beet. Biologia Plantarum 41, 235‑240 doi: 10.1023/A:1001818714922

Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M., 2015. Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. International Journal of Phytoremediat 17, 1005‑1037. doi: 10.1080/15226514.2014.1003788

Krupa, Z., Siedlecka, A., Maksymiec, W., Baszyilski, T., 1993. *In vivo* response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. The Journal of Plant Physiology142, 664‑668. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80899-0

Kukier, U, Chaney, R. 2004. In Situ Remediation of Nickel Phytotoxicity for Different Plant Species. Journal of Plant Nutrition 27, 465‑495. doi: 10.1081/PLN-120028874

Lee, K.H., Larue, T.A., 1992. Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv sparkle. Plant Physiology 100, 1759‑1763

L'Huillier, L., Edighoffer, S., 1996. Extractability of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni-rich ultramafic soils of New Caledonia. Plant and Soil 186, 255‑264. doi: 10.1007/BF02415521

Ligero, F., Caba, J.M., Lluch, C., Olivares, J., 1991. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. Plant Physiology 97, 1221‑1225

Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42, 421‑428. doi: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x

Lizarazo, C.I., Yli-Halla, M., Stoddard, F.L., 2015. Pre-crop effects on the nutrient composition and utilization efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) and narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 311‑327. doi: 10.1007/s10705-015-9743-0

Massoura, S.T., Echevarria, G., Becquer, T., Ghanbaja, J., LeclercCessac, E. and Morel, J.-L., 2006. Control of nickel availability by nickel bearing minerals in natural and anthropogenic soils. Geoderma, 136, 28‑37

Menezes de Sequeira, E., Pinto da Silva, A.R., 1992. Ecology of serpentinized area of North-East Portugal. In: Roberts, B.A., Proctor, J., (eds.), The ecology of areas with serpentinized rocks: a world view: 169‑197. Kluwer, Dordrecht

Mokgehle, S.N., Dakora, F.D., Mathews, C., 2014. Variation in N_2 fixation and N contribution by 25 groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties grown in different agro-ecologies, measured using ^{15}N natural abundance. Agriculture, Ecosystems and Environment 195, 161‑172. doi:10.1016/j.agee.2014.05.014

Munns, D.N., 1977. Mineral nutrition and the legume symbioses. A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV, Wiley, New York. 353‑391

Nyagumbo, I., Mkuhlani, S., Pisa, C., Kamalongo, D., Dias, D., Mekuria, M., 2015. Maize yield effects of conservation agriculture based maize–legume cropping systems in contrasting agro-ecologies of Malawi and Mozambique. Nutrient Cycling in Agroecosystems doi: 10.1007/s10705-015-9733-2

Pajuelo, E., Rodriguez-Llorente, I.D., Dary, M., Palomares, A.J., 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction. Environmental Pollution 154, 203‑211. doi: 10.1016/j.envpol.2007.10.015

Peoples, M.B., Chalk, P.M., Unkovich, M.J., Boddey, R.M., 2015. Can differences in ^{15}N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? Soil Biology and Biochemistry 87, 97‑109. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.04.010

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.D., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electron. Journal of Biotechnology 93, 285‑321

Proctor, J., Woodell, S.R.J., 1975. The ecology of serpentine soils. Advances in Ecological Research 9, 255‑366

Raous, S., Echevarria, G., Sterckeman, T., Hanna, K., Thomas, F., Martins, E.S., Becquer, T., 2013. Potentially toxic metals in ultramafic mining materials: identification of the main bearing and reactive phases. Geoderma, 192, 111‑119. doi:10.1016/j.geoderma.2012.08.017

Robertson, P.G., 1997. Nitrogen use efficiency in row-crop agriculture: crop nitrogen use and soil nitrogen loss. Agricultural Ecology. Academic Press, San Diego pp. 347‑365

Rodrigues, M., Dimande, P., Pereira, E.L., Ferreira, Q.I., Freitas, S., Correia, C.M., Moutinho-Pereira, J., Arrobas, M., 2015. Early-maturing annual legumes: an option for cover cropping in rainfed olive orchards. Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 153‑166. doi: 10.1007/s10705-015-9730-5

Roy, B.K., Prasad, R., Gunjan, R., 2009. Heavy metal accumulation and changes in metabolic parameters in *Cajanus cajan* grown in mine spoil. Journal of Environmental Biology 31, 567‑573

Scalise, A., Tortorella, D., Pristeri, A., Petrovičová, B., Gelsomino, A., Lindström, K., Monti, M., 2015. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding

durum wheat in a rotation under rainfed conditions. Soil Biology and Biochemistry 89, 150‑161. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.003

Sharma, J., Subhadra, A.V., 2010. The effect of Mercury on nitrate reductase activity in bean leaf segments (*Phaseolus vulgaris*) and its chelation by phytochelatin synthesis. Life Science and Medical Research 13

St. Luce, M. et al., 2015. Legumes can reduce economic optimum nitrogen rates and increase yields in a wheat-canola cropping sequence in western Canada. Field Crops Research 179, 12‑25. doi: 10.1016/j.fcr.2015.04.003

Tang Y.T., Deng T.H.B., Wu Q.H., Wang S.Z., Qiu R.L., Wei Z.B., Guo X.F., Wu Q.T., Lei M., Chen T.B., 2012. Designing cropping systems for metal---contaminated sites: A review. Pedosphere 22, 470‑488

Tumi, A.F., Mihailovic, N., Gajic, B.A., Niketic, M., Tomovic, G., 2012. Comparative Study of Hyperaccumulation of Nickel by *Alyssum murale.* Populations from the Ultramafics of Serbia. Pol. J. Environ. Stud. 21, 1855‑1866.

van der Ent, A., Baker, A.J.M. , Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W.N., Meech, J.A., Erskine, P.D, Simonnot, M.O., Vaughan, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q. and Mulligan D.R., 2015. Agromining: farming for metals in the future? Environmental Science and Technology 49, 4773‑4780. doi: 10.1021/es506031u

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. Plant and Soil 362, 319‑334

Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A.G., Pigna, M., 2010. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10, 268‑292. doi: 10.4067/S0718-95162010000100005

Whittaker, R.H., 1954. The Ecology of Serpentine Soils. Ecology 35, 258‑288. doi: 10.2307/1931126

Zengin, F.K., Munzuroglu, O., 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47, 157‑164

Zhang, X., Houzelot, V., Bani, A., Morel, J.L., Echevarria, G., Simonnot, M.O., 2014. Selection and combustion of Ni-hyperaccumulators for the phytomining process. International Journal of Phytoremediation 16, 1058‑1072. doi: 10.1080/15226514.2013.810585

Zhang, X., Laubie, B., Houzelot, V., Plasari, E., Echevarria, G., Simonnot, M.O., 2016. Increasing purity of ammonium nickel sulfatehexahydrate and production sustainability in anickel phytomining process. Chemical Engineering Research and Design 106, 26‑32. doi: 10.1016/j.cherd.2015.12.009

Points marquants de l'étude

- Aucune étude antérieure n'avait testé si la lentille est à même de former des nodosités et de réaliser la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, lorsqu'elle est cultivée sur des sols riches en nickel.

- Notre étude confirme que la lentille peut pousser sur des sols enrichis en nickel dont les teneurs sont 6 fois supérieures à celles mesurées dans des sols non ultramafiques.

- La capacité de la lentille à former des nodosités fonctionnelles est négativement affectée par les très hautes concentrations en nickel biodisponible.

- L'aptitude à fixer l'azote atmosphérique est totalement inhibée dès les teneurs en nickel biodisponible de 50 mg Ni kg^{-1}de sol.

- La mise en place de systèmes de culture dédiés à l'agromine et basés sur l'introduction d'une légumineuse, telle la lentille, doit être limitée aux sols ultramafiques caractérisés par des teneurs en nickel biodisponible faibles à modérées (inférieures à 50 mg Ni kg^{-1} de sol).

- Les légumineuses pourraient ainsi être cultivées en association avec des plantes hyperaccumulatrices de nickel afin d'améliorer la qualité et la fertilité des sols ultramafiques.

CHAPITRE 4. Développement de l'agromine associant *Alyssum murale* et une légumineuse : une expérimentation réalisée *in situ* sur un sol ultramafique, en Espagne

Chapitre 4a. Expérimentations préliminaires à la mise en place des expériences sur sol serpentinique : choix de la légumineuse.

La lentille est apte à se développer et former des nodosités fonctionnelles sur un sol agricole amendé avec une quantité de nickel inférieure à 50 mg Ni kg^{-1} de sol. Il convient à présent de tester si celle-ci peut également croître sur le sol serpentinique que nous avons retenu. Ce sol provient de la région de Melide (Espagne) et se caractérise par des teneurs en nickel biodisponible de l'ordre de 40 mg Ni kg^{-1} de sol. Nous avons donc mis en place un premier essai d'une durée de 6 semaines (Photographie 13) consistant en l'implantation de la lentille sur le sol serpentinique.

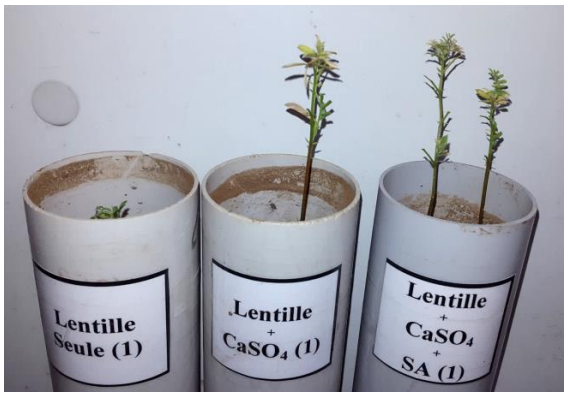
Photographie 13 : Aspect de la lentille sur le sol serpentinique de la parcelle Triangulo (T) après 6 semaines de culture

La lentille présente des symptômes de carences et/ou de toxicité avec jaunissement des feuilles et chute de celles-ci. Après analyse des éléments minéraux de ce sol naturel (Annexe 2), nous constatons un fort déséquilibre du rapport Ca/Mg, pouvant expliquer l'aspect des plants.

Nous avons donc mis en place un second essai, d'une durée de 3 semaines, comprenant trois modalités (Photographie 14) :

- le sol n'a reçu aucun traitement (témoin),

- le sol est amendé avec du sulfate de calcium dihydraté (le gypse : $CaSO_4$, $2H_2O$, 300 mg de Ca kg^{-1} de sol sec) pour équilibrer le rapport Ca/Mg,
- une pulvérisation des plantes est réalisée avec de l'acide salicylique ($C_7H_6O_3$, 1 mM, Wang *et al.*, 2009), (essai de 4 semaines).



Photographie 14 : Aspect de la lentille après 3 semaines de culture sur le sol serpentinique de la parcelle Triangulo (T), n'ayant reçu aucun amendement, amendé avec du gypse et dont les plantes ont reçu ou non une pulvérisation d'acide salycilique

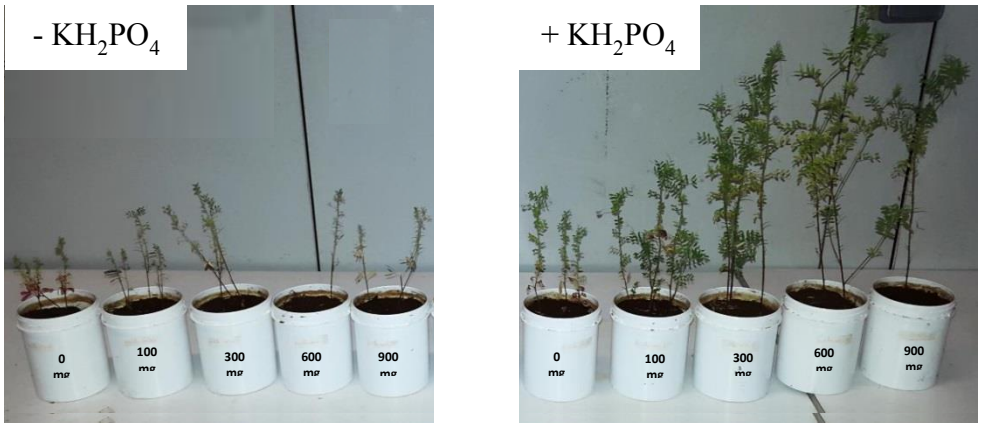
Quel que soit le traitement, la lentille montre un très mauvais développement avec une chutte rapide des feuilles : les symptômes observés ne peuvent pas résulter que du seul déséquilibre Ca/Mg.

Nous avons pensé que l'amendement en sulfate de calcium pouvait induire une toxicité (excès de sulfate) et un troisième essai, d'une durée de 2 semaines, a consisté à amender le sol avec du nitrate de calcium ($Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$, 300 mg de Ca kg^{-1} de sol sec), (Photographie 15).

Photographie 15 : Aspect de la lentille après 2 semaines de culture sur le sol serpentinique de la parcelle Triangulo (T), amendé avec du nitrate de calcium

Les plants de lentille montrent toujours les mêmes symptômes et la forme sous laquelle est apporté le calcium (sel de sulfate ou de nitrate) ne semble pas être à l'origine des symptômes de jaunissement et défeuillaison des plants.

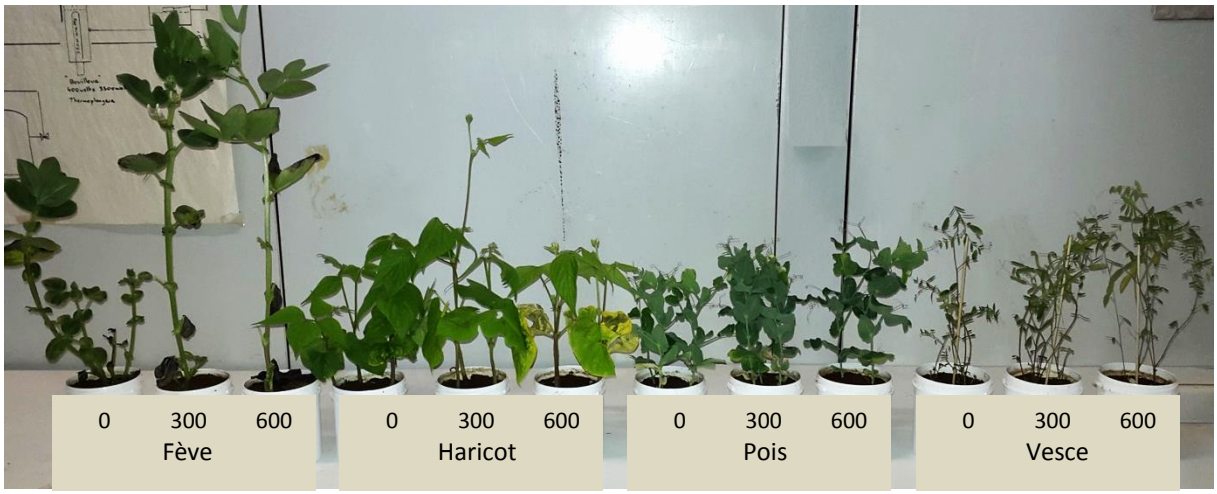
Lors d'un quatrième essai d'une durée de 6 semaines, nous avons amendé le sol avec des doses croissantes de sulfate de calcium (0, 100, 300, 600, 900 mg de Ca kg^{-1} sol sec) et avec l'ajout d'une fertilisation P, K (fertilisation de 0-52-34 NPK, soit 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4 équivalent à 122.5 kg de phosphore et 156,2 kg de potassium à l'hectare), (Photographie 16).



Photographie 16°: Effet de doses croissantes de $CaSO_4$ (0, 100, 300, 600, 900 mg de Ca kg^{-1}) avec ajout ou non de 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4, sur le développement de la lentille

Il ressort clairement que l'ajout d'une fertilisation P, K favorise le développement des plants de lentille dès la dose de 300 mg de Ca kg^{-1}.

Lors d'un dernier essai d'une durée de 6 semaines, nous avons testé plusieurs autres légumineuses (fève, haricot, pois et vesce) en retenant trois doses de calcium sous forme de sulfate de calcium (0, 300 et 600 mg Ca kg^{-1} sol sec) et avec l'ajout d'une fertilisation P, K (fertilisation de 0-52-34 NPK, soit 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4 équivalent à 122.5 kg de phosphore et 156,2 kg de potassium à l'hectare), (Photographie 17).



Photographie 17 : Effet de doses croissantes de $CaSO_4$ (0, 300 et 600 mg Ca kg^{-1} + 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4) sur le développement de différentes légumineuses (fève, haricot, pois et vesce)

En considérant d'une part, le port ainsi que la vitesse de développement des plantes et d'autre part, leur aspect (symptômes de carences/toxicité), nous décidons de retenir comme légumineuse la vesce. Il conviendra lors de l'essai en conditions contrôlées, d'apporter un amendement de sulfate de calcium couplé à une fertilisation P, K pour des pots de 20 cm de hauteur (600 mg Ca kg^{-1} + 152,52 mg kg^{-1} de KH_2PO_4).

Chapitre 4b. Développement de l'agromine associant *Alyssum murale* et une légumineuse : une expérimentation réalisée *in situ* sur un sol ultramafique, en Espagne

L'objectif de cette expérimentation est de mettre en place, *in situ*, des parcelles expérimentales afin de tester l'intérêt de l'insertion d'une légumineuse dans des systèmes de culture dédiés à l'agromine. Ainsi, en partenariat avec des agriculteurs locaux, cette expérimentation a été mise en place fin juin 2015, en Espagne, dans une zone caractérisée un sol ultramafique. Après préparation de la parcelle et ajout d'un fertilisant (KH_2PO_4) et de gypse ($CaSO_4$, $2H_2O$), un dispositif en bloc (4 répétitions) a été mis en place sur une surface de 700 m^2. Ce dispositif comprenait à l'origine 7 traitements différents (28 parcelles de 10 m^2) : la rotation (culture de la vesce puis après destruction de celle-ci, mise en place de la culture de *Alyssum murale*), les témoins positifs et négatifs de la rotation (culture de *Alyssum murale* avec apport d'une fertilisation minérale et culture de *Alyssum* seule), la co-culture (culture de la vesce conjointement à la mise en place de la culture de *Alyssum murale)*, les témoins positifs et négatifs de la co-culture (culture de *Alyssum murale* seule avec apport d'une fertilisation minérale et culture de *Alyssum murale,* seule), le témoin sans plante (sol nu).

Nous avons été confrontés à un problème d'inondation d'une partie des parcelles. En effet, le dispositif expérimental était situé sur une zone légèrement en pente, en contrebas de la route. Lors de chaque pluie, l'eau tombée sur la route se déversait et inondait, en particulier, la partie droite du dispositif, faute de drainage.

Nous n'avons pu, pour cette première année, exploiter que les parcelles correspondant aux traitements de la co-culture, ses témoins positifs et négatifs et les parcelles témoin sans plante. Des mesures concernant la fois les variables du sol, liées aux plantes mais aussi à la microflore rhizosphérique ont été réalisées à l'implantation de la culture (juin 2015) puis à la récolte (juin 2016).

R.F. SAAD, A. KOBAISSI, X. GOUX, M. CALUSINSKA, G. ECHEVARRIA, P. KIDD, E. BENIZRI

Developing Ni-agromining by associating *Alyssum murale* with a legume: an *in-situ* experiment on an ultramafic site in Spain

Ces travaux seront soumis dans la revue « Soil Biology & Biochemistry ».

Developing Ni-agromining by associating *Alyssum murale* with a legume: an *in-situ* experiment on an ultramafic site in Spain

Ramez F. Saad [a, b, c], Ahmad Kobaissi [c], Xavier Goux [d], Magdalena Calusinska [d] Guillaume Echevarria [a, b], Petra Kidd [e], Emile Benizri [a, b, *]

[a] Université de Lorraine, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[b] INRA, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[c] Université Libanaise, Laboratoire « Applied Plant Biotechnology », Faculté des Sciences 1, Beyrouth, Lebanon.

[d] Environmental Research and Innovation (ERIN) Department, Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), 4422 Belvaux, Luxembourg.

[e] Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Santiago de Compostela 15706, Spain.

[*]Corresponding author, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33(0)383595848, Fax: +33(0)383595791, emile.benizri@univ-lorraine.fr

Abstract

Agromining aims to rehabilitate contaminated or natural metal-rich soils (ultramafic soils) by extracting metals of high economic importance, such as nickel (Ni), using hyperaccumulator plants and then to recover these metals for industrial purposes. The final objective of agromining is to improve agronomic value of the ultramafic areas for future agricultural uses. Indeed, ultramafic soils are characterized by low fertility levels and this can limit yields of hyperaccumulators and metal phytoextraction. Co-cropping with legumes in traditional agro-systems leads to soil nitrogen enrichment alongside reduced fertilizer and pesticide applications, resulting in lower environmental impacts and economical profits. However, few studies have assessed the potential benefits of these cropping systems on Ni agromining. Here, we characterized the effect of co-cropping two plants, a Ni-hyperaccumulator (*Alyssum murale*) and a legume (*Vicia sativa*) on phytoextraction efficiency. A field experiment with 3 replicates was set up in an ultramafic zone in North West Spain. Four treatments were tested: co-cropping (Co), fertilized mono-culture (FMo), non-fertilized mono-culture (NFMo) and bulk soil (BS). FMo and Co treatments increased biomass yields by 453% and 417% respectively, compared to NFMo. Co treatment reached the highest Ni-yield by an increase of 35% and 493% when compared to FMo and NFMo, respectively. Most of the microbial

analyses showed that introducing *V. sativa* (Co treatment) into the culture system had a beneficial effect on soil microbial comparisons. Biolog EcoPlate™ revealed that Co significantly modified the phenotypic structure of bacterial communities. Bacterial diversity analyzed by high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing showed the highest relative abundance of the phylum *Bacteroidetes*, and lowest *Actinobacteria* in the Co treatment. In addition, non-metric multidimensional scaling analysis based on the operational taxonomic units (OTUs) showed that Co was clearly separated from all other treatments. This study showed that co-cropping a hyperaccumulator with a legume in Ni-agromining systems improves plant biomass and Ni-yields and also enhanced some soil microbial enzymatic activities. Improving agromining by replacing fertilizers combines eco-efficient or sustainable metal recovery with soil fertility/quality improvement.

Keywords: Agromining . Nickel . *Alyssum murale* . Co-cropping . Legumes . Soil fertility . Bacterial diversity

1. Introduction

Commercial nickel (Ni) mining is generally applied on minerals and rocks that have a high Ni content of at least 30 g kg^{-1}. However, few minerals with such a high Ni concentration exist on earth, and many of the existing mines are close to closure due to limited reserves. Ultramafic soils (i.e. serpentine soils) are derived from ultramafic rocks and are known to hold important concentrations of Ni and other metallic trace-elements (MTE) such as copper, chromium, iron, titanium, and cobalt (Chaney *et al.*, 2008). In these soils, Ni is generally present at concentrations ranging between 1.0 and 7.0 g kg^{-1}, which is well below the cut-off Ni concentration required for ores in modern mining technologies (Nicks and Chambers 1995). Serpentine soils are also categorized by having a high Mg content and are deficient in most important nutrients such as nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K) and calcium (Ca) (Boyd and Jaffré, 2009). These traits make ultramafic soils usually inappropriate for healthy and productive agricultural production (Bani *et al.*, 2007; Tumi *et al.*, 2012). If well managed, serpentine zones could provide multiple ecosystem services especially since they are widespread throughout the world. In California and Oregon, there are more than 400 000 ha of serpentine soils (Alexander, 1994) and 100 000 ha in Albania (Zdruli, 1997) and 150 000 ha in Indonesia (van der Ent *et al.*, 2013). These areas could also assure the production of renewable raw resources and renewable energy (Ali *et al.*, 2013).

Phytomining is a concept that appeared in the 90s (Chaney *et al.*, 2007) with the objective to extract MTE from metal-rich soil with exceptional plants, named hyperaccumulators, that can absorb these elements and transfer them to their aerial parts where they are accumulated (Chaney *et al.*, 2008). The aerial parts (i.e. shoots) could be collected as a "bio-ore" concentrated with target metals such as Ni (> 1% of the dry biomass). *A. murale* (Waldst & Kit.) is a Ni-hyperaccumulator plant that has received most of the attention due to its extraordinary ability to extract and accumulate Ni from soils in its tissues. This hyperaccumulator plant, widely present in ultramafic zones from the Eastern Mediterranean, is able to colonize serpentine soils and accumulate Ni up to more than 2% of its dry weight (Abou-Shanab *et al.*, 2003).

Over the past decade, several studies have highlighted the need to optimize the process of phytoextraction of metals using classical crops management methods in order to increase plant biomass and therefore metal extraction. After the addition of the mineral NPK amendments, herbicide application and irrigation management, crop yields could reach at least 20 tons of dry biomass per hectare (400 kg Ni ha^{-1}) (Chaney *et al.*, 2007). Also, the biomass yields of *A. murale* in Albania were optimized by adding lower quantities of fertilizer (NPK) – N fertilization (120 kg N ha^{-1}) and 100 kg P, K ha^{-1} – than those added by Chaney *et al.* (2007), giving the following results (Bani *et al.*, 2015a): 9.0 tons of dry biomass per ha (105 kg Ni ha^{-1}).

The use of organic amendments remains to be tested on the efficiency of phytomining crops. Indeed, organic residues (such as compost or manure) are characterized by important concentrations of essential nutrients for plant growth and development (i.e. N, P, K). As a classical amendment, the incorporation of organic residues (such as compost or manure) to soils should improve soil fertility as well as physical properties such as water infiltration and water retention capacity. They also reduce the apparent soil bulk density (Vangronsveld *et al.*, 2009). In addition, manure can increase metal mobility due to their high content of soluble and reactive organic matter which can complex the metals and facilitate their movement through the soil (Tandy *et al.*, 2009).

Agromining, which is a non-destructive method, aims at recovering metals with high economic value (e.g. Ni) from cultivated hyperaccumulator plants, and to recycle it in the industry (van der Ent *et al.*, 2013; van der Ent *et al.*, 2015). It has the potential to rehabilitate natural metal-rich soils for future agricultural uses. Creating new ecological and environment-friendly agro-systems is one of the most important objectives of agromining while keeping in mind the reduction of fertilization and pest-control applications. Therefore, designing new

agromining culture systems in which legumes are associated with hyperaccumulator plants could lead to improvements in the phytoextraction process and also N enrichment of ultramafic soils. Such improved agromining systems could result in higher yields and a reduction in fertilizer inputs compared to levels which were required to enhance phytoextraction in recent studies (Chaney *et al.*, 2008; Bani *et al.*, 2015a, 2015b). Finally, reducing fertilizer inputs and obtaining better biomass yields could result in lower environmental impacts and better economic performance (Scalise *et al.*, 2015; St. Luce *et al.*, 2015).

In a recent study, Saad *et al.* (2016) have shown that lentil (*Lens culinaris*) can grow successfully on a soil artificially contaminated with a gradient of Ni concentrations (10-90 mg Ni kg^{-1}). The legumes were able to form functional nodules and fix atmospheric N in soils with up to 60 mg kg^{-1} Ni. Based on these results, the objectives of the present work were to test under real conditions (*in situ*) and over a complete plant growth cycle, if the association of a hyperaccumulator plant (*A. murale*) and a Fabaceae (*Vicia sativa* var. Prontivesa) could lead to efficient agromining practices through amelioration of biomass production, metal remediation and soil quality improvement.

2. Materials and methods

2.1. Experimental site

A field experiment was carried out for 12 months near the village of Eidián, Pontevedra (Galicia, North-West Spain; N 42°49’55,08’’ W 8°00’14,60’’). In the past, the area was one of important agricultural activity but has since then been abandoned and colonized by a typical vegetation of the serpentine soils in the region such as *Erica scoparia*. The current vegetation was removed and the plot was cleared in spring 2015.

2.2. Soil characteristics and experimental design

Soil physico-chemical properties were determined by the Soil Analysis Laboratory of INRA (Arras, France). The soil contained 17.5, 30.6 and 51.9%, clay, silt and sand, respectively, had a C/N ratio of 13.9, an Mg/Ca ratio of 2.79 and available phosphorus content (Olsen P) of 23 mg kg^{-1}. Soil pH was 5.76 and the total Ni content was 861 mg Ni kg^{-1}. In order to improve the Mg/Ca ratio and adjust the P, K content, the soil was amended with gypsum at the rate of 4.5 tons of gypsum per hectare and a fertilization of KH_2PO_4 (0-52-34 NPK) equivalent to an amendment of 122.5 kg P ha^{-1} and 156.2 kg K ha^{-1}. Fertilizers were

mixed within the first 10 cm of the topsoil by a tractor. The gypsum was provided by Luis Pérez Ulecia, S.L. The legume seeds (*V. sativa* var. Prontivesa) were provided by Semillas Batlle (http://www.semillasbatlle.es, Spain) and the seeds of *A. murale* from a Greek population were collected near Trigona (39°47'17,5"N, 21°25'19,1"E, Greece) on August 2014. Legumes seeds were sown at the rate of 30 g per 10 m^2 and *A. murale* had a density of 12 plants per plot (equivalent to 4 plants per m^2).

An experimental design with three replicates of the following treatments was put in place: the co-cropping treatment named "Co" (cropping the legume at the same time with *A. murale*), the fertilized mono-cropping treatment named "FMo" (mono-cropping *A. murale* with two 60-kg N ha^{-1} repeated fertilization inputs, in the form of ammonium nitrate), and the non-fertilized mono-cropping treatment "NFMo" (cropping *A. murale* without fertilization), the control treatment without plants or fertilization ("BS" as bulk soil). The plots measured 3 m^2 each (1.5 x 2 m) and a space of 50 cm was left between them. A plastic film was vertically buried 50 cm deep to delimit the fertilized plots and prevent horizontal N losses through sub-surface run-off and contamination of adjacent plots. In addition, a ditch was dug in the upper part of the field in order to channel out excess rain from upslope. The experiment was put in place in June 2015 after plowing and clearing of the field and after adding amendments (KH_2PO_4 and gypsum). Seeds of *A. murale* were sown on germination plates containing soil collected from the same field (sieved at 8 mm) in June 2015 (with addition of KH_2PO_4 and gypsum). The plates were put in the greenhouse for 14 weeks before transplanting the seedlings to the field on September 2015. The legume was sown on September 2015 for the co-cropping. After 4 months of culture, *V. sativa* shoots were harvested. The aerial parts of the legume were dried and then crushed before being incorporated in the topsoil. Nitrogen fertilization was applied twice at the rate of 60 kg N ha^{-1} for the treatment "FMo" (on March and April 2016) as ammonium nitrate powder dissolved in water each time. The first addition was brought one month after sowing the seeds of *A. murale*.

2.3. Plant analyses

After 12 months of culture and at an early stage of flowering, plant roots and shoots of *A. murale* were collected and separated. Fresh roots were carefully washed with deionized water. Then, roots and shoots parts were oven-dried at 70°C for 72 h and dry weights recorded. Subsamples (0.5 g) of dry and ground plant tissue were acid-digested at 95°C in 2.5 ml of concentrated HNO_3 and 5 ml of H_2O_2 (30 %). The final solutions were filtered (0.45 µm DigiFILTER, SCP science, Canada) and completed up to 25 ml with deionized water. Ni

concentration in the solution was measured with an Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES, Liberty II, Varian). The total C and N in the plant parts were analyzed by combustion at 900°C with a CHNS analyzer (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH).

2.4. Soil analyses

2.4.1. Soil physico-chemical analyses

At harvest, 200 g of fresh soil from each plot were collected and sieved (5 mm), and stored at 4°C before been brought to France for analysis. Half of the fresh soils were dried at 40°C for the physico-chemical analyses and the other half was kept at 4°C for the microbial analyses.

Soil moisture was determined by heating subsamples to 105°C until a constant weight was achieved. Subsamples (0.5 g) of dry soil were acid-digested in 2 ml of concentrated HNO_3 and 6 ml of concentrated HCl for quantification of major and trace elements. The final solutions were filtered (0.45 µm) and completed up to 50 ml with deionized water. [Ni] in the solution was measured with an ICP-AES. Available Ni in soil samples was extracted with a DTPA–TEA solution (0.005 M Diethylene Triamine Pentaacetic Acid, DTPA, 0.01 M $CaCl_2$, 0.1 M triethanolamine, pH 7.3) according to Lindsay and Norvell (1978) and the [Ni] in solutions was measured with an ICP-AES. The CEC and exchangeable cations were measured according to international ISO standard 23470. Soil pH was measured using a pH meter in a soil–water suspension (soil:water ratio = 1:5, v:v). Total and organic C and N were quantified with a CHNS analyzer. Soluble C and N were determined on 5 g of dried soil extracted with 25 ml of $CaCl_2$ (1mM) by agitation at 5 rpm for 24 h. The mixture was then filtered (0.45 µm Whatman nylon filter) and soluble C and N were then analyzed with a TOC analyzer (TOC-VSCN equipment, Shimadzu, Kyoto, Japan). Nitrate and ammonium ions were quantified in 15 g of fresh soil mixed to 75 ml of 0.016 M KH_2PO_4 and stirred for 30 minutes at 17 rpm. The soil suspension was then centrifuged (20 min at 5800 g) and filtered (0.45µm) before analysis by Ion Chromatography (Dionex 1500i with an AS 4 ASC column; Sunnyvale, USA).

2.4.2. Soil microbial analyses

2.4.2.1. Microbial biomasses and enzymatic activities

In order to determine the microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN) in the soil, 10 g of fresh soil were chloroform fumigated for 24 hours at 25°C. Extraction of fumigated and non-fumigated samples was shaking the samples in 40 ml of K_2SO_4 (0.5 M) for 45 minutes at 17 rpm. Solutions were then filtered (Whatman 42) and analyzed with a TOC Analyzer. Calculations were done with a conversion coefficient K of 0.45 and 0.54 for MBC and MBN, respectively (Jenkinson and Ladd, 1981; Brookes *et al.*, 1985). Urease activity was measured according to the method of Tabatabai and Bremner (1972). Arylsulfatase, β-glucosidase and alkaline phosphatase activities were determined using 5 mM pNP-sulfate, 5 mM pNP-β-D-glucopyranoside and 5 mM pNP-phosphate, respectively (Sigma-Aldrich, France) according to the modified protocol of Dick (2013). Substrates of arylsulfatase and β-glucosidase were prepared in sodium acetate buffer (0.5 M, pH 5.8). Substrate of alkaline phosphatase was prepared in Tris HCl buffer (0.1 M, pH 8). Four grams of fresh soil were incubated with 0.5 ml of toluene for 10 minutes before adding 50 ml of distilled water. The mixture was then homogenized with a polytron for 25 seconds. Four hundred µl were immediately sampled and put in a 2 ml microtube and then 1 ml of the adequate substrate was added. Samples were incubated at 37°C for 2 h. The reaction was stopped by adding 250 µl of a NaOH concentrated solution (1M). Blanks were prepared by adding the substrate after the NaOH addition. Microtubes were then centrifuged for 2 minutes at 13 000 g and 200 µl were transferred on a microplate in order to read absorbance at 400 nm using a microplate reader (Biotek Instruments, Synergy HT). To calculate the enzymatic activities, reads were compared to a p-Nitrophenol standard curve. Fluorescein diacetate activity (FDA) was measured according to the method described by Adam and Duncan (2001). Microbial ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) activity in the soil was measured according to Honma and Shimomura (1978).

2.4.2.2. Community-level physiological profiling

Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA) analyses were used to assess community-level physiological profiling. Briefly, 3 g of each fresh subsample were homogenized in 30 ml of saline phosphate buffer (PBS: KH_2PO_4 1.54 mM, NaCl 155.17 mM and $Na_2HPO_4.7H_2O$ 2.7 mM, pH 7.2) and shaken 30 min at 17 rpm. After the agitation and under a hood, one ml of the suspension was 100-fold diluted in sterile PBS buffer (serial

dilution). Plates were inoculated with 150 µl per well of the 10^{-2} soil dilution and incubated at 25ºC in the dark for 5 days. Thereafter, the color development was automatically recorded at 590 nm using a microplate reader. Average well color development (AWCD) was calculated as described by Garland and Mills (1991). The final values of each well were used to calculate Sum index, Shannon's diversity index (H index), substrate richness (R) and substrate evenness (E) .

2.4.2.3. Microbial diversity by High‑throughput 16S rRNA amplicon sequencing

At harvest, genomic DNA extractions from soil samples were performed using the FastDNA™ SPIN kit for Soil (MP Biomedicals™, France) in accordance with the manufacturer's protocol. Concentrations of DNA solutions were first measured with spectrophotometer (SmartSpec Plus spectrophotometer, BIO-RAD) and then adjusted to 1.66 ng μl^{-1} with sterile ultra-pure water using a robot (epMotion P5073, Eppendorf) in 96 well microplates (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction plate). The 16S rRNA gene libraries were constructed with a modified primer pair SD-Bact-0909-aS-18 (5'-ACTCAAAKGAATWGACGG-3') and S-*-Univ-1392-a-A-15 (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') targeting a fragment of 484 bp of the bacterial V6–V8 region (Klindworth *et al.*, 2013). Amplicons were generated using the Q5 DNA Polymerase (High-Fidelity Hot Start, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), then purified with the AMpure magnetic beads (Agencourt, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) and further quantified with the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The concentration of the amplicons was re-adjusted to 1.66 ng μL^{-1} with sterile ultra-pure water using the robot. Nextera XT® barcodes and the Illumina adapters necessary for hybridization to the flow cell were added with the Nextera XT Index kit during a second PCR (Nextera XT Index Kit v2 Set A and Nextera XT Index Kit v2 Set B, Illumina Inc., San Diego, USA). The resulting amplicons were purified with the AMpure magnetic beads (Agencourt). The final concentration of the library pool was determined with a KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA). Libraries were mixed with Illumina-generated PhiX control libraries (5 %) and sequenced with the MiSeq Reagent Kit V3-600 cycles (Illumina Inc., San Diego, USA). The obtained sequence reads were de-multiplexed, quality trimmed and assigned to OTUs at 97 % similarity with Usearch (v7.0.1090_win64) pipeline (Edgar, 2010). Taxonomy affiliation was done with the SILVA database (Silva.nr_v123, https://www.arb-silva.de/). The final nucleotide sequences obtained were deposited in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) under accession

number XXXX. Alpha and Beta diversities were studied using the software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version 1.8.0). Relative abundances were calculated and Heatmaps were generated using XLSTAT software (XLSTAT version Ecology 18.07, http://www.xlstat.com).

2.5. Statistical analyses

Variance analysis was carried out on all data with a one-way ANOVA (Duncan test with confidence interval of 95%). Normality tests and k-sample comparison of variances were also analyzed. Furthermore, data obtained from Biolog Ecoplate^{TM} study was submitted to a Principal Component Analysis (PCA). These statistical analyses were carried out on XLSTAT software (XLSTAT version Ecology 18.07, http://www.xlstat.com). For all tests, differences were considered statistically significant if below p-value < 0.05.

3. Results

3.1. Plant biomass, Ni yields and C, N contents

Shoot biomass of *A. murale* from the treatments of “FMo” and “Co” was significantly enhanced (by 452% and 416%) compared to “NFMo” (i.e. 22.1, 20.7 and 4 g plant^{-1} for “FMo”, “Co” and “NFMo”) (Figure 26). “Co” cropping system had the highest shoot Ni content in comparison to “FMo” and “NFMo” (corresponding to 195.8, 145.3 and 33.1 mg Ni plant^{-1}). In addition, “Co” showed a 35% increase in shoot Ni content in comparison to “FMo” and 491% in comparison to “NFMo”. The same tendencies were observed for root biomass and root Ni content but without any significant difference between treatments. Both the “FMo” and “Co” cropping systems had the greatest shoot C contents, with no significant differences between the two systems. Shoot C and N contents of “FMo” and “Co” treatments were significantly higher than for “NFMo” treatment (7.91, 7.3 and 1.54 g C plant^{-1} and 0.53, 0.49 and 0.08 g N plant^{-1} for “FMo”, “Co” and “NFMo”, respectively). Roots of *A. murale* in the “Co” cropping system showed the highest C and N contents but these were not significantly higher than other treatments. Conversely, root N content of “Co” and “FMo” were significantly greater than “NFMo” (53.6, 48.7 and 19.1 mg N plant^{-1} for “Co”, “FMo” and “NFMo”, respectively).

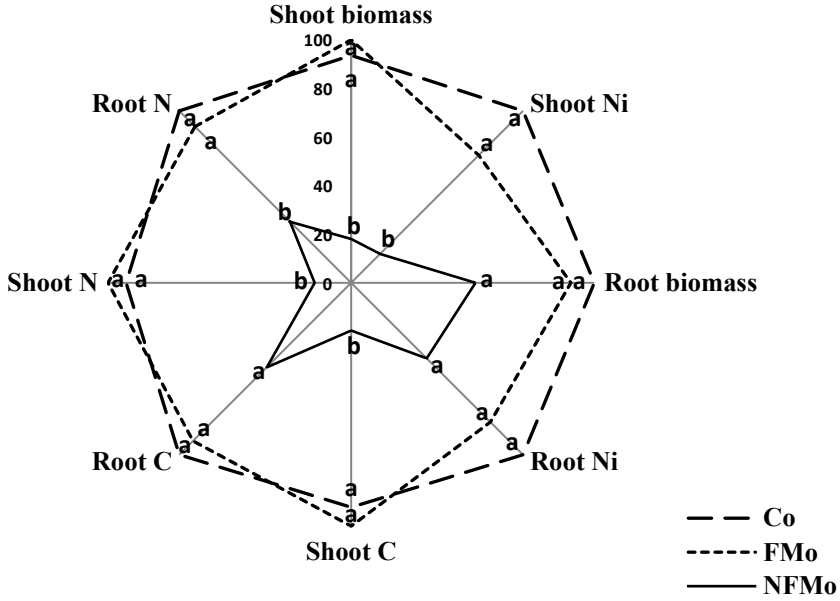


Figure 26 : Sunray plot of plant parameters percentages. A value of 100% corresponds to the highest value for each variable. "Co", "FMo" and "NFMo" correspond to co-cropping, fertilized monoculture and non-fertilized–monoculture cultural systems, respectively. N, C and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively. Lower values are calculated by the following formula "Lower value / highest value x 100". Means for a same plant parameter followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)

The potential dry biomass and Ni yields (kg ha^{-1}) were calculated based on the density of 4 *A. murale* plants per m^2 (40 000 plants per hectare) (Figure 27). Maximum biomass yield was found in the case of "FMo" (884 kg ha^{-1}) followed by "Co" (827 kg ha^{-1}), and both were significantly higher than that of "NFMo" (160 kg ha^{-1}). Ni yields were the greatest for "Co cropping system compared to other treatments (i.e. 7.83 kg Ni ha^{-1}). In addition, Ni yield of "Co" cropping system was significantly higher than that of "NFMo" (i.e. 1.32 kg Ni ha^{-1}). Finally, "FMo" treatment had an intermediate position between the other treatments with a Ni yield of 5.81 kg Ni ha^{-1}.

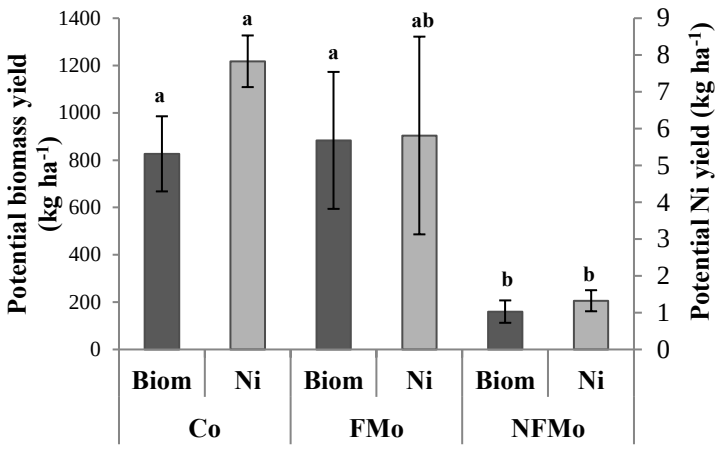


Figure 27 : Potential biomass and Ni yield of the shoots (kg ha^{-1}). "Co", "FMo" and "NFMo" correspond to co-cropping, fertilized monoculture and non-fertilized–monoculture cropping systems, respectively. Means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)

3.2. Soil physico-chemical analyses

Soil physico-chemical characteristics are presented in Table 9. The "Co": treatment had the most elevated soil pH in comparison to other treatments and was significantly different from the "BS". The CEC of "Co" and "NFMo" treatments were significantly higher compared to "FMo" and "BS". Soil conductivity and exchangeable Ni concentration did not differ significantly between treatments. However, "FMo" presented the highest EC and exchangeable Ni was higher in "Co". The lowest percentage of DTPA-extractable Ni to pseudo-total Ni concentrations was observed for "Co". Soil total C and N and C/N ratio were highest for "BS" and "Co" in comparison with "FMo" and "NFMo". Although the "FMo" culture system had the lowest soil total C and N concentrations and C/N ratio in comparison to other treatments. Soil organic matter was significantly reduced in "FMo" compared to other treatments. In addition, "FMo" had the lowest soil organic N in comparison to other treatments. Soil soluble C did not differ between treatments. However, soil soluble N was highest in "Co" and lowest in "FMo". Ammonium concentration in the soil was not different between treatments. No significant differences were observed between the treatments for soil nitrate concentrations although the highest concentration was recorded in the "Co" treatment.

Table 9 : Physico-chemical soil characteristics at the harvest. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" correspond to co-cropping, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. N, C and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil physicochemical analysis) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)

Soil physicochemical analyses	Co		FMo		NFMo		BS	
pH	6.17 ±0.04	a	6.02 ±0.01	ab	6.12 ±0.01	a	5.71 ±0.21	b
CEC (cmol$^+$ kg^{-1})	12.75 ±0.24	a	9.49 ±0.63	b	12.47 ±0.57	a	9.49 ±0.96	b
Conductivity (µS cm^{-1})	56.10 ±1.50	a	63.47 ±6.25	a	52.57 ±3.30	a	54.10 ±4.55	a
Exchangeable [Ni] (mg kg^{-1})	1.07 ±0.03	a	1.02 ±0.12	a	1.03 ±0.05	a	0.91 ±0.11	a
Pseudo-total [Ni] (mg kg^{-1})	732.77 ±12.94	a	557.32 ±36.74	bc	636.40 ±24.13	b	532.48 ±21.82	c
DTPA-Ni (mg kg^{-1})	35.02 ±0.57	a	28.26 ±3.26	b	32.83 ±1.49	ab	26.60 ±0.63	b
DTPA-Ni/pseudo-total Ni (%)	4.78 ±0.13	a	5.12 ±0.68	a	5.16 ±0.11	a	5.02 ±0.30	a
Soil total C (g kg^{-1})	31.89 ±1.82	a	23.87 ±1.73	b	28.00 ±4.28	ab	34.88 ±1.23	a
Soil total N (g kg^{-1})	2.61 ±0.10	a	2.03 ±0.10	b	2.26 ±0.29	ab	2.75 ±0.04	a
C/N ratio	12.22 ±0.16	ab	11.76 ±0.22	b	12.35 ±0.14	ab	12.69 ±0.22	a
Organic Matter (g kg^{-1})	54.21 ±3.06	a	39.42 ±2.54	b	50.23 ±2.34	a	56.99 ±2.33	a
Organic N (g kg^{-1})	3.08 ±0.18	a	2.27 ±0.16	b	2.65 ±0.10	ab	2.98 ±0.08	a
Soluble C (mg kg^{-1})	25.69 ±2.20	a	23.93 ±0.76	a	25.56 ±1.40	a	23.21 ±1.21	a
Soluble N (mg kg^{-1})	2.61 ±0.24	a	0.85 ±0.02	b	1.84 ±0.14	a	2.22 ±0.40	a
[NH_4^+] (mg kg^{-1})	0.14 ±0.04	a	0.14 ±0.04	a	0.19 ±0.06	a	0.30 ±0.16	a
[NO_3^-] (mg kg^{-1})	18.85 ±3.32	a	15.74 ±1.35	a	6.81 ±0.23	a	16.66 ±6.15	a

3.3. Microbial biomass, enzymatic activities and community-level physiological profiling

Soil microbial biomass and enzymatic activities were measured at harvest (Table 10). Soil microbial biomass carbon (MBC) was not statistically different amongst the treatments, but the lowest values were recorded for "FMo". Soil microbial biomass nitrogen (MBN) was higher in the cultivated soils ("Co" and "NFMo") and "BS" than in "FMo". Regarding soil microbial activities, FDA activity was highest in "BS" and significantly lower in all other treatments. No significant differences were found for ACC deaminase and arylsulfatase activities. The "Co" treatment had the most elevated soil urease activity amongst the treatments and was significantly higher than "FMo". No significant differences were detected between the treatments for β-glucosidase and phosphatase activities.

Table 10 : Microbial biomasses and enzymatic activities in the soil at the harvest. “Co”, “FMo”, “NFMo” and “BS” correspond to co-cropping, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil microbial analysis) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan’s multiple range test), (n = 3)

Soil microbial analyses	Co			FMo			NFMo			BS		
MBC (mg C kg^{-1})	758.51	±97.47	a	697.02	±66.78	a	936.69	±123.82	a	781.18	±18.34	a
MBN (mg N kg^{-1})	58.76	±3.73	a	29.42	±2.64	b	54.14	±4.83	a	53.35	±0.35	a
FDA activity (µg g h^{-1})	37.15	±2.68	ab	35.68	±1.46	b	37.74	±2.38	ab	45.51	±0.71	a
ACCd activity (nmol g h^{-1})	78.67	±16.65	a	77.90	±15.28	a	82.61	±24.34	a	127.91	±28.81	a
Arylsulfatase activity (µg g h^{-1})	69.97	±8.08	a	50.96	±4.37	a	71.61	±6.57	a	73.62	±11.40	a
Urease activity (µg g h^{-1})	4.51	±1.60	a	0.82	±0.17	b	3.59	±0.53	ab	3.56	±0.81	ab
β-glucosidase activity (µg g h^{-1})	103.52	±17.98	a	120.49	±12.27	a	112.13	±6.50	a	110.88	±5.73	a
Phosphatase activity (µg g h^{-1})	276.17	±28.90	a	286.10	±18.04	a	289.78	±18.68	a	278.22	±17.56	a

The community level physiological profiling of the soil bacterial communities was studied at harvest. Measured indices are represented in Table 11. “BS” had consistently lowest Sum index for the bacterial communities. H index did not differ between the treatments. “FMo” and “Co” treatments showed significantly greater microbial community substrate richness compared to “BS”. Substrate evenness (E) and AWCD did not vary between the bacterial communities of all treatments despite the higher numerical value for “Co”.

Table 11 : Community-level physiological profiling. “Co”, “FMo”, “NFMo” and “BS” correspond to co-cropping, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. Means ± standard error in a line (for each index) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan’s multiple range test), (n = 3)

Biolog Ecoplate indices	Co			FMo			NFMo			BS		
Sum index	27.33	±0.88	a	28.33	±0.67	a	26.00	±1.00	ab	24.67	±0.33	b
H index	4.09	±0.19	a	4.31	±0.05	a	4.17	±0.07	a	4.15	±0.05	a
Substrate richness (R)	88.17	±2.84	a	91.40	±2.15	a	83.87	±3.23	ab	79.57	±1.08	b
Substrate evenness (E)	0.86	±0.04	a	0.89	±0.01	a	0.89	±0.01	a	0.90	±0.02	a
AWCD	1.48	±0.08	a	1.35	±0.05	a	1.34	±0.08	a	1.21	±0.14	a

Results presented in Figure 28 were obtained by submitting the normalized plates to Principal Component Analysis (PCA). Axis 1 explained 24.3 % of the total variability and strongly discriminated the bacterial community of the “Co” cropping system from the other systems (Figure 28a). The “Co” treatment was significantly different from “BS”. The bacterial community of “NFMo” showed an intermediate position between “FMo” and “BS’”. This separation is the result of a more important oxidation of some carbohydrates (B2: D-Xylose, C2: i-Erythritol, H1: α-D-Lactose, G1: D-Cellobiose) by microbes from “Co” soil,

while there was no specific selection of substrates for “BS” where no plants were present during the entire experiment (Figure 28b).

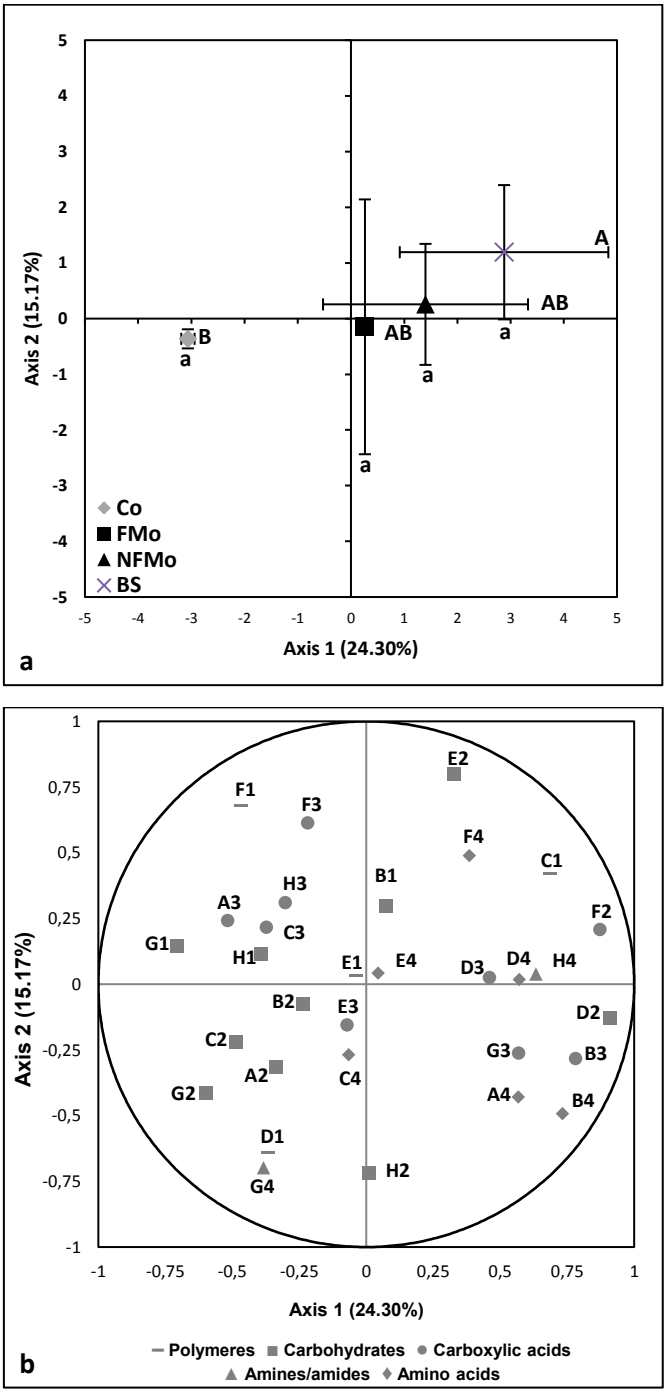


Figure 28 : Principal Component Analysis (PCA) generated from Biolog EcoPlate profiles (31 substrates) after 5 days of incubation. (a) Points represent the coordinate means of different treatments (“Co”, “FMo”, “NFMo” and “BS” refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively) and standard deviation of three replicate samples. Means with different letters have significantly different scores at $p < 0.05$ (Duncan’s multiple range test), (n = 3). (b) Biolog Ecoplate substrates involved in the discrimination of samples

3.4. High-throughput 16S rRNA amplicon sequencing results

3.4.1. Alpha diversity

Alpha diversity for the soil samples was studied using Shannon index, equitability, Chao1 and Simpson evenness (Table 12). Shannon index was not significantly different for all the treatments. The equitability was higher for "Co" and "FMo" indicating that the bacterial community tended to be more homogeneous for these two treatments in terms of different OTU proportions. The oppos ite was found for Chao1, where "Co" and "FMo" treatments had lower Chao1 indices than "NFMo" and "BS" treatments. Except for "NFMo", the Simpson evenness index was significantly lower for "BS".

Table 12 : Alpha diversity indices. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" correspond to co-cropping, fertilizedmonoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bulk soil, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil index) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)

Alpha diversity indices	Co		FMo		NFMo		BS	
Shannon index	10.23±0.04	a	10.23±0.04	a	10.38±0.05	a	10.20±0.15	a
Equitability	0.84±0.01	a	0.84±0.01	a	0.81±0.01	b	0.80±0.01	b
Chao1	5993.57±351	b	6044.90±270	b	8064.48±592	a	7672.10±219	a
Simpson evenness	0.10±0.01	a	0.10±0.01	a	0.07±0.01	ab	0.06±0.01	b

3.4.2. Bacterial diversity at phyla and subphyla level

Bacterial relative abundance at the phyla and subphyla level is represented in the Figure 29. A total of 10 793 OTUs were found for all the treatments and were affiliated with 15 different phyla and subphyla ("*Other*" phylum regroups all the phyla with a relative abundance <1%). *Proteobacteria* phylum which regroups the subphyla of *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *δ-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria* and other classes is the most well represented amongst all the treatments with relative abundances of 38.74, 37.76, 48.14 and 36.29% for "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" treatments, respectively. In addition, the highest relative abundance of the *β-Proteobacteria* subphylum was found in the "Co" treatment (13.93%) compared to other treatments (13.68, 12.87 and 11.92% for "FMo", "NFMo" and "BS", respectively). Similarly, the "Co" treatment had the highest relative abundance of *Acidobacteria* (14.60%), *Armatimonadetes* (1.54%) and *Bacteroidetes* (8.27%) in comparison to other treatments. In contrast, "Co" showed a lower relative abundance of *Actinobacteria* (12.35%), *Chloroflexi* (6.77%) and *Gemmatimonadetes* (5.56%) compared to other treatments. The "BS" treatment, where no plant was present during the experiment, showed the lowest relative abundance of 9 phyla out of 15. On the other hand, the relative abundances

of *Actinobacteria* and *α-Proteobacteria* were highest in this soil (17.88% and 12.85%, respectively). Concerning "FMo", this treatment showed the highest relative abundance of *Chlorofexi* (8.42%) and *Nitrospirae* (2.15%) and the lowest relative abundance of *Bacteriodetes* and *Planctomycetes* (4.87 and 3.42%, respectively). The "NFMo" treatment had the highest relative abundance of *Gemmatimonadetes* (6.11%), *Planctomycetes* (4.27%), *δ-Proteobacteria* (6.13%), and *γ-Proteobacteria* (7.72%). However, this treatment showed the lowest relative abundance of *α-Proteobacteria* (11.19%) amongst all four treatments.

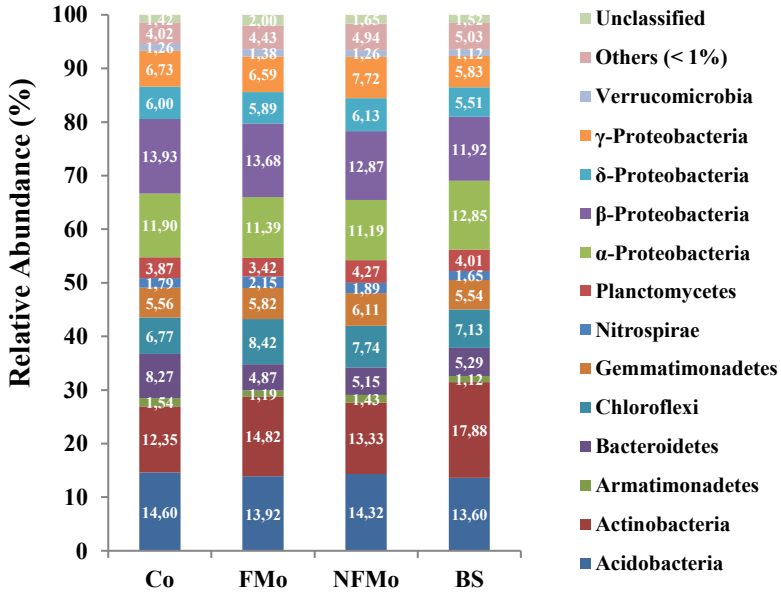


Figure 29 : Relative abundance of bacterial phyla identified in all samples (%). "Others" refer to *Candidate_division_OP3, Candidate_division_WS6, Chlamydiae, Chlorobi, Cloacimonetes, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, GOUTA4, Gracilibacteria, Hydrogenedentes, Kazan-3B-09 Latescibacteria, Lentisphaerae, Microgenomates, Omnitrophica, Parcubacteria, PAUC34f, Saccharibacteria, SHA-109, SM2F11, Spirochaetae, TA06, Thermotogae, TM6, WCHB1-60, WD272, ε-Proteobacteria* and *TA18*. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively

3.4.3. Bacterial diversity at family level

Bacterial phyla with relative abundances higher than 10% were selected for further analyses: these were *β-Proteobacteria*, *α-Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Acidobacteria*. Relative abundances at family level were studied and in order to evaluate the influence of some plant and soil parameters defined earlier (Figure 26, Table 9 and 10) on the microbial communities present in each soil, linear spearman correlations at $p < 0.1$ were calculated and represented using heatmaps. In these Heatmaps (Figure 30) only the significant coefficients of

correlation (R) are presented. It is clear that the plant parameters were positively and negatively correlated at the same time with two groups of bacterial families within each phylum (except *Acidobacteria* phylum). This tendency was not found regarding the correlations between soil parameters and bacterial families. However, for almost all the phyla, relative abundances of many bacterial families were positively correlated at the same time with the plant parameters and soil microbial and physico-chemical parameters. Within the phylum of *β-Proteobacteria*, *Burkholderiaceae* family was positively correlated to all plant parameters ($R \geq 0.650$) (except nitrogen content in shoots and roots), as well as to microbial ACCd activity ($R = 0.643$), soil total C ($R = 0.573$) and nitrogen ($R = 0.547$), soil organic matter ($R = 0.601$) and organic nitrogen ($R = 0.517$). As for *α-Proteobacteria*, *Bradyrhizobiaceae* family was positively correlated to shoot biomass ($R = 0.617$), shoot C content ($R = 0.633$), root Ni content ($R = 0.633$), microbial ACCd ($R = 0.699$) and FDA ($R = 0.531$) activities, soil total C ($R = 0.580$) and nitrogen ($R = 0.564$) and soil organic matter ($R = 0.587$). Regarding, *Actinobacteria* phylum, the bacterial families *YNPFFP1*, *Acidothermaceae*, *Sporichthyaceae* were always positively correlated to some plant and soil parameters. Concerning the *Acidobacteria* phylum, it is important to note that the family *Acidobacteriaceae_(Subgroup_1)* was positively correlated to root nitrogen content ($R = 0.667$). Soil parameters related to soil fertility such as total, organic and soluble C and N, soil pH, microbial biomass and enzymatic activities, which are related to soil nutrient cycling were positively correlated to 29 bacterial families within all the studied phyla.

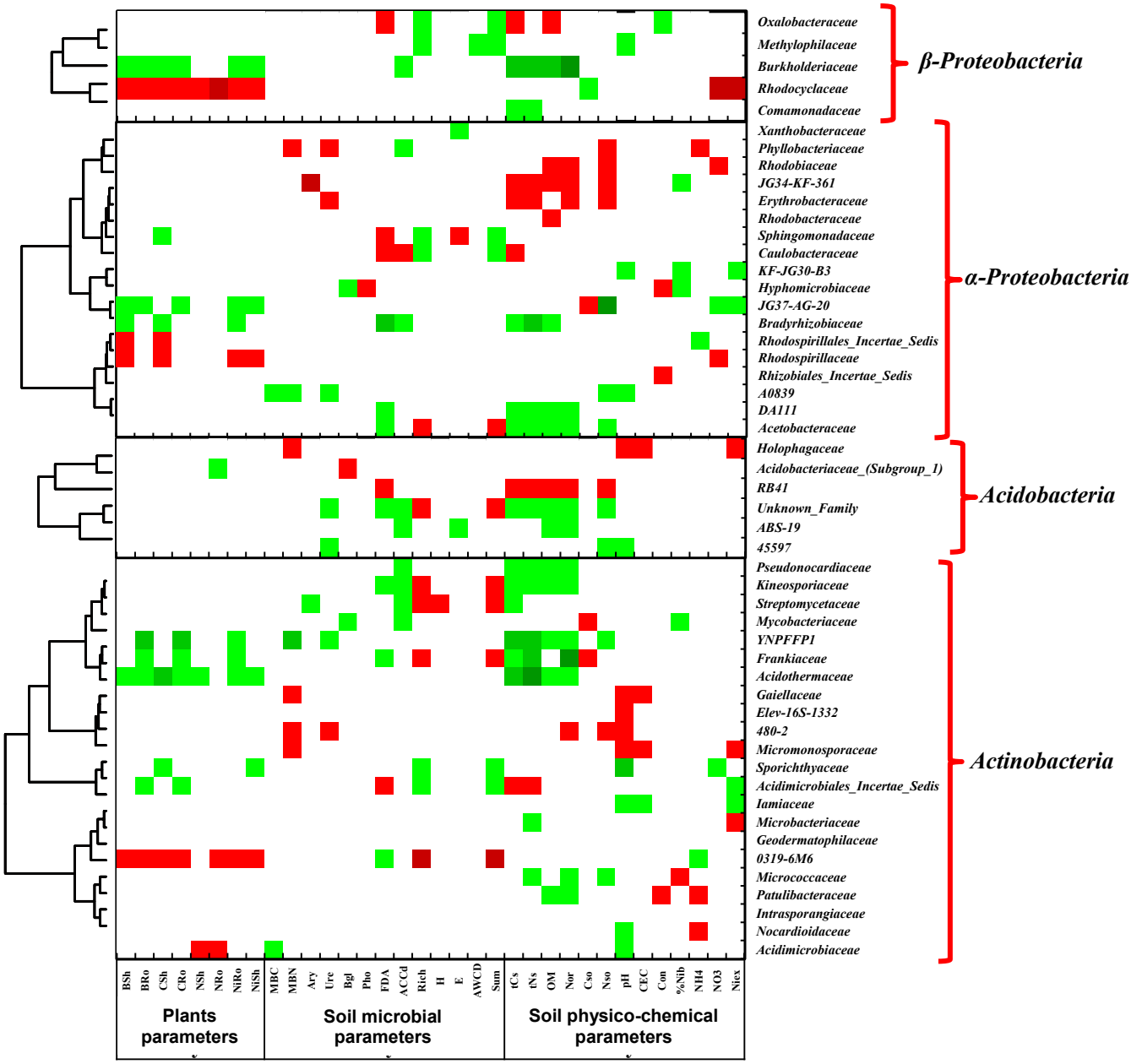
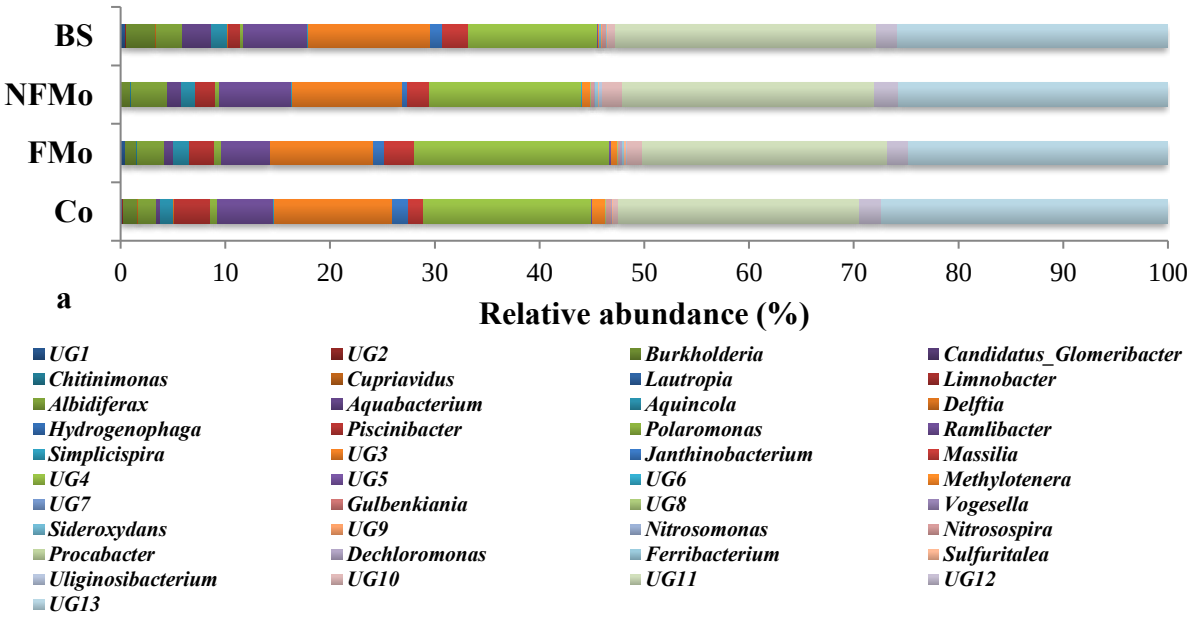
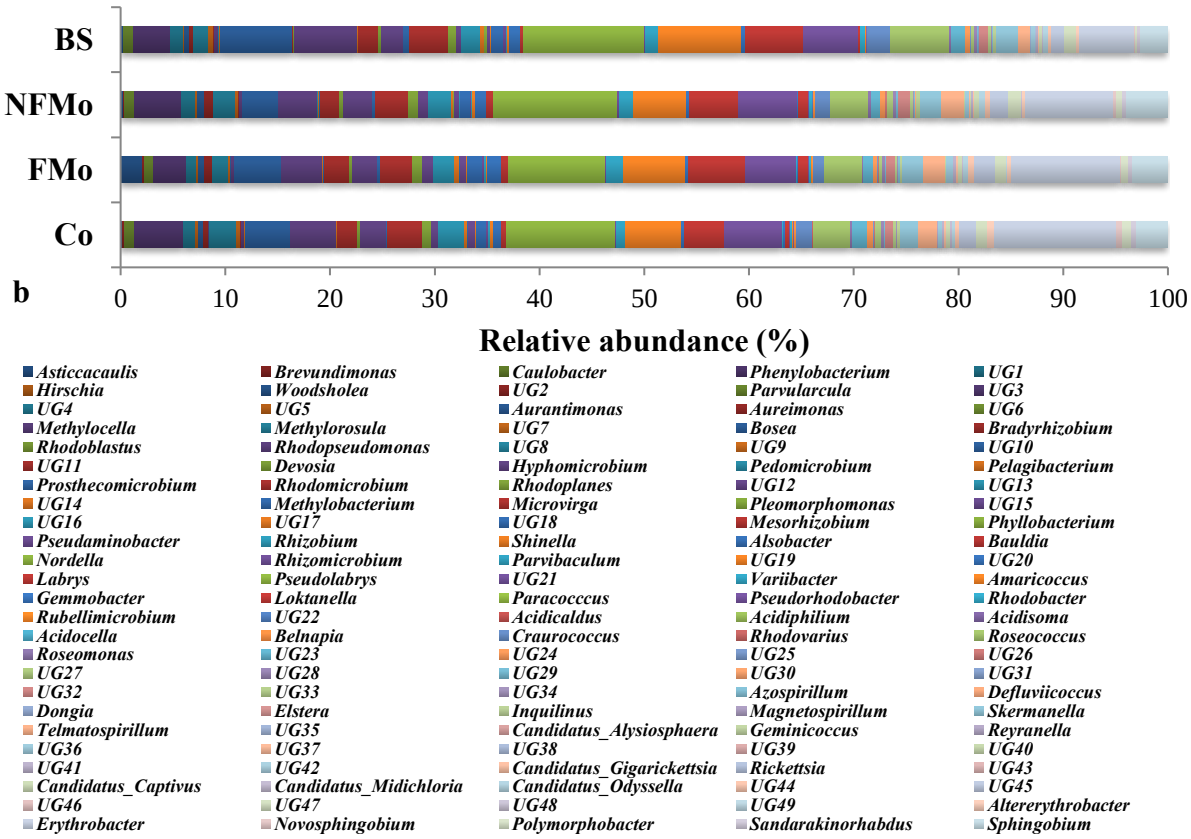


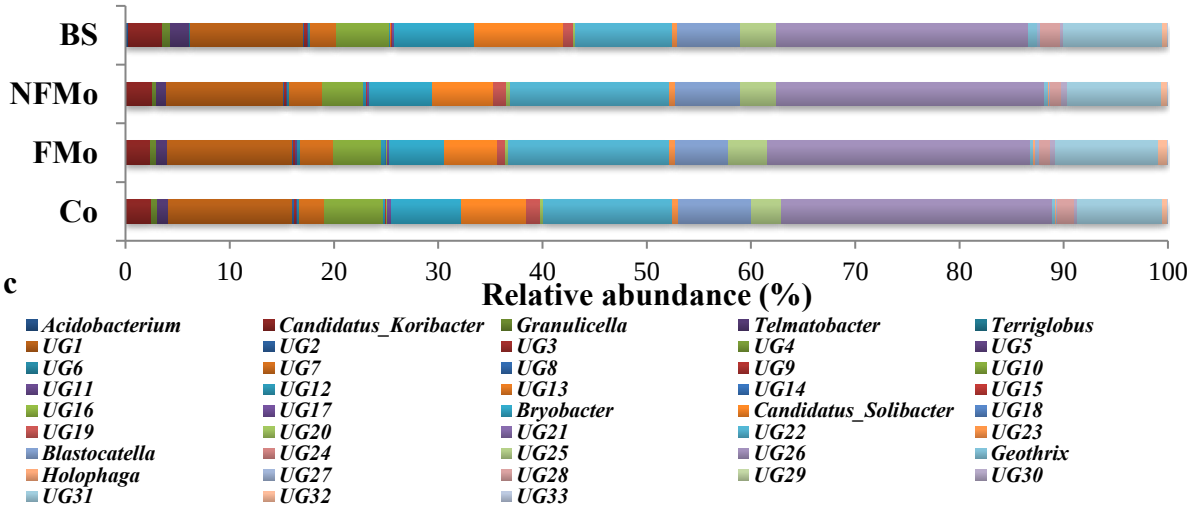
Figure 30 : Heatmap representing linear correlations of plant and soil parameters to bacterial families of phyla with relative abundances higher than 10%. Parameters correlated to the bacterial families are abbreviated as the following: shoot biomass (BSh), root biomass (BRo), shoot carbon content (CSh), root carbon content (CRo), shoot nitrogen content (NSh), root nitrogen content (NRo), shoot Ni content (NiSh), root Ni content (NiRo), microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), soil arylsulfatase activity (Ary), soil urease activity (Ure), soil β-glucosidase activity (Bgl), soil phosphatase activity (Pho), soil FDA activity (FDA), soil ACC deaminase activity (ACCd), substrate richness (R), Shannon's diversity index (H), substrate evenness (E) , average well color development (AWCD), sum index (Sum), soil total carbon concentration (tCs), soil total nitrogen concentration (tNs), soil organic matter concentration (OM), soil organic nitrogen concentration (Nor), soil soluble carbon concentration (Cso), soil soluble nitrogen concentration (Nso), soil pH (pH), soil Cation Exchange Capacity (CEC), soil conductivity (Con), percentage of soil DTPA Ni-extracted concentration to pseudo-total Ni concentration (%Nib), soil ammonium concentration (NH4), soil nitrate concentration (NO3) and soil exchangeable Ni concentration (Niex). Only significant correlations ($p < 0.1$) are represented. The colors of the scale bar indicate the nature of the correlation with red indicating negative correlation and green indicating positive correlation

3.4.4. Bacterial diversity at genus level

Bacterial diversity at the genus level was studied for phyla with relative abundances higher than 10% (Figure 31). Concerning *β-Proteobacteria* phylum (Figure 31a), the genus *Piscinibacter* was found to have the highest relative abundance in the case of co-cropping (3.49%) in comparison to other treatments (2.33%, 1.91% and 1.17% for "FMo", "NFMo" and "BS"). In addition, the genus *Methylotenera* showed the same trend (1.24%, 0.60%, 0.81% and 0.10% for "Co", "FMo", "NFMo" and "BS"). *α-Proteobacteria* phylum was characterized by higher abundance of the genus *Erythrobacter*, especially in the case of "Co" (11.69%, 10.38%, 8.39% and 5.3% for "Co", "FMo", "NFMo" and "BS", respectively). The genus *Asticcacaulis* was found to be more abundant for "FMo" in comparison to other treatments (0.20%, 2.14%, 0.25% and 0.27% for "Co", "FMo", "NFMo" and "BS", respectively). With the phylum *Acidobacteria*, the genus *Blastocatella* was found to be higher for "Co" and lower for "FMo" (6.98% for "Co" *vs* 5.08% for "FMo"). In addition, the genus *Candidatus_Solibacter* was found to be much more abundant for "BS" than for other treatment and the least abundant for "FMo" (8.54% for "BS" *vs* 5.04% for "FMo"). Regarding the phylum *Actinobacteria*, the genus *Arthrobacter* was found to be the highest for "Co" in comparison to all other treatments (5.61%, 2.14%, 2.45% and 2.97% for "Co", "FMo", "NFMo" and "BS", respectively). Inversely, the genus *Gaiella* had higher relative abundance in the case of "FMo" compared to "Co" and other culture systems (9.61%, 12.76%, 10.24% and 11.59% for "Co", "FMo", "NFMo" and "BS", respectively).




BS
NFMo
FMo
Co
b
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Relative abundance (%)
Asticcacaulis
Brevundimonas
Caulobacter
Phenylobacterium
UG1
Hirschia
Woodsholea
UG2
Parvularcula
UG3
UG4
UG5
Aurantimonas
Aureimonas
UG6
Methylocella
Methylorosula
UG7
Bosea
Bradyrhizobium
Rhodoblastus
Rhodopseudomonas
UG8
UG9
UG10
UG11
Devosia
Hyphomicrobium
Pedomicrobium
Pelagibacterium
Prosthecomicrobium
Rhodomicrobium
Rhodoplanes
UG12
UG13
UG14
Methylobacterium
Microvirga
Pleomorphomonas
UG15
UG16
UG17
UG18
Mesorhizobium
Phyllobacterium
Pseudaminobacter
Rhizobium
Shinella
Alsobacter
Bauldia
Nordella
Rhizomicrobium
Parvibaculum
UG19
UG20
Labrys
Pseudolabrys
UG21
Variibacter
Amaricoccus
Gemmobacter
Loktanella
Paracocccus
Pseudorhodobacter
Rhodobacter
Rubellimicrobium
UG22
Acidicaldus
Acidiphilium
Acidisoma
Acidocella
Belnapia
Craurococcus
Rhodovarius
Roseococcus
Roseomonas
UG23
UG24
UG25
UG26
UG27
UG28
UG29
UG30
UG31
UG32
UG33
UG34
Azospirillum
Defluviicoccus
Dongia
Elstera
Inquilinus
Magnetospirillum
Skermanella
Telmatospirillum
UG35
Candidatus_Alysiosphaera
Geminicoccus
Reyranella
UG36
UG37
UG38
UG39
UG40
UG41
UG42
Candidatus_Gigarickettsia
Rickettsia
UG43
Candidatus_Captivus
Candidatus_Midichloria
Candidatus_Odyssella
UG44
UG45
UG46
UG47
UG48
UG49
Altererythrobacter
Erythrobacter
Novosphingobium
Polymorphobacter
Sandarakinorhabdus
Sphingobium


BS
NFMo
FMo
Co
c
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Relative abundance (%)
Acidobacterium
Candidatus_Koribacter
Granulicella
Telmatobacter
Terriglobus
UG1
UG2
UG3
UG4
UG5
UG6
UG7
UG8
UG9
UG10
UG11
UG12
UG13
UG14
UG15
UG16
UG17
Bryobacter
Candidatus_Solibacter
UG18
UG19
UG20
UG21
UG22
UG23
Blastocatella
UG24
UG25
UG26
Geothrix
Holophaga
UG27
UG28
UG29
UG30
UG31
UG32
UG33

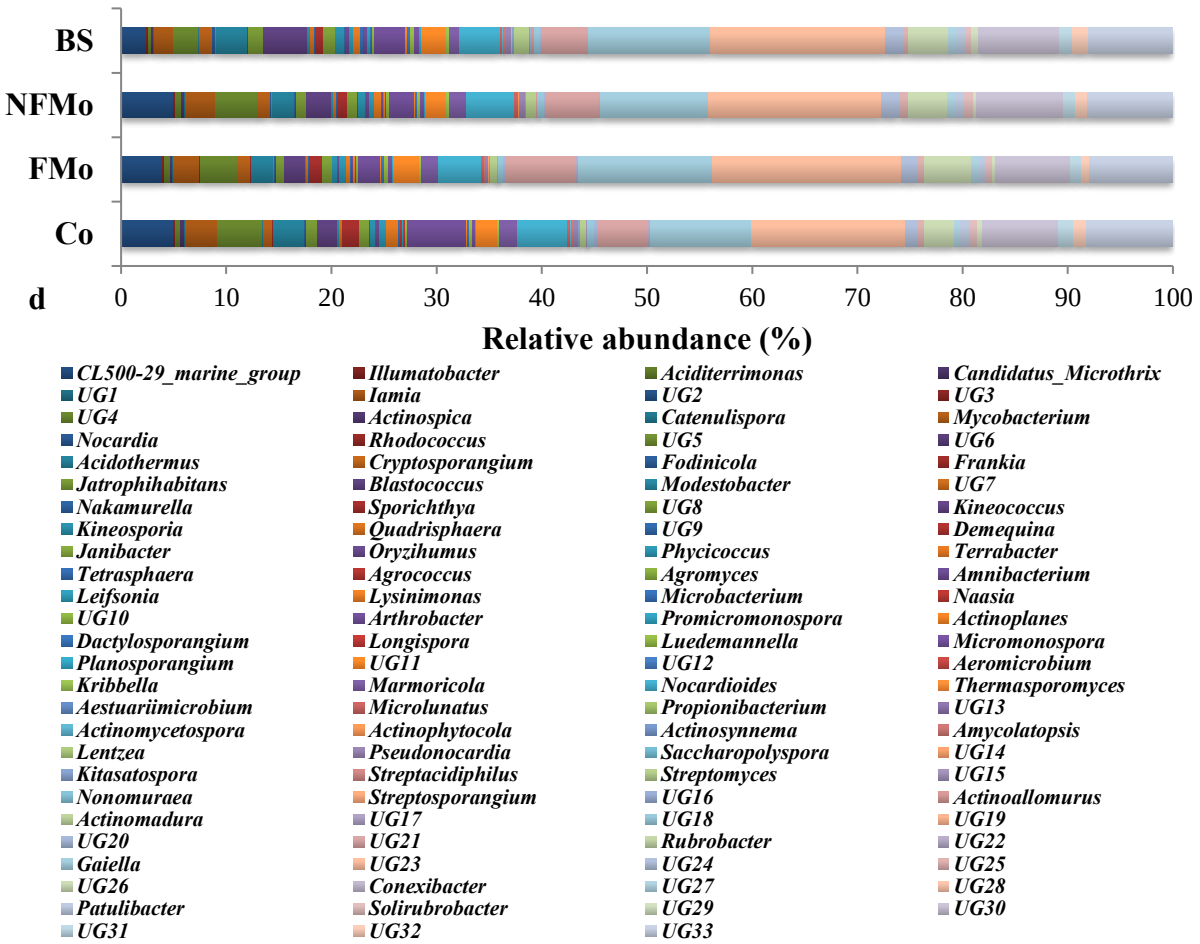


Figure 31 : Bacterial diversity at the genus level for phyla with relative abundances higher than 10%. (a) *β-Proteobacteria*, (b) *α-Proteobacteria*, (c) *Acidobacteria*, (d) *Actinobacteria*. UG refers to an unknown genus. "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively

3.4.5. Non-metric multidimensional scaling at OTUs level

The graphical representation NMDS (Non-metric multidimensional scaling) allowed to compare the treatments (Figure 32) based on the unweighted phylogenetic criteria and on sequences alignment (sequences not influenced by their number). The planted treatments ("Co", "FMo" and "NFMo") are strongly and significantly discriminated by axis 1 (NMDS1) from the unplanted treatment ("BS"). In addition, "Co" and "BS" were discriminated, but not significantly, from "FMo" and "NFMo" treatments along the axis 2 (NMDS2).

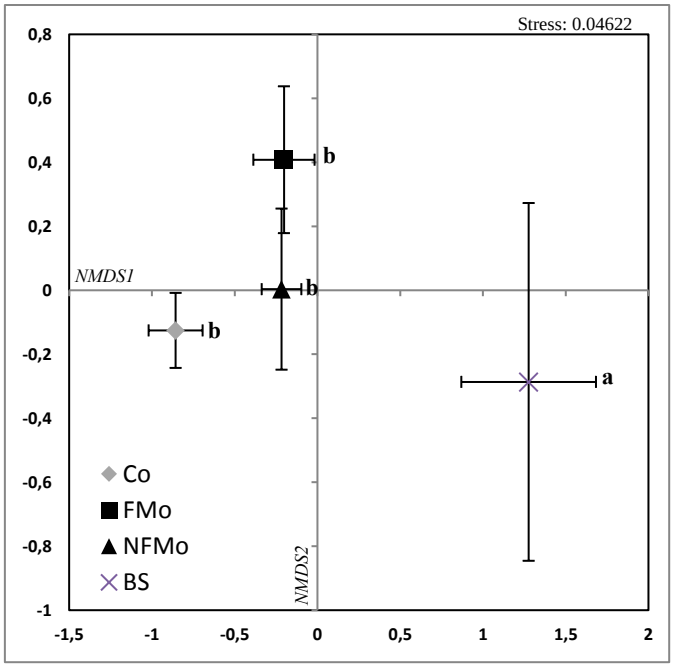


Figure 32 : Non-metric multidimensional scaling: distribution of the treatments according to their bacterial community. Points represent the coordinate means (based on 3 points for each treatment) of different treatments. Means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3). "Co", "FMo", "NFMo" and "BS" refer to the treatments of the co-cropping, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bulk soil, respectively

4. Discussion

Over the past decades, the widespread use of forage legumes as a green manure in agriculture has led to fertilizer savings, improved organic matter quality, soil fertility and soil structure. Recently, the use of green manuring began to be more widely adopted in the semi-arid regions of North America, not only by small farmers but also by some conventional producers (Biederbeck *et al.*, 2005). In addition, the technology of biological organic matter inputs by using legumes improves nitrogen inputs through biological fixation of N_2 from the air. The introduction of legumes at the scale of farming systems can contribute to annual net amounts of about 70 kg N ha^{-1}. Indeed, nitrogen-poor inorganic resources can delay the growth of non-leguminous crops, while legumes are able to compensate for the low availability of this element through N_2 fixation. The presence of legumes in the culture system can also be a competitive advantage over weeds. The legume modifies the soil microenvironment in a way which can benefit the companion plant (Justes *et al.*, 2014). Incorporation of green residues into the soil leads to increased soil microbial activity and the bioavailability of micronutrients (Snapp *et al.*, 1998). Moreover, many authors have attributed the increased yield of the companion plant to changes in soil physical and chemical fertility

(apart from improved soil N fertility) through legume cropping, to the reduction in soil erosion or pesticide use (Breitenbeck *et al.* 1994; Rochester and Peoples, 2005). The objective of this work was to implement new cropping systems that combine agromining with classical agroecological practices. Our goal was to optimize Ni agromining through the compensation of the nitrogen deficiency observed in ultramafic soils.

Alyssum murale when co-cropped with *V. sativa* ("Co" cropping system) showed the same or even higher values for many of the plant parameters measured in comparison to fertilized and non-fertilized monoculture systems. Furthermore, *A. murale* in co-cropping had the highest Ni yields of all treatments. Our results concerning the biomass yields obtained from FMo and NFMo confirm the recent carried out in Albania (Bani *et al.*, 2015a) where an application of the same fertilization rate as that used here resulted in an increase of 780% in *A. murale* biomass compared to the non-fertilized plots (2300 kg ha^{-1} vs 272.2 kg ha^{-1}). In addition, Bani *et al.* (2015a) showed in their study that nitrogen fertilizers at the rate of 120 kg N ha^{-1} increased dramatically Ni yield (20 kg Ni ha^{-1}) in their first trials. In our study, co-cropping treatment led to an increase of 35% and 493% of Ni phytoextracted in comparison to "FMo" and "NFMo", respectively. We did not attain the values of biomass and Ni yield as in the study of Bani *et al.* (2015a) which may have been due to differences in soil characteristics and climate between the ultramafic regions in Albania and Spain (characterized by an Oceanic temperate climate, low temperatures and heavy rains). In addition, the DTPA-extractable Ni concentration in the soil in the studied site (41 mg Ni kg^{-1} dry soil) was also lower than that found in the Albanian soils (>120 mg Ni kg^{-1} dry soil). However, an increased biomass production, as we observed for "Co", is also related to better metal phytoextraction by the hyperaccumulator plants (Bani *et al.*, 2015a; Álvarez-López *et al.*, 2016).

Pronounced increases were shown for C and N contents in *A. murale* tissues for "Co" and "FMo" treatments in comparison to "NFMo". Similar to other Brassicaceae, such as rape, *A. murale* requires high levels of nitrogen for an optimal biomass yield (Simonin, 2017). In classical agriculture, N has been found to be the most limiting factor for an optimum crop yield and grain quality for a long time (Harker *et al.*, 2012). Many studies have also shown increased N use by cereals when co-cropped with legumes due to the release of nitrogenous compounds during decomposition of legume residues. Co-cropping resulted in better nutrient uptake, root and shoot biomass productivity and higher quality of crops (Li *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2010). The incorporation of legume green residues improved biomass yield in agromining systems to the same extent as inorganic fertilization.

It is well known that legumes can induce a pH reduction due to H^+ exudation during atmospheric N_2 fixation, creating localized soil acidification when they are co-cropped with other plants (Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012). However, incorporation of legumes to the soil releases organic anions that are more concentrated in older leaves, such as malate and citrate, and amino acids, such as glycine. These organic compounds were found to increase soil pH during residues decomposition process (Yan *et al.*, 1996). In our study, we did not attain the end of the legume residue decomposition. We could observe not entirely mineralized parts of the plant in soil at the harvest and this may explain the higher pH for the "Co" treatment. Cation Exchange Capacity was found also to be the highest in the case of "Co" treatment. This could be probably due to H^+ complexation to soil surface sites and its exchange with other cations from CEC when the soil pH had increased. Furthermore, the sorption of H^+ ions onto organic particles, which derived from legume residues incorporated in the soil, increased the CEC in the case of "Co" cropping system (Violante *et al.*, 2010). The percentage of DTPA-extracted Ni to the pseudo-total Ni was the lowest in the case of co-cropping treatment. Indeed, the Ni available and unavailable pools are always in a state of equilibrium (Wei et Zhou, 2004). It is recognized that metals bioavailability is enhanced with acidified pH improving their uptake by the hyperaccumulator plants. Surprisingly, when soil pH rises, Ni was found to be more accumulated by plants contrary to other trace metals (Li *et al.*, 2003). In our study, Ni uptake was boosted in the case of co-cropping system where the soil pH attained the value of 6.17 and these results confirm previous studies (Peters *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Kukier *et al.*, 2004). For example, *A. murale* and *A. corsicum* were found to accumulate less Ni in the shoots when the soil pH was acid. Therefore, despite the decreased percentage of bioavailable Ni to pseudo-total Ni with increasing pH, biomass and Ni yields were improved (Peters *et al.*, 2000). This phenomenon is explained by an optimal performance of the Ni^{2+} transmembrane transporter at neutral pH rather than acid pH (Sheoran *et al.*, 2016). Soil C and N contents and organic matter concentrations were higher for co-cropping system compared to planted treatments. C and N are used as soil quality indicators since they are linked to ecosystems performance (Gregorich *et al.*, 2001). Organic matter acts as a source of C and N and has a capacity to complex multivalent cations and also provides a habitat for microorganisms. In addition, soil organic matter has an effect on aggregate stability and water retention (Tisdall and Oades, 1982; Zhang, 1994; Verchot *et al.*, 2011). As shown with cereal food crops, the association of legumes in co-cropping systems provides nitrogen inputs in the cultural system in addition to producing valuable biomass and grain yields (Lizarazo *et al.*, 2015; Peoples *et al.*, 2015). Certainly, legumes used in co-cropping system are also known to

influence the N budget of a system through fixing atmospheric N_2, thus responding to their requirements and providing part of the fixed-N to the companion plant *via* mineralized plant residues (Lizarazo *et al.*, 2015; Nyagumbo *et al.*, 2016). Many studies have shown that there was an addition of important soluble nitrogen quantities to the cropping system and a good balance of the N pool in the soil due to the presence of the co-cropped legume (Snapp *et al.*, 1998; Rühlemann and Schmidtke, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Furthermore, available or soluble N provided by the decomposition of legume residues enhances soil fertility especially in a no-till system (Rühlemann and Schmidtke, 2015) and finally leads to increased yield. In addition, furnished N by the legume responds to the nutrient needs of the cropping system, especially with N being the most limiting factor for optimum biomass production (Isaac *et al.*, 2012; Scalise *et al.*, 2015).

Low ammonium concentrations were detected for all treatments and co-cropping showed highest nitrate concentration in the soil. Nitrification is the process that normally converts ammonia into nitrate in soils (Mohan et Cole, 2007), thus resulting in lower amounts in ammonium than nitrate (Burger et Jackson, 2003). Higher nitrate concentrations for the co-cropping treatment might result from the decomposition of legume residues. In our study, slight, but promising, improvements in agronomic soil properties demonstrated that the co-cropping treatment did not drain soil nutrients after 12 months of cultivation as in the case of fertilized monoculture which depleted important quantities of soil C and N. It is important to note that the maintenance of C and N levels in the soil occurred simultaneously with the enhancement in biomass production of the hyperaccumulator.

Different studies have given substantial consideration for the soil microbial biomass as it is usually used to characterize the dynamics of soil organic C and N (Harris, 2009; Jenkinson and Ladd, 1981; Anderson and Domsch, 2010). Soil MBC is a sensitive indicator of soil organic matter, and can reflect minor modifications in soil organic matter, earlier than the soil total C content (Zhang *et al.*, 2005). For this reason, the microbial biomass is used as a soil fertility index. In our study, soil MBC in the co-cropping system was stimulated and showed greater value than in fertilized regime. Residues of the legume added in the co-cropping appeared to have a positive but non-significant influence on MBC in the rhizosphere of *A. murale* when co-cropped with the legume compared to “FMo”. In addition, rhizosphere soils from the co-cropping system had significantly higher MBN in comparison to “FMo” which showed the lowest value. Based on co-cropping benefits on plant characteristics and soil physico-chemical parameters in our study and especially on N concentration in the soil, there was a direct effect on MBN. An increase in soil MBN is reflected by an improvement of

soil fertility (Singh *et al.*, 2007). In our study, added legume residues in the co-cropping treatment were found to increase N and organic matter contents in the soil. Consequently, the microbial biomass is known to respond fast to soil fertility changes caused by incorporation of organic residues (Anderson et Domsch, 1989; Powlson *et al.*, 1987). Soil enzymatic activities are closely related to biogeochemical nutrient cycling and soil biology and they also show a rapid response to changes in soils (Aon and Colaneri, 2001). Even if microbial enzymes are generally considered as soil biological quality indicators, in our study, arylsulfatase, β-glucosidase and phosphatase activities did not show a clear and significant effect amongst the different cropping systems tested. However, urease activity, which is related to nitrogen cycle, was found to be the highest when *A. murale* was co-cropped with the legume. This might be related to the incorporation of legume N-rich residues in the soil. Indeed, it is well known that the urease activity is influenced by several factors including organic matter and the amount of added N (Cabrera *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2004). Consequently, urease activity can be directly affected by the variation in the soil N-pool. Heavy metals are known for their toxicity to deter the enzymatic activities in the soil due to their inhibition of basic cellular functions and especially energy metabolism (Lorenz *et al.*, 2006). However, urease activity is enhanced by the presence of Ni as the latter is the co-enzyme of urease (Dixon *et al.*, 1975; Lopez and Magnitskiy, 2011). Therefore, the metal effect on enzymes cannot be detected on urease. But, plant diversity can decrease the toxic effect of heavy metals on the microbial communities in the soil, which have developed themselves particular enzymatic activities in the presence of different plant species (Gao *et al.*, 2012). These results could explain that co-cropping of the legume with a hyperaccumulator plant have increased the MBN enhancing the urease activity of the rhizosphere communities in comparison to the monoculture of the hyperaccumulator plant fertilized or not. In addition, FDA activity was also higher in the case of “Co” cropping system when compared to “FMo”. Finally, considering ACCd activity, it is important to note that despite the non-significant effect of the cultural systems on this parameter, it was lowest for “Co” and “FMo” treatments. ACCd is responsible for the cleavage of the ethylene precursor in the plant, the ACC, into ammonia and α-ketobutyrate (Honma et Shimomura, 1978). When ACC levels are decreased in plant tissues, plant ethylene levels decrease in their turn (Glick, 2014). In our study, low ACCd level in the case of “Co” and “FMo” could be induced by a low level of ACC in plant tissues implying that *A. murale* could have been less stressed in these two treatments.

Biolog Ecoplate^{TM} analyses revealed that the presence of easily degradable compounds, i.e. root exudates (such as e.g. sugars, amino compounds, organic acids) (Benizri

et al., 2007; Rue *et al.*, 2015), that are produced in planted soil generally induce greater activity and microbial biomass than did soils without plants. Moreover, in our study, we observed that the co-cropping system induced a different bacterial community structure compared to other planted systems. It appeared that the introduction of a legume in a cultural system clearly induced changes in catabolic capabilities of the bacterial community. Bacterial communities present in the *A. murale* rhizosphere of the co-cropping system were more able to oxidize carbohydrates than those of other treatments. The plant species used in the culture system can favor the development of a specific bacterial community (Sessitsch *et al.*, 2013; Cabello-Conejo *et al.*, 2014; Glick, 2014; Rue *et al.*, 2015). So, plant species (i.e. *A. murale* versus *V. sativa*) can select different rhizosphere microorganisms (Sessitsch *et al.*, 2013). Furthermore, we found that planted treatments had greater substrate richness and AWCD index in comparison to the bulk soil and this can be related to the presence of root exudates in the rhizosphere of *A. murale* that can be rapidly degraded by the microbial communities, thus, increasing their activity (Benizri *et al.*, 2007).

The high throughput sequencing of the 16S rRNA gene is an approach which is currently used to analyze the bacterial diversity in various ecosystems with a wide application in soil analyses (Gołębiewski *et al.*, 2014; Yasir *et al.*, 2015). It is well known that the bacterial community in the rhizosphere of hyperaccumulators, such as *A. murale* can enhance their growth and development in trace metals contaminated or naturally rich soils (Bani *et al.*, 2007; Reeves and Adigüzel, 2008). In addition, it has been shown that the microbial communities can influence trace metals mobility and availability for the plants (Lebeau *et al.*, 2008; Sessitsch *et al.*, 2013; Glick, 2014). In our study, the results of relative abundances at the phyla level indicated the presence of 41 phyla. Among all these phyla, 10 groups had relative abundances higher than 1%. These phyla are commonly encountered as dominant taxa in soils (Janssen, 2006; Rastogi *et al.*, 2010). We found that the phylum of *Proteobacteria* is the most dominant for all the treatments (> 36%) and it confirms the results obtained by Gołębiewski *et al.* (2014) who found that this phylum is predominant in a multicontaminated soil (Cr, Zn and Pb). The *Actinobacteria* phylum is also predominant in our soils and this can be explained by the fact that it is a group of Gram-positive bacteria that are adapted to toxic concentrations of trace elements (Abou-Shanab *et al.*, 2010). Concerning the *Actinobacteria* phylum, we could observe a higher relative abundance in unplanted soil (i.e. bulk soil) compared to the other treatments. The reason of this difference might be a decrease of the toxic conditions in planted soil compared to unplanted one by Ni removing thanks to *A. murale*. Furthermore, soil in the case of co-cropping showed the lowest relative abundance of

Actinobacteria which could be related to the different plant species used in this treatment (Sessitsch *et al.*, 2013). Nevertheless, the phyla *Nitrospirae* and *Chloroflexi* were shown to be more abundant for the treatment "FMo". The phylum *Nitrospirae* were also shown to be the dominant nitrite oxidizers in activated sludge (Juretschko *et al.*, 1998) and microbial aggregates in a fluidized bed reactor (Schramm *et al.*, 1998) and this could be related to the addition of mineral fertilizers (i.e. ammonium nitrate) for this treatment. The phylum *Chloroflexi* was found to be abundant in extreme and stressing conditions such as saline water (Yamada *et al.*, 2005) and is one of the dominant phyla in the rhizosphere of *A. murale* in their natural habitats in the Balkans (Lopez *et al.*, 2017). We can hypothesize that mineral fertilization induced unfavorable conditions for soil bacterial community. This observation was confirmed by the fact that physico-chemical parameters linked with soil fertility were lower than in other treatments. Significant positive correlations for soils parameters related to soil fertility were found with a great number of bacterial families. Soil pH and soil C and N contents are known to have a direct effect on microbial communities and their diversities (Rousk *et al.*, 2010). Some bacterial families were shown to be positively correlated to the plant and soil parameters at the same time. *Burkholderiaceae* are known for their ability to rehabilitate contaminated sites by degrading chlororganic pesticides and polychlorinated biphenyls (Weinberg *et al.*, 2007). *Bradyrhizobiaceae* are a bacterial family that can fix nitrogen from the air and are associated with legumes (DeLeon-Rodriguez *et al.*, 2013). The three bacterial families *YNPFFP1*, *Acidothermaceae*, *Sporichthyaceae* are known to have a role in organic matter decomposition especially cellulose and chitin during humus formation (Kampfer, 2010). *Acidobacteriaceae_(Subgroup_1)* appeared to tolerate various pollutant such as PCBs and petroleum compounds, linear alkylbenzene sulfonate, p-nitrophenol (Sánchez-Peinado *et al.*, 2010) and heavy metals (Barns *et al.*, 2007).

At the genus level, the genera *Piscinibacter* and *Methylotenera* were found to have the highest relative abundance for the case of co-cropping and this can be due to that these genera are facultative methylotrophic bacteria that can utilize C compounds (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008) which could be associated with the incorporated legume residues. In the same way, the genus *Blastocatella* in the case of "Co" was more abundant compared to other treatments and this can be due to a preference for protein-containing complex substrates (in our case, legume residues) (Pascual *et al.*, 2015). The genus *Asticcacaulis* was found to be more abundant for FMo in comparison to other treatments. This genus was found to be more expressed in extreme conditions such as desert soils, mine tailings and sewage systems (Bergey, 2005). In addition, the genus *Candidatus_Solibacter* was found to be much more abundant for "BS"

this can be explained by the fact that this bacterial genus survives under conditions of environmental stress (Paulsen *et al.*, 1998). The NMDS showed that the co-cropping of the two plant species (*A. murale* with *V. sativa*) modified bacterial diversity. Indeed, the rhizosphere soil of *A. murale* also contained compounds that originated from legume residues. It is moreover known that the more diverse are the organic compounds the greater is the bacterial community diversity (Lavelle *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2012; Sessitsch *et al.*, 2013).

5. Conclusions

This study showed that the introduction of a legume into a Ni agromining system improved dry weight biomass of plants and consequently yields of Ni. The results obtained from the co-cropping system clearly demonstrated the improvement of Ni yields in comparison to fertilized and non-fertilized mono-culture. The co-cropping system clearly showed changes in soil microbial biomass (MBN), enzymatic activities (Urease, ACCd), phenotypical structure and bacterial diversity at the phylum, family and genus levels. Moreover, this new cultural system dedicated to agromining can decrease the application of fertilizers and then reduce the risk of nitrogen leaching and underground water pollution. In addition, several studies have shown the importance of the legume introduction in cropping systems to successfully reduce soil erosion, reduce weeds and herbicide, and naturally reduce insects that can damage the crops. Thus, all these benefits conduct to also reduce the use of herbicides and then reducing the use of insecticides and improving soil quality/fertility and structure. Enhancing agromining system by the replacement of inorganic fertilizers can be at the same time a safe depolluting method of ultramafic soils and a way to restore soil quality and functions leading to recover ecosystem services.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the technical team of “Laboratoire Sols et Environnement” and especially Mr. Lucas Charrois and Mr. Romain Goudon for their help and support. We are thankful for the technical assistance of the Soil Microbiology Group of the Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Santiago de Compostela, Spain). We would like to thank also Dr. Celestino Quintela Sabarís and Mr. Manuel Gomez for their assistance and direct work in the field. This work was supported by the French National Research Agency through the national “Investissements d’avenir” program, reference ANR-10-LABX-21 - LABEX RESSOURCES21, through the “Agromine” project, reference ANR-14-CE04-0005, through

the European ERA-net FACCE_SURPLUS project “AGRONICKEL: Developing Ni agromining on ultramafic land in Europe”, reference ANR-15-SUSF-0003-05 and the “Application of Nickel hyperaccumulating plants in phytomining processes” program, reference I-LINK0900. Finally, we are thankful to the Association of Specialization and Scientific Guidance (ASSG, Lebanon) for funding the PhD scholarship of Ramez Saad.

References

Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., Ghozlan, H.A., Ghanem, K., Moawad, H., 2010. Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26, 101‑108. doi:10.1007/s11274-009-0148-6

Abou-Shanab, R.I., Delorme, T.A., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H., Ghozlan, H.A., 2003. Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. International Journal of Phytoremediation 5, 367‑379. doi:10.1080/16226510390268766

Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Soil Biology and Biochemistry 33, 943‑951. doi:10.1016/S0038-0717(00)00244-3

Akhtar, M., Yaqub, M., Iqbal, Z., Ashraf, M.Y., Akhter, J., Hussain, F., 2010. Improvement in yield and nutrient uptake by cocropping of wheat and chickpea. Pakistan Journal of Botany 42, 4043‑4049

Alexander, E.B., 1994. Serpentine Soils Mapped in California and Southwestern Oregon. Soil Horizons 35, 61. doi:10.2136/sh1994.3.0061

Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. Chemosphere 91, 869‑881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075

Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, Cabello-Conejo, M.I., Kidd, P.S., 2016. Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. Science of the Total Environment 548‑549, 370‑379. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.147

Anderson, T.-H., Domsch, K.H., 1989. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. Soil Biology and Biochemistry 21, 471‑479. doi:10.1016/0038-0717(89)90117-X

Anderson, T.H., Domsch, K.H., 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. Soil Biology and Biochemistry 42, 2039‑2043. doi:10.1016/j.soilbio.2010.06.026

Aon, M.A., Colaneri, A.C., 2001. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. Applied Soil Ecology 18, 255‑270. doi:10.1016/S0929-1393(01)00161-5

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., 2015a. Improving the Agronomy of *Alyssum murale* for Extensive Phytomining: A Five-Year Field Study. International Journal of Phytoremediation 6514, 117‑127. doi:10.1080/15226514.2013.862204

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). Plant and Soil 293, 79‑89. doi:10.1007/s11104-007-9245-1

Bani, A., Echevarria, G., Zhang, X., Benizri, E., Laubie, B., Morel, J.L., Simonnot, M.-O., 2015b. The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with *Alyssum murale* in Albania. Australian Journal of Botany 63, 72‑77. doi:10.1071/BT14285

Barns, S.M., Cain, E.C., Sommerville, L., Kuske, C.R., 2007. *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. Applied and Environmental Microbiology 73, 3113‑3116. doi:10.1128/AEM.02012-06

Benizri, E., Nguyen, C., Piutti, S., Slezack-Deschaumes, S., Philippot, L., 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. Soil Biology and Biochemistry 39, 1230‑1233. doi:10.1016/j.soilbio.2006.12.026

Bergey, D.H., 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 2: The *Proteobacteria*, Part C - The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-* and *Epsilonproteobacteria*, Springer-Verlag New York Inc

Biederbeck, V.O., Zentner, R.P., Campbell, C.A., 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. Soil Biology and Biochemistry 37, 1775‑1784. doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.011

Boyd, R.S., Jaffré, T., 2009. Elemental concentrations of eleven New Caledonian plant species from serpentine soils: elemental correlations and leaf-age effects. Northeastern Naturalist 16, 93‑110. doi:10.1656/045.016.0508

Breitenbeck, G.A., Hutchinson, R.L., Boquet, D.J., 1994. Nitrogen status of cotton following winter cover crops. Proceedings - Beltwide Cotton Conf. San Diego, CA, USA. pp. 1505–1507. National Cotton Council, Memphis, USA

Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. Soil Biology and Biochemistry 17, 837‑842. doi:10.1016/0038-0717(85)90144-0

Burger, M., Jackson, L.E., 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. Soil Biology and Biochemistry 35, 29‑36. doi:10.1016/S0038-0717(02)00233-X

Cabello-Conejo, M.I., Becerra-Castro, C., Prieto-Fernàndez, A., Monterroso, C., Saavedra-Ferro, A., Mench, M., Kidd, P.S., 2014. Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. Plant and Soil 379, 35‑50. doi:10.1007/s11104-014-2043-7

Cabrera, M.L., Kissel, D.E., Bock, B.R., 1991. Urea hydrolysis in soil: Effects of urea concentration and soil pH. Soil Biology and Biochemistry 23, 1121‑1124. doi:10.1016/0038-0717(91)90023-D

Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Sparks, D.L., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. Journal of Environmental Quality 36, 1429‑1443. doi:10.2134/jeq2006.0514

Chaney, R.L., Chen, K.Y., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 2008. Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. Plant and Soil 311, 131‑140. doi:10.1007/s11104-008-9664-7

DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R, L.M., Barazesh, J.M., Anderson, B.E., Beyersdorf, A.J., Ziemba, L.D., Bergin, M., Nenes, A., Konstantinidis, K.T., 2013. Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 2575‑80. doi:10.1073/pnas.1212089110

Dick, L.K., Jia, G., Deng, S., Dick, R.P., 2013. Evaluation of microplate and bench-scale β-glucosidase assays for reproducibility, comparability, kinetics, and homogenization methods in two soils. Biology and Fertility of Soils 49, 1227‑1236. doi:10.1007/s00374-013-0820-8

Dixon, N.E., Gazzola T.C., Blakeley, R.L., Zermer, B., 1975. Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? Journal of the American Chemical Society 97, 4131‑3

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460‑2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461

Gao, Y., Miao, C.Y., Xia, J., Mao, L., Wang, Y.F., Zhou, P., 2012. Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. Frontiers of Environmental Science & Engineering 6, 213‑223. doi:10.1007/s11783-011-0345-z

Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. Applied and Environmental Microbiology 57, 2351‑2359. doi:0099-2240/91/082351-09$02.00/0

Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169, 30‑39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009

Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A., Wróbel, B., 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. Microbial

Ecology 67, 635‑647. doi:10.1007/s00248-013-0344-7
Gregorich, E.G., Drury, C.F., Baldock, J. a, 2001. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. Canadian Journal of Soil Science 81, 21‑31. doi:10.4141/S00-041
Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Turkington, T.K., Blackshaw, R.E., Lupwayi, Z.N., Smith, G.E., Klein-Gebbinck, H., Dosdall, L.M., Hall, L.M., Willenborg, C.J., Kutcher, H.R., Malhi, S.S., Vera, C.L., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Grant, C.A., Mclaren, D.L., 2012. High-yield no-till canola production on the Canadian prairies. Canadian Journal of Plant Science 92, 221‑233. doi:10.4141/cjps2011-125
Harris, J., 2009. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? Science (New York, N.Y.) 325, 573‑574. doi:10.1126/science.1172975
Honma, M., Shimomura, T., 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agricultural and Biological Chemistry 42, 1825‑1831. doi:10.1271/bbb1961.42.1825
Isaac, M.E., Hinsinger, P., Harmand, J.M., 2012. Nitrogen and phosphorus economy of a legume tree-cereal intercropping system under controlled conditions. Science of the Total Environment 434, 71‑78. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.12.071
Janssen, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology. doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006
Jenkinson, D.S., Ladd, J.N., 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. Soil biochemistry 5, 415‑471
Justes, E., Bedoussac, L., Corre-Hellou, G., Fustec, J., Hinsinger, P., Jeuffroy, M.H., Journet, E.P., Louarn, G., Naudin, C., Pelzer, E., 2014. Les processus de complémentarité de niche et de facilitation déterminent le fonctionnement des associations végétales et leur efficacité pour l'acquisition des ressources abiotiques. Innovations Agronomiques 40, 1‑24
Kalyuzhnaya, M.G., Hristova, K.R., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L., 2008. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: Implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. Journal of Bacteriology 190, 3817‑3823. doi:10.1128/JB.00180-08
Kampfer, P., 2010. Actinobacteria, in: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. p. 1819‑1838. doi:10.1007/978-3-540-77587-4
Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 41. doi:10.1093/nar/gks808
Kukier, U., Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S., Roseberg, R.J., 2004. The effect of pH on metal accumulation in two *Alyssum* species. Journal of Environmental Quality 33, 90‑102
Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D., Barois, I., 1995. Mutualism and biodiversity in soils. Plant and Soil 170, 23-33
Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. Environmental Pollution 153, 497‑522. doi:10.1016/j.envpol.2007.09.015
Li, L., Li, S.-M., Sun, J.-H., Zhou, L.-L., Bao, X.-G., Zhang, H.-G., Zhang, F.-S., 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 11192‑6. doi:10.1073/pnas.0704591104
Li, L., Sun, J., Zhang, F., Li, X., Rengel, Z., Yang, S., 2001. Wheat/maize or wheat/soybean strip intercropping II. Recovery or compensation of maize and soybean after wheat harvesting. Field Crops Research 71, 173‑181. doi:10.1016/S0378-4290(01)00157-5
Li, Y.M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Nelkin, J., 2003. Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. Environmental Science and Technology 37, 1463‑1468. doi:10.1021/es0208963
Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal 42, 421‑428. doi:10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x

Liu, L., Zhang, Q., Hu, L., Tang, J., Xu, L., Yang, X., Yong, J.W.H., Chen, X., 2012. Legumes can increase cadmium contamination in neighboring crops. Public Library of Science ONE 7. doi:10.1371/journal.pone.0042944

Lizarazo, C.I., Yli-Halla, M., Stoddard, F.L., 2015. Pre-crop effects on the nutrient composition and utilization efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) and narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 311‑327. doi:10.1007/s10705-015-9743-0

Lopez, M.A., Magnitskiy, S., 2011. Nickel: The last of the essential micronutrients. Agronomía Colombiana. 29, 49‑56

Lopez, S., Piutti, S., Vallance, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Benizri, E., 2017. Nickel drives bacterial community diversity in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale*. Soil Biology and Biochemistry 114, 121-130. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.07.010

Lorenz, N., Hintemann, T., Kramarewa, T., Katayama, A., Yasuta, T., Marschner, P., Kandeler, E., 2006. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. Soil Biology and Biochemistry 38, 1430‑1437. doi:10.1016/j.soilbio.2005.10.020

Mohan, S.B., Cole, J.A., 2007. The dissimilatory reduction of nitrate to ammonia by anaerobic bacteria, in: Biology of the Nitrogen Cycle. p. 93‑106. doi:10.1016/B978-044452857-5.50008-4

Nicks, L. and Chambers, M.F., 1995. Farming for metals. Mining Environmental Management. 3, 15-18

Nyagumbo, I., Mkuhlani, S., Pisa, C., Kamalongo, D., Dias, D., Mekuria, M., 2016. Maize yield effects of conservation agriculture based maize–legume cropping systems in contrasting agro-ecologies of Malawi and Mozambique. Nutrient Cycling in Agroecosystems 105, 275‑290. doi:10.1007/s10705-015-9733-2

Pascual, J., Wüst, P.K., Geppert, A., Foesel, B.U., Huber, K.J., Overmann, J., 2015. Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in Acidobacteria subdivision 4. Systematic and Applied Microbiology 38, 534‑544. doi:10.1016/j.syapm.2015.08.001

Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier Jr., M.H., 1998. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. Journal of Molecular Biology 277, 573‑592. doi:10.1006/jmbi.1998.1609

Peoples, M.B., Chalk, P.M., Unkovich, M.J., Boddey, R.M., 2015. Can differences in ^{15}N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? Soil Biology and Biochemistry 87, 97‑109. doi:10.1016/j.soilbio.2015.04.010

Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S., Roseberg, R.J., 2000. Effect of the pH of pH-buffered nutrient solutions on Ni accumulation by hyperaccumulator species p. 50. In 2000 Agronomy Abstracts. ASA, Madison, WI

Powlson, D.S., Prookes, P.C., Christensen, B.T., 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. Soil Biology and Biochemistry 19, 159‑164. doi:10.1016/0038-0717(87)90076-9

Rastogi, G., Osman, S., Kukkadapu, R., Engelhard, M., Vaishampayan, P.A., Andersen, G.L., Sani, R.K., 2010. Microbial and mineralogical characterizations of soils collected from the deep biosphere of the former Homestake gold mine, South Dakota. Microbial Ecology 60, 539‑550. doi:10.1007/s00248-010-9657-y

Reeves, R.D., Adigüzel, N., 2008. The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of turkey and adjacent areas : A Review with new data. Turkish Journal of Biology 32, 143‑153.

Rochester, I., Peoples, M., 2005. Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: Inputs of fixed N, N fertilizer savings and cotton productivity. Plant and Soil 271, 251‑264. doi:10.1007/s11104-004-2621-1

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2010. The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. Soil Biology and Biochemistry 42, 516‑520. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.026

Rue, M., Vallance, J., Echevarria, G., Rey, P., Benizri, E., 2015. Phytoextraction of nickel and rhizosphere microbial communities under mono- or multispecies hyperaccumulator plant cover in a serpentine soil. Australian Journal of Botany 63, 92‑102. doi:10.1071/BT14249

Rühlemann, L., Schmidtke, K., 2015. Evaluation of monocropped and intercropped grain legumes for cover cropping in no-tillage and reduced tillage organic agriculture. European Journal of Agronomy 65, 83‑94. doi:10.1016/j.eja.2015.01.006

Saad, R., Kobaissi, A., Robin, C., Echevarria, G., Benizri, E., 2016. Nitrogen fixation and growth of Lens culinaris as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining. Environmental and Experimental Botany 131, 1‑9. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.06.010

Sánchez-Peinado, M. del M., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C., Rodelas, B., 2010. Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* communities in a soil microcosm. Environmental Science and Pollution Research 17, 779‑790. doi:10.1007/s11356-009-0180-y

Scalise, A., Tortorella, D., Pristeri, A., Petrovičová, B., Gelsomino, A., Lindström, K., Monti, M., 2015. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding durum wheat in a rotation under rainfed conditions. Soil Biology and Biochemistry 89, 150‑161. doi:10.1016/j.soilbio.2015.07.003

Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. Soil Biology and Biochemistry 33, 1481‑1491. doi:10.1016/S0038-0717(01)00057-8

Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 60, 182‑194. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.012

Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2016. Factors affecting phytoextraction: A review. Pedosphere. doi:10.1016/S1002-0160(15)60032-7

Simonin, P., 2017. Observation des pratiques de fertilisation azotée par un outil d'aide à la décision pour le colza. Oilseeds & fats Crops and Lipids 24, 1‑7. doi:10.1051/ocl/2016056

Snapp, S.S., Mafongoya, P.L., Waddington, S., 1998. Organic matter technologies for integrated nutrient management in smallholder cropping systems of southern Africa. Agriculture, Ecosystems and Environment 71, 185‑200. doi:10.1016/S0167-8809(98)00140-6

St. Luce, M., Grant, C.A., Zebarth, B.J., Ziadi, N., O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., Harker, K.N., Johnson, E.N., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Khakbazan, M., Smith, E.G., 2015. Legumes can reduce economic optimum nitrogen rates and increase yields in a wheat-canola cropping sequence in western canada. Field Crops Research 179, 12‑25. doi:10.1016/j.fcr.2015.04.003

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry 4, 479‑487. doi:10.1016/0038-0717(72)90064-8

Tandy, S., Healey, J.R., Nason, M.A., Williamson, J.C., Jones, D.L., 2009. Heavy metal fractionation during the co-composting of biosolids, deinking paper fibre and green waste. Bioresource Technology 100, 4220‑4226. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.046

Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. Journal of Soil Science 33, 141‑163. doi:10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x

Tumi, A.F., Mihailović, N., Gajić, B.A., Niketić, M., Tomović, G., 2012. Comparative study of hyperaccumulation of nickel by *Alyssum murale* s.l. Populations from the Ultramafics of Serbia 21, 1855‑1866

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W.N., Meech, J.A., Erskine, P.D., Simonnot, M.O., Vaughan, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q., Mulligan, D.R., 2015. Agromining: Farming for metals in the future? Environmental Science and Technology 49, 4773‑4780. doi:10.1021/es506031u

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant and Soil 362, 319‑334. doi:10.1007/s11104-012-1287-3

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. Environmental Science and Pollution Research 16, 765‑794. doi:10.1007/s11356-009-0213-6

Verchot, L.V., Dutaur, L., Shepherd, K.D., Albrecht, A., 2011. Organic matter stabilization in soil aggregates: Understanding the biogeochemical mechanisms that determine the fate of carbon inputs in soils. Geoderma 161, 182‑193. doi:10.1016/j.geoderma.2010.12.017

Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A.G., Pigna, M., 2010. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10, 268‑292. doi:10.4067/S0718-95162010000100005

Wang, W.J., Smith, C.J., Chen, D., 2004. Predicting soil nitrogen mineralization dynamics with a modified double exponential model. Soil Science Society of America Journal 68, 1256. doi:10.2136/sssaj2004.1256

Wei, S., Zhou, Q., 2004. Identification of weed species with hyperaccumulative characteristics of heavy metals. Progress in Natural Science 14, 495‑503. doi:10.1080/10020070412331343851

Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J., Wang, J.X., Lee, E.R., Block, K.F., Sudarsan, N., Neph, S., Tompa, M., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R., 2007. Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. Nucleic Acids Research 35, 4809‑4819. doi:10.1093/nar/gkm487

Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2005. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. Applied and Environmental Microbiology 71, 7493‑7503. doi:10.1128/AEM.71.11.7493-7503.2005

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. Soil Biology and Biochemistry 28, 617‑624. doi:10.1016/0038-0717(95)00180-8

Yasir, M., Azhar, E.I., Khan, I., Bibi, F., Baabdullah, R., Al-Zahrani, I.A., Al-Ghamdi, A.K., 2015. Composition of soil microbiome along elevation gradients in southwestern highlands of Saudi Arabia. BMC Microbiology 15, 65. doi:10.1186/s12866-015-0398-4

Zdruli, P., 1997. Benchmark Soils of Albania: Resource assessment for sustainable land use. PhD thesis. Published by the USDA Natural Resources Conservation Service (NRCS), Washington DC and the International Fertilizer Development Center (IFDC), Muscle Shoals, Alabama. 2 Volumes. 293 pp

Zhang, H., 1994. Organic matter incorporation affects mechanical properties of soil aggregates. Soil and Tillage Research 31, 263‑275. doi:10.1016/0167-1987(94)90085-X

Zhang, W., Parker, K.M., Luo, Y., Wan, S., Wallace, L.L., Hu, S., 2005. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. Global Change Biology 11, 266‑277. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.00902.x

Zhao, J., Zeng, Z., He, X., Chen, H., Wang, K., 2015. Effects of monoculture and mixed culture of grass and legume forage species on soil microbial community structure under different levels of nitrogen fertilization. European Journal of Soil Biology 68, 61‑68. doi:10.1016/j.ejsobi.2015.03.008

Points marquants de l’étude

- La culture de *Alyssum murale* en association avec la légumineuse conduit à l’obtention d’une biomasse plus élevée de la plante hyperaccumulatrice et des rendements de Ni supérieurs, en comparaison avec la monoculture de l’hyperaccumulateur sans fertilisation minérale.

- Les conditions édaphiques locales pourraient limiter le rendement.

- La co-culture de *Alyssum murale* avec la légumineuse favorise la fertilité des sols. Des changements sont notables concernant les biomasses microbiennes (MBN), des activités enzymatiques microbiennes (Urease, ACCd), la structure phénotypique des communautés bactériennes ainsi que la diversité bactérienne, aussi bien niveau des phyla, familles que des genres bactériens.

- Ce nouveau système cultural dédié à l'agromine permet de diminuer l'application d’engrais chimiques et apparaît comme une méthode respectueuse de dépollution des sols ultramafiques, permettant une restauration de leur qualité et de leurs fonctions.

CHAPITRE 5. Effet de l'association d'une légumineuse et d'une plante hyperaccumulatrice sur les caractéristiques physicochimiques du sol serpentinique, son biofonctionnement et sur la diversité bactérienne rhizosphérique

Chapitre 5. Effet de l'association d'une légumineuse et d'une plante hyperaccumulatrice sur les caractéristiques physico-chimiques du sol, son biofonctionnement et sur la diversité bactérienne rhizosphérique

La qualité des sols dépend de multiples facteurs et son évaluation repose sur de nombreux indicateurs. Ces indicateurs doivent permettre d'appréhender les fonctions essentielles du sol et d'évaluer la qualité physique, chimique et biologique de ces derniers.

Dans ce chapitre, trois expérimentations sont présentées ; chacune portant sur une catégorie d'indicateurs :

- la première partie concerne l'effet de l'association d'une légumineuse à une plante hyperaccumulatrice sur les caractéristiques physico-chimiques d'un sol serpentinique et ses conséquences sur l'architecture racinaire et l'efficience de la plante hyperccumulatrice à prélever le nickel contenu dans le sol. En effet, la porosité et la distribution de la taille des pores ainsi que la stabilité des agrégats sont fortement liées à la qualité physique d'un sol et nous tenterons de cerner si l'insertion d'une légumineuse dans un système de culture dédié à l'agromine améliore ces paramètres.

- la deuxième partie s'intéresse aux différents types d'agrégats et au biofonctionnement des sols étudiés, soumis à différents systèmes culturaux.

- la troisième partie porte sur l'étude de la diversité bactérienne des sols serpentiniques sous différents couverts : co-cultures, rotation, monoculture fertilisée ou non.

Chapitre 5a. R. SAAD, A. KOBAISSI, B. AMIAUD, J. RUELLE, E. BENIZRI

Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume

Ces travaux sont en cours de soumission.

Chapitre 5b. R. SAAD, A. KOBAISSI, G. MACHINET, G. VILLEMIN, G. ECHEVARRIA, E. BENIZRI

Crop rotation of a hyperaccumulator plant and a legume: improving Ni-agromining, the structure and the biofunctioning of an ultramafic soil

Ces travaux ont été soumis dans la revue « Ecological Research » en juillet 2017.

Chapitre 5c. R.F. SAAD, A. KOBAISSI, G. ECHEVARRIA, P. KIDD, M. CALUSINSKA, X. GOUX, E. BENIZRI

What is the influence of new agromining cropping systems on soil biological properties?

Ces travaux sont en cours de soumission.

Chapitre 5a. Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume

R. Saad[ab] · A. Kobaissi[b]
B. Amiaud[c] · J. Ruelle[d] · E. Benizri[a*]

[a] Université de Lorraine, INRA, UMR 1120 « Sols et Environnement », Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.
[b] Université Libanaise, Laboratoire « Biologie Végétale et Environnement », Faculté des Sciences 1, Beirut, Lebanon.
[c] Université de Lorraine, INRA, UMR 1137 « Ecologie et Ecophysiologie Forestières », Nancy, 54000, France.
[d] Université de Lorraine, INRA, UMR 1092 « Étude des Ressources Forêt-Bois », Champenoux, F-54280, France.

[*]Corresponding author, Tel.: +33(0)383595848, Fax: +33(0)383595791, emile.benizri@univ-lorraine.fr

Abstract

Aims Agromining is a new technology that establishes agricultural systems on ultramafic soils in order to produce valuable metal compounds such as nickel (Ni), with the final aim of restoring a soil's agricultural functions.

Methods Based on standard agricultural systems, consisting in the association of legumes and another crop such as wheat or rape, a three-month rhizobox experiment was carried out to study the effect of the co-cropping or rotation (inter-cropping) of a hyperaccumulator plant (*Alyssum murale*) with a legume (*Vicia sativa*), on the structure and physicochemical properties of an ultramafic soil and on root architecture.

Results Under co-cropping conditions, *A. murale* showed higher values of biomass, C and N contents and taken-up Ni than under the other cultivation systems tested. The rhizosphere soil of *A. murale* in co-cropping had larger soil particles size and better aggregates stability than other treatments. Using geostatistics, co-cropped *Alyssum* showed a greater root surface area spatial distribution. Moreover, co-cropping and rotation induced lower soil Ni-DTPA

concentrations than other treatments, but higher pH values. *A. murale* co-cropped with a legume showed a higher biomass production, improved soil physical characteristics and enhanced Ni phytoextraction.

Conclusions Consequently, legume-introduction in Ni-agromining systems could be an innovative strategy to reduce chemical inputs and to improve soil functions.

Keywords plant association . serpentine soil . agromining . nickel . hyperaccumulator plant . *Alyssum murale* . legume . soil physicochemical properties

1. Introduction

Legumes are frequently introduced into cropping systems because of their ability to fix atmospheric nitrogen using their excellent nitrogen income, the nodules (Sutton *et al.*, 2011). Nodule installation by the legumes promotes soil fertility and incorporating legume residues into the soil significantly increases its nitrogen storage capacity. Incorporation of the legumes into the soil also prevents organic C loss and can increase total C storage in the soil by 600 kg ha^{-1} per year (Kuo *et al.*, 1997; Constantin *et al.*, 2012). The action of legumes is not only limited to nitrogen fixation: they also play a triggering role in biological activity, which is responsible for improved plant nutrition. Local soil acidification in the microenvironment of the active nodule conditions the diversity and the activity of microbial communities and enhances the quality of soil organic matter (Bédoussac *et al.*, 2010a; Hinsinger *et al.*, 2011). The geometry of roots, with little ramification, and incorporation of residues reduce tillage needs and diminish soil compaction. The diversity of plants in the same field permits the maintenance of stable yield production and at the same time, the reduction of all chemical inputs to the field, such as chemical fertilizers, herbicides and fungicides. All these benefits allow a reduction of the environmental pollution of soil and groundwater (due to leaching) (Justes *et al.*, 2014). The valuation of the environmental benefits of legumes is essentially currently considered through crop yield in the case of major crops (wheat, rape...) based on rotation i.e. inter-cropping and plant associations i.e. co-cropping.

Firstly, the introduction of legumes into cropping systems diversifies plant rotation (Stevenson and van Kessel, 1996). In addition, the organic matter present in the soil in rotation, that includes buried legume shoots, can be much more resistant to biological degradation, supporting a longer and deeper carbon stock in the soil, which is beneficial to the next plant implantation (Gregorich *et al.*, 2001). Unavailable P and other nutrients can be solubilized by organic acids, which can be found in the root exudates of grain legumes such as

Faba beans and narrow-leafed lupin (Alamgir *et al.*, 2012). Soil K availability is also boosted by the production of root exudates, especially organic acids, during a legume-cereal crop rotation (Rengel and Damon, 2008; Lizarazo *et al.*, 2015).

Secondly, in the case of co-cropping, plants of interest's yields were always higher in comparison to monospecific culture. Recent studies have shown that a 1.2 hectare yield of wheat and pea monocultures can be produced in 1 hectare culture when these two plants are associated (Pelzer *et al.*, 2012). Furthermore, a co-cropping field that includes legumes can stock 2 to 6 times more N and C than a monoculture, due to complementarity with the legume, which can fix atmospheric nitrogen (Fornara and Tilman, 2008). Legumes, unlike weeds, do not compete with companion plants, but exercise the role of booster. Indeed, the roots of the cereal rapidly explore the soil horizons and go deeper than the legume roots and absorb the available mineral nitrogen. This fact forces the legume to rely on its biological nitrogen fixation when it sets up its nodules, due to the N-uptake by the cereal. This phenomenon is accentuated by a higher formation of aerial biomass of the cereal, which has far greater nitrogen requirements at the beginning of its vegetative cycle (Corre-Hellou *et al.*, 2007). In addition, the percentage of nitrogen derived from air by peas has shown greater performance in association (85%) than from peas fertilized in a mono-culture (70%), thereby demonstrating that legume residues are a nitrogen-rich source, particularly when degraded during freezing winter periods (Corre-Hellou *et al.*, 2006a). One should not forget that the density of the legume in association with other plant is two times lower than in the mono-culture (Bédoussac *et al.*, 2010a).

The interest of using legumes in standard agronomic systems, such as rotation and co-cropping, can be applied to soil rehabilitation methods. Agromining consists of coupling phytoextraction to a special metal-adapted metallurgy (Morel, 2013). It is both ecological and aesthetic, when properly implanted, and a low-cost technique when compared to conventional soil decontamination methods and classic excavation. In addition, it has the advantage of improving the ecological functions of soils (van der Ent *et al.*, 2015a). It is based on the use of hyperaccumulator plants that have the ability to accumulate metals from soil to their shoots (Li *et al.*, 2003; Bani *et al.*, 2007). After the harvesting and incineration of plant biomass, it is possible to extract and recycle metals for industrial use (Barbaroux *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Hyperaccumulator plants have tremendous potential for environmental metal-cleaning applications. Nowadays, agromining appears to be an innovative tool with great potential to help soil rehabilitation (van der Ent *et al.*, 2015a). However, the success of agromining is related to the ability of hyperaccumulator plants to absorb and translocate the metal towards

their aerial parts, in addition to their capacity to produce sufficient plant biomass (Ma *et al.*, 2009). This goal can be achieved through improving soil fertility to maximize the yields of hyperaccumulator plant biomass (Bani *et al.*, 2015b). In this context, several studies have shown that the application of chemical fertilizer increased both the plant biomass and the density of hyperaccumulator plants (Bani *et al.*, 2015a). The reckless and excessive use of synthetic nitrogen fertilizers in agriculture has effectively led to an increase in nitrogen loss in the environment, polluting both underground water and the atmosphere (Zhao *et al.*, 2015).

Hence the objectives in this work were to study the effect of legumes employed in agromining systems (co-cropping and/or rotation) and particularly to observe the effect of cultivating a legume (*Vicia sativa* var. Prontivesa) in association with a hyperaccumulator plant (*Alyssum murale*) on the structure and physicochemical properties of a serpentine soil. We chose a naturally Ni-rich soil which derived from an ultramafic zone in North West Spain. In order to detect the impact of the co-cropping and the rotation of both species on soil characteristics, an experiment was conducted under controlled conditions using rhizoboxes. Physicochemical analyses were carried out in order to show which cultural system, co-cropping *vs.* rotation, could better enhance the characteristics of an ultramafic soil, Ni phytoextraction, as well as the biomass production of the hyperaccumulator plant.

2. Materials and methods

2.1. Soil characteristics and experimental design

An experiment was conducted for 115 days in a growth-chamber under controlled conditions (a 16-hour photoperiod, a 18°C night and 22°C day temperature, a 70% relative humidity level and a photosynthetic photon flux density of 350 µmol m^{-2} s^{-1}). The mesocosms used (30 cm in height, 15 cm wide and 5 cm thick) had a rectangular parallelepiped shape with a transparent front glass side (rhizoboxes). The soil used in this experiment was a serpentine soil, collected from the surface layer (10-20 cm), originating from the region of Melide in Spain (42°49'54.5"N, 8°00'13.5"W, Agolada, Pontevedra, Spain). After collection, the soil was air-dried and sieved to < 5 mm. The soil physicochemical properties were determined by the Soil Analysis Laboratory of INRA, (Arras, France). It contained 17.5% clay, 30.6% silt and 51.9% sand (NF X 31-107), had a C/N ratio of 13.9 (NF ISO 10694 and NF ISO 13878), a Mg/Ca ratio of 2.79 (NF ISO 23470) and an available phosphorus content (Olsen P, NF ISO 11263) of 23 mg kg^{-1}. Soil pH was 5.76 (NF ISO 10390) and the total and available Ni (Ni-DTPA, NF X 31-121 and NF ISO 22036) contents were respectively 861 and 24.8 mg Ni kg^{-1}

(ISO 11466 and NF ISO 22036). In order to improve the Mg/Ca ratio and adjust the P and K contents, soil was amended with 600 mg of Ca kg^{-1} of dry soil (equivalent to 4.5 tons of gypsum per hectare) and 155.2 mg kg^{-1} of dry soil of KH_2PO_4 (fertilization of 0-52-34 NPK equivalent to an amendment of 122.5 kg ha^{-1} P and 156.2 kg ha^{-1} K). The rhizoboxes were filled with 2 239 g of soil (DW). One *A. murale* and two *V. sativa* seeds were sown depending on the treatment. *V. sativa* seeds were provided by Semillas Batlle (www.semillasbatlle.es, Spain) and *A. murale* seeds were harvested from a site in Trigona (Greece) in August 2014.

The experiment had a randomized block design with three replicates of the following treatments: rotation "Ro" (*Vicia* culture for one month following, after shoot burying by the culture of *Alyssum*), co-cropping "Co" (co-cropping of *Vicia* and *Alyssum*), fertilized control "FMo" (*Alyssum* with mineral fertilization at the rate of 60 kg N per hectare) and bulk soil "BS" without any plant or fertilizer. In this study, in order to simplify the name of the treatments, we used the term rotation which corresponded to inter-cropping. The rhizoboxes were put on a stand that was tilted to a 45° angle. The transparent glass-side faced the stand throughout the experiment. The rhizoboxes were watered with tap water three times a week to 60% of soil water holding capacity. In the case of the association of *Alyssum* with the legume (Co and Ro), the *Vicia* shoots were harvested and incorporated after 1 month of culture. The aerial parts of the legume were dried, then crushed and finally incorporated into the first two centimeters of topsoil in the rhizoboxes. The mineral fertilization was added one month after sowing the *Alyssum* seeds (FMo) in the form of NH_4NO_3 dissolved in distilled water.

2.2. Plant analyses

After 3.5 months of growth under controlled conditions, images of the *Alyssum* roots visible through one side of the rhizoboxes were scanned (EPSON V750 Perfection Pro optical scanner) in order to study the surface area covered by the roots. Sub-images were created and the percentage of surface area covered by the roots was estimated using a script on Image J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, http://imagej.nih.gov/ij). The script consisted of measuring the percentage of the predefined color, corresponding to the root presence, in each 2 cm^2 (13 x 6 units). Then, plants were collected and the roots and stems were separated. Fresh roots were carefully washed with deionized water, then their architecture was studied using WinRHIZO software (Regent Instruments, Québec, Canada) in the aim of measuring their total length (cm), total surface area (cm^2), average diameter (mm) and number of tips and forks.

Root and shoot parts were oven-dried at 70°C for 72 h and the dry weights recorded. Subsamples (0.5 g) of dry and ground plant tissue were acid-digested at 95°C in 2.5 ml of concentrated HNO_3 and 5 ml of H_2O_2 (30 %). The final solutions were filtered (0.45 µm DigiFILTER) and completed with deionized water to 25 ml. The Ni concentration in the solution was measured with an Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES, Liberty II, Varian).

The total C and N concentrations of the plant parts were analyzed by combustion at 900°C with a CHNS analyzer (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH, Germany).

2.3. Soil analyses

Only one rhizobox per treatment was used to carry out soil analyses, except for laser diffraction granulometry, due to the large number of analyses to be carried out per replicate (analyses in each 2 cm^2 (13x6 units) generating 78 measurements per rhizobox) and in order to link measured parameters to one root system.

The pH spatial variation at the soil surface of the glass side was measured using a contact pH meter (SoilStik™ pH Meter, Field Scout®, USA) after removal of the transparent glass side and the creation of a 2 cm^2 grid (13x6 units, 78 measurements per rhizobox).

In addition, bioavailable Ni variation at the soil surface of the grid was studied. 5 g of soil were collected and dried at 40°C for 48 h (78 samples per rhizobox). The bioavailable Ni in each soil sample was extracted with a DTPA–TEA solution (0.005 M DTPA, 0.01 M $CaCl_2$, 0.1 M triethanolamine, pH 7.3) according to Lindsay and Norvell (1978) and their concentrations were measured with an ICP-AES (Liberty II, Varian).

The quantification of macropores in the soil at harvest was done using X-ray computed tomography and image analysis, in order to investigate the impact of plant association (co-cropping Co *versus* rotation Ro in comparison with fertilized monoculture FMo) on the pore network present in the soil. This technique consisted of scanning the rhizoboxes using X-ray Imaging. We used a 4-slice medical X-ray scanner (BrightSpeed Excel by GE Healthcare) designed for medical purposes and one rhizobox was scanned per pass. The generator was set to 80 kV–60 mA, and the slice thickness to 1.25 mm. Insofar as the greatest roots number was close to the transparent glass side of the rhizobox due to gravity, we only analyzed the image of the stack the nearest to the glass side. Each image obtained from the stacks was reframed to avoid the rhizobox border (PVC) artifacts. Then, this reframed image was processed on Image J software (Wayne Rasband, National Institues

of Health, USA, http://imagej.nih.gov/ij). An electronic grid was created by an automatic script in order to estimate the macropore percentages in the images that were created from the tomography. This script consisted in measuring the percentage of the predefined color in each 2 cm^2 area.

Total soil C and N were quantified for each 2 cm^2 area of the grid with the C, N analyzer. At harvest, the soil particles distribution, for each treatment, was studied using laser diffraction granulometry in order to study the aggregation process. The differences in soil granulometry was studied for each treatment (Co, Ro and FMo), in both *A. murale* rhizosphere soil and non-rhizosphere soil. This technique uses the principle of diffraction and scattering of a laser beam hitting the soil particles. The grain size distribution was determined using a "Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer" (Patrica V2 Horiba LA – 950, Japan). Soils were dried at 40ºC and sieved at 2 mm. The measuring procedure was based on the Mie scattering theory (Mie, 1908), with a range between 0.01 and 2000 µm, using an ultrasound with a period of 20 seconds at a frequency of 20 kHz. The machine was equipped with an optical system with two light sources, a 1.6 mW laser diode (650 nm) and a 0.3 mW led light diode (405 nm). The diffraction pattern obtained was then transformed using an optical model and an appropriate mathematical procedure (Bohren *et al.*, 2008). The result was obtained as fraction volume percentage and then classified using the international classification of fraction size distribution used by the United States Department of Agriculture (USDA) (Brown, 1998; Minasny and McBratney, 2001). This qualitative measurement helped detect whether there were changes in soil particles size (aggregates) before and after sonication and thus aggregate stability of rhizosphere and non-rhizosphere soil within the treatments.

2.4. Geostatistical and statistical analyses

The soil physicochemical and biological parameters were geostatistically analyzed by calculating a semivariogram for all the parameters. The formula used for these analyses was

$$\gamma(h) = 1/2N(h)\sum[z(xi + h) - z(xi)]^2$$

where γ(h) is the experimental semivariogram value at distance interval *h*, *N*(*h*) is the number of sample pairs within the distance interval *h*, *z*(*xi*) and *z*(*xi*+*h*) are the sample values at two points separated by the distance interval *h*. All pairs of points separated by a distance *h* (lag *h*) were used to calculate the experimental semivariogram. Most appropriate semivariograms were chosen after testing different models. Semivariance was used to calculate the semivariogram models providing the required material for data interpolation at non-sampled

points. The geostatistical parameters sill, range and nugget semivariance were calculated. The sill is the constant value of the variogram when the variables do not influence each other, the range is the distance at which the value of one variable becomes spatially independent of another and the nugget semivariance is the variance at zero distance. The *Q* value, which is an index of spatial dependence, was also determined during the analysis. The *Q* value, varying from 0 to 1, was calculated as sill/sill+nugget, which indicated the spatial structure at the soil sampling scale. No spatial structure was detected in our maps when the *Q* value approached 0. The spatial variation can be explained by the semivariogram model when the *Q* value is close to 1. Maps generation was then processed by using ordinary interpolation to evaluate the regional patterns of variation rather than local details (Görres *et al.*, 1998). A Mantel test was performed to compare pairwise differences between two treatments to the geographic distances between them. Each treatment matrix was transformed into a matrix of distances to detect a spatial autocorrelation. Geostatistical analyses were carried out with R 3.0.2 (R foundation for Statistical Computing Vienna AT) and the following packages were used: geoR for kriging (Paulo *et al.*, 2016) and ade4 for the Mantel test (Dray and Dufour, 2007).

Variance analysis was carried out on all data using one-way ANOVA (Duncan test with a confidence interval of 95%). Also, normality tests and k-sample comparison of variances were analyzed. These statistical analyses were carried out on XLSTAT software (XLSTAT 2015.2.01.16520, http://www.xlstat.com).

3. Results

3.1. Plant analyses

3.1.1. Biomass, Ni yields and C, N contents

All parameters measured on *A. murale* conducted in Co co-cropping system showed the highest values followed by FMo and Ro (Co>FMo>Ro), except for root Ni yield for which Ro was better than FMo (Figure 33). No significant difference was detected for the shoot dry biomass of *Alyssum* between the three cultural systems, even if Co had a 48.5% and 97% augmentation in comparison to FMo and Ro (i.e. 1.89, 1.27 and 0.96 g plant^{-1} for Co, FMo and Ro). Co had a significantly highest root dry biomass than FMo and Ro, which were similar (i.e. 0.42, 0.18 and 0.14 g plant^{-1} for Co, FMo and Ro). Despite the non-significant difference for shoot and root Ni yields (Figure 33), Co showed 30% and 43% more Ni accumulation in shoots than FMo and Ro (17.3, 12.1 and 9.7 mg Ni plant^{-1}). As for root Ni yield, Ro showed 11.4% higher Ni accumulation in roots than FMo, which showed the lowest

root Ni accumulation (i.e. 3.4, 2.1 and 1.8 mg Ni plant^{-1} for Co, Ro and FMo). No significant difference was shown for shoot carbon content between treatments (Figure 33). As for shoot nitrogen content, Co was significantly higher (67 mg N plant^{-1}) than Ro (29.4 mg N plant^{-1}), but not significantly different to FMo (57.2 mg N plant^{-1}). Concerning C and N content in the roots, Co had significantly highest values (182 mg C plant^{-1} and 8.3 mg N plant^{-1}) than the other treatments (76.6 mg C plant^{-1} and 4.2 mg N plant^{-1} for FMo and 61.6 mg C plant^{-1} and 2.8 mg N plant^{-1} for Ro).

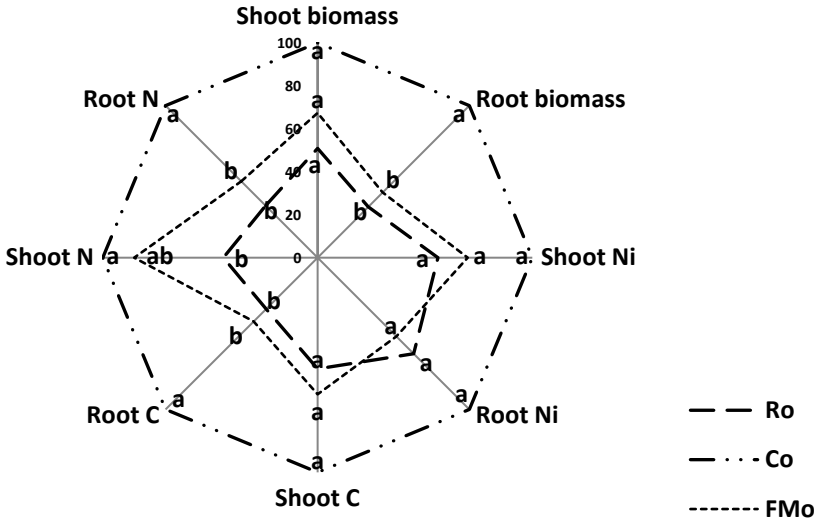


Figure 33 : Sunray plot of plant parameters percentages. A value of 100% corresponds to the highest value for each variable. Ro, Co and FMo correspond to the treatments of rotation, co-cropping and fertilized monoculture respectively. N, C and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel respectively. Lower values are calculated by the following formula "(lower value/highest value) x 100". Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)

3.1.2. Root architecture and spatial distribution

No significant differences were found for the five variables measured (Figure 34). Nevertheless, *Alyssum* collected from the co-cropping system showed higher values than FMo and Ro for total root length (10121.3, 7410.0 and 3932.8 cm for Co, FMo and Ro), total root surface area (1204.0, 855.9 and 444.5 cm^2 for Co, FMo and Ro), tip numbers (47540, 34804 and 19442 tips for Co, FMo and Ro) and fork numbers (21828, 14257 and 8459 forks for Co, FMo and Ro), (Figure 34). However, the average root diameter was approximately the same for all the treatments (0.39, 0.38 and 0.37 mm for Co, FMo and Ro).

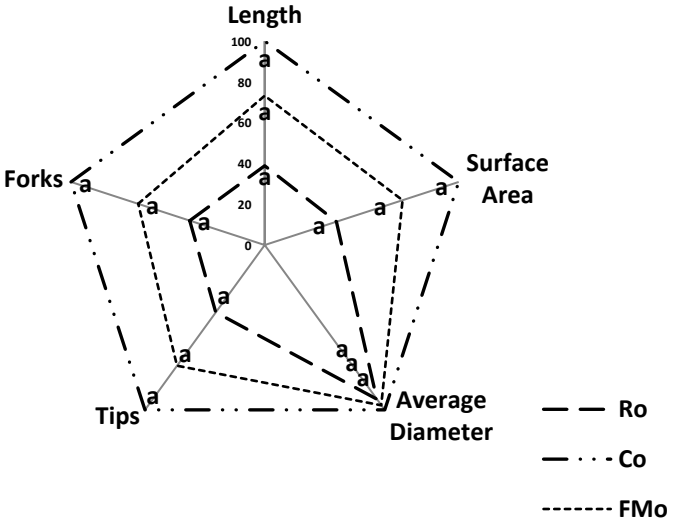


Figure 34 : Sunray plot of root architecture parameters percentages. A value of 100% corresponds to the highest value for each variable. Ro, Co and FMo correspond to the treatments of rotation, co-cropping and fertilized monoculture respectively. Lower values are calculated by the following formula "(lower value/highest value) x 100". Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 3)

The spatial variability of Root Surface Area percentage (RSA, %) was studied for the three different cultural systems (i.e. Co, Ro and FMo), (Table 1). The RSA of Co cultural system varied from 0.29 to 41.49% with an average of 10.95% and a coefficient of variation (CV) of 87.81%. The RSA of Co cultural system showed the highest average in comparison to Ro and FMo (10.95, 6.30 and 6.83 for Co, Ro and FMo). In addition, *Q* values, which indicate the spatial structure at the 2 cm^2 sampling grid, ranged between 0.13 and 0.97. A higher value was found for the Co treatment (0.97), which indicates the best spatial structure in comparison to Ro and FMo (0.34 and 0.13). On the other hand, the range of spatial correlation was 12.1 cm for the RSA from the co-cropping system, while it was as high as 25.0 cm for FMo. However, FMo showed higher descriptive statistics in comparison to Ro and the highest range (25.9 cm) in comparison to Co and Ro (12.1 and 3.4 cm). Kriged maps of the root surface area percentage showed different spatial distributions between the treatments where the legume was present (Co and Ro) and the FMo, (Figure 35). The highest RSA percentage is to be observed on the right of the map in the case of Co and Ro, with a lower value for Ro. FMo showed multiple zones (black color) on the map, where the RSA percentage is relatively high.

Table 13 : Descriptive statistics and geostatistical analysis of Root Surface Area percentage (RSA, %) measured for co-cropping (Co), rotation (Ro) and fertilized monoculture (FMo). SD, CV and *Q* refer to the standard deviation, the coefficient of variation and *Q* value, respectively

Variable	**Treatment**	**Min**	**Max**	**Mean**	**STD**	**CV (%)**	**Sill**	**Range (cm)**	**Nugget**	**Model**	***Q***
RSA (%)	Co	0.29	41.49	10.95	9.62	87.81	250.1	12.1	7.3	Exponential	**0.97**
	Ro	0.22	24.61	6.30	4.50	71.32	7.5	3.4	14.5	Exponential	**0.34**
	FMo	0.38	25.03	6.83	4.96	72.54	2.6	25.9	17.2	Exponential	**0.13**

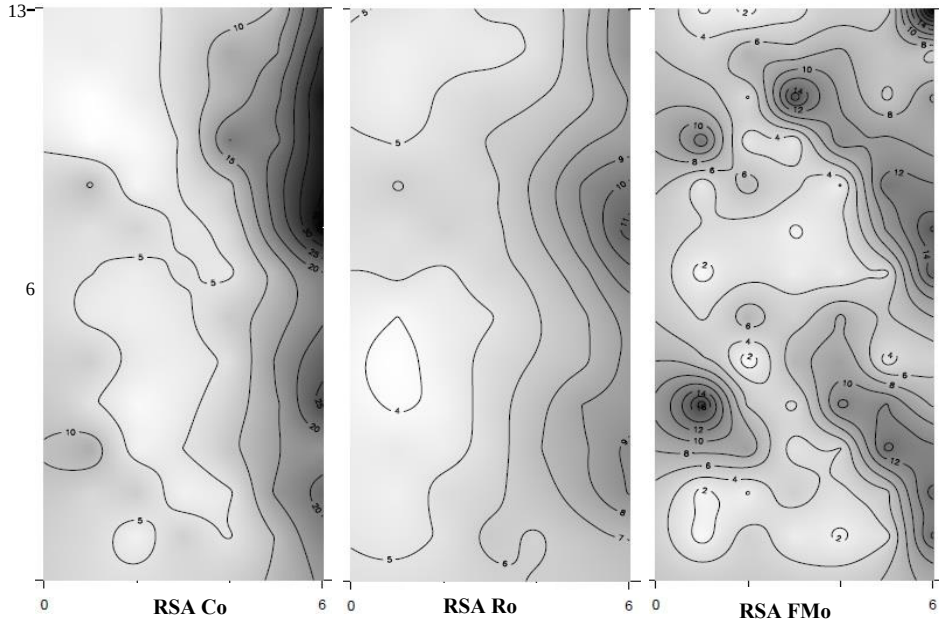


Figure 35 : Kriged maps of Root Surface Area (RSA, %). Co, Ro and FMo correspond to the treatments of co-cropping, rotation and fertilized monoculture, respectively

3.2. Soil characteristics

3.2.1. Spatial distribution of physicochemical properties

Concerning soil C content, no spatial distribution was observed for the various cultural systems. As for soil N content, some spatial distribution was found, but only in the case of FMo and at a low *Q* value (0.33) (Table 2), (kriged map not shown).

Among the four treatments (i.e. Co, Ro, FMo and BS), two of them, Co and Ro showed lower values (15.1 and 14.9 mg Ni kg^{-1} for Co and Ro) of bioavailable Ni concentrations (Ni-DTPA), while the other two had higher values (19.04 and 21.98 mg Ni kg^{-1} for FMo and BS) (Table 2). The Ni-DTPA of Co cultural system varied from 8.83 to 21.22 mg Ni kg^{-1} with the highest coefficient of variation (CV) of 19.8% and range (12.9 cm) in comparison to all other treatments. Furthermore, Ni-DTPA of the co-cropping system had a higher *Q* value (0.78) than those of Ro and BS (0.36 and 0.63). Despite the Ni-DTPA of FMo cultural system having a strong *Q* value of 1.0, this was characterized by a null nugget

variance, which indicated the absence of a spatial structure at a finer scale than that investigated in our study. Kriged maps of the Ni-DTPA concentrations in the soil (Figure 36) reflected two concentration levels, as we mentioned before, with lower concentrations for the cultural systems where the legume was introduced and higher for FMo and BS.

Table 14 : Descriptive statistics and geostatistical analysis of soil total nitrogen content (N total, %), concentration of Ni-DTPA (Ni-DTPA, mg kg^{-1}), soil porosity (Porosity, %) and soil pH (pH) determined for co-cropping (Co), rotation (Ro) and fertilized monoculture (FMo). Min, Max, SD and CV refer to the minimum value, the maximum value, the standard deviation and the coefficient of variation respectively

Variable	**Treatment**	**Min**	**Max**	**Mean**	**STD**	**CV (%)**	**Sill**	**Range (cm)**	**Nugget**	**Model**	***Q***
N total (%)	FMo	0.16	0.23	0.20	0.02	7.84	0.0001	3.9	0.0002	Exponential	**0.33**
Ni-DTPA (mg kg^{-1})	Co	8.93	21.22	15.10	2.99	19.78	8.7	12.9	2.4	Exponential	**0.78**
	Ro	7.97	18.58	14.93	1.78	11.93	1.2	4.5	2.1	Exponential	**0.36**
	FMo	13.95	23.82	19.04	2.08	10.90	4.3	4.9	0	Exponential	**1.00**
	BS	15.17	26.3	21.98	1.96	8.93	2.6	4	1.52	Exponential	**0.63**
Porosity (%)	Co	0.00	44.58	7.11	7.56	106.41	166	19	0	Exponential	**1.00**
	Ro	0.00	17.67	7.17	4.58	63.98	20.7	1.2	0	Exponential	**1.00**
	FMo	0.00	38.28	7.56	8.69	114.85	75.6	0.7	0	Exponential	**1.00**
	BS	0.00	29.30	7.75	7.57	97.77	58	0.8	0	Exponential	**1.00**
pH	Co	5.83	6.83	6.30	0.21	3.30	0.05	8.15	0.02	Exponential	**0.71**
	Ro	5.92	6.92	6.23	0.20	3.15	0.1	5.5	0.01	Exponential	**0.91**
	FMo	6.00	6.48	6.19	0.10	1.70	0.012	1.8	0.002	Spherical	**0.86**
	BS	5.60	6.22	6.10	0.08	1.29	0.008	4.3	0.001	Exponential	**0.89**

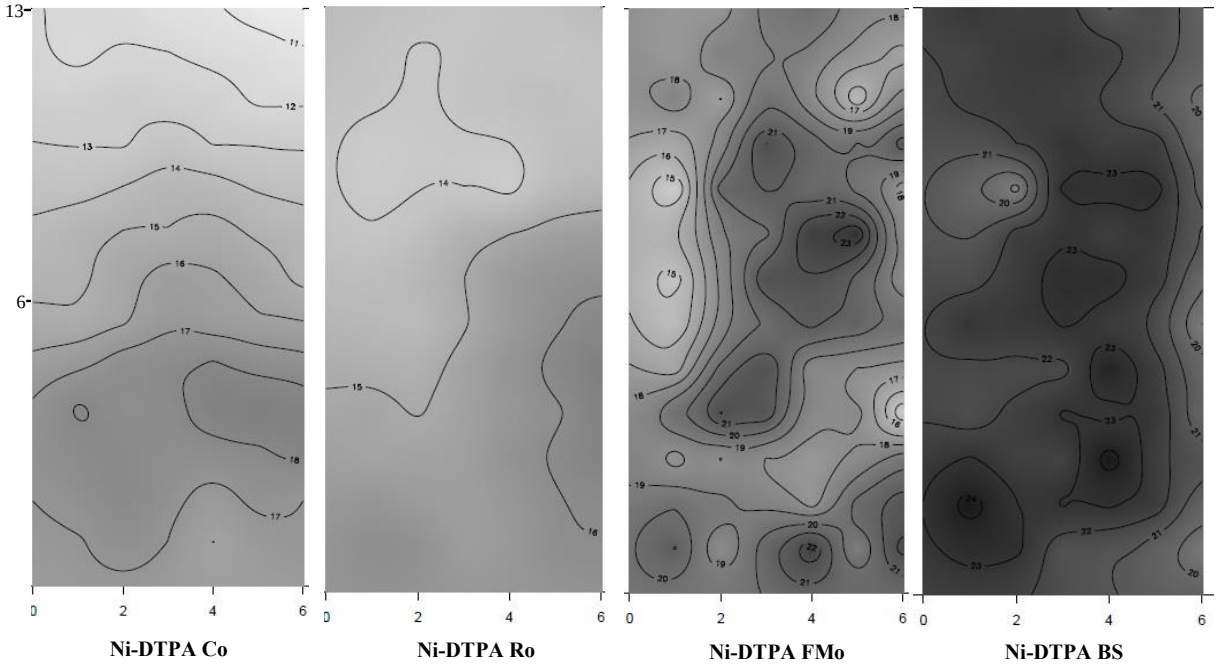


Figure 36 : Kriged maps of soil Ni-DTPA concentrations (mg kg^{-1}). Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively

Soil porosity showed wider variation in the case of Co, ranging between 0 and 44.58% (Table 2). In addition, Co showed the widest range of all the treatments (19 cm). FMo showed the highest coefficient of variation (114.8%), followed by Co (106.4%). Ro showed the lowest variation and mean value among all treatments. All treatments showed same strong *Q* value (1.00), despite the null nugget variances. The Kriged maps for the porosity percentage (Figure 37) showed that for Co, a zone with high soil porosity was present in the lower left part of the rhizobox, whereas other treatments showed heterogeneous and different distribution of soil porosity within the rhizoboxes.

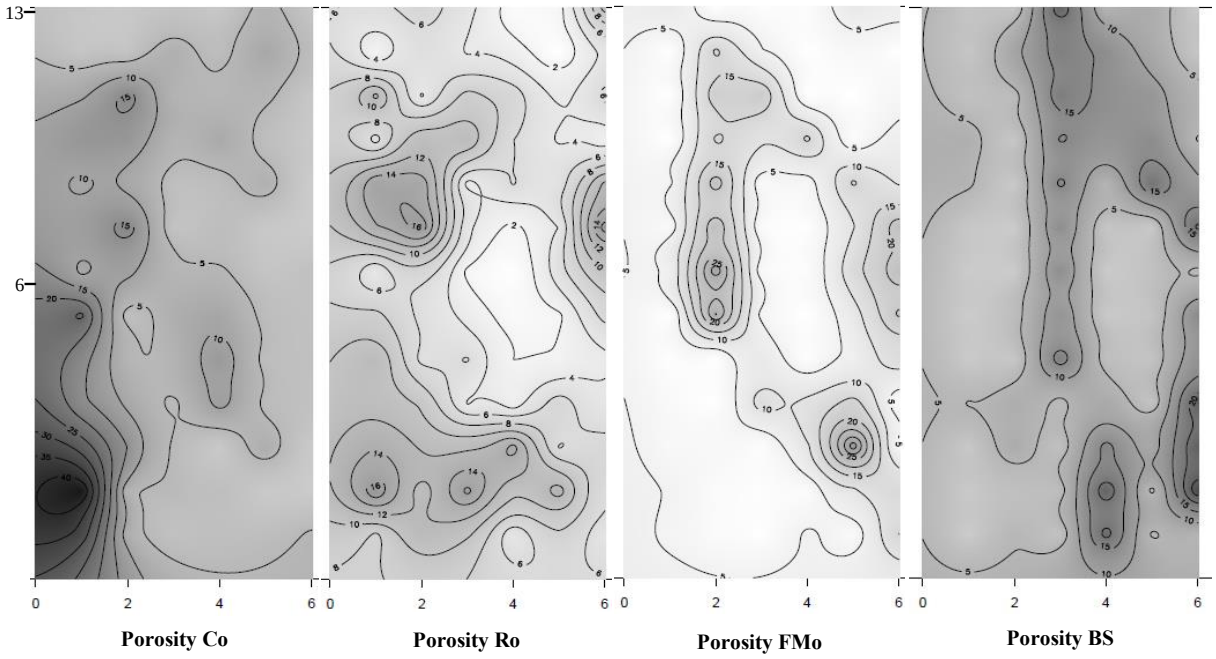


Figure 37 : Kriged maps of soil porosity (%). Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively

Soil pH varied from 5.60 to 6.92 (Table 2). It was higher in co-cropping and rotation systems than in other treatments. Similarly, these two cultural systems were characterized by a coefficient of variation (CV) of 3.30 and 3.15% respectively, which was higher than for FMo and BS. In addition, *Q* values, which indicated the spatial structure at the 2 cm^2 sampling grid, ranged between 0.71 to 0.91 and Ro cultural system was characterized by the greatest spatial structure of all the treatments. The co-cropping system had the widest range (8.15 cm) in comparison to all other treatments. Kriged maps of soil pH (Figure 38) showed zones with alkaline pH values in the lower part of the rhizoboxes in the case of Co and Ro (black zones) and acidified (white zone) in the lower left zone of the rhizobox in the case of BS.

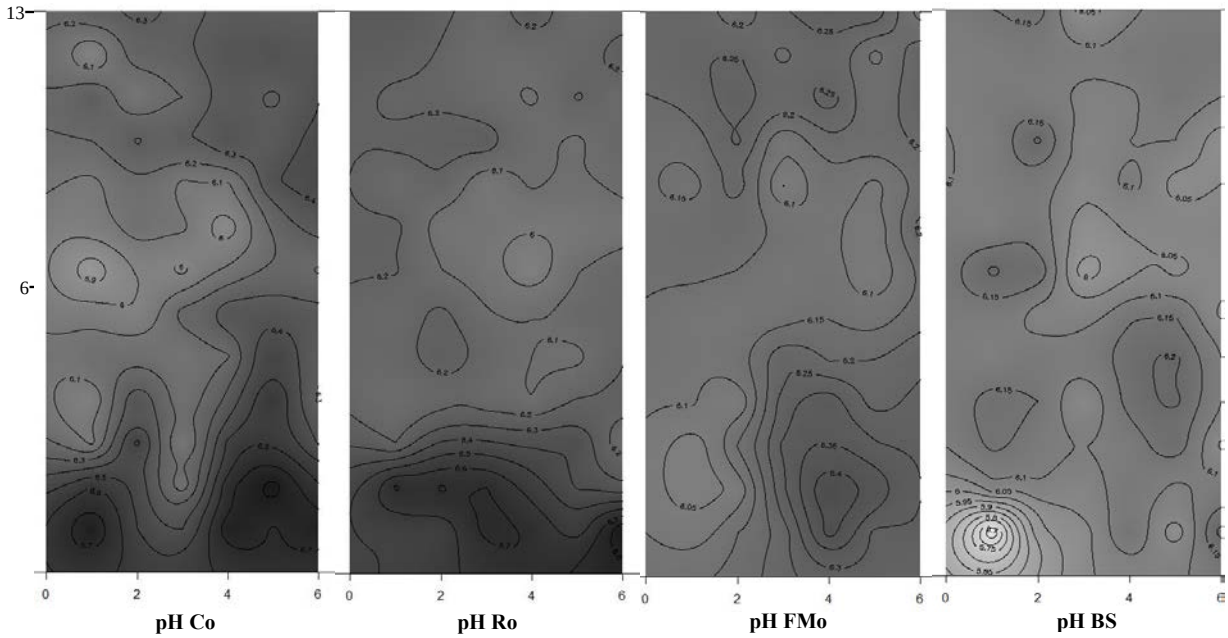


Figure 38 : Kriged maps of soil pH. Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively

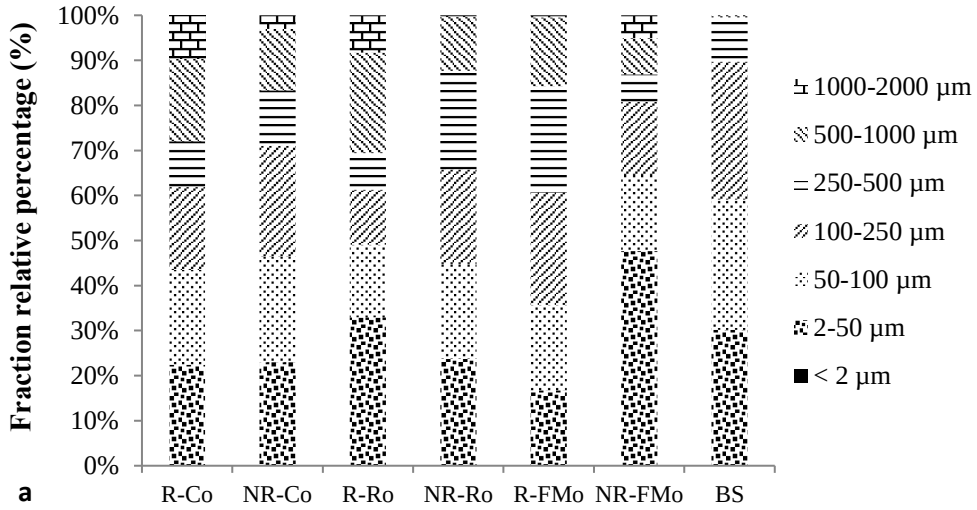
The Mantel test was carried out in order to test spatial auto-correlations between on the one hand, the map of RSA (that represents the plant roots, Figure 35) and on the other hand the soil pH (Figure 38), Ni-DTPA (Figure 36) and soil porosity (Figure 37) maps. Concerning the co-cropping treatment, positive significant auto-correlations were detected between the maps showing RSA and soil pH (R = 0.31) and soil Ni-DTPA (R = 0.27) concentrations at the level of $p<0.001$. No significant correlation was found between the RSA and porosity map in the case of co-cropping. As for the Ro treatment, strong positive auto-correlations linked the RSA to the soil pH map (R = 0.59 at $p<0.001$) and to the Ni-DTPA concentration map (R = 0.55 at $p<0.001$). In addition, the RSA map in the case of Ro treatment was positively auto-correlated to soil porosity map (R = 0.46 at $p<0.001$). Regarding the FMo treatment, the RSA was also positively auto-correlated to soil pH, Ni-DTPA concentration and soil porosity maps at varying magnitudes (R = 0.56 at $p<0.001$, R = 0.49 at $p<0.001$ and R = 0.19 at $p<0.01$ for soil pH, Ni-DTPA concentrations and soil porosity maps).

3.2.2. Grain size distribution and soil aggregation

Laser diffraction granulometry showed that before sonication, all planted treatments had higher percentages of soil coarse fractions (500-2000 µm) in comparison to the bulk soil (BS)

(Figure 39a). Overall, rhizosphere soils (R) had a higher coarse fraction percentage (500-2000 µm) than non-rhizosphere soils (NR), showing that the soil was much more aggregated in the root microenvironment (i.e. rhizosphere). In detail, rhizosphere soils from R-Co and R-Ro cultural systems showed the highest relative percentage of 500-2000 µm in comparison to R-FMo (27.98% and 30.57% in comparison to 15.57%). However, R-Co had a higher percentage of the fraction ranging from 1000 to 2000 µm in comparison to R-Ro, showing the best aggregation of all the treatments (9.5 in comparison to 8.26%). The non-rhizosphere soil NR-FMo had the highest percentage of the 2-50 µm fraction (47.66 %). However, it had a higher percentage of 1000-2000 µm fractions than NR-Co and NR-Ro (5.07% in comparison to 3.03 and 0.42%).

Sonication entailed a clear increase in fine particles percentages (<250 µm) for all the treatments (Figure 39b). A total disappearance of the 1000-2000 µm fractions was clearly observed for NR-Co, R-Ro, NR-Ro and BS. Nevertheless, rhizosphere soil from R-Co retained, even after sonication, a higher relative percentage of 1000-2000 µm fractions than R-FMo and NR-FMo (3.55% in comparison to 0.45 and 1.56%). In addition, after sonication, the 500-1000 µm fraction retained the highest relative percentage in the case of R-Co (19.26%). These relatively high percentages of 500-2000 µm fractions in the case of R-Co cropping system presented the best aggregates stability of all the treatments. In contrast, a lower but existing relative percentage of 500-1000 µm fractions was found in the cases of R-FMo, NR-FMo and R-Ro (7.54, 5.01 and 0.36%). NR-Co indicated the highest relative percentage of the <50 µm fraction (57.67%) when compared to other treatments and the bulk soil (BS), hence showing the lowest soil aggregate stability.



a

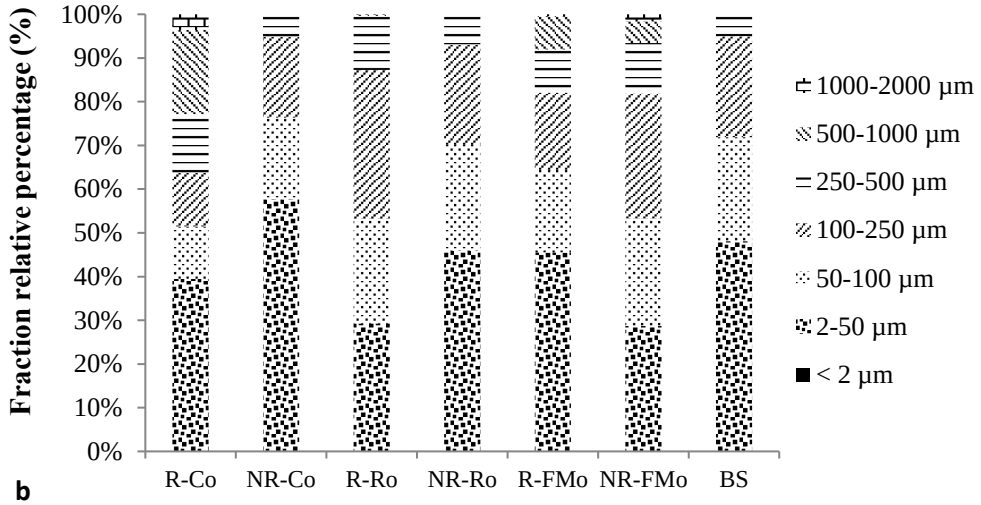


Figure 39 : Particle size distribution per treatment before (a) and after sonication (b). Co, Ro, FMo and BS correspond to the treatments of co-cropping, rotation, fertilized monoculture and bulk soil, respectively. R and NR refer to rhizosphere and non-rhizosphere soil samples, respectively

4. Discussion

Novel agro-ecological systems have been introduced by farmers for many decades, in order to break the monoculture cropping and to optimize ecosystem functions and services. By their efficient use of soil resources and nitrogen fixation from the air, the inclusion of legumes in rotation or co-cropping has provided nitrogen inputs in the cultivation system in addition to producing valuable yields (Lizarazo *et al.*, 2015). Soil organic matter is a key factor in developing and modifying soil structure through the organic bindings that contribute to assembling large and stable soil aggregates (Coleman *et al.*, 2004; Bot and Benites, 2005). Based on these results dedicated to traditional agricultural systems (wheat/legume; rape/legume), our objective was to characterize the impact of co-cropping or legume rotation (i.e. *V. sativa* var. Prontivesa) and the hyperaccumulator plant *A. murale* on soil characteristics and to investigate in particular whether these cropping systems could enhance the physicochemical characteristics of ultramafic soil, the biomass of the hyperaccumulator plant and at least, Ni phytoextraction.

A. murale is the Ni-hyperaccumulator plant that has received the most attention due to its extraordinary ability to extract and accumulate Ni from soils in its tissues (Shallari *et al.*, 1998; Shallari *et al.*, 2001). Because of this ability to extract considerable quantities of metals from soils, this hyperaccumulator plant has aroused scientists' interest studying agromining. Indeed, *A. murale*, widely present in ultramafic areas, is able to colonize serpentine soils and accumulate Ni to up to more than 2% of its dry weight (Abou Shanab *et al.*, 2008). These

serpentine soils typically present a low-fertility which can limit the growth of some hyperaccumulator plants, such as *A. murale*, and therefore their use in phytoextraction. There was a significant increase in the biomass of *A. murale* from 3.2 t ha^{-1} in unfertilized plots to 6.3 t ha^{-1} in the fertilized treatment (Bani *et al.*, 2007, 2013, 2015a). However, significant N applications could lead to excessive N leaching. Thus, split N applications could be employed to minimize this risk. Another strategy would be to use legumes in association with a hyperaccumulator plant as a nitrogen provider in order to optimize Ni agromining and to reduce nitrate leaching in ground- and surface-waters (Saad *et al.*, 2016). In our study, *A. murale* was cropped with *V. sativa*. Despite the successful growth of *Lens culinaris* in a previous study on an artificially Ni-contaminated soil (functional nodules able to fix nitrogen from the air) (Saad *et al.*, 2016), here, we chose *V. sativa* var. Prontivesa for its better performance when planted directly in the naturally Ni-rich ultramafic soil (unpublished results).

Alyssum when co-cropped with *V. sativa* (Co cultural system) had the highest values of the all plant parameters measured in comparison to rotation and fertilized mono-culture. *A. murale* co-cropped with the legume had a 48.50% and 97.00% shoot biomass augmentation in comparison to FMo and Ro. Same effect was showed for root dry biomass. Based on legumes and cereal co-cropping systems, many studies have shown an increase in the N utilization process by both species (Fujita *et al.*, 1992; Ofosu-Budu *et al.*, 1995), thereby producing better biomass of a higher quality (Li *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2010). Nitrogen content in the shoots and roots of *A. murale* in co-cropping was improved compared to other treatments. Nitrogen is known to be the most crucial element for optimum crop yield and grain quality in agriculture (Harker *et al.*, 2012), and as with other *Brassicaceae*, such as rape, *A. murale* requires high levels of nitrogen to produce optimal biomass (Simonin 2017). For example, Bani *et al.* (2015a) showed a great increase in the biomass and Ni yields of *A. murale* when it was fertilized with 120 kg N per hectare. In nitrogen-restrictive soils, such as ultramafic ones, associating *Rhizobium* to legumes has the capacity to fix nitrogen gas from the air into ammonia (Postgate, 1998). In addition, soil fertility and water absorption are enhanced by the growth of beneficial soil microorganisms (St. Luce *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2015). In our study, there was a clearly significant effect of the co-cropping system on root N content of *A. murale*.

A. murale' root C in the co-cropping treatment was enhanced and this is evidently due to the better nutritive state of this hyperaccumulator plant. Many studies have shown the increased N utilization by cereals when co-cropped with legumes, due to the nitrogenous

compounds released from decomposition of legume residues. This resulted in better nutrient uptake, root and shoot biomass productivity and crop quality (Akhtar *et al.*, 2010).

Concerning Ni yields, *A. murale*, when co-cropped with the legume, showed more than 30% and 43% more Ni accumulation in its shoots than under the FMo and Ro regimes. Normally, increased biomass production is positively related to greater amounts of metal accumulated by the hyperaccumulator plants (Echevarria *et al.*, 1998; Bani *et al.*, 2015a; Álvarez-López *et al.*, 2016). Furthermore, root exudates differing from one plant species to other, one can select different rhizosphere microorganisms and consequently enrich microbial diversity in the soil that can solubilize many more minerals, thereby liberating more metals in the soil (Sessitsch *et al.*, 2013). In the same way, Li *et al.* (2009b) tested the use of high biomass plants that are usually not metal-specific and contain low to moderate heavy metal concentrations, in co-planting (i.e., intercropping) systems. In their experiment focusing on cadmium, maize was chosen as the main crop and the intercropped plants were different legumes such as cowpea, purple bean, chickpea or alfalfa. Our results concur with their observations: purple bean and alfalfa intercrops significantly increased Cd concentration of maize root in comparison to maize with non-legumes and maize alone. These results might be partly attributed to the beneficial effect of nitrogen fixation by legumes, which could also explain the fact that *A. murale* in rotation with the legume also accumulated more than 11% of Ni in its roots in comparison to FMo. Other studies suggested that root interactions between the co-existing crops could induce significant increases in metal accumulation. Indeed, plants can only absorb metals, such as Ni, in the exchangeable form, which usually constitutes a small portion of the total Ni content in soils. However, in the rhizosphere, there are two factors that could increase the exchangeable form of Ni. One is the presence of low molecular weight organic acids, whose soluble form complexes with Ni, thus releasing Ni from the soil matrix. The other is attributed to the low soil pH values which desorbs the Ni from absorbed forms in soils. Legumes are well known to reduce pH values, because these plants exude large quantities of H^+ during the process of nitrogen fixation. Consequently, localized soil acidification occurs when crops are co-planted with legumes (Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012). In our study, these results cannot be observed because the legume was harvested and incorporated into the soil. Thus, the legume residues were in a decomposition phase, inducing a tendency to increase soil pH (Yan *et al.*, 1996).

A. murale, in the co-cropping system, showed the highest values of root length, total root surface area, root forks and tips which are related to the biomass augmentation and high C and N contents, especially in the roots. Legume presence in standard cropping systems is

known to induce a positive effect on root development and to improve nutrient availability by releasing organic acids (Rochester *et al.*, 2001a). The simultaneous presence of *A. murale* and the legume created a spatial complementarity between the two species as seen in standard agriculture with rape (Jamont *et al.*, 2013). The fact that the species have contrasting root architectures, leads to a deeper exploration of soil profile of the rhizoboxes, as observed by several authors (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014). When maize is co-cropped with Faba bean, the compatibility of the two root systems facilitated the deep soil exploitation by the maize roots, resulting in an increased root length, area and ramifications. This fact allowed the maize roots to optimally prospect the soil and hence to access additional resources (Li *et al.*, 2006).

Kriged maps of the root surface area percentage showed different spatial distributions between the treatments where the legume was present and FMo. In addition, the widest variation and best spatial structure was found in the case of co-cropping. Indeed, *A. murale* in the co-cropping system had almost the highest values of all plant parameters and especially the root architecture parameters. So, an enhanced development of *A. murale*' shoot and root was revealed by a maximum root surface area percentage on the glass side. In addition, strong positive correlations were found between the kriged maps of root surface area percentage and pH, Ni-DTPA and porosity maps, based on Mantel test. Legume presence in cropping systems has a positive impact on roots development and their ability to improve nutrient availability (Rochester *et al.*, 2001a). Indeed, the enhanced biomass of *A. murale* in co-cropping system with the legume can be explained by two propositions. Firstly, after harvesting and burying the aerial part of companion plant (i.e. the legume), the residue's mineralization was a compensating N source for the hyperaccumulator plant. Furthermore, the decomposition of legume residues in the first centimeters of topsoil was found to be very fast and especially in the case of *Fabaceae* plants (Coppens *et al.*, 2007; Redin *et al.*, 2014). Moreover, legumes were found to improve the organic matter mineralization already present in the soil (Kuzyakov, 2010). Secondly, in the case of co-cropping with legumes, an enhanced root development of companion plants was detected through a better horizontal distribution (ramifications) and an improved root length in the soil (Schröder and Köpke, 2012).

The facilitation process for the companion plant of the legume, i.e. *A. murale*, modifies the soil microenvironment in a positive way that is beneficial to the companion plant (Juste, 2014). It is postulated that the increased yield potential of the companion plant was largely due to changes in soil's physical and chemical fertility (apart from improved soil N fertility) through legume cropping, as reported by many authors (Breitenbeck *et al.*, 1994;

Rochester *et al.*, 2005). Indeed, it has been shown that legumes, when introduced to cropping systems, improve soil quality, increase its porosity, decrease its bulk density, increase the stability of aggregates and decrease the resistance to penetration of the roots and thus allow a better soil exploration (Rochester *et al.*, 2001a). In our study, increased soil macropores percentages were found especially in Kriged co-cropping maps. The legume used in this study seemed to help overcome physical constraints to *A. murale* root development, either by improving soil structure or by increasing infiltration rates or enhancing water-stable aggregates as shown by McVay *et al.* (1989) and Rochester *et al.* (2001a)

It is recognized that soil pH is a strategic factor that influences Ni extraction by *A. murale* (Chaney *et al.*, 2008). Kriged maps of soil pH and Ni-DTPA concentrations have been found to be different for treatments of co-cropping and rotation in comparison to fertilized mono-culture and the bulk soil. In our study, no beneficial improvements were found owing to these two factors, whether on the biomass production, or the C and N content and Ni accumulated in the case of the rotation. However, a clear positive effect of legume association on the plant parameters was demonstrated when *A. murale* was co-cropped with the legume. In contradiction to what is known about legumes, soil pH was found to increase in the treatments where the legume shoots were incorporated (i.e. co-cropping and rotation) and this was revealed by the Kriged maps of soil pH where darker zones were present in the lower parts of the rhizoboxes. In fact, changes in the soil pH of cultural systems where the legumes are associated differ between the growth stage and that of the residue's decomposition. During their vegetative growth, legumes reduce the soil pH due to a release of organic compounds and nitrogen fixation process. However, when legumes are returned to the soil (i.e. incorporated), organic anions, that are more greatly concentrated in older leaves, such as malate and citrate, and amino acids, such as glycine, were found to increase soil pH during their decomposition process (Yan *et al.*, 1996). Thus, increased pH in the co-cropping and rotation treatments might be related to organic nitrogen decomposition in legume residues (shoot residues) after being incorporated into the soil. In addition, an equivalent and parallel effect of decarboxylation and ammonification might be responsible for pH increase during amino acid decomposition (Gonzalez-Prieto *et al.*, 1991). The carboxylic group of amino acids was found to be deprotonated at a pH of around 6. Hence, the increase in soil pH might also be caused by the decarboxylation of the deprotonated carboxylic group that could consume protons present in the soil solution (Michael *et al.*, 1965). Moreover, an ammonification of deprotonated amino groups consumes soil protons and thus increases soil pH (Yan *et al.*, 1996). Normally, at the end of the residue's decomposition, soil pH was found

to re-decrease due the nitrification process that releases H^+ in the soil (Yan *et al.*, 1996). In our study, we did not reach the end of the decomposition of legume residues that we found, as some were not entirely mineralized at harvest and this fact explains why they were still at the increased pH stage.

Metal accumulation can be enhanced by an acidified soil pH that raises metals bioavailability and thus, their uptake by the hyperaccumulator plant (Brown *et al.*, 1994). Contrary to other metals, Ni was found to be more accumulated by plants when soil pH increases (Li *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2015). In our study, conditions were more advantageous for Ni uptake in the case of co-cropped and rotated *A. murale* with the legume, where the pH increased to 6.83 and 6.92. Our results confirm these previous studies that found an increased Ni content in plants with higher pH (Peters *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Kukier *et al.*, 2004). For example, *A. murale* and *A. corsicum* were found to accumulate less Ni in the shoots when the soil pH was acidified by 0.5 to 1 pH units (Li *et al.*, 2003). Therefore, even though the pool of bioavailable Ni decreased with rising pH, biomass and Ni, yields were improved (Peters *et al.*, 2000). This fact is related to the increased activity of transmembrane Ni^{2+} transporter that is optimal in neutral pH (around 7.5) rather than in acid pH (Sheoran *et al.*, 2016). It is important to note that the available and unavailable Ni-pools are always in a state of equilibrium (Wei and Zhou, 2004).

Other non-nutritional benefits provided by legumes include the enhancement of soil structure. We found that the percentage of large soil particles (500-2000 µm) was the highest in the case of co-cropping rhizosphere soils in comparison to the other treatments. In addition, after sonicating soil samples, a remarkable stability of the 1000-2000 µm fraction was found in the rhizosphere soil of co-cropped *A. murale*. These results confirm the legume effect in co-cropping on the size and stability of aggregates in the soil (Chu *et al.*, 2016). Certainly, aggregation is the process by which inorganic particles and organic are assembled (rearranged) in order to maintain stability within the soil (Amezketa, 1999). This process leads to the formation of aggregates which corresponds to natural particles that organize the soil macroporosity (Bechet *et al.*, 2009). This fact contributes to a better soil aggregation when the root systems of both species explored the rhizoboxes profiles. In addition, the organic matter derived from the incorporated shoot residues and root decomposition played a crucial role in modifying soil structure, as shown in standard agricultural systems based on co-cropping (Coleman *et al.*, 2004). Organic bindings are found to be stronger and much more stable than inorganic ones contributing to greater aggregate stability in almost all soil types

(Bot and Benites, 2005). A well-stabilized soil aggregate is the most important factor in limiting soil compaction (Bot and Benites, 2005).

5. Conclusions

This study showed that the introduction of a legume into Ni agromining systems can improve yields of dry biomass of the hyperaccumulator plant used and consequently, the yields of Ni. Our strategy can decrease the need to apply fertilizers and thus minimizes the risk of nitrogen leaching and underground water pollution. Co-cropping of *A. murale* with the legume enhanced Ni phytoextraction and plant biomass in comparison to fertilized mono-culture. In addition, co-cropping improved soil physical characteristics and soil structure through larger and more stabilized aggregates. It is therefore reasonable to conclude that the use of legumes in Ni-agromining systems could be a good strategy to reduce chemical inputs and to restore soil agricultural functions. Improving the agromining system by the replacement of inorganic fertilizers can simultaneously be a safe way of rehabilitating degraded soils and a method to restore soil quality and functions leading to the recovery of ecosystem services. Our upcoming work will be to conduct the co-cropping system at a large field scale in the ultramafic zone of Melide (Spain) from where we brought the serpentine soil.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the technical team of “Laboratoire Sols et Environnement” and especially Mr. Lucas Charrois, Mr. Romain Goudon, Mr. Stéphane Colin and Mr. Alain Rakoto for their help and support. We are thankful for the technical assistance of the joint research unit INRA of Champenoux, UMR 1092 AgroParisTech INRA Laboratoire d'Etude des ressources FOrêt Bois "LERFoB" Plate-forme Technique Xylosciences and especially Mrs. Charline Freyburger for the X-ray analysis. We are thankful for the technical assistance of the joint research unit Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Santiago de Compostella, Spain) and especially the “Soil Microbiology Group” represented by Dr. Petra Kidd. We would like to thank also Dr. Ali Kanso for his support in the laser diffraction granulometry analyses. This work was supported by the French National Research Agency through the national “Investissements d’avenir” program, reference ANR-10-LABX-21 - LABEX RESSOURCES21 and through the ANR-14-CE04-0005 project “Agromine”. Finally, we are thankful to the Association of Specialization and Scientific Guidance (ASSG, Lebanon) for funding the PhD scholarship of Ramez Saad.

References

Abou Shanab, R.I., Delorme, T.A., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghane, K., Moawad, H., Ghozlan, H.A., 2003. Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. International Journal of Phytoremediation 5, 367-379. doi: 10.1080/15226510309359043

Akhtar, M., Yaqub, M., Iqbal, Z., Ashraf, M.Y., Akhter, J., Hussain, F., 2010. Improvement in yield and nutrient uptake by co-cropping of wheat and chickpea. Pakistan Journal of Botany 42, 4043-4049

Alamgir, M., McNeill, A., Tang, C., Marschner, P., 2012. Changes in soil P pools during legume residue decomposition. Soil Biology and Biochemistry 49, 70-77

Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, Á., Cabello-Conejo, M.I., Kidd, P., 2016. Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. Science of Total Environment 548-549, 370-379. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.147

Amezketa, E., 1999. Soil aggregate stability: A review. Journal of Sustainable Agriculture 14, 83-151

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). Plant and Soil 293, 79-89. doi: 10.1007/s11104-007-9245-1

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L. 2015a. Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. International Journal of Phytoremediation 17, 117-127. doi: 10.1080/15226514.2013.862204

Bani, A., Echevarria, G., Zhang, X., Benizri, E., Laubie, B., Morel, J.L., Simonnot, M-O., 2015b. The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with Alyssum murale in Albania. Australian Journal of Botany 63, 72-77

Bani, A., Imeri, A., Echevarria, G., Pavlova, D., Reeves, R.D., Morel, J.L., Sulçe, S., 2013. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. Fresenius Environmental Bulletin 22, 1792-1801

Barbaroux, R., Mercier, G., Blais, J.F., Morel, J.L., and Simonnot, M.O., 2011. A new method for obtaining nickel metal from the hyperaccumulator plant *Alyssum murale*. Separation and Purification Technology. 83, 57-65,

Bechet, B., Carré, F., Florentin, L., Leyval, C., Montanarella, L., Morel, J.L., Raimbault, G., Rodriguez, F., Rossignol, J.P., Schwartz, C., 2009. Caractéristiques et fonctionnement des sols urbains. In Cheverry, C., Gascuel, C. M. (Eds),"sous les pavés, la terre", Omniscience, pp. 45-77

Bédoussac, L., Justes, E., 2010a. Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. Plant and Soil 330, 37-54

Bohren, C.F., Huffman, D.R., 2008. Absorption and scattering of light by small particles. John Wiley and Sons 544 pp

Bot, A., Benites, J., 2005. The importance of soil organic matter key to drought-resistant soil and sustained crop production. FAO soils bulletin 80 pp

Breitenbeck, G.A., Hutchinson, R.L., Boquet, D.J., 1994. Nitrogen status of cotton following winter cover crops. Proceedings - Beltwide Cotton Conferences, San Diego, CA, USA. pp. 1505-1507. National Cotton Council, Memphis, USA

Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1994. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and Bladder Campion for Zinc- and Cadmium-contaminated soil. Journal of Environmental Quality 23, 1151-1157. doi:10.2134/jeq1994.00472425002300060004x

Brown, R.B., 1998. Soil Texture, Soil and Water Science. Fact Sheet SL-29, Department, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida

Chaney, R.L., Chen, K.Y., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 2008. Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. Plant and Soil 311, 131-140. doi: 10.1007/s11104-008-9664-7

Chu, J., Zhang, T., Chang, W., Zhang, D., Zulfiqar, S., Fu, A., Hao, Y., 2016 Impacts of cropping systems on aggregates associated organic carbon and nitrogen in a semiarid highland agroecosystem. Public Library of Science one 11, e0165018. doi: 10.1371/journal.pone.0165018

Coleman, D.C., Crossley, D.A., Hendrix, P.F., 2004. Fundamentals of Soil Ecology, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam–Boston, 386 pp

Constantin, J., Beaudoin, N., Launay, M., Duval, J., Mary, B., 2012. Long-term nitrogen dynamics in various catch crop scenarios: Test and simulations with STICS model in a temperate climate. Agriculture, Ecosystems and Environment 147, 36-46. doi: 10.1016/j.agee.2011.06.006

Coppens, F., Garnier, P., Findeling, A., Merckx, R., Recous, S., 2007. Decomposition of mulched versus incorporated crop residues: modelling with PASTIS clarifies interactions between residue quality and location. Soil Biology and Biochemistry 39, 2339-2350

Corre-Hellou, G., Brisson, N., Launay, M., Fustec, J., Crozat, Y., 2007. Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea–barley intercrops given different soil nitrogen supplies. Field Crops Research 103, 76-85. doi: 10.1016/j.fcr.2007.04.008

Corre-Hellou, G., Fustec, J., Crozat, Y., 2006a. Interspecific competition for soil N and its interaction with N_2 fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. Plant and Soil 282, 195-208

Dray, S., Dufour, A.B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. Journal of Statistical Software 22, 1-20

Echevarria, G., Morel, J.L., Fardeau, J.C., Leclerc-Cessac, E., 1998. Assessment of phytoavailability of nickel in soils. Journal of Environmental Quality 27, 1064-1070

Fornara, D.A., Tilman, D., 2008. Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. Journal of Ecology 96, 314-322

Fujita, K., Ofosu-Budu, K.G., Ogata, S., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. Plant and Soil 141, 155-175

Gonzalez-Prieto, S.J., Carballas, M., Carballas, T., 1991. Mineralization of a nitrogen-bearing organic sustrate model ^{14}C, ^{15}N-glycine in two acid soils. Soil Biology and Biochemistry 23, 53-63

Görres, J.H., Dichiaro, M.J., Lyons, J.B., Amador, J.A., 1998. Spatial and temporal patterns of soil biological activity in a forest and an old field. Soil Biology and Biochemistry 30, 219-230

Gregorich, E.G., Drury, C.F., Baldock, J.A., 2001. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. Canadian Journal of Soil Science 81, 21-31

Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Turkington, T.K., Blackshaw, R.E., Lupwayi, N.Z., Smith E.G., Klein-Gebbinck, H., Dosdall, L.M., Hall, L.M., Willenborg, C.J., Kutcher, H.R., Malhi, S.S., Vera, C.L., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Grant, C.A., McLaren, D.L., 2012. High-yield no-till canola production on the Canadian prairies. Canadian Journal of Soil Science 92, 221-233. doi: 10.4141/cjps2011-125

Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., Zhang, F., 2011. P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. Plant Physiology 156, 1078-1086. doi: 10.1104/pp.111.175331

Jamont, M., Piva, G., Fustec, J., 2013. Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? Plant and Soil 371, 641-653

Jiang, C.A., Wu, Q.T., Goudon, R., Echevarria, G., Morel, J.L., 2015. Biomass and metal yield of co-cropped *Alyssum murale* and *Lupinus albus.* Australian Journal of Botany 63, 159-166. doi: 10.1071/BT14261

Justes, E., Bedoussac, L., Corre-Hellou, G., Fustec, J., Hinsinger, P., Journet, E-P., Louarn, G., Naudin, C., Pelzer, E., 2014. La complémentarité pour l'acquisition des ressources abiotiques dans les associations végétales : quels processus déterminent leur fonctionnement ? Innovations Agronomiques 40

Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J-O., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M., 2015. Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. International Journal of Phytoremediation 17, 1005-1037. doi: 10.1080/15226514.2014.1003788

Kukier, U., Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S., Roseberg, R.J., 2004. The effect of pH on metal accumulation in two *Alyssum* species. Journal of Environmental Quality 33, 2090-2102

Kuo, S., Sainju, U.M., Jellum, E.J., 1997. Winter cover crop effects on soil organic carbon and carbohydrate in soil. Soil Science Society of America Journal 61, 145-152. doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100010022x

Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. Soil Biology and Biochemistry 42, 1363-1371. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.04.003

Li, L., Li, S.M., Sun, J.H., Zhou, L.L., Bao, X.G., 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 11192-11196

Li, L., Sun, J., Zhang, F., Guo, T., Bao, X., Smith, F.A., Smith, S.E., 2006. Root distribution and interactions between intercropped species. Oecologia 147, 280-290

Li, L., Sun, J., Zhang, F., Li, X., Rengel, Z., Yang, S., 2001. Wheat/maize or wheat/soybean strip intercropping: II. Recovery or compensation of maize and soybean after wheat harvesting. Field Crops Research 71, 173-181

Li, N.Y., Li, Z.A., Zhuang, P., Zhou, B., McBride, M., 2009b. Cadmium uptake from soil by maize with intercrops. Water, Air, and Soil Pollution 199, 45-56

Li, Y.M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Nelkin, J., 2003. Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel contaminated soils. Environmental Science and Technology 37, 1463-1468

Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal 42, 421-428. doi:10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x

Liu, L., Zhang, Q., Hu, L., Tang, J., Xu, L., Yang, X., Yong, J.W.H., Chen, X., 2012. Legumes can increase cadmium contamination in neighboring crops. Public Library of Science one 7, e42944

Lizarazo, C.I., Yli-Halla, M., Stoddard, F.L., 2015. Pre-crop effects on the nutrient composition and utilization efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) and narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 311-327. doi: 10.1007/s10705-015-9743-0

Ma,Y., Rajkumar, M., Freitas, H., 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica spp*. Chemosphere 75, 719-725

McVay, K.A., Radcliffe, D.E., Hargrove, W.L., 1989. Winter legume effects on soil properties and nitrogen fertiliser requirement. Soil Science Society of America Journal 53, 1856-1862

Michael, G., Schumacher, H., Marschner, H., 1965. Aufnahme von Ammonium- und Nitratstickstoff aus markiertem ammoniumnitrat und deren verteilung in der pflanze. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 110, 225-238. doi: 10.1002/jpln.19651100308

Mie, G., 1908. Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. Annals of Physics, Leipzig, 25, 377-445

Minasny, B., McBratney, A.B., 2001. The Australian soil texture boomerang: a comparison of the Australian and USDA/FAO soil particlesize classification systems. Australian Journal of Soil Research 39, 1443-1451

Morel, J.L., 2013. Using plants to “micro-mine” metals. In: http://www.inra.fr/en/Scientists-Students/Biomass/All-the-news/Using-plants-to-micro-mine-metals

Ofosu-Budu, K.G., Noumura, K., Fujita, K., 1995. Nitrogen fixation, N transfer and biomass production of soybean cv. bragg or its super-nodulating NTS-1007 and sorghum mixing-cropping at two rates of N fertilizer. Soil Biology and Biochemistry 27, 311-317

Paulo, J., Ribeiro, J.R., Diggle, P.J., 2016. geoR: Analysis of Geostatistical Data. R package version 1.7-5.2. http://CRAN.R-project.org/package=geoR

Pelzer, E., Bazot, M., Makowski, D., Corre-Hellou, G., Naudin, C., Al Rifaï, M., Baranger, E., Bedoussac, L., Biarnès, V., Boucheny, P., Carrouée, B., Dorvillez, D., Foissy, D., Gaillard, B., Guichard, L., Mansard, M-C., Omon, B., Prieur, L., Yvergniaux, M., Justes, E., Jeuffroy, M.H., 2012. Pea–wheat intercrops in low-input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. European Journal of Agronomy 40, 39-53

Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S., Roseberg, R.J., 2000. Effect of the pH of pH-buffered nutrient solutions on Ni accumulation by hyperaccumulator species p. 50. In 2000 Agronomy abstracts. ASA, Madison, WI

Postgate, J., 1998. Nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 112 pp

Redin, M., Recous, S., Aita, C., Dietrich, G., Skolaude, A.C., Ludke, W.H., Schmatz, R., Giacomini, S.J., 2014. How the chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. Soil Biology and Biochemistry 78, 65-75

Rengel, Z., Damon, P.M., 2008. Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. Plant Physiology 133, 624-636

Rochester, I., Peoples, M., 2005. Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: inputs of fixed N, N fertiliser savings and cotton productivity. Plant and Soil 271, 251-264

Rochester, I.J., Peoples, M.B., Hulugalle, N.R., Gault, R.R., Constable, G.A., 2001a. Using legumes to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. Field Crops Research 70, 27-41

Saad, R., Kobaissi, A., Robin, C., Echevarria, G., Benizri, E., 2016. Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining. Environmental and Experimental Botany 131, 1-9. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.06.010

Schröder, D., Köpke, U., 2012. Faba bean (*Vicia faba* L.) intercropped with oil crops – a strategy to enhance rooting density and to optimize nitrogen use and grain production? Field Crops Research 135, 74-81

Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 60, 182-194. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.01.012

Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J.L., 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. Science of the Total Environment 209, 133-142

Shallari, S., Echevarria, G., Schwartz, C., Morel, J.L., 2001. Availability of nickel in soils for the hyperaccumulator *Alyssum murale* (Waldst. & Kit.). South African Journal of Science 97, 568-570

Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2016. Factors Affecting Phytoextraction: A Review. Pedosphere 26, 148-166. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60032-7

Simonin, P., 2017. Observation des pratiques de fertilisation azotée par un outil d'aide à la décision pour le colza. Oilseeds and fats, Crops and Lipids 24, D105. doi: 10.1051/ocl/2016056

Sutton, M.A., Oenema, O., Erisman, J.W., Leip, A., van Grinsven, H., Winiwarter, W., 2011. Too much of a good thing. Nature 472, 159-162

St. Luce, M., Grant, C.A., Zebarth, B.J., Ziadi, N., O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., Harker, K.N., Johnson, E.N., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Khakbazan, M., Smith, E.G., 2015. Legumes can reduce economic optimum nitrogen rates and increase yields in a wheat-canola cropping sequence in western Canada. Field Crops Research 179, 12-25. doi: 10.1016/j.fcr.2015.04.003

Stevenson, F.C., van Kessel, C., 1996. The nitrogen and non-nitrogen rotation benefits of pea to succeeding crops. Canadian Journal of Plant Science 76, 735-745

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W.N., Meech, J.A., Erskine, P.D., Simonnot, M.O., Vaughan, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q., Mulligan, D.R., 2015a. Agromining: farming for metals in the future? Environmental Science and Technology 49, 4773-4780. doi: 10.1021/es506031u

Wei, S.H., Zhou, Q.X., 2004. Identification of weed species with hyperaccumulative characteristics of heavy metals. Progress in Natural Science 14, 495-503

Yan, E., Schubert, S., Mengel, K., 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. Soil Biology and Biochemistry 28, 617-624

Zhang, C.C., Postma, J.A., York, L.M., Lynch, J.P., 2014. Root foraging elicits niche complementarity-dependent yield advantage in the ancient 'three sisters' (maize/bean/squash) polyculture. Annals of Botany-London 114, 1719-1733

Zhang, X., Houzelot, V., Bani, A., Morel, J.L., Echevarria, G., Simonnot, M.O., 2014. Selection and combustion of Ni-hyperaccumulators for the phytomining process. International. Journal of Phytoremediation 16, 1058-1072. doi: 10.1080/15226514.2013.810585

Zhao, J., Zeng, Z., He, X., Chen, H., Wang, K., 2015. Effects of monoculture and mixed culture of grass and legume forage species on soil microbial community structure under different levels of nitrogen fertilization. European Journal of Soil Biology 68, 61-68

Points marquants de l’étude

- Aucune étude antérieure n'avait testé l'effet de l'introduction d’une légumineuse sur les caractéristiques physico-chimiques d'un sol serpentinique et sur l'architecture du système racinaire de *Alyssum murale*.

- *Alyssum murale* associée à une légumineuse produit une biomasse plus importante et permet l’obtention de meilleurs rendements en nickel, par rapport aux autres systèmes culturaux testés.

- La co-culture est à l’origine d’une amélioration des caractéristiques physiques du sol, avec en particulier, une plus grande taille des particules du sol et une meilleure stabilité des agrégats.

- Les approches de géostatistiques ont mis en évidence une meilleure répartition spatiale de la surface des racines, dans le cas de la co-culture.

- L'introduction de légumineuses dans un système cultural dédié à l’agromine permettrait de s’affranchir des intrants chimiques et favoriserait les fonctions du sol.

Chapitre 5b. Improving the structure and the biofunctioning of an ultramafic soil with agro-ecological agromining

Ramez F. Saad [a, b, c] . Ahmad Kobaissi [c] . Gaylord Machinet [d]. Geneviève Villemin [d] . Guillaume Echevarria [a, b] . Emile Benizri [a, b, *]

[a] Université de Lorraine, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[b] INRA, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[c] Université Libanaise, Laboratoire « Applied Plant Biotechnology », Faculté des Sciences 1, Beyrouth, Lebanon.

[d] Université de Lorraine, Microhumus, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[*]Corresponding author, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33(0)383595848, Fax: +33(0)383595791, emile.benizri@univ-lorraine.fr

Abstract

The objective of agromining is to phytoextract heavy metals using hyperaccumulators while rehabilitating ultramafic soils. After the removal of bioavailable metal, ultramafic soils are improved in terms of agronomic properties in the aim of future agricultural uses. The low fertility of ultramafic soils can be compensated by integrating legumes already used in traditional agro-systems because of their importance in soil nitrogen enrichment. However, rare studies have evaluated the potential profits of legumes on nickel (Ni) agromining, and nothing is known on the potential benefits of such co-cropping on soil biological fertility. Here, we characterized the effect of the crop rotation of two plants: a legume (*Vicia sativa*) and a hyperaccumulator (*Alyssum murale*), on the efficiency of phytoextraction and on soil structure and biofunctioning. A pot experiment was set up in controlled conditions to grow *A. murale* and four treatments were tested: rotation with *V. sativa* (*Ro*), fertilized mono-culture (*FMo*), non-fertilized mono-culture (*NFMo*) and bare soil without plants (*BS*). No significant difference was found between *Ro* and *NFMo* treatments for the dry biomass. However, *Ro* treatment showed highest Ni concentrations ([Ni]) in *A. murale* shoots compared to *FMo* and

NFMo. *Ro* treatment had more than twice as much leaves [Ni] compared to *FMo*. Soil physico-chemical analyses showed that *Ro* treatment was better structured and showed the highest presence of bacterial micro-aggregates as well as less non-aggregated particles. The integration of legumes in Ni-agromining systems could be a pioneering strategy to reduce chemical inputs and to improve soil biofunctioning and thus fertility.

Keywords Nickel · *Alyssum murale* · Legume · Soil fertility · Soil fractionation · Ultrastructural characterization · Agromining · Crop rotation

1. Introduction

Fixing nitrogen from the air, an alternative nitrogen source for the legumes, is the reason why they were largely used into agricultural cropping systems for decades. Indeed, by introducing the legumes in cropping systems, farmers aim to improve plant nutrition. Legumes can enhance soil fertility by increasing the nitrogen income and storage (Zahran, 2001). Legumes also enhance soil organic matter as well as the activity and diversity of microbial communities (Hinsinger *et al.*, 2011). Another benefit of using the legume in agriculture is the reduction of chemical inputs (Justes *et al.*, 2014). In fact, the introduction of legumes in cropping systems lowers the occurrence of plant diseases due to the interruption of insect and pathogen cycles. Thus, the application of insecticides is limited (Sieverding and Leihner, 1984; Stevenson and Kessel, 1996; Karpenstein-Machan and Stuelpnagel, 2000; Rodrigues *et al.*, 2015). In addition, legume cover prevents weeds from invading agricultural fields and thus application of herbicide is also reduced. Furthermore, the introduction of legumes in agricultural systems has shown to prevent erosion and diminish soil compaction thanks to a good soil structure and aeration (Rodrigues *et al.*, 2015). Legumes can be used in cropping systems in either succession (rotation) or simultaneous co-cropping. Crop rotation involves growing different crops in recurring sequence on the same unit of land, in contrast to the monoculture. Rotation can involve crop sequences extending over several years or compressed within a single year. Moreover, rotation can also involve the use of non-harvested crop grown for soil improvement, such as green manure. Consequently, incorporated legume residues into the soil in the crop rotation system transform into a kind of organic matter that can be less affected by biological degradation. This contributes to maintain the carbon stock for the next crop installment (Gregorich *et al.*, 2001). Moreover, before destruction and incorporation of legume residues into the soil, root exudates which comprise organic acids, can solubilize P and K, thus increasing their bioavailability (Lizarazo *et al.*, 2015). The assemblage of

inorganic and organic particles is known as the phenomenon of aggregation which maintains soil stability (Amezketa, 1999). So, associating legumes to cultural systems, such as crop rotation, and the incorporation of their organic residues in the soil both play an essential role in modifying soil structure (Coleman *et al.*, 2004). Greater aggregate stability is achieved when organic bindings are more present in the soil than inorganic bindings (Bot and Benites, 2005). The importance of 0-200 µm micro-aggregates fraction has been highlighted in this specific process due to its important reactivity in the soil. Indeed, this fraction is one of the most C-rich fractions in soils and provides a habitat for almost all soil microorganisms (Aspiras *et al.*, 1971; Hattori, 1988).

The widely-demonstrated interests of using legumes in agronomic systems, such as crop rotation, could be applied to soil rehabilitation methods. Within the rehabilitation methods, agromining, which is a non-destructive method, has the potential to restore natural metal-rich soils for future agricultural uses (Morel, 2013). Linking phytoextraction to a metal adapted-metallurgy is the goal of agromining in the aim to recover metals with high economic value from plant and to recycle it in the industry (van der Ent *et al.*, 2013; van der Ent *et al.*, 2015). This method consists of using hyperaccumulator plants that can accumulate elevated quantities of trace elements, such as nickel (Ni), in their shoots (Li *et al.*, 2003; Bani *et al.*, 2007, 2015). Indeed, hyperaccumulator plants have tremendous potential for environmental metal-cleaning applications. Agromining involves recovering the trace metals by harvesting and incinerating the hyperaccumulator biomass (Barbaroux *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Compared to conventional decontamination methods of contaminated or naturally metal-rich soils, agromining is an environmental-aesthetic method and a low-cost technique when correctly implanted. Moreover, recovering the ecological functions of soils is another essential advantage of agromining (van der Ent *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016). Currently, agromining appears to be an innovative tool with great potential to help soil rehabilitation (van der Ent *et al.*, 2015). The ability of the hyperaccumulator plants to produce great aerial biomass and to accumulate high metal concentrations in their shoots could limit the success of agromining especially because ultramafic soils are known to be poor in terms of available essential nutrients (N, P and K) (Ma *et al.*, 2009; Saad *et al.*, 2016; Kidd *et al.*, 2017). This objective can be attained by enhancing soil fertility, through the application of chemical fertilizers, in order to optimize the yields of the hyperaccumulator plant biomass and those of Ni (Bani *et al.*, 2015). However, excessive application of chemical fertilizers puts underground water and atmosphere at risk, due to nitrogen leaching in the environment (Zhao *et al.*, 2015).

Therefore, the objectives of this work were to study the impact of integrating a legume in nickel agromining systems on ultramafic soils with the aim of developing more efficient cropping systems, with a better soil structure and biofunctioning. Soil biofunctioning is the interaction between the living organisms in the soil and its physico-chemical components. This study, conducted in controlled conditions and using a naturally Ni-rich soil which derived from an ultramafic zone in North West Spain, focused on the evaluation of the effects of different cropping systems (i.e. rotation of the hyperaccumulator plant with a legume *vs* mineral fertilization) on the efficiency of Ni-phytoextraction and on the enhancement of soil structure and biofunctioning.

2. Methods

2.1. Soil characteristics and experimental design

A pot experiment, using the hyperaccumulator plant *Alyssum murale* and the legume *Vicia sativa* var. Prontivesa, was conducted for 11 months in a growth-chamber under controlled conditions. *A. murale* seeds were harvested from a natural ultramafic site near Trigona (Thessaly, Greece) in August 2014, and *V. sativa* seeds were provided by Semillas Batlle (www.semillasbatlle.es, Spain). The pots used had a cylindrical shape (with a 17 cm diameter and 28 cm height) and were filled with 3.96 kg of dry soil. This soil was a Ni-rich serpentine soil, collected from the topsoil in the region of Melide in Spain (42°49'54.5"N, 8°00'13.5"W, Agolada, Pontevedra, Spain). It contained 17.5% clay, 30.6% silt and 51.9% sand (NF X 31-107), had a C/N ratio of 13.9 (NF ISO 10694 and NF ISO 13878), a Mg/Ca ratio of 2.79 (NF ISO 23470) and an available phosphorus content (Olsen P, NF ISO 11263) of 23 mg kg^{-1}. Soil pH was 5.76 (NF ISO 10390). The total and available Ni (Ni-DTPA, NF X 31-121 and NF ISO 22036) contents were respectively 861 and 24.8 mg Ni kg^{-1} (ISO 11466 and NF ISO 22036). In order to improve the Mg/Ca ratio and adjust the P and K contents, the soil was amended with 600 mg of Ca kg^{-1} of dry soil (equivalent to 4.5 tons of gypsum per hectare) and 155 mg kg^{-1} of dry soil of KH_2PO_4 (fertilization of 0-52-34 NPK equivalent to an amendment of 123 kg ha^{-1} P and 156 kg ha^{-1} K).

Four treatments were designed as follows:

1. Rotation (*Ro*): *Vicia* was grown for 3 months, then *Vicia* shoots were cut and buried in the soil. The aerial parts of the legume were dried, then crushed and finally incorporated into the first two centimeters of topsoil in the pots. *A. murale* was then sown and grown for 8 months);

2. Fertilized monoculture (*FMo*): *A. murale* was grown with mineral fertilization at the rate of 68.8 mg of N kg^{-1} dry soil (equivalent to 120 kg N per hectare) added as NH_4NO_3 for the whole duration of the experiment;
3. Non-fertilized monoculture (*NFMo*): *A. murale* grown without fertilization for the whole duration of the experiment;
4. Bare soil (*BS*) without any plant or fertilizer.

The experiment lasted 11 months before all treatments were harvested. It had a randomized block design with five replicates for each treatment. Depending on the treatment, two seeds of each plant species were sown in each pot. The pots were watered with tap water three times a week up to 60% of soil water holding capacity. The growth conditions throughout the experiments were as follows: a 16-hour photoperiod, an 18°C night and 22°C day temperature, a 70% relative humidity level and a photosynthetic photon flux density of 350 µmol m^{-2} s^{-1}).

2.2. Plant analyses

After 11 months of growth under controlled conditions, all plants from all treatments were collected. The stems, leaves and roots were separated upon collection. Fresh roots were carefully washed with sodium metaphosphate (1%) for 24 h, then with deionized water and were finally oven-dried at 70°C for 72 h. Dry weights were recorded for all plant part samples. Subsamples (0.5 g) of dry plant tissue were acid-digested at 95°C in 2.5 ml of concentrated HNO_3 and 5 ml of H_2O_2 (30 %). The final solutions were filtered (0.45 µm DigiFILTER) and completed with deionized water up to 25 ml. The Ni concentration in the solution was measured with an Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES, Liberty II, Varian).

The total C and N concentrations of the plant parts were analyzed by combustion at 900°C with a CHNS analyzer (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH, Germany).

2.3. Soil chemical analyses

Soil pH was measured using a pH meter in a soil–water suspension (soil:water ratio = 1:5). Soil C and N were quantified by combustion at 900°C with a CHNS analyzer. The bioavailable Ni in each soil sample was assessed by an extraction with Diethylene Triamine Pentaacetic Acid (DTPA), the latter was shown to perfectly assess the pool of soil Ni ions that are able to become soluble and possibly be absorbed by hyperaccumulator roots (Echevarria *et al.*, 1998, 2006; Shallari *et al.*, 2001). Extractions were thus performed with a DTPA–TEA

solution (0.005 M DTPA, 0.01 M $CaCl_2$, 0.1 M triethanolamine, pH 7.3) according to Lindsay and Norvell (1978) and the Ni concentration in the extracts was measured with an ICP-AES (Liberty II, Varian); Ni extracted by DTPA (Ni_{DTPA}) was calculated in mg kg^{-1}.

2.4. Analyses of soil structure and biofunctioning

In this study, the structure and biofunctioning of the soil was evaluated for each treatment. One replicate per treatment was chosen due the complexity of the method. At harvest, 25 g of rhizosphere soils (sieved at 2 mm) from each treatment were collected and directly agitated with 167 ml of distilled water for 1h at 15 rpm. After agitation, soil sedimentation allowed to separate the surface floating organic matter on one hand and the different organo-mineral associations on the other hand. These organo-mineral aggregates sedimented according to their size: coarse sands (200 µm-2 mm), fine sands (50-200 µm), coarse silts (20-50 µm), fine silts (2-20 µm) and clays (0-2 µm). An aliquot of the micro-aggregates (0-200 µm) was sampled after 4 minutes and 40 seconds of sedimentation and further studied by observation using Transmission Electronic Microscopy (TEM) (Watteau *et al.*, 2012). Fractions with size lower than 200 µm and floating organic matter particles were biologically fixed with osmium tetroxyde and dehydrated with acetone before inclusion into blocs of *Epon* resin (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, United States of America). Ultra-thin sections (70-90 nm) were applied to the blocks with an ultramicrotome (Leica UltracutS) and obtained thin sections were put on Cu grids. Ultra-thin sections were then contrasted with uranyle acetate and lead citrate (Valentine, 1961; Reynolds, 1963) in order to be observed by TEM (JEOL 1200 EMXII functioning at 80 kV).

Typologies of the different associations observed between mineral and organic particles of soil fractions < 200 µm were described and the numbers of particles from each category were estimated for each treatment. For each sample, mineral and/or organic particles < 200 µm were then counted in the aim to obtain a representative typology of all soil organo-mineral associations. Then, the existing proportion of each type of these associations reflected the soil biofunctioning: more the organo-mineral and bacterial aggregates were dominant in the soil, more the soil was well structured and had a better biological activity.

2.5. Statistical analyses

Variance analysis was carried out on all data using one-way ANOVA (Duncan test with a confidence interval of 95%). Also, normality tests and k-sample comparison of variances were analyzed. Furthermore, data obtained from all soil analyses was submitted to a Principal

Component Analysis (PCA). These statistical analyses were carried out on XLSTAT software (XLSTAT 2017.19.01, http://www.xlstat.com).

3. Results

3.1. Plant analyses

3.1.1. Biomass yields and Ni concentrations

Biomass yields for stems, leaves and roots showed that *A. murale* conducted in treatment *FMo* produced more biomass than for other treatments (2.05, 2.22 and 0.84 g of stems, leaves and roots plant^{-1}) (Figure 40). No significant difference was shown between *FMo* and *NFMo* for all dry weights. Furthermore, no significant difference was detected between *NFMo* and *Ro* treatments for all the dry weights measured. However, *Ro* treatment had lowest stem (1.08 g plant^{-1}) and leaf (1.26 g plant^{-1}) yields. The root dry mass was similar among treatments, without any significant difference.

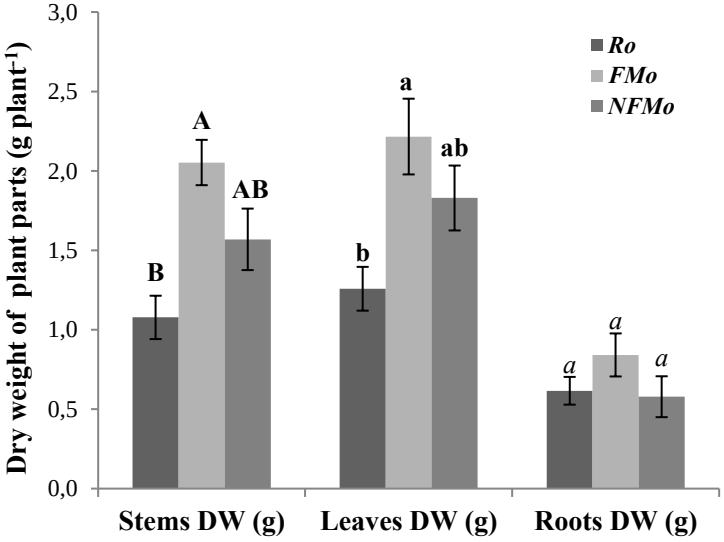


Figure 40 : Dry weights of stems, leaves and roots of *Alyssum murale* at the harvest. *Ro*, *FMo* and *NFMo* correspond to rotation, fertilized monoculture and non-fertilized monoculture cultural systems, respectively. DW corresponds to dry weight. Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5)

Concerning Ni concentrations in plant parts, *Ro* treatment showed the most elevated Ni concentrations in stems (11.6 g Ni kg^{-1} DW), leaves (21.6 g Ni kg^{-1} DW), and roots (8.08 g Ni kg^{-1} DW) (Figure 41). The *Ro* treatment had almost double Ni concentrations in leaves than other treatments (21.6, 10.2 and 12.5 g Ni kg^{-1} DW for *Ro*, *FMo* and *NFMo*, respectively) with significant differences. In addition, whatever the plant parts considered, *Ro* treatment was always significantly different from *FMo* that had the lowest Ni concentrations

among the treatments for all the plant parts. However, no difference in Ni concentrations of the different plant parts was observed between *FMo* and *NFMo* (Figure 41).

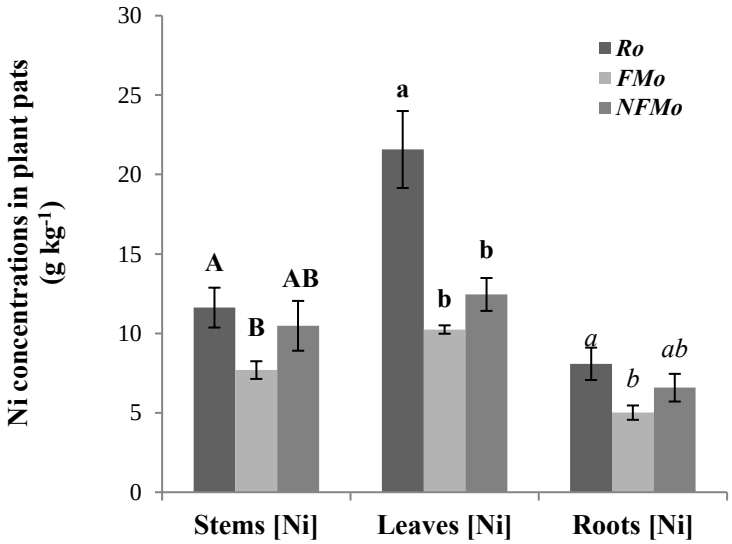


Figure 41 : Ni concentrations in shoots, leaves and roots of *Alyssum murale* at the harvest. *Ro*, *FMo* and *NFMo* correspond to rotation, fertilized monoculture and non-fertilized monoculture cultural systems, respectively. DW and [Ni] correspond to dry weight and Ni concentrations (g kg^{-1}). Means followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5)

3.2. Soil characteristics

3.2.1. Soil pH and available Ni

Despite the non-significant difference between the treatments for soil pH, planted treatments (*Ro*, *FMo* and *NFMo*) had higher soil pH in comparison to bare soil (*BS*) (Table 15). In contrast, for the bioavailable Ni concentration, *BS* had significantly higher Ni_{DTPA} contents in the soil than any other treatment, with the order *BS* > *Ro* > *NFMo* > *FMo*.

Table 15 : Soil physico-chemical characteristics at the harvest. *Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS* correspond to rotation, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bare soil, respectively. C, N and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively. Means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5)

Soil analyses	*Ro*		*FMo*		*NFMo*		*BS*	
pH	5.93 ±0.03	a	5.89 ±0.05	a	5.93 ±0.02	a	5.76 ±0.10	a
DTPA-Ni (mg kg^{-1})	19.66 ±1.00	b	11.90 ±0.74	c	17.10 ±1.23	b	31.88 ±1.53	a
Soil total C (g kg^{-1})	21.04 ±0.51	a	18.76 ±0.86	a	20.73 ±0.67	a	20.63 ±0.86	a
Soil total N (g kg^{-1})	1.90 ±0.06	a	1.74 ±0.09	a	1.86 ±0.07	a	1.94 ±0.09	a
C/N ratio	11.06 ±0.09	a	10.76 ±0.07	b	11.16 ±0.10	a	10.66 ±0.11	b
Organic Matter (g kg^{-1})	36.00 ±0.82	a	31.84 ±1.55	a	35.19 ±0.94	a	33.81 ±2.00	a
Organic N (g kg^{-1})	2.11 ±0.08	a	1.64 ±0.21	a	2.10 ±0.07	a	1.51 ±0.39	a

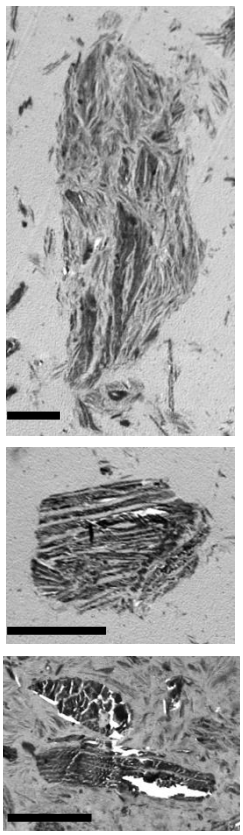
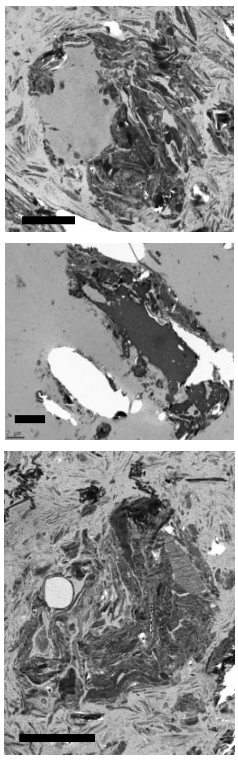
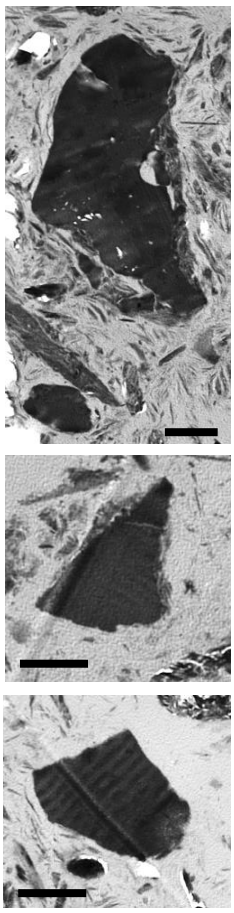
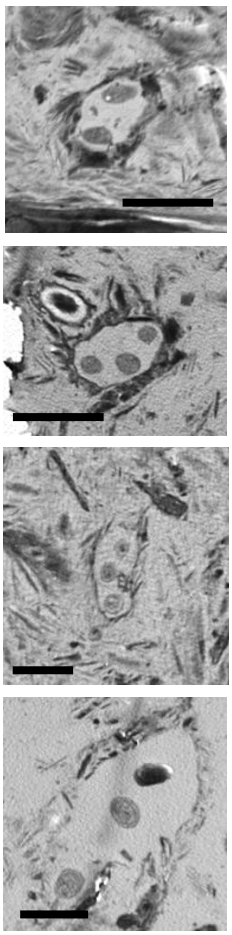
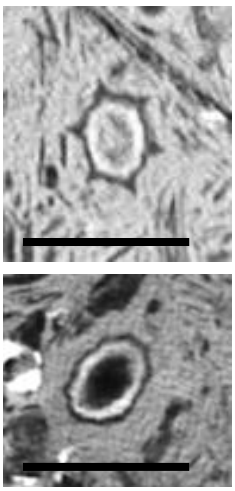
3.2.2. Total and organic C, N concentrations

Soil carbon and nitrogen concentrations did not show any significant differences between the treatments (Table 15). However, *Ro* treatment had the highest C and N concentrations when compared, in particular, to *FMo*. Indeed, *FMo* showed the lowest values among all treatments for these two parameters. As for the C/N ratio, *FMo* and *BS* were similar and significantly lower than *Ro* and *NFMo*. Same tendency was shown for the organic matter and organic N concentrations in the soil where *FMo* and *BS* had lowest values compared to *Ro* and *NFMo* (Table 15).

3.2.3. Soil structure and biofunctioning

Five different types of associations between organic and mineral particles were identified when the ultra-thin sections were observed on the TEM. The counting of aggregates and associations was done according the following categories: weakly aggregated mineral particles, organo-mineral micro-aggregates, non-aggregated organic particles, bacterial micro-aggregates and free bacteria (Table 16). Organo-mineral micro-aggregate fraction predominated for all the treatments and represented a relative abundance more than 40% (Figure 42). However, the presence of a plant (*Ro*, *FMo* and *NFMo*) induced higher percentages for this category of micro-aggregates in comparison to the unplanted treatment (*BS*) (49.5%, 53.9%, 56.6% and 40.7% for *Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS*, respectively). The relative abundance of mineral particles was highest for the *FMo* treatment (34.8%) whilst bare soil (BS) had higher percentages of non-aggregated organic particles and free bacteria compared to other treatments. As for the bacterial micro-aggregates, *Ro* and *NFMo* showed higher percentages compared to *BS* and *FMo* (7.38%, 1.15%, 6.85% and 4.21% for *Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS*, respectively) (Figure 42).

Table 16 : Typologies of different associations between mineral and organic particles of soil fractions < 200 µm

Mineral particles weakly aggregated (In the form of small phyllite and quartz packages)	**Organo-mineral microaggregates** (associated organic matter to mineral particles)	**Non aggregated organic particles** (weakly associated to mineral particles)	**Bacterial microaggregates** (associated bacteria to mineral particles)	**Free bacteria** (non-associated to mineral particles)
				 **scale: 2 µm**

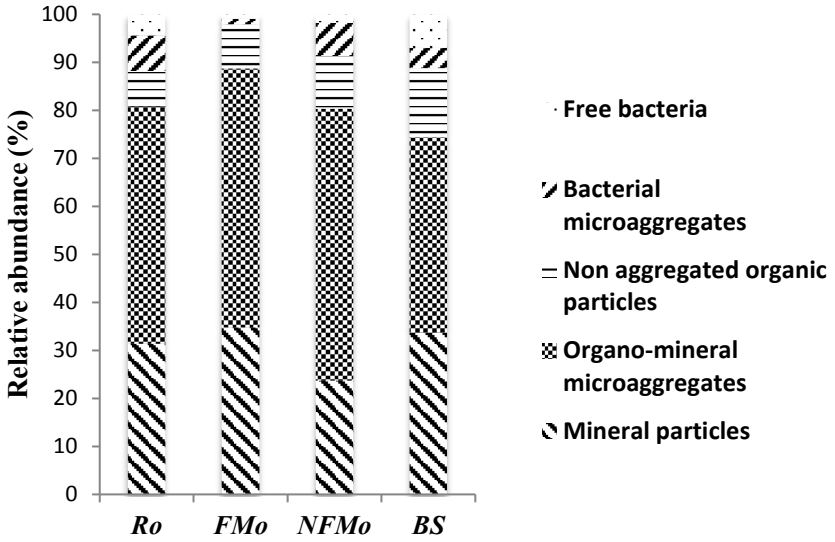


Figure 42 : Relative abundances of different organo-mineral associations in the rhizosphere soil from each treatment. *Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS* correspond to rotation, fertilized monoculture, non-fertilized monoculture cultural systems and bare soil, respectively

3.3. Principal Component Analysis

Results presented in Figure 4 were obtained by submitting the different soil parameters studied to a Principal Component Analysis (PCA). Axis 1 explained 51.5 % of the total variability and strongly discriminated *Ro* and *NFMo* (positive abscises) from *FMo* and *BS* (negative abscises) (Figure 43a). Along Axis 2, which explained 38.5 % of the total variability, the planted treatments (*Ro*, *FMo* and *NFMo*) appeared to be discriminated from the bare soil (*BS*). The soils from the *Ro* treatment were characterized by a relative abundance of bacterial micro-aggregates that was more important than in the other treatments and were also positively influenced by enhanced soil organic matter content (and therefore by soil total C) and to a lesser extent by soil pH, organic nitrogen and C/N ratio. In the case of *FMo* treatment, the relative abundance of mineral particles in the rhizosphere soil was enhanced. Finally, in *BS* treatment, the presence of the non-aggregated organic particles and the Free bacteria was favored. Moreover, this treatment showed a higher soil total N and DTPA-Ni concentrations in comparison with the other treatments (Figure 43b).

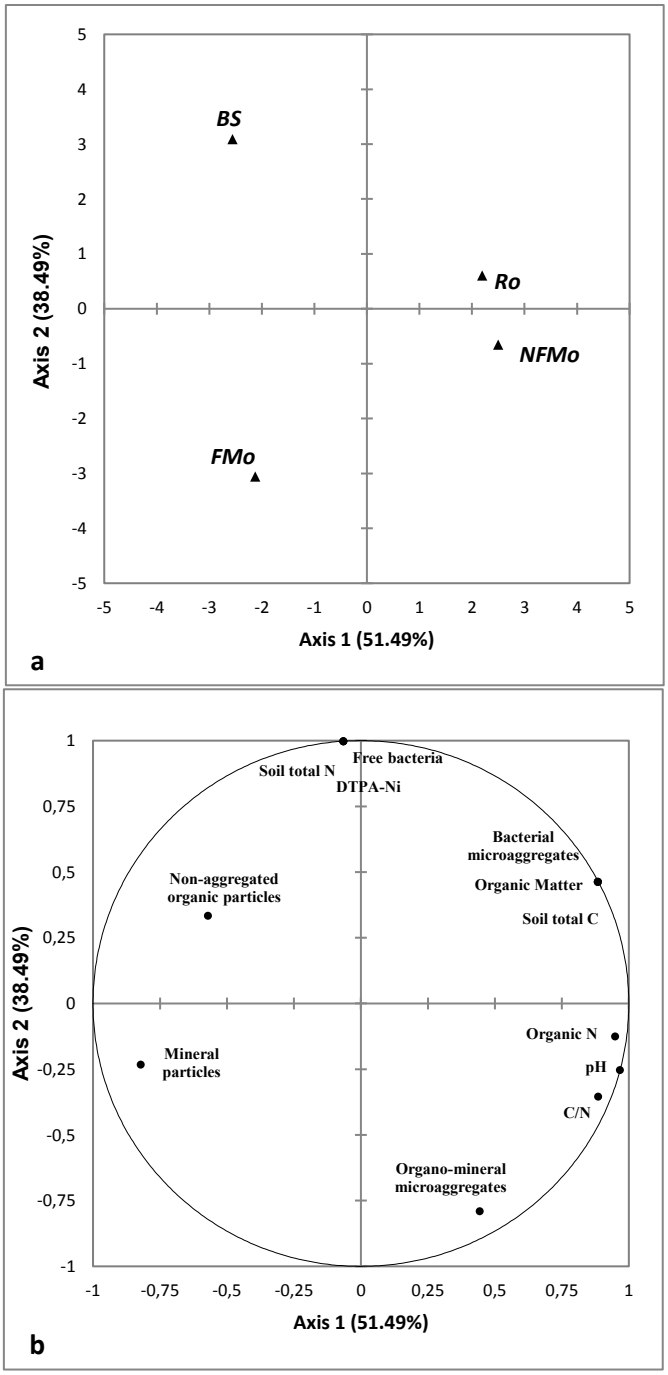


Figure 43 : Principal Component Analysis (PCA) generated from all measured soil parameters. (4a) Points represent the coordinate of different treatments (*Ro*, *FMo*, *NFMo* and *BS* refer to the treatments of the rotation, the fertilized monoculture, the non-fertilized monoculture and the bare soil respectively). (4b) Different soil parameters measured at the harvest and involved in the discrimination of samples. C, N and Ni correspond to nitrogen, carbon and nickel, respectively

4. Discussion

Agromining is a non-destructive method that has the aim to recover metals with high economic value (e.g. Ni) from hyperaccumulator plants and to recycle them in the industry. The final objective of agromining is to improve agronomic value of the ultramafic areas for

future agricultural uses. But ultramafic soils are known for their low-fertility that limits the production of sufficient hyperaccumulator biomass and therefore prevents from an optimal phytoextraction. Amending the soil with mineral fertilizers had been shown to increase significantly biomass and Ni yields of hyperaccumulator plants (Bani *et al.*, 2007, 2015). However, chemical fertilizers could have negative environmental impacts such as progressive decrease of organic matter stock in the soil, soil destructuring and N leaching in underground waters. So, if the main aim of agromining is to create new ecological and environment-friendly agro-ecosystems, it appears necessary to keep in mind the reduction of chemical fertilizer and pest-control applications. Indeed, the effect of chemical applications on Ni agromining is not yet clear. Introducing legumes into "traditional" agromining systems aims at optimizing crops yields and enhancing soil quality and fertility and thus increase the level of ecosystem services. Relying on the use of legumes in associations with plants of agronomic interest (wheat, rape…) in the traditional cultural systems, our aim was to study a new cropping system dedicated to Ni-agromining. In fact, legumes retained for decades their importance in agronomy due to nitrogen fixation from the air and thereby soil N-enrichment and efficient N-use that helped farmers to produce valuable yields (Lizarazo *et al.*, 2015). Organic bindings in the soil are know for their role to assemble large and stable soil aggregates giving the soil organic matter a crucial aspect in maintaining soil structure (Körschens, 2002; Coleman *et al.*, 2004).

This new cropping system involved the introduction of the legume *V. sativa* var. Prontivesa in rotation with the hyperaccumulator plant *A. murale* in order to evaluate whether this new system could induce changes in Ni phytoextraction and on soil physico-chemical characteristics and biofunctioning.

When rotated with the legume, no clear difference was shown for the biomass yield compared to non-fertilized regime. Still, *Alyssum* cropped with mineral fertilization had the highest biomass production but without any significant difference from non-fertilized treatment. Our results confirmed the positive effect of mineral fertilization on Ni phyotextraction by *A. murale* as shown by many previous studies. This is due to the lack of nutrients in the ultramafic soils and consequently the high needs of nitrogen by hyperaccumulator plants (McNear *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016; Kidd *et al.*, 2017). In agromining cropping systems, previous studies showed that after the addition of the mineral NPK amendments, herbicide application and irrigation management, crop yields could reach a maximum of 20 tons of dry biomass per hectare (400 kg Ni ha^{-1}) (Chaney *et al.*, 2007). Similarly, the biomass yield of *A. murale* in Albania (Bani *et al.*, 2015) was improved by

adding less fertilizer quantities (NPK) than those added by Chaney *et al.* (2007). In their experiment, Bani *et al.* (2015), after 5 years of the management of a spontaneous or a planted cover of *A. murale* with the yearly addition of N (120 kg N ha^{-1}) and 100 kg P, K ha^{-1}, obtained an increase of dry biomass yields from 0.3 to 9.0 t ha^{-1} and of phytoextracted Ni yields from 1.7 to 105 kg Ni ha^{-1}. This positive effect of N addition on biomass boost was also known for traditional plant production and has been shown with other *Brassicaceae*, such as rape (Simonin, 2017). Regarding Ni concentrations in *A. murale*, a clear significant effect was shown in the case of the crop rotation system with legumes (*Ro* treatment) where the hyperaccumulator plant accumulated much more Ni than in the other treatments. Normally, increased biomass production, as shown in this study for the fertilized treatment, should be positively related to greater amounts of metal accumulated by the hyperaccumulator plants, as observed by several authors (Centofanti *et al.*, 2012; Bani *et al.*, 2015). However, a phenomenon of Ni dilution was observed in the plant parts of *A. murale* in the case of mineral fertilization: in this study, the more the plant biomass increased, the more the Ni concentrations are diluted in plant tissues. Furthermore, in our study higher Ni concentrations were found in leaves of *A. murale* compared to stems and roots for all treatments. In fact, *A. murale* is known to accumulate more Ni in leaves at flowering stage and before leaves start to drop off (Bani *et al.*, 2015).

Bioavailable Ni showed higher concentrations in non-planted soils (bare soil) compared to planted ones. This can be explained by two phenomena, which can interact. The first one is that during its growth, the hyperaccumulator plant absorbs Ni from the soil bioavailable Ni-pool, which is somewhat a limiting factor in Ni uptake (Echevarria *et al.*, 1998; Shallari *et al.*, 2001). Thus, bioavailable Ni concentration in the planted soil logically decreases. In addition, one should not forget that in the case of the rotation treatment, the phenomenon of facilitation existed due to the presence of the legume. In fact, legume's root system, that has prospected the soil, created initial soil channels that *A. murale* could benefit from. Consequently, the hyperaccumulator plant could prospect greater soil volumes. In fact, we can imagine that despite the absence of a positive effect on the root dry biomass when rotated with the legume, *A. murale* could colonize more soil volume resulting with a higher root-soil contact and therefore a higher Ni root uptake in this treatment. The other phenomenon is due to the low soil pH values in the case of the bare soil where no plant was present, which could increase Ni solubility (Echevarria *et al.*, 2006; Chaney *et al.*, 2008). Moreover, it was well known that the decomposition of the legume residues, after incorporation in the soil in the case of crop rotation system, induce a tendency to increase soil

pH (Yan *et al.*, 1996; Saad *et al.*, 2017). When studying the effect of Ni-hyperaccumulators on three soils and comparing it to bare soils, it was shown that although pH was higher after incubation of the bare soils, all planted treatments had much lower Ni water soluble and DTPA-extractable Ni than bare soils because of the intensity of plant uptake of Ni (Chardot *et al.*, 2005). Therefore, the effect on Ni_{DTPA} is probably the effect of Ni uptake mainly.

The presence of legume residues increased the contents of C and N in the soil and positively affected the quantities of organic matter (*Ro* treatment). Indeed, the introduction of legumes in traditional cropping systems has proved to release organic acids. These organic acids can complex with soil nutrients attached to soil particles and thus, increase nutrient availability in the soils (Rochester *et al.*, 2001). Moreover, decayed legume residues in the topsoil were shown to enhance soil organic matter and its mineralization (Coppens *et al.*, 2007; Kuzyakov, 2010; Dieng *et al.*, 2015). Consequently, the mineralization of incorporated legumes in the soil was a compensating N source for the hyperaccumulator plant in the rotation treatment. In fact, a cropping system based on the rotation with legumes is known to be an important practice in conventional agriculture for improving and maintaining soil fertility. The explanatory phenomena are partly related to nitrogen inputs, with different processes combined together such as the mineralization of organic nitrogen from aerial and underground legumes' residues, a better distribution of resources and better soil structure (Saad *et al.*, 2017). In addition, soil healthy conditions for better root development are created with limiting soil diseases due to the alternation of different botanical families (Snapp *et al.*, 1998; Scalise *et al.*, 2015). It is important to note that the levels of organic matter in our soil are relatively high compared to an ultramafic or to an agricultural soil. This could be related to site characteristics and previous natural plantations from where the soil of this study was sampled.

Plant treatments had more organo-mineral aggregates proportions than the bare soil (without plant). This last observation is related to the absence of the root system that is a key factor in promoting soil aggregation and stability of aggregates (Vergani and Graf, 2016). Indeed, when roots grow through the soil, the release of root exudates changes several processes: soil particles adhere to each other to form soil organo-mineral aggregates, nutrient availability of organic anions increases, and signaling molecules selectively induce an increase of the size of the microbial community (Whipps, 2001). Moreover, rhizosphere microorganisms, which feed on root exudates and produce hypha and polysaccharides to bind soil particles together, are known to indirectly influence aggregate formation and stability (Andrade *et al.*, 1998). So, root exudates, which include hundreds of specific molecules such

as hydrocarbon, total sugar, total amino acids, and phenolic compounds, therefore provide the driving force for the development of soil structure (Walker, 2003). So, the release of root exudates is a continual source of organic matter, which will improve the soil structure (Tisdall and Oades, 1982; Morel *et al.*, 1991; Czarnes *et al.*, 2000). Moreover, enhancement of soil structure is one of the benefits provided by legumes when introduced into cropping systems. Indeed, crop rotation, which was based on the succession of two plant species (in our study a legume followed by a hyperaccumulator plant), induced the succession of different rhizodeposits in terms of quality and quantity. This could induce an increase of the size of the microbial community compared with the monoculture, which is known to favor soil structure and stability (Gao *et al.*, 2010, 2012). Consequently, we found that the percentage of bacterial micro-aggregates was higher in the case of rotation than in other treatments. In addition, the proportion of non-aggregated particles was lowest in the case of rotation with legume. In fact, it is well known that a physical quality of a soil is closely related to its structure and to the way in which the mineral and organic constituents are assembled together (Amezketa, 1999; Haynes, 1999). Furthermore, the stability of soil aggregates and their resistance to external factors – e.g. heavy rains and mechanical compaction – is involved in maintaining important ecosystem functions such as organic carbon accumulation, water infiltration and storage capacity and both root and microbial community activity. Aggregation can thus be used to measure soil resistance to erosion and changes in tillage management (Christensen, 2001; Moebius *et al.*, 2007). Singer and Ewing (2000) proposed the aggregate stability and distribution of pore sizes with other parameters to evaluate the soil quality allowing a suitable plant production. In the case of crop rotation with legumes, Tiemann *et al.* (2015) showed that soil microbial communities were increased when soil aggregation was enhanced. This could explain why we had in our study more bacterial micro-aggregates in the case of the rotation treatment with the legume than in other treatments. Indeed, different types of residues with plant rotation can sustain microbial communities and at the same time improve soil organic matter (Tiemann *et al.*, 2015). Legumes cover crops are regularly related to rise soil N content, aggregate formation, aggregate size and stability (Sainju *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2016). Our results confirm these previous studies and this explains why we had less non-aggregated particles for this treatment. In addition, increased concentration of the organic matter on the case of rotation had led to create organic bindings with soil particles that normally are known to be stronger and much more stable than inorganic bindings in almost all soil types (Körschens, 2002).

5. Conclusions

This study showed that the introduction of legumes into Ni agromining systems can improve both Ni phytoextraction yield and soil structure. Our new approach can limit chemical fertilizers that are applied heavily to the soils. This can reduce the risk of nitrogen leaching and underground water pollution. Rotation of *A. murale* with a legume enhanced N contents and organic matter concentrations in the soil. This was reflected by a parallel positive effect on soil structure and biofunctioning through more bindings between soil organic matter and bacterial communities in the soil. Restoring agricultural functions of degraded soils or soils with geochemical anomalies, such as ultramafic soils, can be accelerated by the introduction of legumes in cropping systems dedicated to agromining. In the same way, legumes can replace inorganic amendments pushing forward agromining in an advanced ecological "green" stage. The upcoming work will be to put in place our new agromining system, based on crop rotation at larger scale on ultramafic soil in Spain.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the technical team of "Laboratoire Sols et Environnement". We are thankful for the technical assistance of the joint research unit Microhumus and especially Mr. Maxime Maire. We would like to thank Dr. Petra Kidd and her joint research unit Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Santiago de Compostella, Spain) and especially the "Soil Microbiology Group". This work was supported by the French National Research Agency through the national "Investissements d'avenir" program, reference ANR-10-LABX-21 - LABEX RESSOURCES21 and through the ANR-14-CE04-0005 project "Agromine" and through the European ERA-net FACCE_SURPLUS project "AGRONICKEL: Developing Ni agromining on ultramafic land in Europe", reference ANR-15-SUSF-0003-05. Finally, we are thankful to the Association of Specialization and Scientific Guidance (ASSG, Lebanon) for funding the PhD scholarship of Ramez Saad.

References

Amezketa, E., 1999. Soil aggregate stability: A review. Journal of Sustainable Agriculture 14, 83-151. doi: 10.1300/J064v14n02_08

Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J., 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. Plant and Soil 202, 89-96. doi: 10.1023/A:1004301423150

Aspiras, R.B., Allen, O.N., Harris, R.F., Chesters, G., 1971. The role of microorganisms in the stabilization of soil aggregates. Soil Biology and Biochemistry 3, 347-353. doi: 10.1016/0038-0717(71)90045-9

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). Plant and Soil 293, 79-89. doi: 10.1007/s11104-007-9245-1

Bani, A., Echevarria G., Sulçe, S., Morel, J.L., 2015. Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. International Journal of Phytoremediation 17, 117-127. doi: 10.1080/15226514.2013.862204

Barbaroux, R., Mercier, G., Blais, J.F.,Morel, J.L.,.Simonnot, M.O., 2011. A new method for obtaining nickel metal from the hyperaccumulator plant *Alyssum murale*. Separation and Purification Technology. 83, 57-65. doi: 10.1016/j.seppur.2011.09.009

Bot, A., Benites, J., 2005 The importance of soil organic matter: key to drought-resistant soil and sustained food production. FAO Soils Bull 1–80. doi: 10.1080/03650340214162

Centofanti, T., Siebecker, M.G., Chaney, R.L., Davis, A.P., Sparks, D.L., 2012. Hyperaccumulation of nickel by Alyssum corsicum is related to solubility of Ni mineral species. Plant and Soil 359, 71-83. doi: 10.1007/s11104-012-1176-9

Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Petersce, C.A., Tapperod, R.V., Sparksd, D.L., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. Journal of Environmental Quality 36, 1429-1443. doi: 10.2134/jeq2006.0514

Chaney, R.L., Chen, K.Y., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 2008. Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. Plant and Soil 311, 131-140. doi: 10.1007/s11104-008-9664-7

Chardot, V., Massoura, S.T., Echevarria, G., Reeves, R.D., Morel, J.L., 2005. Phytoextraction potential of the nickel hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. International Journal of Phytoremediation 7, 323-335.

Christensen, B.T., 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. European Journal of Soil Science 52, 345-353. doi: 10.1046/j.1365-2389.2001.00417.x

Chu, J., Zhang, T., Chang, W., Zhang, D., Zulfiqar, S., Fu, A., Hao, Y., 2016. Impacts of cropping systems on aggregates associated organic carbon and nitrogen in a semiarid highland agroecosystem. Public Library of Science one 11, 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0165018

Coleman, D.C., Crossley, D.A., Hendrix, P.F., 2004. Future developments in soil ecology. In: Fundamentals of soil ecology. Elsevier, pp 271–298

Coppens, F., Garnier, P., Findeling, A, Merckx, R., Recous, S., 2007. Decomposition of mulched versus incorporated crop residues: Modelling with PASTIS clarifies interactions between residue quality and location. Soil Biology and Biochemistry 39, 2339-2350. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.04.005

Czarnes, S., Dexter, A.R., Bartoli, F., 2000. Wetting and drying cycles in the maize rhizosphere under controlled conditions. Mechanics of the root-adhering soil. Plant and Soil 221,253-271. doi: 10.1023/A:1004747323220

Dieng, A., Baudoin, E., Thioulouse, J., Brunet, D., Toucet, J., Sylla, S.N., Brauman, A., 2015. Soil organic matter quality, structure and activity of the denitrifiers community as influenced by decaying mulched crop residues. Applied Ecology and Environmental Research 13, 655-675. doi: 10.15666/aeer/1303_655675

Echevarria, G., Massoura, S., Sterckeman, T., Becquerm, T., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2006. Assessment and control of the bioavailability of Ni in soils. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 643-651.

Echevarria, G., Morel, J.-L., Fardeau, J.C., Leclerc-Cessac, E., 1998. Assessment of phytoavailability of nickel in soils. Journal of Environmental Quality 27,1064-1070. doi: 10.2134/jeq1998.00472425002700050011x

Gao, Y., Miao, C.Y., Xia, J., Mao, L., Wang, Y., Zhou,P., 2012. Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. Frontiers of Environmental Science and Engineering 6, 213-223. doi: 10.1007/s11783-011-0345-z

Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., Shi, W., 2010. Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined

pollution. Journal of Environmental Sciences 22, 1040-1048. doi: 10.1016/S1001-0742(09)60215-1
Gregorich, E.G., Drury, C.F., Baldock, J.A., 2001. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. Canadian Journal of Soil Science 81, 21-31. doi: 10.4141/S00-041
Hattori, T., 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. Reports of the Institute for Agricultural Research, Tohoku University 37, 23-36.
Haynes, R.J., 1999. Labile organic matter fractions and aggregate stability under short-term, grass-based leys. Soil Biology and Biochemistry 31, 1821-1830. doi: 10.1016/S0038-0717(99)00102-9
Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., Zhang, F., 2011. P for two, sharing a scarce resource: Soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. Plant Physiology 156, 1078-1086. doi: 10.1104/pp.111.175331
Justes, E., Bedoussac, L., Corre-Hellou, G., Fustec J., Hinsinger, P., Jeuffroy, M., H.,Journet, E.P., Louarn, G., Naudin, C., Pelzer, E., 2014. Les processus de complémentarité de niche et de facilitation déterminent le fonctionnement des associations végétales et leur efficacité pour l'acquisition des ressources abiotiques. Innovations Agronomiques 40, 1-24.
Karpenstein-Machan, M., Stuelpnagel, R., 2000. Biomass yield and nitrogen fixation of legumes monocropped and intercropped with rye and rotation effects on a subsequent maize crop. Plant and Soil 218, 215-232. doi: 10.1023/A:1014932004926
Kidd, P.S., Álvarez-López, V., Becerra-Castro, C., Cabello-Conejo, M., Prieto-Fernández, Á., 2017. Chapter Three – Potential role of plant-associated bacteria in plant metal uptake and implications in phytotechnologies. Advances in Botanical Research 83, 87-126. doi: 10.1016/bs.abr.2016.12.004
Körschens, M., 2002. Importance of soil organic matter (SOM) for biomass production and environment (a review). Archives of Agronomy and Soil Science 48, 89-94. doi: 10.1080/03650340214162
Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. Soil Biology and Biochemistry 42, 1363-1371. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.04.003
Li, Y.M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Nelkin, J., 2003. Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. Environmental Science and Technology 37, 1463-1468. doi: 10.1021/es0208963
Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal 42, 421-428.
Liu, W., Zhang, C., Hu, P., Luo, Y., Wu, L., Sale, P., Tang, C., 2016. Influence of nitrogen form on the phytoextraction of cadmium by a newly discovered hyperaccumulator *Carpobrotus rossii*. Environmental Science and Pollution Research 23, 1246-1253. doi: 10.1007/s11356-015-5231-y
Lizarazo, C.I., Yli-Halla, M., Stoddard, F.L., 2015. Pre-crop effects on the nutrient composition and utilization efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) and narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 311-327. doi: 10.1007/s10705-015-9743-0
Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H., 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. Chemosphere 75, 719-725. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.056
McNear, D.H., Chaney, R.L., Sparks, D.L., 2010. The hyperaccumulator *Alyssum murale* uses complexation with nitrogen and oxygen donor ligands for Ni transport and storage. Phytochemistry 71, 188-200. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.10.023
Moebius, B.N., Van, Es, H.M., Schindelbeck, R.R., Idowu, O.J., Clune, D.J., Thies, J.E., 2007. Evaluation of laboratory-measured soil properties as indicators of soil physical quality. Soil Science 172, 895-912. doi: 10.1097/ss.0b013e318154b520
Morel, J.L., 2013. Using plants to "micro-mine" metals. In: http://www.inra.fr/en/Scientists-Students/Biomass/All-the-news/Using-plants-to-micro-mine-metals
Morel, J.L., Habib, L., Plantureux, S., Guckert, A., 1991. Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. Plant and Soil 136, 111-119. doi: 10.1007/BF02465226
Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17, 208-212. doi: 10.1083/jcb.17.1.208
Rochester, I.J., Peoples, M.B., Hulugalle, N.R., Gault, R.R., Constable, G.A., 2001. Using legumes to

enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. Field Crops Research 70, 27-41. doi: 10.1016/S0378-4290(00)00151-9

Rodrigues, J., Houzelot, V., Ferrari, F., Laubie, B., Simonnot, M.-O., Pons, M.-N., Echevarria, G., Morel, J.-L., 2016. Life cycle assessment of agromining chain highlights role of erosion control and bioenergy. Journal of Cleaner Production 139, 770-778. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.08.110

Rodrigues, M.Â., Dimande, P., Pereira, E.L., Ferreira, I.Q., Freitas, S., Correia, C.M., Moutinho-Pereira, J., Arrobas, M., 2015. Early-maturing annual legumes: an option for cover cropping in rainfed olive orchards.). Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 153-166. doi: 10.1007/s10705-015-9730-5

Saad, R., Kobaissi, A., Amiaud, B., Ruelle, J., Benizri, E., 2017. Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume. Unpublished results

Saad, R., Kobaissi, A., Robin, C., Echevarria, G., Benizri, E., 2016. Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining. Environmental and Experimental Botany 131, 1-9. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.06.010

Sainju, U.M., Whitehead, W.F., Singh, B.P., 2003. Cover crops and nitrogen fertilization effects on soil aggregation and carbon and nitrogen pools. Canadian Journal of Soil Science 83, 155-165. doi: 10.4141/S02-056

Scalise, A., Tortorella, D., Pristeri, A., Petrovičová, B., Gelsomino, A., Lindström, K., Monti, M., 2015. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding durum wheat in a rotation under rainfed conditions. Soil Biology and Biochemistry 89, 150-161. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.003

Shallari, S., Echevarria, G., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2001. Availability of nickel in soils for the hyperaccumulator *Alyssum murale* (Waldst. & Kit.). South African Journal of Science 97, 568-570.

Sieverding, E., Leihner, D.E., 1984. Influence of crop rotation and intercropping of cassava with legumes on VA mycorrhizal symbiosis of cassava. Plant and Soil 80, 143-146. doi: 10.1007/BF02232949

Simonin, P., 2017. Observation des pratiques de fertilisation azotée par un outil d'aide à la décision pour le colza. Oilseeds fats Crop Lipids 24, 1-7. doi: 10.1051/ocl/2016056

Singer, S., Ewing, M., 2000. Soil quality. In: Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 271–278

Snapp, S.S., Mafongoya, P.L., Waddington, S., 1998. Organic matter technologies for integrated nutrient management in smallholder cropping systems of southern Africa. Agriculture, Ecosystems and Environment 71,185-200. doi: 10.1016/S0167-8809(98)00140-6

Stevenson, F.C., Kessel, C., Van, 1996. The nitrogen and non-nitrogen rotation benefits of pea to succeeding crops. Canadian Journal of Plant Science 76, 735-745. doi: 10.4141/cjps96-126

Tiemann, L.K., Grandy, A.S., Atkinson, E.E., Marin-Spiotta, E., McDaniel, M.D., 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. Ecology Letters 18, 761-771. doi: 10.1111/ele.12453

Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. Journal of Soil Science 33, 141-163. doi: 10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x

Valentine, R.C., 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. Advances in Virus Research 8, 287-318.

Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant and Soil 362, 319-334. doi: 10.1007/s11104-012-1287-3

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W., Meech, J.A., Erskine, P.D., Simonnot, M.O., Vaughan, J., Morel, J.-L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q., Mulligan, D.R., 2015. Agromining: Farming for metals in the future? Environmental Science and Technology 49, 4773-4780. doi: 10.1021/es506031u

Vergani, C., Graf, F., 2016. Soil permeability, aggregate stability and root growth: a pot experiment from a soil bioengineering perspective. Ecohydrology 9, 830-842. doi: 10.1002/eco.1686

Walker, T.S., 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiology 132, 44-51. doi: 10.1104/pp.102.019661

Watteau, F., Villemin, G., Bartoli, F., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2012. 0–20 µm aggregate typology based on the nature of aggregative organic materials in a cultivated silty topsoil. Soil Biology and Biochemistry 46, 103-114. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.11.021

Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52, 487-511. doi: 10.1093/jexbot/52.suppl_1.487

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. Soil Biol Biochem 28, 617-624. doi: 10.1016/0038-0717(95)00180-8

Zahran, H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. In: Journal of Biotechnology. pp 143–153

Zhang, X., Houzelot, V., Bani, A., Morel, J.-L., Echevarria, G., Simonnot, M.O., 2014. Selection and combustion of Ni-hyperaccumulators for the phytomining process. International Journal of Phytoremediation 16, 1058-1072. doi: 10.1080/15226514.2013.810585

Zhao, J., Zeng, Z., He, X., Chena, H., Wang, K., 2015. Effects of monoculture and mixed culture of grass and legume forage species on soil microbial community structure under different levels of nitrogen fertilization. European Journal of Soil Biology 68, 61-68. doi: 10.1016/j.ejsobi.2015.03.008

Points marquants de l’étude

- L'introduction de légumineuses dans les systèmes de culture dédiées à l’agromine du Ni peut améliorer le rendement en de phytoextraction du Ni et la structure du sol.

- Des concentrations plus élevées en azote et de meilleurs taux de matière organique ont été détectés dans le sol des traitements de la rotation de *A. murale* avec une légumineuse.

- Un effet positif de l’insertion de la légumineuse a été observé sur la structure du sol et son fonctionnement biologique grâce à des liaisons entre la matière organique du sol et les communautés bactériennes dans le sol.

- La restauration des fonctions agricoles des sols ultramafiques peut être accélérée par l'introduction de légumineuses dans les systèmes de culture dédiés à l'agromine.

- De la même manière, les légumineuses peuvent remplacer les engrais chimiques qui sont fortement appliqués aux sols. Cela peut réduire le risque de lessivage de l'azote et de pollution des eaux souterraines.

Chapitre 5c. What is the influence of new agromining cropping systems on soil biological properties?

Ramez F. Saad [a, b, c], Ahmad Kobaissi [c], Guillaume Echevarria [a, b], Petra Kidd [d], Magdalena Calusinska [e], Xavier Goux [e], Emile Benizri [a, b, *]

[a] Université de Lorraine, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[b] INRA, Laboratoire « Sols et Environnement », UMR 1120, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54518, France.

[c] Université Libanaise, Laboratoire « Applied Plant Biotechnology », Faculté des Sciences 1, Beyrouth, Lebanon.

[d] Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Santiago de Compostela 15706, Spain.

[e] Environmental Research and Innovation (ERIN) Department, Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), 4422 Belvaux, Luxembourg.

[*]Corresponding author, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33(0)383595848, Fax: +33(0)383595791, emile.benizri@univ-lorraine.fr

Abstract

Most of the research dedicated to agromining has focused on the culture of only one hyperaccumulator plant, however, plant diversity has long been shown to positively modify processes and characteristics. Hence, we characterized the effect of co-cropping two plants – the Ni-hyperaccumulator *Alyssum murale* and a legume – on bacterial diversity and physico-chemical characteristics of an ultramafic soil in comparison with mono-culture of *A. murale* with chemical fertilizers. A pot experiment with 5 replicates was conducted in controlled conditions for 11 months. Two cropping systems were studied: co-cropping and rotation *vs.* mineral fertilization treatments. Results showed that the treatment of the rotation with the legume had a higher C/N ratio compared to bare soil and a higher organic matter content compared to the fertilized control. A clear positive effect of the introduction of legumes in new cropping systems tested was observed on microbial carbon and nitrogen contents (MBC and MBN). They also increased microbial activity in comparison with fertilized control crops. Arylsulfatase and urease activities were enhanced in the treatments with legumes and decreased with mineral fertilization treatments. However, β-glucosidase and phosphatase decreased with legumes. *Actinobacteria* was the most represented among bacterial phyla and had lower relative abundance in the treatments associating legumes. Conversely, the relative

abundance of *Acidobacteria* and of *Gemmatimonadetes* phyla increased in treatments with legumes. The relative abundance of *Chloroflexi* phylum was shown to be higher for the fertilized control of the rotation. The relative abundances of *α-Proteobacteria* and *β-Proteobacteria* subphyla increased in treatments with legumes. NMDS analysis showed that planted treatments were clearly discriminated from bare soil. In addition, the treatments of co-cropping and rotation were also clearly discriminated from control treatments. The reduction of microbial diversity was mainly due to chemical inputs in the soil, as shown by the Shannon Index values. The treatments with mineral fertilization, especially the fertilized control of the rotation, had a negative impact on soil microbial analyses. This study showed that new cropping systems dedicated to agromining do influence the bacterial diversity of ultramafic soils, with several modifications of physico-chemical characteristics and that mineral fertilization can negatively impact bacterial communities in these soils.

Keywords: *Alyssum murale*. Legume. *Vicia sativa*. Co-cropping. Ultramafic soil. Bacterial diversity. Phytomining. High-throughput sequencing

1. Introduction

Aboveground ecosystem functions can be affected by changes in plant diversity (Tilman *et al.*, 2001). Also, these changes could also have an effect on belowground processes (Tilman *et al.*, 2006). Many studies carried out to compare the genetic structure and the diversity of microbial communities, in contrasting rhizosphere conditions, have postulated that differences in the exudation pattern were partly responsible for the recorded divergences (Grayston and Campbell, 1996; Baudoin *et al.*, 2001, 2002). These results were attributed to the effect of exudate diversity and availability. Conversely, few studies have focused on the effect of multi-species vegetation covers on soil microbial diversity (Spehn *et al.*, 2000; Zak *et al.*, 2003; Innes *et al.*, 2004; Benizri and Amiaud, 2005; Rue *et al.*, 2015). These studies, focusing on agricultural crop systems or on grasslands, showed that increased plant diversity enhanced soil microbial biomass, activity and diversity (Benizri and Amiaud, 2005; Chung *et al.*, 2007; Tiemann *et al.*, 2015). Indeed, soil carbon content was found to be enhanced by plant diversity through exudation and turnover of plant biomass (Zak *et al.*, 2003). In addition, diversified organic compounds (i.e. rhizodeposits), released from different plants growing together in multi-species vegetation cover, can change the conditions in rhizosphere environment. Thus, the abundance, functions and diversity of microbial communities are affected (Berg and Smalla, 2009). It was shown that microbial biomass was significantly

correlated with plant diversity in experimental fields involving 1 to 16 plant species (Zak *et al.*, 2003). Moreover, the association of different plant species allowed, on one hand, an increase in the size of the microbial community by 15-20% compared to the monoculture and on the other hand a relative stimulation of certain functions of the associated rhizosphere microbial community (Gao *et al.*, 2010, 2012). This correlation was attributed to the higher level of primary production associated with higher plant species diversity, even if some studies found contradictory results (Kennedy *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2005; Zul *et al.*, 2007). Concerning microbial activities and functions, Gao *et al.* (2010, 2012) pointed out that plant diversity induced a complex microbial community and more diversified microbial functional groups. For example, it was shown that extracellular enzymes were altered by the composition of plant cover. This group of enzymes is generally produced by soil microorganisms but also by plant roots and they can degrade polymeric substances such as cellulose, chitin and lignin into accessible nutrients such as sugar, amino acids and ammonium. These final products are necessary for the metabolism and the growth of both soil microorganisms and plants (Sinsabaugh, 1994; Sanaullah *et al.*, 2011). However, the activity of soil microorganisms was found to be dependent on the availability of different substrates in the soil (Burns *et al.*, 2013) and consequently, the presence of different plant species caused differences in soil chemical properties and induced change in microbial activities and functions. Several authors have studied the effect of plant diversity on bacterial diversity. Zul *et al.* (2007) put in evidence that different types of plant communities affected the species composition of bacterial groups, even outside of the rhizosphere.

The effects of plant diversity on several soil microbial processes at the community level may be more pronounced in the presence of environmental stress such as the presence of trace elements in the soil (Ives and Carpenter, 2007). Most studies dedicated to agromining, which is a method of phytoextraction based on the use of hyperaccumulator plants to accumulate metals from contaminated or naturally metal-rich soils (Morel, 2013), were based on the culture of only one hyperaccumulator plant. These plants are able to extract metal from the soil to their aerial parts (Baker and Brooks, 1989). Conversely, only few studies have investigated the impact of associating different plants on phytoextraction efficiency (Gove *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Epelde *et al.*, 2012), but also on the size of the cultivable rhizosphere bacterial communities, their phenotypic and genetic structures (Lucisine *et al.*, 2014; Rue *et al.*, 2015). In the case of plant covers containing exclusively hyperaccumulator plants, the coexistence of several hyperaccumulators improved the production of biomass by each plant species, promoted the bioavailability of metals in the

soil, but also modified the genetic and phenotypic structures of rhizosphere bacterial communities (Lucisine *et al.*, 2014).

To our knowledge, no studies have investigated the impact of new cropping systems dedicated to agromining and based on cropping a hyperaccumulator plant with a non-accumulator (e.g. a legume), with the hypothesis that these mixed plant covers could have an impact on the rhizosphere bacterial diversity. The objective of this work was to study the effect of two plant species, a hyperaccumulator plant (*Alyssum murale*) and a legume (*Vicia sativa*) in co-cropping or rotation cultural systems dedicated to agromining on the diversity of bacterial communities and on the physico-chemical characteristics of a nickel-rich ultramafic soil.

2. Materials and methods

2.1. Soil characteristics and experimental design

A pot experiment, using the hyperaccumulator plant *Alyssum murale* (Waldst & Kit.) and the legume *Vicia sativa* var. Prontivesa, was conducted for 11 months. *A. murale* seeds were harvested from a natural site near Trigona (39°47'17,5"N, 21°25'19,1"E, Greece) in August 2014, and *V. sativa* seeds were provided by Semillas Batlle (www.semillasbatlle.es, Spain). The ultramafic soil used for the experiment was collected from the topsoil in the region of Melide in Spain (42°49'54.5"N, 8°00'13.5"W, Agolada, Pontevedra, Spain) where field agromining experiments are currently been carried out. Soil physico-chemical properties were determined by the Soil Analysis Laboratory of INRA (Arras, France). It contained 17.5% clay, 30.6% silt and 51.9% sand, had a C/N ratio of 13.9, a Mg/Ca ratio of 2.79 and an available phosphorus content of 23 mg kg^{-1}. Soil pH was 5.76 and the total and available nickel (Ni-DTPA) contents were respectively 861 and 24.8 mg Ni kg^{-1} of dry soil.

The treatments were as follows : co-cropping “CoC” (Co-Cropping of the legume and *A. murale*, legume shoots were cut and buried in the soil after 3 months of co-culture), fertilized control of co-cropping “FCon-CoC” (*A. murale* with mineral fertilization; 120 kg N per hectare added as NH_4NO_3 at the same time of burying legume residues in the co-cropping treatment), non-fertilized control of co-cropping “NFCon-CoC” (*A. murale* without fertilization), rotation “Ro” (legume culture for 3 months followed, after burying legume residues, by the culture of *A. murale*, fertilized control of rotation “FCon-Ro” (*A. murale* with mineral fertilization; 120 kg N per hectare added as NH_4NO_3 at the same time of burying

legume residues in the rotation treatment), non-fertilized control of rotation "NFCon-Ro" (*A. murale* without fertilization) and bare soil "BS" without neither vegetation nor fertilizer.

The experiment had a randomized block design with five replicates of the seven treatments. Pots were placed in a growth-chamber under controlled conditions (a 16-hour photoperiod, an 18°C night and 22°C day temperature, a 70% relative humidity level and a photosynthetic photon flux density of 350 µmol m^{-2} s^{-1}). The pots used had a cylindrical shape (with a 17 cm diameter and 28 cm height) and were filled with 3 957 g of dry soil. In addition, Mg/Ca ratio was improved and P, K contents were adjusted by amending the soil with 600 mg of Ca kg^{-1} of dry soil (equivalent to 4.5 tons of gypsum per hectare) and 155.2 mg kg^{-1} of dry soil of KH_2PO_4 respectively (fertilization of 0-52-34 NPK equivalent to an amendment of 122.5 kg ha^{-1} P and 156.2 kg ha^{-1} K). Depending on the treatment, two seeds of each plant species were sown in each pot. The pots were watered with tap water three times a week to 60% of soil water holding capacity. In the case of the "CoC" and "Ro" treatments, the *Vicia* shoots were harvested and incorporated after 3 months of culture. The aerial parts of the legume were dried, then crushed and finally incorporated into the first two centimeters of topsoil in the pots.

2.2. Soil analyses

2.2.1. Soil physico-chemical analyses

Soil moisture was determined by heating subsamples to 105°C until a constant weight was achieved. The CEC and exchangeable cations were measured according to international ISO standard 23470. Soil pH was measured using a pH meter in a soil–water suspension (soil:water ratio = 1:5). Total and organic C and N were quantified with a CHNS analyzer (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme GmbH). Soluble C and N were determined on 5 g of dried soil extracted with 25 ml of $CaCl_2$ (1mM) by agitation at 5 rpm for 24 h. The mixture was then filtered (0.45 µm Whatman nylon filter) and soluble C and N were then analyzed with a TOC analyzer (TOC-VSCN equipment, Shimadzu, Kyoto, Japan). Nitrate and ammonium ions were quantified in 15 g of fresh soil mixed to 75 ml of 0.016 M KH_2PO_4 and stirred for 30 minutes at 17 rpm. The soil suspension was then centrifuged (20 min at 5 800 g) and filtered (0.45µm) before analysis by Ion Chromatography (Dionex 1500i with an AS 4 ASC column, Sunnyvale, USA).

2.2.2. Soil microbial analyses

2.2.2.1. Microbial biomass and enzymatic activity

Microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN) in the soil were determined by chloroform fumigation of 10 g of fresh soil for 24 hours at 25°C. Fumigated and non-fumigated soil samples were then extracted by agitation in 40 ml of K_2SO_4 (0.5 M) for 45 minutes and at 17 rpm. Solutions were filtered (Whatman 42) before being analyzed by a TOC analyzer. Calculations were done with a conversion coefficient K of 0.45 and 0.54 for MBC and MBN, respectively (Jenkinson and Ladd, 1981; Brookes *et al.*, 1985). Urease activity was measured according to the method of Tabatabai and Bremner (1972). Arylsulfatase, β-glucosidase and alkaline phosphatase activities were determined using 5 mM pNP-sulfate, 5 mM pNP-β-D-glucopyranoside and 5 mM pNP-phosphate, respectively (Sigma- Aldrich, France) according to the modified protocol of Deng *et al.* (2013). Substrates of arylsulfatase and β-glucosidase were prepared in sodium acetate buffer (0.5 M, pH 5.8) while substrate of alkaline phosphatase was prepared in Tris HCl buffer (0.1 M, pH 8). Four grams of fresh soil were incubated with 0.5 ml toluene for 10 minutes before adding 50 ml of distilled water. The mix was then homogenized with a polytron for 25 seconds. Four hundred µl were immediately sampled and put in a 2 ml microtube then 1 ml of the adequate substrate was added. Samples were incubated at 37°C for 2 h. The reaction was stopped by adding 250 µl of NaOH concentrated solution (1M). The blanks were realized by adding the substrate after the addition of the NaOH. Microtubes were then centrifuged for 2 minutes at 13 000 g and 200 µl were transferred on a microplate in order to read absorbance at 400 nm on a microplate reader (Biotek Instruments, Synergy HT). In order to calculate the enzymatic activities, readings were compared to a p-Nitrophénol standard curve. Fluorescein diacetate activity (FDA) was measured according to the method described by Adam and Duncan (2001). Microbial ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) activity in the soil was measured according to Honma and Shimomura (1978).

2.2.2.2. Community-level physiological profiling

Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA) analyses were used to assess community-level physiological profiling. Briefly, three grams of each fresh soil subsample were homogenized in 30 ml of saline phosphate buffer (PBS: KH_2PO_4 1.54 mM, NaCl 155.17 mM and Na_2HPO_4-$7H_2O$ 2.7 mM, pH 7.2) and shaken 30 min at 17 rpm. After the agitation and under a hood, one ml of the suspension was 100 fold diluted in sterile PBS buffer (serial

dilution). Plates were inoculated with 150 µl per well of the 10^{-2} soil dilution and incubated at 25ºC in the dark for five days after which the color development was automatically recorded at 590 nm using a microplate reader. Average well color development (AWCD) was calculated as described by Garland and Mills (1991). The final values of each well were used to calculate Shannon's diversity index (H index) (Schutter and Dick, 2001).

2.2.2.3. Microbial diversity by High-throughput 16S rRNA amplicon sequencing

Genomic DNA extractions from fresh soil samples were performed using the FastDNA™ SPIN kit for Soil (MP Biomedicals™, France) in accordance with the protocol of the manufacturer. Concentrations of DNA solutions were first measured with spectrophotometer (SmartSpec Plus spectrophotometer, BIO-RAD) and then were adjusted to 1.66 ng μl^{-1} with sterile ultra-pure water using a robot (epMotion P5073, Eppendorf) in 96 well microplates (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction plate). The 16S rRNA gene libraries were constructed with a modified primer pair SD-Bact-0909-aS-18 (5'-ACTCAAAKGAATWGACGG-3') and S-*-Univ-1392-a-A-15 (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') targeting a fragment of 484 bp of the bacterial V6–V8 region (Klindworth *et al.*, 2013). The modification consisted of including the Nextera XT® transposase sequence (Illumina Inc., San Diego, USA) in the 5' end of the forward and reverse primer and adding additional four random nucleotides in the forward primer to increase the nucleotide diversity (Bartram *et al.*, 2011). Amplicons were generated using the Q5 DNA Polymerase (High-Fidelity Hot Start, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), then purified with the AMpure magnetic beads (Agencourt, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) and further quantified with the NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The concentration of the amplicons was re-adjusted to 1.66 ng μL^{-1} with sterile ultra-pure water using the robot. Nextera XT® barcodes and the Illumina adapters necessary for hybridization to the flow cell were added with the Nextera XT Index kit during a second PCR (Nextera XT Index Kit v2 Set A and Nextera XT Index Kit v2 Set B, Illumina Inc., San Diego, USA). The resulting amplicons were purified with the AMpure magnetic beads (Agencourt). The final concentration of the library pool was determined with a KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA). Libraries were mixed with Illumina-generated PhiX control libraries (5 %) and sequenced with the MiSeq Reagent Kit V3-600 cycles (Illumina Inc., San Diego, USA). The obtained sequence reads were de-multiplexed, quality trimmed and assigned to OTUs at 97 % similarity with

Usearch (v7.0.1090_win64) pipeline (Edgar, 2010). Taxonomy affiliation was done with the SILVA database (Silva.nr_v123, https://www.arb-silva.de/). The final nucleotide sequences obtained were deposited in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) under accession number XXXX. Alpha and Beta diversities were studied using the software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, version 1.8.0) (Caporaso *et al.*, 2010). Relative abundances were calculated using XLSTAT software (XLSTAT version Ecology 18.07, http://www.xlstat.com).

2.3. Statistical analyses

Variance analysis was carried out on all data with a one-way ANOVA (Duncan test with confidence interval of 95%). Normality tests and k-sample comparison of variances were analyzed. Redundancy analysis (RDA) was performed between the soil physicochemical characteristics and the relative abundancy at the bacterial phyla level for the planted treatments. These statistical analyses were carried out on XLSTAT software (XLSTAT version Ecology 18.07, http://www.xlstat.com).

3. Results

3.1. Soil physico-chemical analyses

The treatment NFCon-CoC had significantly the lowest soil pH in comparison to all other treatments (Table 17). Soil CEC was the lowest for the treatment of FCon-Ro C. Soil conductivity, soil total C and N concentrations were not different among all treatments. Nevertheless, the C/N ratio was found to be higher than other treatments in the case of NFCon-Ro. In addition, Ro treatment had a significantly higher C/N ratio compared to BS. Regarding soil organic matter, despite the fact that it was greatest for the Ro treatment, it was not significantly different among all treatments. Planted treatments significantly enhanced soil organic N compared to BS, except FCon-Ro. Concerning soil soluble C, on one hand FCon-CoC had significantly the highest concentration among all treatments and, on the other hand, CoC and FCon-CoC were significantly higher compared to BS. As for soil soluble N, BS had the most elevated concentration compared to all planted treatments. Ammonium concentration in the soil was not different among planted treatments and BS except NFCon-CoC which was significantly higher. Once again, and as in the case of soil soluble N, BS showed significantly highest concentrations of nitrate.

3.2. Soil microbial biomass and community-level physiological profiling

Soil microbial biomass and the phenotypic structure of the soil bacterial communities were characterized at harvest. Concerning MBC, CoC and Ro had significantly the highest value compared to all planted treatments but were not different from BS (Table 17). Same tendency was shown for MBN, but this time CoC and Ro had significantly higher values than BS. Strongest AWCD for the bacterial communities was observed in the case of CoC and Ro despite the non-significant effect with other treatments except FCon-Ro which had the lowest value among all the planted treatments and BS. Same tendency was shown for H index that was again lowest for FCon-Ro treatment.

Table 17 : Soil physico-chemical and microbial biomass characteristics at harvest. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. N, C, Ni, MBC and MBN correspond to nitrogen, carbon, nickel, microbial biomass carbon and microbial biomass nitrogen, respectively. Means ± standard error in a line (for each soil parameter) followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5)

	CoC		FCon-CoC		NFCon-CoC		Ro		FCon-Ro		NFCon-Ro		BS	
Soil physicochemical analyses														
pH	5.76 ±0.09	a	5.77 ±0.11	a	5.44 ±0.05	b	5.93 ±0.03	a	5.89 ±0.05	a	5.93 ±0.02	a	5.76 ±0.10	a
CEC ($cmol^+ kg^{-1}$)	14.11 ±1.12	ab	15.45 ±0.95	ab	12.80 ±0.85	bc	15.41 ±0.70	ab	11.13 ±1.19	c	16.22 ±0.48	a	14.97 ±1.08	ab
Conductivity ($\mu S\ cm^{-1}$)	543.60 ±61.20	a	618.20 ±140.95	a	518.40 ±70.27	a	565.00 ±76.28	a	616.00 ±57.17	a	641.00 ±38.65	a	526.80 ±39.57	a
Soil total C ($g\ kg^{-1}$)	18.02 ±1.01	a	20.16 ±0.96	a	20.23 ±1.41	a	21.04 ±0.51	a	18.76 ±0.86	a	20.73 ±0.67	a	20.63 ±0.86	a
Soil total N ($g\ kg^{-1}$)	1.69 ±0.10	a	1.86 ±0.07	a	1.89 ±0.12	a	1.90 ±0.06	a	1.74 ±0.09	a	1.86 ±0.07	a	1.94 ±0.09	a
C/N ratio	10.69 ±0.14	c	10.84 ±0.16	abc	10.66 ±0.10	c	11.06 ±0.09	ab	10.76 ±0.07	bc	11.16 ±0.10	a	10.66 ±0.11	c
Organic Matter ($g\ kg^{-1}$)	33.08 ±1.40	a	34.04 ±1.63	a	34.26 ±2.10	a	36.00 ±0.82	a	31.84 ±1.55	a	35.19 ±0.94	a	33.81 ±2.00	a
Organic N ($g\ kg^{-1}$)	2.09 ±0.07	a	2.17 ±0.11	a	2.09 ±0.09	a	2.11 ±0.08	a	1.64 ±0.21	b	2.10 ±0.07	a	1.51 ±0.39	b
Soluble C ($mg\ kg^{-1}$)	16.62 ±0.60	b	21.08 ±0.95	a	13.65 ±0.58	c	15.60 ±0.75	bc	15.78 ±0.76	bc	15.90 ±0.87	bc	13.78 ±0.21	c
Soluble N ($mg\ kg^{-1}$)	0.86 ±0.11	b	0.85 ±0.10	b	0.67 ±0.03	b	0.70 ±0.07	b	0.65 ±0.03	b	0.68 ±0.07	b	35.45 ±1.76	a
[NH_4^+] ($mg\ kg^{-1}$)	0.14 ±0.03	b	0.19 ±0.08	b	0.51 ±0.16	a	0.22 ±0.07	b	0.31 ±0.04	ab	0.39 ±0.08	ab	0.23 ±0.03	b
[NO_3^-] ($mg\ kg^{-1}$)	5.06 ±1.28	b	8.43 ±1.41	b	6.53 ±0.31	b	5.29 ±1.12	b	5.86 ±0.57	b	7.14 ±0.49	b	18.76 ±2.91	a
Soil microbial analyses														
MBC ($mg\ C\ kg^{-1}$)	149.32 ±8.35	a	116.70 ±9.83	b	102.41 ±11.34	b	149.49 ±10.37	a	97.95 ±7.33	b	119.29 ±8.01	b	147.42 ±10.82	a
MBN ($mg\ N\ kg^{-1}$)	15.42 ±0.57	a	10.16 ±0.99	b	8.90 ±0.87	b	15.08 ±0.79	a	9.41 ±1.08	b	10.21 ±0.99	b	8.75 ±0.84	b
AWCD	1.47 ±0.09	a	1.41 ±0.09	a	1.37 ±0.19	a	1.47 ±0.08	a	0.78 ±0.10	b	1.18 ±0.17	a	1.12 ±0.11	ab
H index	4.13 ±0.08	a	4.19 ±0.07	a	4.21 ±0.06	a	4.22 ±0.08	a	3.81 ±0.14	b	4.16 ±0.08	a	4.03 ±0.06	ab

3.3. Soil enzymatic activities

Regarding soil microbial enzyme activities, the values related to planted treatments were normalized to that of the bare soil (Figure 44). The activity of ACC deaminase (ACCd) showed the highest value for the CoC cropping system compared to all other treatments. FCon-Ro showed the lowest ACCd activity and was the nearest to zero (zero corresponds to the value of the bare soil, BS). Concerning FDA activity, the normalized values of this enzyme were lower than those for BS. Moreover, FDA activity was lower in the case of FCon-CoC and NFCon-Ro. The arylsulfatase activity of CoC and Ro cropping systems showed higher and positive values compared to their fertilized and non-fertilized controls. Moreover, for this microbial enzymatic activity, the fertilized controls FCon-CoC and FCon-Ro displayed negative normalized values compared to all treatments. Inversely, CoC and Ro treatments exhibited lower phosphatase activity compared to controls. Same tendency was shown in the case of the β-glucosidase activity. However, for the latter two, mean values for the planted treatments were always above zero. As for soil urease activity, FCon-CoC showed the lowest activity among treatments.

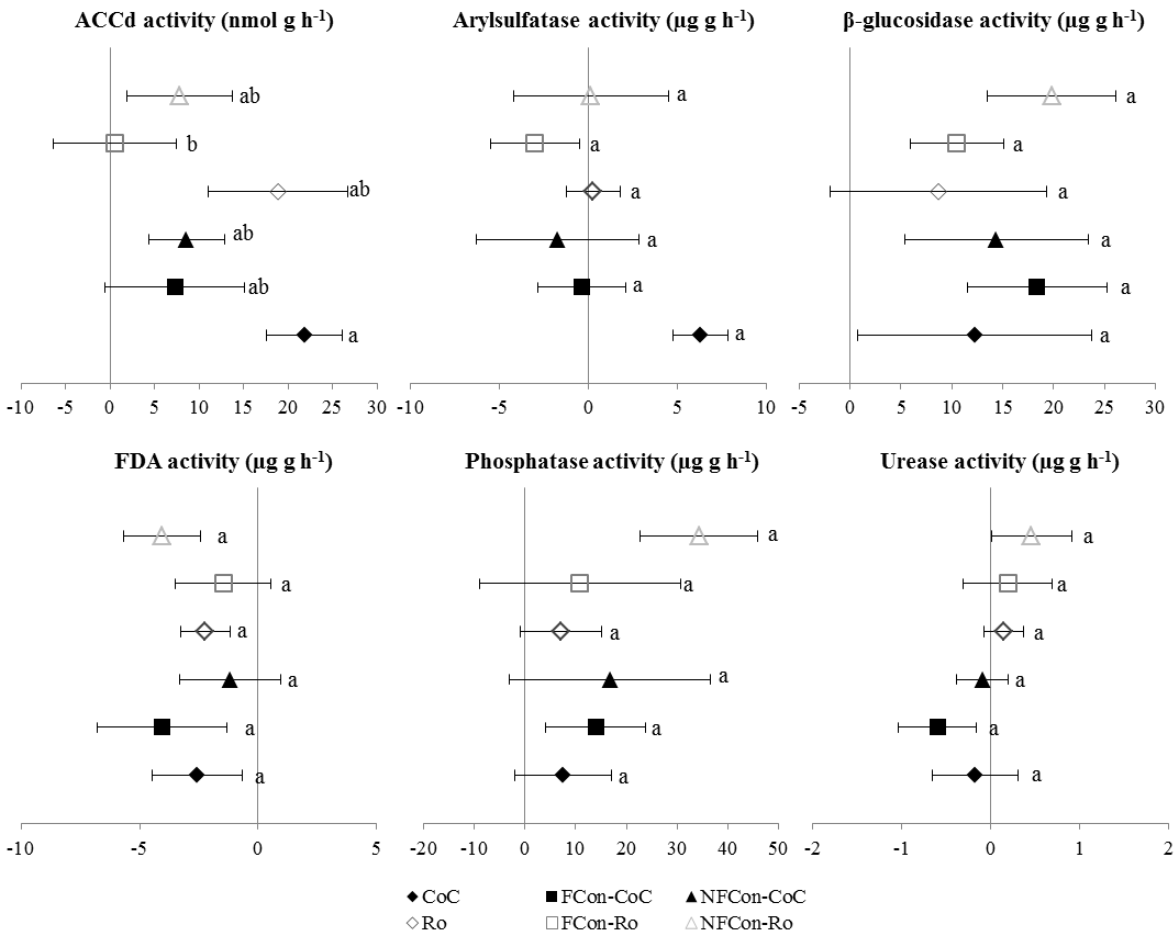


Figure 44 : Microbial enzyme activities in the soil at the harvest. Values were normalized to bare soil values. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. For each enzymatic activity, means ± standard error followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), ($n = 5$).

3.4. High‑throughput 16S rRNA amplicon sequencing results

3.4.1. Bacterial diversity at phyla and subphyla levels

A total of 2 867 714 bacterial sequences were obtained from the seven treatments analyzed with a mean of 81 935 reads per sample (ranging from 17 005 in the treatment FCon-Ro to 186 315 in the treatment CoC). A total of 8 790 OTUs were found for all the treatments and were separated in 18 different phyla and subphyla ("*Other*" phylum regroups all phyla that have a relative abundance <1%). Bacterial relative abundance at the phyla and subphyla level is represented in Figure 45. *Actinobacteria* phylum is the most represented among all treatments. This phylum showed lower relative abundance for CoC (27.48%) and Ro cultural (28.09%) systems compared to their fertilized and non-fertilized controls. Furthermore, all the planted treatments had for this phylum higher relative abundance compared to BS (25.32%). In the case of *Acidobacteria* phylum, an inverse effect was shown for the treatment of CoC and Ro treatments compared to their fertilized and non-fertilized controls. In addition, all planted treatments had lower relative abundances of this phylum when compared the unplanted soil (BS). The presence of the *Chloroflexi* phylum was greater for the treatment of FCon-Ro (10.25%) compared to all other treatments. Concerning the *Gemmatimonadetes* phylum, CoC (12.16%) and Ro (12.25%) cropping systems showed greatest relative abundances compared to their fertilized or non-fertilized controls, but BS had the greatest relative abundance of all treatments (13.65%). *α-Proteobacteria* subphylum was more abundant in the case of non-fertilized treatments (NFCon-CoC and NFCon-Ro) compared to all other planted treatments. Treatments where the legume was introduced (CoC and Ro) showed greater relative abundances of the *β-Proteobacteria* subphylum compared to their fertilized controls (FCon-CoC and FCon-Ro).

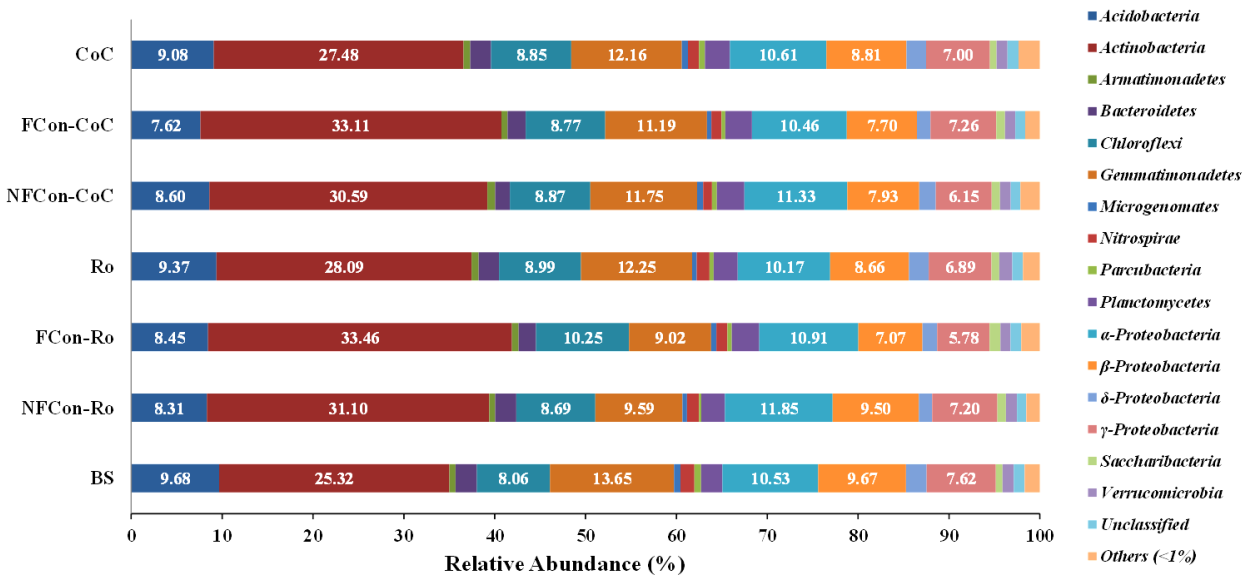
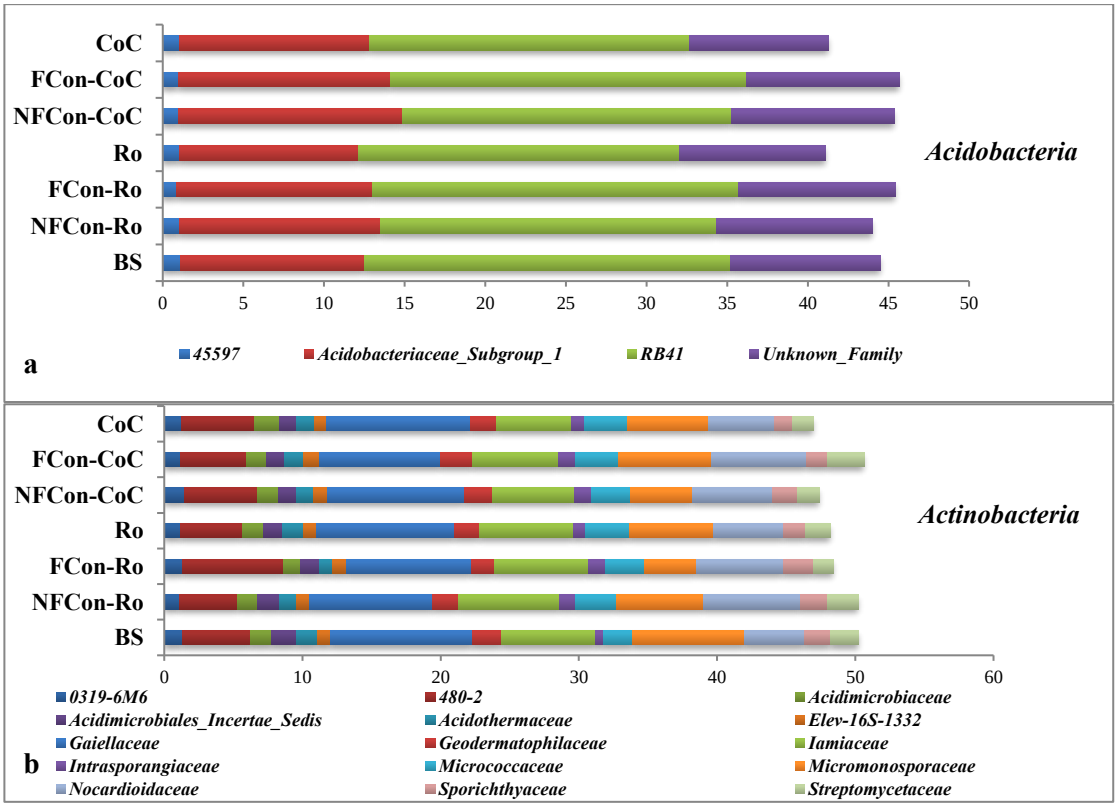


Figure 45 : Relative abundance of bacterial phyla and subphyla identified in all soil samples (%). "Others" refer to *Candidate_division_OP3, Candidate_division_WS6, Chlamydiae, Chlorobi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, GAL08, GOUTA4, Gracilibacteria, Hydrogenedentes, Kazan-3B-09, Latescibacteria, Omnitrophica, ε-Proteobacteria, TA18, SHA-109, SM2F11, Spirochaetae, Thermotogae, TM6, WCHB1-60, WD272* having a relative abundance <1%. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively.

3.4.2. Bacterial diversity at family level

Bacterial phyla and subphyla with relative abundances greater than 7% were selected for further analyses of bacterial diversity at family level. These bacterial phyla and subphyla were the following: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *Chloroflexi* and *Gemmatimonadetes* (Figure 46). Regarding the families belonging to the *Acidobacteria* phylum (Figure 46a), the *Acidobacteriaceae_Subgroup_1* and *RB41* bacterial families showed lowest relative abundances for the treatments with legume (CoC and Ro). In addition, *RB41* family showed greatest percentages of relative abundance for fertilized controls (FCon-CoC, 22.06% and FCon-Ro, 22.68%) and bare soil (BS, 22.70 %). For the families of *Actinobacteria* phylum (Figure 46b), *Nocardioidaceae* was shown to be favored in fertilized controls (6.83 and 7.00 for FCon-CoC and FCon-Ro, respectively). Inversely, *Gaiellacea* was negatively affected in the fertilized treatment FCon-CoC (8.71 %) and *Micromonosporaceae* in the fertilized treatment FCon-Ro (3.75 %). *Lamiacea* bacterial family had less relative abundances in the treatments with legume, when comparing CoC (5.40 %) and Ro (6.76 %) with their respective fertilized or non-fertilized controls. Concerning the bacterial families in the *α-Proteobacteria* subphylum (Figure 46c), there was a negative effect of the fertilization on the relative abundances of the *Caulobacteracea*. In

addition, all planted treatments showed greater abundancy of the *Erythrobacteraceae* family compared to the bare soil (BS) (7.57 %). The bacterial family *Rhizobiales_Incertae_Sedis* showed greater abundances in the treatment of CoC (7.31 %) and Ro (7.37 %) compared to their fertilized and non-fertilized controls. Among the families belonging to the *β-Proteobacteria* subphylum (Figure 46d), the different families revealed opposite tendencies related to mineral fertilization. The bacterial family *Comamonadaceae* was adversely affected by mineral fertilization compared to CoC (17.26 %) and Ro (15.24 %) treatments. On the other side, the *Oxalobacteraceae* family was favored in fertilized controls compared to treatments with legume. In the *Chloroflexi* phylum (Figure 46e), the bacterial family *Anaerolineaceae* was unfavored in both fertilized and non-fertilized treatments when compared to CoC (7.91 %), Ro (8.25 %) and BS (8.10 %). In addition, there was a clear negative effect of mineral fertilization on the *Roseiflexaceae* bacterial family in the case of the FCon-Ro treatment (%). Within the *Gemmatimonadetes* phylum (Figure 46f), one bacterial family was abundant, which is the *Gemmatimonadaceae*, and it was favored in treatments with legume (CoC (92.56 %) and Ro (92.83 %)) and unfavored within fertilized treatments.



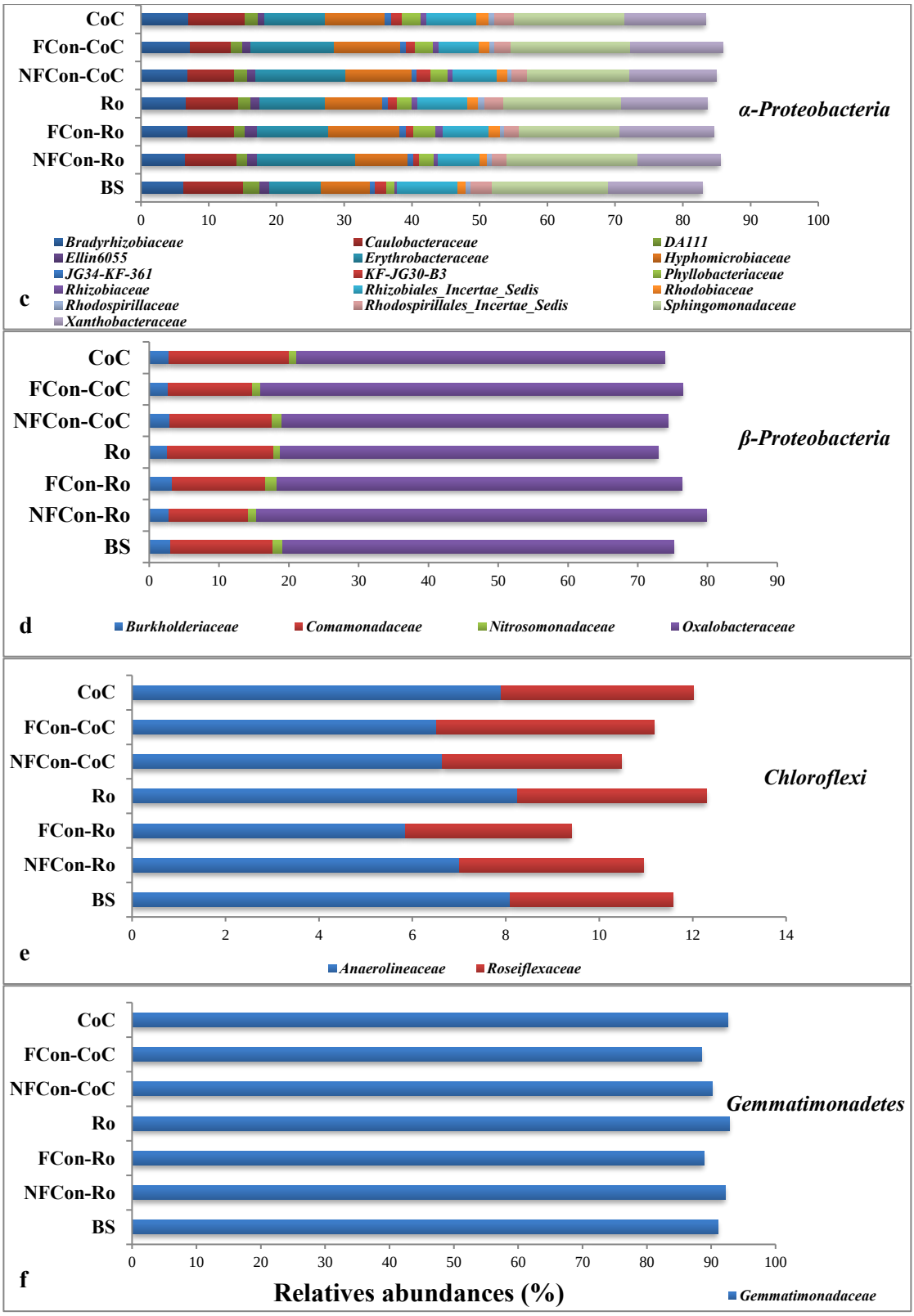


Figure 46 : Relative abundance of bacterial families per phyla and subphyla with relative abundances greater than 7% (*Acidobacteria* (a), *Actinobacteria* (b), *α-Proteobacteria* (c), *β-Proteobacteria* (d), *Chloroflexi* (e), *Gemmatimonadetes* (f)). CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively.

3.4.3. Non-metric multidimensional scaling at OTUs level

The graphical representation NMDS (Non-metric multidimensional scaling) allowed to compare the treatments (Figure 47) based on the unweighted phylogenetic criteria and on sequences alignment (sequences not influenced by their number). The planted treatments were strongly discriminated by axis 2 (NMDS2) from the unplanted treatment (BS). In addition, CoC and Ro treatments were discriminated from their fertilized control. In fact, CoC (negative abscise) was discriminated from FCon-CoC (positive abscise) along the axis 1 (NMDS1) and Ro (positive ordinate) was discriminated from FCon-Ro (negative ordinate) along the axis 2 (NMDS2).

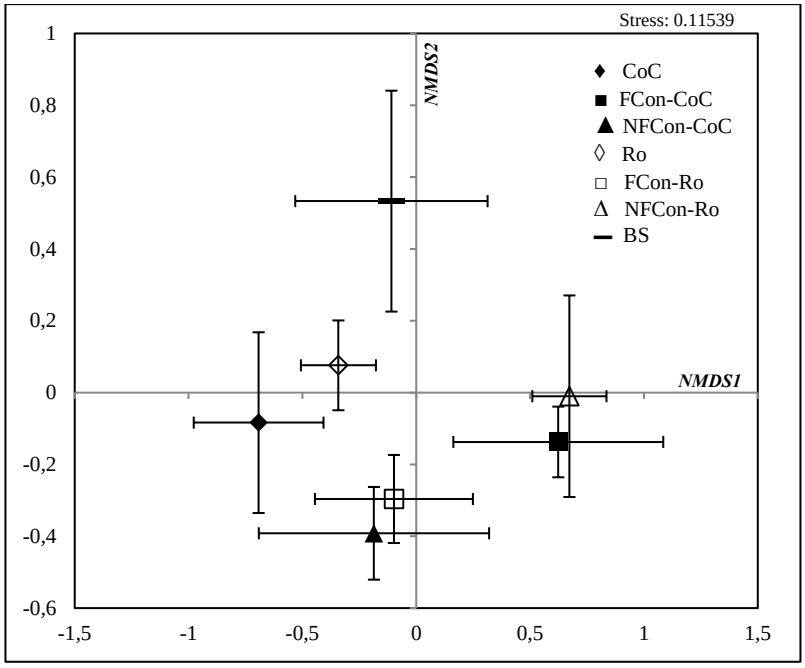


Figure 47 : Non-metric multidimensional scaling: distribution of the treatments according to their bacterial community. Points ± standard error represent the coordinate means (based on 5 points for each treatment. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro and BS correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively.

3.5. Global analysis

Redundancy analysis (RDA) was performed between soil physico-chemical characteristics and the relative abundancy at the bacterial phylum level (> 7 %) for all planted treatments (Figure 48). Axis 1 explained 46.1 % of the total variability discriminated CoC from FCon-CoC and Ro from NFCon-Ro. Along Axis 2, which explained 26.6 % of the total variability, all the planted treatments were strongly discriminated from FCon-Ro. Spearman correlations ($p < 0.1$) were measured between the relative abundance of the bacterial phyla and soil physico-chemical characteristics for all the treatments. Only significant correlations

were kept. *Gemmatimonadetes* was more abundant in the rhizosphere soils of CoC and Ro treatments and was negatively correlated to soil conductivity (R = -0.56) and soil ammonium concentrations (R = -0.33). *Chloroflexi* phylum was shown to be more abundant in the case of FCon-Ro soils, which were negatively correlated to soil organic matter concentrations (R = -0.33), CEC (R = -0.53), conductivity (R = -0.34) and nitrate concentration (R = -0.41). *Actinobacteria* was favored in the case of FCon-CoC treatment and was positively correlated to soil conductivity (R = 0.44) and ammonium concentration (R = 0.48). *Acidobacteria* was negatively influenced in the treatment of FCon-CoC and negatively correlated to soil soluble nitrogen (R = -0.36), nitrate concentration (R = -0.37) and conductivity (R = -0.48). The presence of the *β-Proteobacteria* was unfavored in the case of NFCon-Ro and was positively correlated to soil CEC (R = 0.38). As for *α-Proteobacteria*, this subphylum was negatively correlated to soil total carbon and nitrogen contents (R = -0.34 and R = -0.32 respectively), organic matter (R = -0.45), organic nitrogen content (R = -0.46) and CEC (R = -0.39).

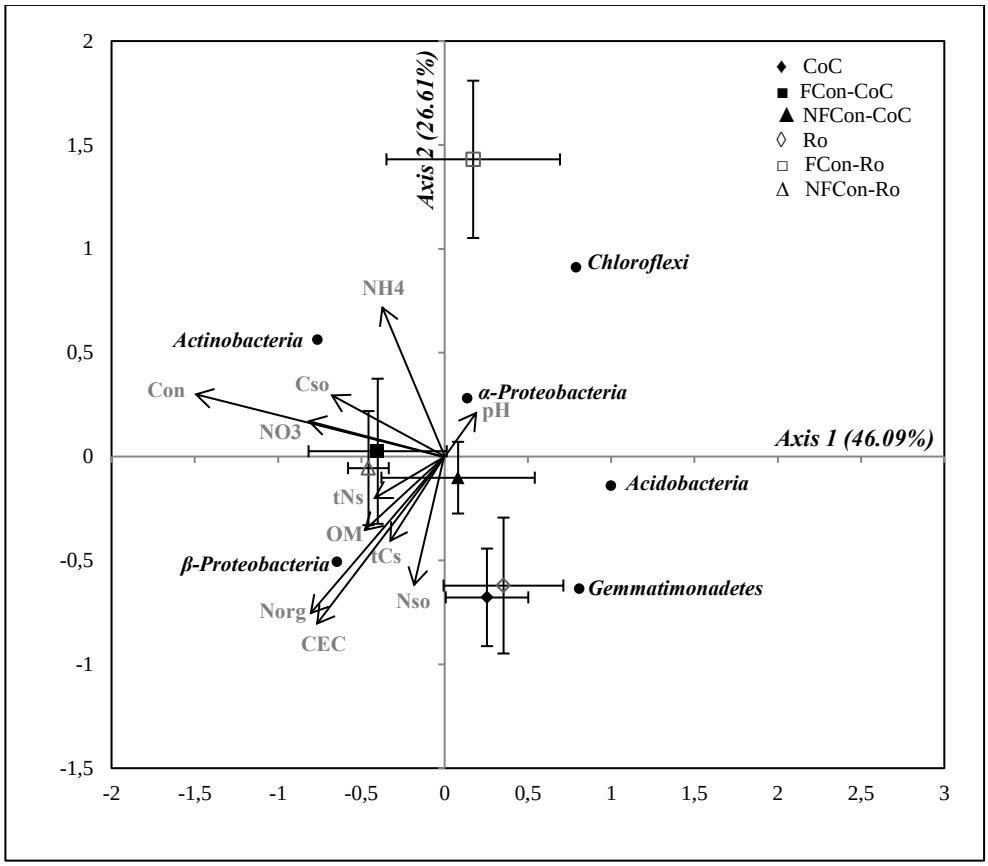


Figure 48 : Redundancy Analysis (RDA) performed between soil physico-chemical characteristics and relative abundancy of bacterial phyla for planted treatments. Points ± standard error represent the coordinate means based on 5 points for each treatment (5 replicates). Coordinates of soil parameters were multiplied by a factor of 2.5 in order to be clearer on the RDA graph. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro and NFCon-Ro correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. *Abbreviations:* Soil total carbon concentration

(tCs), soil total nitrogen concentration (tNs), soil organic matter concentration (OM), soil organic nitrogen concentration (Nor), soil soluble carbon concentration (Cso), soil soluble nitrogen concentration (Nso), soil pH (pH), soil Cation Exchange Capacity (CEC), soil conductivity (Con), soil ammonium concentration (NH_4), soil nitrate concentration (NO_3).

3.6. Alpha diversity indexes

Alpha diversity was studied with the software QIIME (Figure 49). Shannon and Chao1 indices showed the same tendencies: CoC and Ro treatments had greater values for both indices compared to their fertilized and unfertilized treatments and BS. In addition, CoC treatment had significantly greater values for these indices than FCon-CoC.

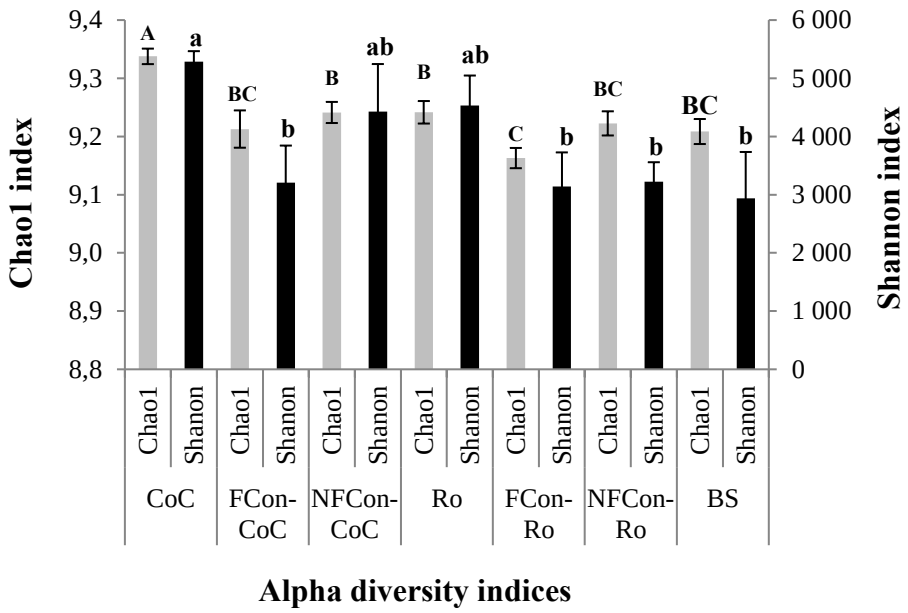


Figure 49 : Alpha diversity indices (Chao1 and Shannon). CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro and NFCon-Ro correspond to co-cropping, fertilized control of co-cropping, non-fertilized control of co-cropping, rotation, fertilized control of rotation, non-fertilized control of rotation cultural systems and bare soil, respectively. Means ± standard error followed by different letters (from the same shape: lower- or uppercase) are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test), (n = 5)

4. Discussion

Only few studies have investigated the impact of associating different plants on metal phytoextraction efficiency (Epelde *et al.*, 2012), but also on the size of the cultivable rhizosphere bacterial communities, their phenotypic and genetic structures (Lucisine *et al.*, 2014; Rue *et al.*, 2015). Here, our objective was to study the impact of new cropping systems (co-cropping and rotation with legume *vs* mineral fertilization) dedicated to agromining, already used in conventional agriculture, on bacterial diversity and physico-chemical characteristics of an ultramafic soil. Our hypothesis was that the increase of plant diversity by

associating two different plant species (a legume and a hyperaccumulator plant) could in turn modify bacterial diversity and the characteristics of a naturally nickel-rich soil.

In our study, the treatment of the rotation with the legume (Ro) showed a higher C/N ratio compared to bare soil and a higher soil organic matter compared to its fertilized control. Due to their importance in ecosystem performance, C and N were always used as soil quality indicators (Gregorich *et al.*, 2001). Furthermore, soil carbon content was found to be enhanced by plant diversity through exudation and turnover of plant biomass (Zak *et al.*, 2003). Moreover, available or soluble N provided by the decomposition of legume residues enhances soil fertility (Rühlemann and Schmidtke, 2015). So, N supplied by the legume meets the nutrient needs of the crop, N being the most limiting factor for optimum plant growth (Scalise *et al.*, 2015). We found that bare soil had higher amounts of nitrates and soluble N in comparison with planted soils and particularly with co-cropping and rotation systems. This could be due to the fact that, in the case of planted soil, the plant (*A. murale*) absorbed these elements during the period of the experiment. This species responds dramatically to N fertilization levels by increasing (Bani *et al.*, 2007).

The effect of plant diversity on soil microorganisms was studied by few researchers (Spehn *et al.*, 2000; Zak *et al.*, 2003; Innes *et al.*, 2004; Benizri and Amiaud, 2005). It has been proved that plant diversity can enhance the size of soil microbial community, its activities and diversity (Chung *et al.*, 2007). A clear positive effect of the introduction of a legume in our cropping systems (co-cropping and rotation) was shown on the microbial biomass MBC and MBN. Thus, for example, Eisenhauer *et al.* observed (2017) an increase of soil bacterial biomass from 22.7 to 25.7 nmol g^{-1} soil dry weight with increasing plant species richness (from 1 to 6 plant species). In parallel, mineral fertilization was found to have a negative impact on these microbial parameters. Different studies have given substantial consideration for soil microbial biomass as it is usually used to characterize the mineralization of soil organic C and nitrogen (Jenkinson and Ladd, 1981; Harris, 2009; Anderson and Domsch, 2010). In addition, soil MBC can reflect minor modifications in soil organic matter earlier than soil total C content (Lupwayi *et al.*, 2015). Furthermore, microbial biomass was significantly positively correlated with plant diversity in many studies (Zak *et al.*, 2003; Thakur *et al.*, 2015; Eisenhauer *et al.*, 2017). In our study, we did not detect a clear effect on total carbon content in the soil but MBC was clearly stimulated when *Vicia* was introduced in the cropping system (co-cropping and rotation). Moreover, an increase in soil MBN is reflected by an improvement of soil fertility (Singh *et al.*, 2007) as shown especially in the treatment of rotation with the legume where the organic matter content tended to increase.

Gao *et al.* (2010, 2012) showed that different plant species induced the development of a complex microbial community and more diversified microbial functional groups. This observation was confirmed by recent studies in controlled experiments which indicated that soil microorganisms were closely tied to plant diversity effects on multiple ecosystem functions. Accordingly, the functional composition of soil microbial communities changes with plant diversity (Chung *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2015; Eisenhauer *et al.*, 2017). On the other side, Chaussod (1996) and Geisseler and Scow (2014) showed that nitrogen fertilization can significantly depress microbial biomass. This was also confirmed by a synthesis on 82 field studies revealed that N fertilization reduced the microbial biomass by an average of 15 % (Treseder, 2008). Likewise, Liu and Greaver (2010) found that N addition reduced Cmic (microbial carbon) by 20 % across 57 studies (Geisseler and Scow, 2014).

Our results, based on community level physiological profiles, confirmed these previous observations. Indeed, the introduction of a legume increased AWCD and H index in and the case of Ro treatments in comparison with its fertilized control. As soil carbon is a key factor governing soil microorganism growth (Grayston *et al.*, 1997), the increase in microbial community functional potential may be explained by an increase in carbon availability as a consequence of legume incorporation (Gomez *et al.*, 2006). This was confirmed by other studies which reported that the addition of organic matter (compost, manure) caused a significant increase in microbial activity (Perucci, 1992; Fließbach and Mäder, 1997; Marinari *et al.*, 2000). Moreover, this could also be due to the presence of mixed root exudates that originated from two different plant species (before the legume destruction) which induced an increased activity of the microbial communities (Benizri *et al.*, 2007; Rue *et al.*, 2015). In fact, it is well known that the amount, and in a lower extent the diversity, of root exudates with increasing plant diversity, can alter soil microbial communities and functions (Hooper *et al.*, 2000). Soil microbial enzyme activities are closely related to biogeochemical nutrient cycles and soil fertility. They are known to show a rapid response to changes in soils (Aon and Colaneri, 2001). They are affected by management practices and can be used as sensitive indicators of ecological stability (Ajwa *et al.*, 1999). In our study, the different cropping systems tested influenced the activities of arylsulfatase, β-glucosidase, phosphatase and urease in many different ways. Arylsulfatase activity was shown to be enhanced in the treatments with legume and decreased with mineral fertilization treatments. In fact, plant diversity can decrease the toxic effect of heavy metals on microbial communities in the soil, thus allowing the particular enzymatic activities in the presence of different plant species (Gao *et al.*, 2012). In addition, the amendment of legume residues to the soil in the co-

cropping and rotation treatments stimulated this enzyme activity. Many studies have shown an increase of microbial enzymatic activity in the soil with the addition of organic carbon (i.e. legume residues) (Knauff *et al.*, 2003). Concerning β-glucosidase and phosphatase activities, all planted treatment showed positive values when normalized to the bare soil. These two enzymes, involved with the cycling of C and P, were unfavored in the treatments with the legume. Indeed, the activity of soil microorganisms was found to be dependent on one hand to their demand and, on the other hand, to the availability of soil nutrients (Burns *et al.*, 2013). So, as shown in the Ro treatment, when the soil C/N ratio increases, the activity of the β-glucosidase theoretically decreases. Conversely, β-glucosidase activity was still significantly increased by fertilization, as it has been shown by Geisseler and Scow (2014). Indeed, a number of studies found that an increased availability of mineral N promoted the production of extracellular enzymes involved in the C cycle (Henriksen and Breland, 1999; Carreiro *et al.*, 2000; Geisseler and Horwath, 2009). The same tendency was shown for phosphatase activity. The incorporation in the soil of green residues in the treatments with the legume (in our study CoC and Ro) decreased such microbial activity due to bioavailable nutrients (Snapp *et al.*, 1998). In addition, legumes release organic acids in the soil during their vegetative growth. These organic acids can complex soil nutrients attached to soil particles and thus, increase nutrient availability (such as P) in soils (Rochester *et al.*, 2001; Yadav *et al.*, 2017). So, the decreased activity of phosphatase in the soil, after the incorporation of legume residues, could be explained by the high energy required for the production this microbial extracellular enzyme that could force the soil microorganisms to act in an economical way when nutrients are available in the soil. Thus, the microbial community reduces its activity (Allison *et al.*, 2011). Concerning urease activity, it is well known that this microbial enzymatic activity is influenced by several factors such as organic matter content and the amount of added N in the soil (Wang *et al.*, 2004). Consequently, urease activity can be directly affected by the variation of the soil N-pool. Consequently, there was a tendency of a negative effect of mineral fertilization on urease activity in our study, noting that the FCon-CoC treatment had the lowest normalized value compared to other treatments. This could be explained by the significant input of available and mineral N in the soil in these treatments during the experiment, thus forcing microbial communities to decrease their activity. This fact was also proved by the decrease of the MBN in treatments receiving a supply of ammonitrate. So, our results confirmed those obtained by Ajwa *et al.* (1999), who evidenced that N fertilization increased activities of β-glucosidase and phosphatase but decreased urease activity. Concerning ACCd activity, our study revealed a clear positive effect of the

treatments with the legume (CoC and Ro) on this enzyme. In addition, all normalized values of the planted treatments were positive, thus indicating a stimulation of this enzymatic activity compared to the bare soil. In fact, ACCd can degrade ACC, the immediate precursor of ethylene in plants, to alpha-ketobutyrate and ammonia and thereby lower plant ethylene levels (Honma and Shimomura, 1978). In our study, we observed that co-cropping or rotation with a legume increased this enzyme activity and could result from the presence of more diverse plant species, favoring the development of a bacterial community possessing this function. Moreover, the higher the ACCd activity, the less *A. murale* is suffering from ethylene levels in its tissues (Glick, 2014) which results in plants that are less stressed.

Analyzing the bacterial diversity in different ecosystems and with a large field of application is within aims of the high-throughput sequencing of 16S DNA (Gołębiewski *et al.*, 2014; Yasir *et al.*, 2015). *Actinobacteria* was the most represented among bacterial phyla and had lower relative abundance in the treatments associating the legume (CoC and Ro). The high presence if this phylum in the soil of all the treatments could be related to the Ni-resistant bacteria (Sessitsch *et al.*, 2013). In addition, our results showed an increase of the presence of this phylum in fertilized treatments compared to the treatments with legumes. In fact, a high availability of substrate (mineral nitrogen) in the fertilized treatments could boost the *Actinobacteria* population (Li *et al.*, 2012). The addition of organic amendments to the soils is almost always expected to favor the growth of the *Actinobacteria* phylum due to its role in the degradation of organic compounds (Acosta-Martínez *et al.*, 2008; Jenkins *et al.*, 2009). In our study, in the treatments with the legume where the residues were buried in the soil, there were unfavorable conditions for the growth of *Actinobacteria*. In fact, Bell *et al.* (2012) and Li *et al.* (2012) showed the same unexplained effect of organic amendments on the decrease of the *Actinobacteria* relative abundance in the soil. Concerning *Acidobacteria* and *Gemmatimonadetes* phyla, their relative abundance increased in the treatments with the legume. In fact, the *Acidobacteria* bacterial phylum is one of the most abundant bacterial phyla in terrestrial ecosystems (Barns *et al.*, 1999). In addition, they play a crucial role in the C cycle due to their ability to degrade complex plant derived polysaccharides such as cellulose and lignin (Ward *et al.*, 2009). Consequently, higher value of the relative abundance of this phylum could be related to the degradation of the legume residues that were incorporated into the soil. Bacteria belonging to phylum *Gemmatimonadetes* are frequently detected in environmental 16S rRNA gene libraries and have been identified as one of the top nine phyla found in soils (Janssen, 2006). In their study, DeBruyn *et al.* (2011) found the highest proportions of *Gemmatimonadetes* in arid soils, suggesting an adaption to low-

moisture environments. Moreover, in microbial communities associated with soil microaggregates, a much higher percentage of *Gemmatimonadetes* (10 to 32% of the community) was found in the inner microaggregates than in the whole aggregates (Mummey *et al.*, 2006). This may be indicative of an adaptation to low-moisture (or low-oxygen) conditions typical of inner aggregates (DeBruyn *et al.*, 2011). Thus, in our study, we could suggest that the increase in the relative abundance of the *Gemmatimonadetes* in the treatments of CoC and Ro was due, firstly both to the presence of legume and the hyperaccumulator plant, inducing periods with low soil moisture and, secondly, to the fact that previous results showed that more bacterial microaggregates where observed in the case of treatment with the introduction of a legume (Saad *et al.*, 2017). *Chloroflexi* phylum was shown to be more expressed for the treatment of FCon-Ro compared to all other treatments. The phylum *Chloroflexi* was found to be abundant in extreme and stressing conditions such as saline waters (Yamada *et al.*, 2005). We can hypothesize that mineral fertilization induced higher ion concentrations in the soil that favored the growth of bacteria belonging to this plylum. *α-Proteobacteria* and *β-Proteobacteria* subphyla were shown to be more abundant in the case of treatments with the legume (CoC and Ro) compared to their fertilized controls. *Proteobacteria* were more abundant in treatments with organic matter amendments compared to mineral fertilized soils. Bacterial families of both subphyla have been defined as copiotrophic bacteria (Fierer *et al.*, 2007; Lienhard *et al.*, 2014), which are fast-growing organisms that prefer carbon-rich environments. Organic matter amendments (in our study, the incorporation of legume residues) contributed to higher amounts of organic matter and organic N in the topsoil (Ludwig *et al.*, 2011) thus, favored *α-Proteobacteria* and *β-Proteobacteria* subphyla. Moreover, the presence of legumes in agricultural systems is known to increase populations of *α-Proteobacteria* and *β-Proteobacteria* (Moulin *et al.*, 2001) and several bacterial strains, belonging to these subphyla, are able to fix atmospheric nitrogen in nodules present on legume roots.

Regarding the results of the NMDS, it showed that planted treatments are clearly discriminated from bare soil (BS). In addition, the treatment of co-cropping and rotation were also clearly discriminated from their fertilized controls. In fact, the rhizosphere soil of *A. murale,* in the case of these two treatments, also contained compounds that originated from legume residues. Consequently, it is known that the more diverse the composition of organic compounds is, the more diverse the bacterial communities are (Gao *et al.*, 2012; Sessitsch *et al.*, 2013), the observed results from the NMDS are not surprising. Similar tendencies as in the NMDS were observed using the treatment discrimination done by the RDA analysis. As a

reminder, the discrimination of the different tested cropping systems in the RDA analysis was coupled to bacterial diversity at the phylum level and the physico-chemical parameters of the soil, at harvest. Thus, as we can see, the soil physico-chemical parameters can influence the bacterial rhizobiome of *A. murale* in terms of distribution and diversity. Indeed, since they constitute the substrates or products of soil microbial activities, the availabilities of NH_4^+ and NO_3^- do influence nitrification (Leininger *et al.*, 2006; Patra *et al.*, 2006) and denitrification (Patra *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2008). Consequently, the composition of nitrifying (Attard *et al.*, 2010) and denitrifying communities (Bremer *et al.*, 2007) are affected by soil N availability. Fierer *et al.* (2012) showed that nitrogen content can affect the composition of the microbial community by promoting certain bacterial groups such as *Proteobacteria*, due to their needs of resources during their longer developmental period (MacArthur and Wilson, 1967). We observed that the bacterial sub-phylum *α-Proteobacteria* is positively correlated to the soil organic matter and organic N. The availability of soil C which is the energy substrate of heterotrophic microbial communities (the case of denitrifiers), also influences the composition of bacterial communities (Griffiths *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2008). In our study we observed that the *Actinobacteria* phylum was positively influenced by soluble C in the soil. Previous studies have analyzed the effects of the abiotic parameters on microbial functional parameters, which in turn have effects on soil properties such as soil nutrients and pH. In our study, even if soil pH did not highly vary between all the treatments, our RDA analysis showed that the *α-Proteobacteria* subphylum and soil pH were closely related, and even that these parameters were positively correlated. This is in accordance of studies which have shown an increase of the relative abundance of this bacterial subphylum with higher soil pH (Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010).

The reduction of microbial diversity is mainly due to anthropogenic activities that disrupt the soil (Gans *et al.*, 2005), such as inputs of chemicals (Hussain *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013). Postma-Blaauw *et al.* (2012) investigated the taxonomic diversity of bacteria in grassland soil transformed into arable land. They noted that intensification of land use (tillage, mineral fertilization, reduced crop diversity) negatively affects the taxonomic diversity of bacteria. Our study clearly confirms previous results obtained by several authors: the treatments with mineral fertilization (especially FCon-Ro) induced a negative impact on the soil microbial analyses. Inversely, treatments with legumes (CoC and Ro) increased soil bacterial diversity.

5. Conclusions

Our results showed that plant diversity, consisting in inserting a legume in agrominign cropping systems, can modify soil processes and characteristics of an ultramafic soil. The rotation treatment with the legume had both higher C/N ratio and soil organic matter compared to its fertilized control. Microbial biomass analysis showed a clear effect of legume treatments on microbial communities. Soil enzymatic activities were significantly affected under the cropping of the two different plants. Also, bacterial diversity was modified with the introduction of the legume or the use of mineral fertilization. Indeed, on one hand, CoC and Ro treatments had a higher soil bacterial diversity, while on the other hand, a lower microbial diversity was shown for the treatments with mineral fertilization (especially the fertilized control of the rotation), mainly due to chemical inputs in the soil. Finally, in response to changes in the type of compounds brought to the soil (quantity and quality of root exudates from different plant species), a change in the activity of the microbial community enzymes involved in the degradation of organic matter is evident as . Co-cropping or rotation of a hyperaccumulator plant with a legume seemed to be a way to improve soil bacterial diversity and soil functioning.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the technical team of “Laboratoire Sols et Environnement” and especially Mr. Lucas Charrois and Mr. Romain Goudon for their help and support. We are thankful for the technical assistance of the joint research unit Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Santiago de Compostella, Spain) and especially the “Soil Microbiology Group”. This work was supported by the French National Research Agency through the national “Investissements d’avenir” program, reference ANR-10-LABX-21 - LABEX RESSOURCES21, through the “Agromine” project, reference ANR-14-CE04-0005, through the European ERA-net FACCE_SURPLUS project “AGRONICKEL: Developing Ni agromining on ultramafic land in Europe”, reference ANR-15-SUSF-0003-05 and the “Application of Nickel hyperaccumulating plants in phytomining processes” program, reference I-LINK0900. Finally, we are thankful to the Association of Specialization and Scientific Guidance (ASSG, Lebanon) for funding the PhD scholarship of Ramez Saad.

References

Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y., Allen, V., 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. Soil Biology and Biochemistry 40, 2762–2770. doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.022

Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of

total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Soil Biology and Biochemistry 33, 943–951. doi:10.1016/S0038-0717(00)00244-3

Ajwa, H.A., Dell, C.J., Rice, C.W., 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. Soil Biology and Biochemistry 31, 769–777. doi:10.1016/S0038-0717(98)00177-1

Allison, S.D., Weintraub, M.N., Gartner, T.B., Waldrop, M.P., 2011. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. Soil Enzymology 22, 229–243. doi:10.1007/978-3-642-14225-3

Anderson, T.H., Domsch, K.H., 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. Soil Biology and Biochemistry 42, 2039–2043. doi:10.1016/j.soilbio.2010.06.026

Aon, M.A., Colaneri, A.C., 2001. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. Applied Soil Ecology 18, 255–270. doi:10.1016/S0929-1393(01)00161-5

Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., Keller, H., 2010. The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. New Phytologist 187, 449–460. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03272.x

Baker, A.J.M., Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1, 81–126.

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania), Plant and Soil, 293 (1-2), 79–89.

Barns, S.M., Takala, S.L., Kuske, C.R., 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. Applied and Environmental Microbiology 65, 1731–1737.

Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. Applied Soil Ecology 19, 135–145. doi:10.1016/S0929-1393(01)00185-8

Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. European Journal of Soil Biology 37, 85–93. doi:10.1016/S1164-5563(01)01071-8

Bartram, A.K., Lynch, M.D.J., Stearns, J.C., Moreno-Hagelsieb, G., Neufeld, J.D., 2011. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. Applied and Environmental Microbiology 77, 3486–3852

Bell, L.W., Sparling, B., Tenuta, M., Entz, M.H., 2012. Soil profile carbon and nutrient stocks under long-term conventional and organic crop and alfalfa-crop rotations and re-established grassland. Agriculture, Ecosystems and Environment 158, 156–163. doi:10.1016/j.agee.2012.06.006

Benizri, E., Amiaud, B., 2005. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. Soil Biology and Biochemistry 37, 2055–2064. doi:10.1016/j.soilbio.2005.03.008

Benizri, E., Nguyen, C., Piutti, S., Slezack-Deschaumes, S., Philippot, L., 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. Soil Biology and Biochemistry 39, 1230–1233. doi:10.1016/j.soilbio.2006.12.026

Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x

Bremer, C., Braker, G., Matthies, D., Reuter, A., Engels, C., Conrad, R., 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-type denitrifier communities in soil. Applied and Environmental Microbiology 73, 6876–6884. doi:10.1128/AEM.01536-07

Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. Soil Biology and Biochemistry 17, 837–842. doi:10.1016/0038-0717(85)90144-0

Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. Soil Biology and Biochemistry. doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.009

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 2010; doi:10.1038/nmeth.f.303

Carreiro, M.M., Sinsabaugh, R.L., Repert, D.A., Parkhurst, D.F., 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. Ecology 81, 2359–2365. doi:Doi 10.2307/177459

Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols : Évaluation et implications. Etude et Gestion Des Sols 3, 261–278.

Chung, H., Zak, D.R., Reich, P.B., Ellsworth, D.S., 2007. Plant species richness, elevated CO_2, and atmospheric nitrogen deposition alter soil microbial community composition and function. Global Change Biology 13, 980–989. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01313.x

DeBruyn, J.M., Nixon, L.T., Fawaz, M.N., Johnson, A.M., Radosevich, M., 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. Applied and Environmental Microbiology 77, 6295–6300. doi:10.1128/AEM.05005-11

Deng, S., Popova, I.E., Dick, L., Dick, R., 2013. Bench scale and microplate format assay of soil enzyme activities using spectroscopic and fluorometric approaches. Applied Soil Ecology 64, 84–90. doi:10.1016/j.apsoil.2012.11.002

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461

Eisenhauer, N., Lanoue, A., Strecker, T., Scheu, S., Steinauer, K., Thakur, M.P., Mommer, L., 2017. Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. Scientific Reports 7, 44641. doi:10.1038/srep44641

Epelde, L., Becerril, J.M., Blanco, F., Kowalchuk, G.A., Garbisu, C., 2012. Links between pseudometallophytes and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. Pedobiologia 55, 219–225. doi:10.1016/j.pedobi.2012.03.005

Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 88, 1354–1364. doi:10.1890/05-1839

Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., Owens, S., Gilbert, J.A., Wall, D.H., Caporaso, J.G., 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 21390–21395. doi:10.1073/pnas.1215210110

Fließbach, A., Mäder, P., 1997. Carbon source utilization by microbial communities in soils under organic and conventional farming practice. Microbial Communities - Functional versus Structural Approaches. 109–120.

Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309, 1387–1390. doi:10.1126/science.1112665

Gao, Y., Miao, C.Y., Xia, J., Mao, L., Wang, Y.F., Zhou, P., 2012. Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. Frontiers of Environmental Science and Engineering 6, 213–223. doi:10.1007/s11783-011-0345-z

Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., Shi, W., 2010. Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. Journal of Environmental Sciences 22, 1040–1048. doi:10.1016/S1001-0742(09)60215-1

Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. Applied and Environmental Microbiology 57, 2351–2359. doi:0099-2240/91/082351-09$02.00/0

Geisseler, D., Horwath, W.R., 2009. Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. Pedobiologia 53, 87–98. doi:10.1016/j.pedobi.2009.06.002

Geisseler, D., Scow, K.M., 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. Soil Biology and Biochemistry 75, 54–63. doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.023

Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the

world. Microbiological Research 169, 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A., Wróbel, B., 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. Microbial Ecology 67, 635–647. doi:10.1007/s00248-013-0344-7
Gomez, E., Ferreras, L., Toresani, S., 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. Bioresource Technology 97, 1484–1489. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.021
Gove, B., Hutchinson, J.J., Young, S.D., Craigon, J., McGrath, S.P., 2002. Uptake of metals by plants sharing a rhizosphere with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. International Journal of Phytoremediation 4, 267–281. doi:10.1080/15226510208500087
Grayston, S.J., Campbell, C.D., 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). Tree Physiology 16, 1031–1038. doi:10.1093/treephys/16.11-12.1031
Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1997. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Applied Soil Ecology 5, 29–56. doi:10.1016/s0929-1393(96)00126-6
Gregorich, E.G., Drury, C.F., Baldock, J.A., 2001. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. Canadian Journal of Soil Science 81, 21–31. doi:10.4141/S00-041
Griffiths, B., Ritz, K., Ebblewhite, N., Dobson, G., 1999. Soil microbial community structure - Effects of substrate loading rates. Soil Biology and Biochemistry 31, 145–153. doi:10.1016/S0038-0717(98)00117-5
Harris, J., 2009. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? Science (New York, N.Y.) 325, 573–574. doi:10.1126/science.1172975
Henriksen, T.M., Breland, T.A., 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. Soil Biology and Biochemistry 31, 1121–1134. doi:10.1016/S0038-0717(99)00030-9
Henry, S., Texier, S., Hallet, S., Bru, D., Dambreville, C., Chèneby, D., Bizouard, F., Germon, J.C., Philippot, L., 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates. Environmental Microbiology 10, 3082–3092. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01599.x
Honma, M., Shimomura, T., 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agricultural and Biological Chemistry 42, 1825–1831. doi:10.1271/bbb1961.42.1825
Hooper, D.U., Bignell, D.E., Brown, V.K., Brussard, L., Mark Dangerfield, J., Wall, D.H., Wardle, D. a., Coleman, D.C., Giller, K.E., Lavelle, P., Van Der Putten, W.H., De Ruiter, P.C., Rusek, J., Silver, W.L., Tiedje, J.M., Wolters, V., 2000. Interactions between Aboveground and Belowground Biodiversity in Terrestrial Ecosystems: Patterns, Mechanisms, and Feedbacks. BioScience 50, 1049. doi:10.1641/0006-3568(2000)050[1049:IBAABB]2.0.CO;2
Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., Khalid, A., 2009. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. Advances in Agronomy 102, 159–200. doi:10.1016/S0065-2113(09)01005-0
Innes, L., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D., 2004. The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility. Biology and Fertility of Soils 40, 7–13. doi:10.1007/s00374-004-0748-0
Ives, A.R., Carpenter, S.R., 2007. Stability and diversity of ecosystems. Science (New York, N.Y.) 317, 58–62. doi:10.1126/science.1133258
Janssen, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology. doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006
Jenkins, S.N., Waite, I.S., Blackburn, A., Husband, R., Rushton, S.P., Manning, D.C., O'Donnell, A.G., 2009. Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 95, 319–334. doi:10.1007/s10482-009-9317-8
Jenkinson, D.S., Ladd, J.N., 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. Soil Biochemistry 5, 415–471.
Jiang, C. ai, Wu, Q.T., Sterckeman, T., Schwartz, C., Sirguey, C., Ouvrard, S., Perriguey, J., Morel, J.L., 2010. Co-planting can phytoextract similar amounts of cadmium and zinc to mono-cropping

from contaminated soils. Ecological Engineering 36, 391–395. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.005

Kennedy, N., Brodie, E., Connolly, J., Clipson, N., 2004. Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. Environmental Microbiology 6, 1070–1080. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00638.x

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 41. doi:10.1093/nar/gks808

Knauff, U., Schulz, M., Scherer, H.W., 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. European Journal of Agronomy 19, 215–223. doi:10.1016/S1161-0301(02)00035-7

Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C.A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R.I., Mellado-Vázquez, P.G., Malik, A.A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B.C., Trumbore, S.E., Gleixner, G., 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. Nature Communications 6, 6707. doi:10.1038/ncomms7707

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology 75, 5111–5120. doi:10.1128/AEM.00335-09

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature 442, 806–809. doi:10.1038/nature04983

Li, R., Khafipour, E., Krause, D.O., Entz, M.H., de Kievit, T.R., Fernando, W.G.D., 2012. Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities. PloS One 7, e51897. doi:10.1371/journal.pone.0051897

Lienhard, P., Terrat, S., Prévost-Bouré, N.C., Nowak, V., Régnier, T., Sayphoummie, S., Panyasiri, K., Tivet, F., Mathieu, O., Levêque, J., Maron, P.A., Ranjard, L., 2014. Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. Agronomy for Sustainable Development 34, 525–533. doi:10.1007/s13593-013-0162-9

Liu, L., Greaver, T.L., 2010. A global perspective on belowground carbon dynamics under nitrogen enrichment. Ecology Letters 13, 819–828. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01482.x

Lucisine, P., Echevarria, G., Sterckeman, T., Vallance, J., Rey, P., Benizri, E., 2014. Effect of hyperaccumulating plant cover composition and rhizosphere-associated bacteria on the efficiency of nickel extraction from soil. Applied Soil Ecology 81, 30–36. doi:10.1016/j.apsoil.2014.04.011

Ludwig, B., Geisseler, D., Michel, K., Joergensen, R.G., Schulz, E., Merbach, I., Raupp, J., Rauber, R., Hu, K., Niu, L., Liu, X., 2011. Effects of fertilization and soil management on crop yields and carbon stabilization in soils. A review. Agronomy for Sustainable Development 31, 361–372. doi:10.1051/agro/2010030

Lupwayi, N.Z., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Turkington, T.K., Blackshaw, R.E., Hall, L.M., Willenborg, C.J., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Grant, C.A., 2015. Relating soil microbial properties to yields of no-till canola on the Canadian prairies. European Journal of Agronomy 62, 110–119. doi:10.1016/j.eja.2014.10.004

MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. The theory of island biogeography by Robert H. MacArthur and Edward O. Wilson, Monographs in population biology: 1.

Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2000. Influence of organic and mineral fertilizers on soil biological and physical properties. Bioresource Technology 72, 9–17. doi:10.1016/S0960-8524(99)00094-2

Morel, J.L., 2013. Using plants to "micro-mine" metals. In: http://www.inra.fr/en/Scientists-Students/Biomass/All-the-news/Using-plants-to-micro-mine-metals

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C., 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of *Proteobacteria*. Nature 411, 948–950. doi:10.1038/35082070

Mummey, D., Holben, W., Six, J., Stahl, P., 2006. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. Microbial Ecology 51, 404–411. doi:10.1007/s00248-006-9020-5

Nunan, N., Daniell, T.J., Singh, B.K., Papert, A., McNicol, J.W., Prosser, J.I., 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. Applied and Environmental Microbiology 71, 6784–6792. doi:10.1128/AEM.71.11.6784-6792.2005

Pan, S.W., Wei, S.Q., Yuan, X., Cao, S.X., 2008. Mechanisms of the removal and remediation of phenanthrene and pyrene in soil by *dwarf lilyturf*. Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica 28, 3654–3661. doi:10.1016/S1671-2927(08)60185-6

Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Guillaumaud, N., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., Philippot, L., Poly, F., Prosser, J.I., Le Roux, X., 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. Environmental Microbiology 8, 1005–1016. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00992.x

Perucci, P., 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. Biology and Fertility of Soils 14, 54–60. doi:10.1007/BF00336303

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.K., 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. Nature Reviews Microbiology 11(11):789-99. doi: 10.1038/nrmicro3109

Postma-Blaauw, M., de Goede, R.G.M., Bloem, J., Faber, J.H., Brussaard, L., 2012. Agricultural intensification and de-intensification differentially affect taxonomic diversity of predatory mites, earthworms, enchytraeids, nematodes and bacteria. Applied Soil Ecology v. 57, 39-49–2012 v.57. doi:10.1016/j.apsoil.2012.02.011

Rochester, I.J., Peoples, M.B., Hulugalle, N.R., Gault, R.R., Constable, G.A., 2001. Using legumes to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. Field Crops Research 70, 27–41. doi:10.1016/S0378-4290(00)00151-9

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2010. The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. Soil Biology and Biochemistry 42, 516–520. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.026

Rue, M., Vallance, J., Echevarria, G., Rey, P., Benizri, E., 2015. Phytoextraction of nickel and rhizosphere microbial communities under mono- or multispecies hyperaccumulator plant cover in a serpentine soil. Australian Journal of Botany 63, 92–102. doi:10.1071/BT14249

Rühlemann, L., Schmidtke, K., 2015. Evaluation of monocropped and intercropped grain legumes for cover cropping in no-tillage and reduced tillage organic agriculture. European Journal of Agronomy 65, 83–94. doi:10.1016/j.eja.2015.01.006

Saad, R., Kobaissi, A., Amiaud, B., Ruelle, J., Benizri, E., 2017. Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume. Unpublished results

Sanaullah, M., Blagodatskaya, E., Chabbi, A., Rumpel, C., Kuzyakov, Y., 2011. Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. Applied Soil Ecology 48, 38–44. doi:10.1016/j.apsoil.2011.02.004

Scalise, A., Tortorella, D., Pristeri, A., Petrovičová, B., Gelsomino, A., Lindström, K., Monti, M., 2015. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding durum wheat in a rotation under rainfed conditions. Soil Biology and Biochemistry 89, 150–161. doi:10.1016/j.soilbio.2015.07.003

Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. Soil Biology and Biochemistry 33, 1481–1491. doi:10.1016/S0038-0717(01)00057-8

Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.012

Singh, S., Ghoshal, N., Singh, K.P., 2007. Variations in soil microbial biomass and crop roots due to differing resource quality inputs in a tropical dryland agroecosystem. Soil Biology and Biochemistry 39, 76–86. doi:10.1016/j.soilbio.2006.06.013

Sinsabaugh, R.S., 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. Biology and Fertility of Soils 17, 69–74. doi:10.1007/BF00418675

Snapp, S.S., Mafongoya, P.L., Waddington, S., 1998. Organic matter technologies for integrated nutrient management in smallholder cropping systems of southern Africa. Agriculture, Ecosystems and Environment 71, 185–200. doi:10.1016/S0167-8809(98)00140-6

Spehn, E.M., Joshi, J., Schmid, B., Alphei, J., Körner, C., 2000. Plant diversity effects on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. Plant and Soil 224, 217–230. doi:10.1023/A:1004891807664

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry 4, 479–487. doi:10.1016/0038-0717(72)90064-8

Thakur, M.P., Milcu, A., Manning, P., Niklaus, P.A., Roscher, C., Power, S., Reich, P.B., Scheu, S., Tilman, D., Ai, F., Guo, H., Ji, R., Pierce, S., Ramirez, N.G., Richter, A.N., Steinauer, K., Strecker, T., Vogel, A., Eisenhauer, N., 2015. Plant diversity drives soil microbial biomass carbon in grasslands irrespective of global environmental change factors. Global Change Biology 21, 4076–4085. doi:10.1111/gcb.13011

Tiemann, L.K., Grandy, A.S., Atkinson, E.E., Marin-Spiotta, E., Mcdaniel, M.D., 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. Ecology Letters 18, 761–771. doi:10.1111/ele.12453

Tilman, D., Hill, J., Lehman, C., 2006. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. Science 314, 1598–1600. doi:10.1126/science.1133306

Tilman, D., Reich, P.B., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T., Lehman, C., 2001. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. Science (New York, N.Y.) 294, 843–845. doi:10.1126/science.1060391

Treseder, K.K., 2008. Nitrogen additions and microbial biomass: A meta-analysis of ecosystem studies. Ecology Letters. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01230.x

Wang, W.J., Smith, C.J., Chen, D., 2004. Predicting soil nitrogen mineralization dynamics with a modified double exponential model. Soil Science Society of America Journal 68, 1256. doi:10.2136/sssaj2004.1256

Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., Xie, G., Haft, D.H., Sait, M., Badger, J., Barabote, R.D., Bradley, B., Brettin, T.S., Brinkac, L.M., Bruce, D., Creasy, T., Daugherty, S.C., Davidsen, T.M., DeBoy, R.T., Detter, J.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Ganapathy, A., Gwinn-Giglio, M., Han, C.S., Khouri, H., Kiss, H., Kothari, S.P., Madupu, R., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Paulsen, I., Penn, K., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Selengut, J.D., Shrivastava, S., Sullivan, S.A., Tapia, R., Thompson, S., Watkins, K.L., Yang, Q., Yu, C., Zafar, N., Zhou, L., Kuske, C.R., 2009. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. Applied and Environmental Microbiology 75, 2046–2056. doi:10.1128/AEM.02294-08

Wu, Q.-T., Hei, L., Wong, J.W.C., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2007. Co-cropping for phyto-separation of zinc and potassium from sewage sludge. Chemosphere 68, 1954–1960. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.047

Yadav, A.N., Verma, P., Kour, D., Rana, K.L., Kumar, V., Singh, B., 2017. Plant microbiomes and its beneficial multifunctional plant growth promoting attributes. International Journal of Environmental Sciences and Natural Resources 3, 1–8. doi:10.19080/IJESNR.2017.03.555601

Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2005. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. Applied and Environmental Microbiology 71, 7493–7503. doi:10.1128/AEM.71.11.7493-7503.2005

Yasir, M., Azhar, E.I., Khan, I., Bibi, F., Baabdullah, R., Al-Zahrani, I.A., Al-Ghamdi, A.K., 2015. Composition of soil microbiome along elevation gradients in southwestern highlands of Saudi Arabia. BMC Microbiology 15, 65. doi:10.1186/s12866-015-0398-4

Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D., Tilman, D., 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? Ecology 84, 2042–2050. doi:10.1890/02-0433

Zul, D., Denzel, S., Kotz, A., Overmann, J., 2007. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: Implications for the determinants of bacterial diversity. Applied and Environmental Microbiology 73, 6916–6929. doi:10.1128/AEM.01533-07

Points marquants de l’étude

- La diversité des plantes, consistant à insérer une légumineuse dans les systèmes de culture d’agromine, permet de modifier les caractéristiques et les processus se déroulant dans le sol ultramafique.

- Le sol du système de culture de type rotation, avec introduction de la légumineuse, a un rapport C/N et taux de matière organique plus élevés, par rapport à son témoin fertilisé.

- L'analyse de la biomasse microbienne a montré un effet clair des traitements avec insertion de légumineuses. Les activités enzymatiques microbiennes ont été significativement affectées par la culture des deux plantes différentes.

- La diversité bactérienne a été augmentée avec l'introduction de la légumineuse et diminuée par la fertilisation minérale, par rapport au sol nu.

- La co-culture ou la rotation d'une plante hyperaccumulatrice avec une légumineuse favorise la diversité bactérienne du sol et son fonctionnement.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Les chapitres précédents ont permis de mettre en exergue i°) la possibilité de cultiver une légumineuse sur un sol ultramafique, ii°) la possibilité d'implanter ces systèmes culturaux en situation réelle, au champ, et de cerner leurs impacts sur les rendements obtenus en biomasse végétale et en nickel, iii°) une meilleure compréhension, au travers d'expérimentations en conditions contrôlées, de l'effet de ces systèmes de culture d'une part, sur les caractéristiques physico-chimiques du sol ultramafique étudié, à une échelle fine et ultrafine, et d'autre part, sur les caractéristiques biologiques du sol, par l'étude de la diversité des communautés microbiennes et leurs activités.

Dans cette partie, nous discuterons de manière plus globale de l'intérêt de la mise en place de ces nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine du nickel, basés sur l'introduction de légumineuses, afin de dégager des conclusions globales sur la faisabilité technique et économique de ces systèmes de culture agro-écologiques et de leurs intérêts dans la filière de l'agromine.

1. De l'extraction minière à l'agromine : intérêts et limites

Au XVIIe siècle dans les montagnes de Saxe, des mineurs allemands tentent de traiter, en vain, un minerai de couleur rouge croyant qu'il pouvait contenir du cuivre. Persuadés alors que ce minerai était l'œuvre du démon, ils le nommèrent "kupfernickel" signifiant "cuivre du diable". En 1751, le chimiste suédois Axel Fredrik Cronstedt isole et identifie un nouvel élément métallique tiré d'un minerai (la pentlandite) très semblable au "Kupfernickel" allemand. Il donnera le nom de nickel à ce métal en souvenir du nom traditionnel du minerai. En 1804, ce métal, le nickel, sera obtenu sous une forme plus pure et ses propriétés physiques seront déterminées.

Les minerais sulfurés, qui représentent 65% de la production de Ni, se présentent sous forme de pentlandite et ont des teneurs variant de 0,7 à 3% de nickel. Ils contiennent, en outre, du cuivre, des platinoïdes, du cobalt, de l'argent et de l'or. Les minerais oxydés (35% de la production de Ni), sont exploités à ciel ouvert. A la différence des précédents, ils ne contiennent pas de métaux précieux, mais renferment du cobalt. Dans cette catégorie sont distingués : i°) les minerais silicatés (saprolites) dans lesquels le nickel (avec des teneurs de l'ordre de 2 à 3%) se substitue au magnésium de la serpentine. Le plus important gisement mondial est localisé en Nouvelle-Calédonie, mais ces minerais sont également exploités en Colombie et, à des teneurs plus faibles, en Indonésie, République Dominicaine, Philippines,

Brésil..., ii°) les latérites nickélifères (limonites) dans lesquelles le nickel se substitue au fer dans la goethite. Ce sont des minerais pauvres qui ne contiennent que de 1 à 1,5% de Ni et qui sont exploités à Cuba, en Australie et en Grèce

Qu'en est-il aujourd'hui de l'exploitation minière du nickel ? L'extraction minière du nickel est généralement appliquée sur des roches ayant une teneur élevée en Ni d'au moins 30 g kg^{-1}. Mais les ressources naturelles constituent un stock fini et donc non inépuisable et un grand nombre des mines existantes sont proches de la fermeture en raison de réserves limitées. Ainsi, à dire d'experts, nous sommes sans doute en train de vivre la fin de l'exploitation des gisements faciles pour de nombreuses matières premières critiques, dont le nickel et les gisements futurs seront plus difficiles à exploiter (baisse de la concentration, augmentation de la profondeur d'extraction), ce qui ne sera pas sans conséquences sur l'environnement. Selon Dodson *et al.* (2012), l'estimation du nombre d'années de réserves de nickel, si la consommation continue au niveau actuel, serait de 50 à 100 ans.

Sous l'action des agents atmosphériques, les roches magmatiques produisent des roches riches en métaux, nommés les roches ultramafiques. Les sols ultramafiques sont les dérivés des roches ultramafiques et sont connus pour contenir du nickel et d'autres éléments traces métalliques (ETM), tels que le cuivre, le chrome, le fer, le titane et le cobalt (Chaney *et al.*, 2008). Dans ces sols, le Ni est généralement présent à des concentrations comprises entre 1 et 7 g kg^{-1}, ce qui est bien inférieur à la concentration de Ni requise pour les minerais dans les technologies minières (Nicks et Chambers 1995). Les sols ultramafiques sont également caractérisés par des teneurs élevées en magnésium et sont déficients en nutriments les plus importants pour les végétaux, tels que l'azote, le phosphore, le potassium et le calcium (Boyd et Jaffré, 2009). Ces caractéristiques rendent les sols ultramafiques inappropriés pour une production agricole correcte et rentable (Bani *et al.*, 2007 ; Tumi *et al.*, 2012), bien qu'ils soient répandus dans le monde entier, occupant des surfaces considérables. En Californie et en Oregon, il y a plus de 400 000 ha de sols ultramafiques (Alexander, 1994), 100 000 ha en Albanie (Zdruli, 1997) et 150 000 ha en Indonésie (van der Ent *et al.*, 2013).
Du fait de surfaces conséquentes de ces aires ultramafiques, qui pourraient assurer la production de ressources premières et d'énergies renouvelables (Ali *et al.*, 2013), le concept de phytomine a été proposé dans les années 90 (Chaney *et al.*, 2007). Il repose sur l'extraction des ETM d'un sol riche en métaux par des plantes hyperaccumulatrices, qui présentent l'aptitude d'absorber ces éléments par leurs racines et de les accumuler dans leurs parties

aériennes (Chaney *et al.*, 2008). Ainsi, il est possible d'obtenir une biomasse aérienne concentrée en métaux, tels que le Ni (> 1% de la biomasse sèche). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont souligné la nécessité d'optimiser le processus de phytoextraction des métaux en utilisant des méthodes classiques de gestion des cultures, afin d'augmenter la biomasse végétale et donc l'extraction des métaux et les rendements obtenus. Parmi ces méthodes, figurent l'apport d'une fertilisation minérale de type NPK, l'application d'herbicides et la gestion de l'irrigation. Les rendements des cultures pourraient alors atteindre au moins 20 tonnes de biomasse sèche par hectare avec des rendements en nickel de l'ordre de 400 kg Ni ha^{-1} (Chaney *et al.*, 2007). De la même manière, les rendements de biomasse de *Alyssum murale,* en Albanie, ont été améliorés par des apports moindres en fertilisants minéraux (N : 120 kg N ha^{-1} et 100 kg de P et K ha^{-1}) permettant malgré tout l'obtention de 9 tonnes de biomasse sèche et de 105 kg Ni par hectare (Bani *et al.*, 2015a). Concernant les amendements organiques (comme le compost ou le fumier), ceux-ci sont connus pour contenir des concentrations importantes de nutriments essentiels à la croissance et au développement des plantes et permettre ainsi un meilleur développement des plantes hyperaccumulatrices (Kidd *et al.*, 2015 ; Nkrumah *et al.*, 2016 ; Álvarez-López *et al.*, 2016). Ce type d'amendement permet d'améliorer la fertilité des sols ainsi que certaines propriétés physiques des sols telles qu'une meilleure capacité de rétention en eau. Il réduit également la densité apparente du sol (Vangronsveld *et al.*, 2009). En outre, le fumier peut augmenter la mobilité des métaux en raison de ses teneurs élevées en matières organiques solubles et réactives qui peuvent complexer ces derniers et faciliter leur déplacement dans le sol (Tandy *et al.*, 2009). D'autres leviers ont été proposés pour optimiser la phytomine comme l'utilisation de bactéries d'intérêt dites PGPR (Plant Growth Promoting Rhzobacteria), favorisant d'une part, l'absorption des métaux par des plantes et d'autre part, la croissance des plantes inoculées, dans le cadre de stratégies de bioremédiation (Haslmayr *et al.*, 2014). Ainsi, de nombreux travaux ont montrés l'intérêt d'inoculer les plantes hyperaccumulatrices telles que *Alyssum serpyllifolium*, *A. malacitanum* et *A. murale*, avec des bactéries PGPR afin d'augmenter la disponibilité du Ni dans le sol et d'améliorer son accumulation (Abou-Shanab *et al.*, 2003, 2006 ; Rajkumar *et al.*, 2009 ; Becerra-Castro *et al.*, 2013 ; Durand *et al.*, 2016).

La notion de phytomine a évolué au cours des dernières années et en 2013, un nouveau concept a été énoncé : il s'agit de l'agromine (Morel, 2013). Cette technique consiste à extraire le nickel présent dans les sols par la culture de plantes hyperaccumulatrices (van der Ent *et al.*, 2013 ; 2015) puis à récupérer le métal par des procédés d'hydrométallurgie à partir de la biomasse végétale incinérée. La technique d'hydrométallurgie permet d'extraire le

nickel de son support et de le purifier *via* plusieurs étapes dont l'incinération (production de cendres), la lixiviation (mise en solution) et la cristallisation, permettant d'obtenir du nickel sous forme de sel. L'étude de Barbaroux *et al.* (2012) a permis d'obtenir des sels de nickel (13,2% de nickel) dont le nickel a été au préalable extrait de *A. murale*. Le métal peut être ensuite valorisé en tant qu'élément biosourcé, à haute valeur ajoutée. L'agromine apparaît donc comme une véritable filière permettant de recycler le nickel extrait de plantes dans l'industrie, tout en ayant également comme objectif de réhabiliter les sols naturellement riches en ETM à des fonctions agricoles classiques.

Bien que les différents leviers actuellement proposés et testés pour optimiser l'agromine (fertilisations minérale et/ou organique, inoculations par des microorganismes d'intérêt) aient donné des résultats probants, d'autre pistes pourraient être envisagées.

2. Vers de nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine avec insertion d'une légumineuse ?

L'introduction d'une légumineuse dans des systèmes de culture basés sur la rotation ou la co-culture est à l'origine d'un apport d'azote avec pour conséquence une amélioration des rendements (Lizarazo *et al.*, 2015 ; Peoples *et al.*, 2015). En effet, les légumineuses utilisées dans ces systèmes de culture, influencent le bilan azoté de deux façons : elles fixent une partie de leur exigence en azote à partir du N_2 atmosphérique et, par conséquent, réduisent leurs prélèvements à partir de l'azote du sol, en comparaison avec les plantes non-légumineuses. De plus, elles peuvent fournir également une partie de l'azote fixée, lors de la minéralisation de leurs résidus, une fois détruites et enfouies dans le sol, à la culture de rente (non légumineuse) (Nyagumbo *et al.*, 2015 ; Peoples *et al.*, 2015). De plus, dans les cas d'approches agronomiques classiques, la culture de légumineuses est également envisagée pour réduire ou prévenir l'érosion, attirer des insectes bénéfiques mais aussi rompre les cycles d'agents pathogènes et d'insectes, tout en limitant le développement des adventices, enrichir le sol en matière organique après enfouissement.

Ainsi, dans le cadre de ce doctorat, nous sommes partis de l'hypothèse que la création d'un nouveau système de culture agro-écologique dédié à l'agromine et basé sur l'introduction d'une légumineuse pourrait d'une part, impliquer une réduction des applications de fertilisants minéraux et de produits phytosanitaires tout en améliorant le statut azoté des sols, et d'autre part, conduire à une amélioration du processus de phytoextraction par une modification de paramètres physico-chimiques et biologiques de ces sols ultramafiques. De tels systèmes

« d'agromine améliorée » pourraient permettre l'obtention de rendements plus élevés de biomasse corrélativement à une réduction des intrants chimiques, nécessaires pour améliorer la phytoextraction (Chaney *et al.*, 2008 ; Bani *et al.*, 2015a, 2015b). Ainsi, la mise en place de ces nouveaux systèmes culturaux pourraient être à l'origine d'impacts environnementaux plus faibles et se traduire par une meilleure performance économique (Scalise *et al.*, 2015 ; St. Luce *et al.*, 2015). De plus, la fixation biologique de l'azote, *via* la légumineuse, joue le rôle de biofertilisant et fournit ainsi un service écosystémique de régulation, complétant ou même remplaçant les intrants chimiques classiques (Fustec *et al.*, 2010 ; Mokgehle *et al.*, 2014).

Les premiers résultats de la thèse ont montré que la lentille (*Lens culinaris*) était à même de se développer sur un sol agricole artificiellement contaminé par un gradient de concentrations de Ni (10-90 mg Ni kg^{-1}). Cette plante a formé des nodules fonctionnels capables de fixer l'azote atmosphérique dans les sols enrichis en nickel, jusqu'à une concentration de 60 mg Ni-DTPA kg^{-1} de sol sec (Saad *et al*., 2016). Néanmoins, nous avons retenu comme légumineuse la vesce (*Vicia sativa*) qui avait montré un meilleur développement sur sol ultramafique, après amendement de ce dernier uniquement en calcium et phosphate de potassium. Sur la base de résultats préliminaires, l'enjeux de ce doctorat était de tester, *in situ*, la faisabilité de mise en place de ces nouveaux systèmes de culture dédiés à l'agromine et si l'association de *Alyssum murale* et de la vesce pouvait conduire à une agromine respectueuse de l'environnement et plus efficiente en termes i°) de production de biomasse de la plante hyperaccumulatrice, ii°) de phytoextraction du nickel, mais aussi iii°) d'améliorations de la qualité physico-chimique et biologique des sols.

3. Quels sont les intérêts des nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine ?

3.1. Une amélioration de la qualité physique et chimique des sols ?

La rhizosphère, « zone de contact entre le biologique et le minéral », peut être définie, de manière simple, comme la zone d'influence de la racine vivante sur le sol. Certains la définissent aussi comme la zone de sol qui reste la plus solidement accrochée à la racine lorsque l'on arrache une plante. Ce n'est pas faux, mais la zone d'influence de la racine est plus étendue que cela. Elle dépend du type de plante, de son stade et de son activité mais aussi du type de sol et de sa fonctionnalité. En fait cette zone de sol entourant la racine est déterminée par la racine elle-même. C'est elle qui organise « sa » rhizosphère en modifiant les propriétés physico-chimiques de cette dernière (et sa composition biologique) à travers deux mécanismes majeurs : l'acidification *via* l'émission de protons (ions H^+) et l'exsudation

racinaire, qui correspond à la sécrétion et/ou diffusion, par la racine, de composés organiques dans le sol. Concernant les légumineuses, la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les nodosités permet à la plante, comme nous l'avons évoqué précédemment, de pourvoir à ses besoins en azote en utilisant la molécule N_2 électriquement neutre. Il s'ensuit alors que leurs besoins en éléments cationiques excèdent largement leurs besoins en éléments anioniques. Ceci se traduit par une réduction du pH du fait d'une acidification localisée de leur rhizosphère (Bolan *et al.,* 1991 ; Li *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2012).

Cependant, l'incorporation de légumineuses dans le sol libère des anions organiques concentrés dans les feuilles plus âgées, comme le malate et le citrate, et des acides aminés tels la glycine, qui vont contribuer à alcaliniser le sol. Nous avons constaté, en effet, lors de l'essai au champ, que ces composés organiques augmentaient le pH du sol, après restitution de la légumineuse au sol et décomposition des résidus (Yan *et al.*, 1996). Dans notre étude au champ, nous n'avons pas atteint la fin de la décomposition des résidus de légumineuses et donc le pH du sol montrait des valeurs élevées à la récolte. La capacité d'échange cationique (CEC) était également la plus élevée dans le cas du traitement de la co-culture. Cela pourrait probablement être dû à la complexation d'ions H^+ sur des particules organiques, qui proviennent des résidus de légumineuses incorporés dans le sol, et à leur échange avec d'autres cations, ceci lorsque le pH du sol était légèrement augmenté (Violante *et al.*, 2010). Le rapport (exprimé en pourcentage) du Ni extrait au DTPA sur le Ni pseudo-total était le plus bas dans le cas de la co-culture. En effet, les taux du Ni disponible et indisponible sont toujours en état d'équilibre (Wei et Zhou, 2004). Les concentrations en carbone et en l'azote du sol et celle de matière organique étaient plus élevés pour la co-culture que dans le cas des autres traitements plantés. Or, le carbone et l'azote sont utilisés comme indicateurs de la qualité des sols puisqu'ils sont liés à la performance des écosystèmes (Gregorich *et al.*, 2001). La matière organique sert de source de carbone et d'azote et a une capacité à complexer les cations multivalents et fournit également un habitat pour les microorganismes. En outre, la matière organique du sol a un effet positif sur la stabilité structurale globale du sol et sur la rétention d'eau (Tisdall et Oades, 1982 ; Zhang, 1994 ; Verchot *et al.*, 2011). Comme pour le cas des cultures classiques, l'introduction de légumineuse, dans les systèmes de type co-culture, fournit des intrants azotés favorisant la production de biomasse et les rendements en grains (Lizarazo *et al.*, 2015 ; Peoples *et al.*, 2015). En effet, les légumineuses utilisées dans le système de co-culture sont connues pour influencer les teneurs en azote du sol du fait de la fixation du N_2 atmosphérique, répondant ainsi à leurs besoins mais fournissant également une partie de l'azote fixé à la culture de rente *via* leurs résidus végétaux minéralisés (Lizarazo *et*

al., 2015 ; Nyagumbo *et al.*, 2016). Ainsi, de nombreuses études ont montré que l'introduction d'une légumineuse en co-culture impliquait la présence d'importantes quantités d'azote soluble et un bon équilibre de cet élément dans le sol (Snapp *et al.*, 1998 ; Rühlemann et Schmidtke, 2015 ; Zhao *et al.*, 2015). Ainsi, l'azote fourni par la légumineuse répond aux besoins nutritifs de la culture de rente, d'autant que cet élément est le facteur le plus limitant pour une production optimale de biomasse (Isaac *et al.*, 2012 ; Scalise *et al.*, 2015).

L'effet positif de la légumineuse en co-culture avec *Alyssum murale*, dans notre étude au champ, est résumé dans la Figure 50.

De faibles concentrations d'ammonium dans le sol ont été détectées pour tous les traitements. En effet, la nitrification est le processus, dominant normalement dans les sols, qui convertit l'ammoniac en nitrate, ce qui entraîne des quantités plus faibles d'ammonium (Burger et Jackson, 2003 ; Mohan et Cole, 2007). Des concentrations plus élevées de nitrate ont été détectées pour le traitement de la co-culture par rapport autres traitements. Ces taux élevés de nitrates peuvent résulter de la décomposition des résidus de légumineuses. Par ailleurs, il ressort que le traitement de la co-culture n'a pas épuisé les nutriments du sol après 12 mois de culture. Par contre, dans le cas de la monoculture fertilisée, il a été noté une réduction notable des quantités de carbone et d'azote du sol. Il est important de noter que la maintenance des niveaux de carbone et d'azote dans le sol, dans le cas de la co-culture, s'est produite simultanément avec l'amélioration de la production de biomasse de l'hyperaccumulateur.

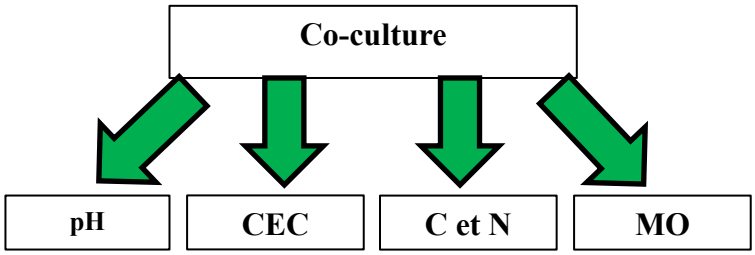


Figure 50 : Effet de la co-culture sur les propriétés physico-chimiques du sol. CEC, C, N et MO réfèrent à la capacité d'échange cationique, au carbone (total et soluble), à l'azote (total, organique et soluble) et à la matière organique du sol. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés

Nous avons tenté de réaliser un bilan azoté, à l'issue de la première année, pour le dispositif mis en place au champ (Tableau 18) et qui portait sur la comparaison de la co-culture de *Alyssum murale* associée à la vesce, avec la monoculture de l'hyperaccumulateur fertilisé ou non. Il ressort que la quantité d'azote restituée par la légumineuse, dans le cas de la co-culture, est quasiment égale à la moitié de celle ajoutée sous forme minérale, dans le cas du traitement fertilisé. Quoiqu'il en soit, dans ces deux cas, les teneurs en azote dans *Alyssum*

murale sont très proches. La différence repose sur le fait que la matière organique ajoutée dans le cas de la co-culture (résidus de la légumineuse) sert de source de nutriments sur le long terme par rapport à la fertilisation minérale qui constitue une source d'azote, à plus court terme. En outre, nous notons, qu'après récolte, le stock final d'azote total du sol a moins diminué dans le cas de la co-culture en comparaison avec le traitement fertilisé.

Tableau 18 : Bilan azoté pour la première année de culture au champ. Co, FCon-CoC, NFCon-CoC et BS correspondent aux traitements de la co-culture, au témoin positif (fertilisé) de la co-culture, au témoin négatif (non fertilisé) de la co-culture et au sol nu, respectivement

Traitements	Stock initial d'azote (kg/ha)	Quantité d'azote ajoutée (kg/ha)	Teneur en azote dans *Alyssum murale* (kg/ha)	Stock final d'azote (kg/ha)
CoC	3.35	54.87	19.67	3.13
FCon-CoC	3.35	120	21.25	2.43
NFCon-CoC	3.35	0	3.18	2.72
BS	3.35	0	0	3.30

Parmi les autres avantages non nutritionnels fournis par l'introduction de légumineuses dans les systèmes de culture, il est connu que le système racinaire souvent très développé de ces dernières favorise la structuration du sol. Nous avons pu confirmer cela au travers de l'expérimentation réalisée en rhizobox. En effet, nous avons mis en évidence que le pourcentage de particules de sol de grande taille (500-2000 µm) était le plus élevé dans la rhizosphère de *Alyssum murale* après co-culture avec la légumineuse. De plus, l'expérience mettant en jeu une sonification du sol a montré une stabilité remarquable de la fraction 1000-2000 µm dans la rhizosphère d'*Alyssum murale* après co-culture avec la vesce. Ainsi, nos résultats confirment l'intérêt de l'introduction d'une légumineuse sur l'amélioration de la taille et de la stabilité des agrégats du sol (Chu *et al.*, 2016). En effet, l'agrégation - processus par lequel les particules inorganiques et organiques sont assemblées (Amezketa, 1999) - conduit à la formation d'agrégats qui définissent la macroporosité du sol (Bechet *et al.*, 2009). Cette dernière permettra à l'eau de circuler par gravité après une pluie, mais permettra aussi, après drainage, l'aération du sol. En outre, la matière organique dérivée des résidus de légumineuse incorporés et la décomposition des racines de cette dernière jouent un rôle crucial dans la modification de la structure du sol, comme cela a déjà été montré dans les systèmes agricoles basés sur la co-culture (Coleman *et al.,* 2004). Les liaisons organiques sont plus fortes et beaucoup plus stables que les inorganiques, contribuant à une plus grande stabilité globale, ceci dans presque tous les types de sols (Bot et Benites, 2005). *In fine*, un sol

présentant des agrégats bien stabilisés sera un sol dans lequel les phénomènes de compaction seront limités (Bot et Benites, 2005).

Ainsi, l'introduction d'une légumineuse dans un système cultural dédié à l'agromine apparaît être à l'origine d'une combinaison d'effets bénéfiques : différents systèmes racinaires, différentes explorations du sol, un effet direct sur la structure du sol et la stabilité des agrégats, un effet tout aussi important sur la fertilité du sol par une meilleure récupération des éléments fertilisants dans différents horizons du sol et au final clairement améliorer la qualité physico-chimique des sols ultramafiques (Figure 51).

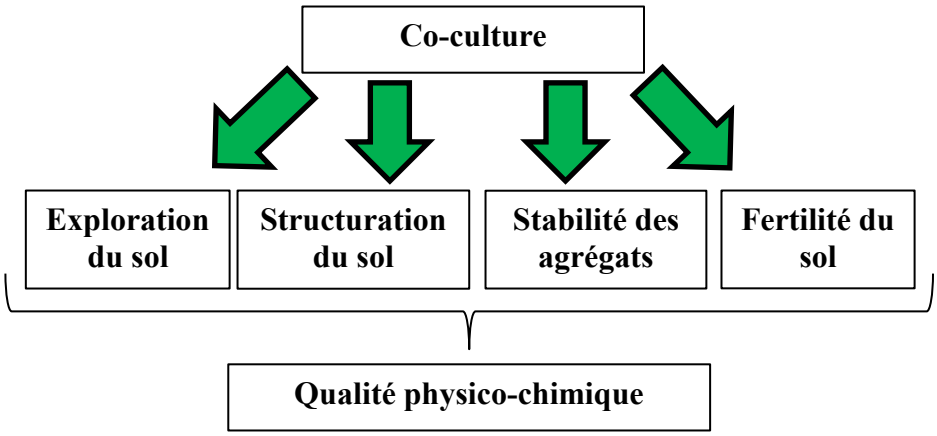


Figure 51 : Impacts de la co-culture sur la qualité physico-chimique du sol. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés

3.2. Une amélioration de la qualité biologique des sols ?

Evaluer l'effet de pratiques, quelle que soit leur nature, est indispensable pour définir des modes de gestion durables. Il faut pour cela pouvoir mesurer et suivre l'évolution de la qualité biologique des sols, ce qui nécessite de disposer d'indicateurs fiables et de références. Ces indicateurs doivent être pertinents (en lien avec les fonctions des sols), assez sensibles pour rendre compte de changements de pratiques et suffisamment robustes pour intégrer les variations naturelles de court terme, telles que des variations saisonnières. Plusieurs indicateurs sont actuellement comparés sur leurs performances, leur facilité de mise en œuvre, leur standardisation ainsi que leur coût : lombriciens, biomasse microbienne, activités enzymatiques, populations microbiennes spécifiques... Dans le cadre de nos travaux, nous n'avons ciblé que des indicateurs microbiens.

Différentes études ont accordé une attention particulière aux biomasses microbiennes carbonée et azotée des sols, car elles sont généralement utilisées pour rendre compte de la minéralisation du carbone et de l'azote organiques des sols (Jenkinson et Ladd, 1981 ; Harris, 2009 ; Anderson et Domsch, 2010). Par ailleurs, la biomasse microbienne carbonée du sol

peut refléter des modifications mineures au niveau de la matière organique du sol plutôt que la teneur totale en carbone (Lupwayi *et al.*, 2015).

L'introduction de la légumineuse dans nos systèmes culturaux (co-culture et rotation), aussi bien lors de nos expérimentations *in situ*, au champ, qu'en conditions contrôlées (expérimentation en pot) a montré un effet positif sur les biomasses microbiennes carbonée (MBC) et azotée (MBN) par rapport à l'apport d'une fertilisation minérale. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus par d'autres auteurs qui concluent que la diversité du couvert végétal, en termes d'espèces végétales, stimule la biomasse microbienne des sols (Zak *et al.*, 2003 ; Thakur *et al.*, 2015 ; Eisenhauer *et al.*, 2017). Par ailleurs, comme l'ont souligné certains auteurs (Singh *et al.*, 2007), une augmentation de la MBN des sols se traduit par une amélioration de leur fertilité, comme en témoigne particulièrement le traitement de la rotation avec la légumineuse, pour lequel la teneur en matière organique a tendance à augmenter. A l'inverse, la fertilisation minérale (120 unités par hectare d'ammonitrate) apportée sur le couvert de *Alyssum murale*, cultivée seule, a eu un impact négatif sur ces indicateurs microbiens. Nos résultats confirment les travaux de Chaussod (1996) et Geisseler et Scow (2014) qui ont montré que l'apport d'une fertilisation minérale azotée peut influencer négativement, et de manière significative, la biomasse microbienne. Ceci a, en outre, été également confirmé par une synthèse de 82 études de terrain, révélant que la fertilisation minérale azotée réduit la biomasse microbienne en moyenne de 15% (Treseder, 2008). De même, Liu et Greaver (2010) ont constaté qu'un amendement en azote minéral réduit le carbone microbien de 20%, ceci suite à une étude bibliométrique portant sur 57 articles (Geisseler et Scow, 2014).

Gao *et al.* (2010, 2012) ont montré que des espèces végétales différentes induisent le développement d'une communauté microbienne complexe et des groupes fonctionnels microbiens plus diversifiés. En conséquence, la composition des communautés microbiennes fonctionnelles du sol change avec la diversité végétale (Chung *et al.*, 2007 ; Lange *et al.*, 2015 ; Eisenhauer *et al.*, 2017). Nos résultats, basés sur l'étude des profils physiologiques des communautés bactériennes (Biolog EcoPlate), confirment ces observations précédentes. En effet, l'introduction d'une légumineuse est à l'origine d'une augmentation de quelques indices de diversité rendant compte de la diversité des aptitudes cataboliques des communautés bactériennes des sols, dans le cas des traitements avec introduction de la légumineuse dans le système de culture. Dans la mesure où le carbone est un facteur clé de la croissance des microorganismes telluriques, constituant en effet une source d'énergie et de nutriments (Grayston *et al.*, 1997 ; Baudoin *et al.*, 2002, 2003), un couvert végétal plus diversifié (dans

les cas de la co-culture et de la rotation avec la légumineuse) implique une augmentation de la ressource en termes de quantité mais aussi de qualité. En effet, pour les systèmes culturaux basés sur la rotation et la co-culture, que cela soit avant destruction de la légumineuse ou après incorporation puis dégradation des résidus de cette dernière, du fait d'une diversité de sources trophiques (rhizodépôts de nature et en quantité différentes, matières organiques en décomposition), il est observé une augmentation de la diversité catabolique de la communauté microbienne (Benizri *et al.*, 2007 ; Hooper *et al.*, 2000 ; Gomez *et al.*, 2006 ; Rue *et al.*, 2015). Ceci a été, en outre, également confirmé par d'autres études qui ont mis en évidence que l'introduction de matière organique (compost, fumier) entraîne une augmentation significative de l'activité microbienne (Perucci, 1992 ; Fließbach et Mäder, 1997 ; Marinari *et al.*, 2000).

Les activités enzymatiques microbiennes sont étroitement liées aux cycles biogéochimiques des nutriments et à la fertilité des sols. Elles sont connues pour montrer une réponse rapide aux changements dans les sols (Aon et Colaneri, 2001) et sont aussi affectées par les pratiques de gestion des sols. Ainsi, elles sont fréquemment utilisées comme indicateurs sensibles de la stabilité écologique des sols (Ajwa *et al.*, 1999). Malgré ce fait, dans l'expérimentation au champ, les activités de l'arylsulfatase, de la β-glucosidase et de la phosphatase n'ont pas montré un effet clair et significatif lors de la comparaison des différents systèmes de culture testés. Cependant, l'activité de l'uréase, qui est liée au cycle de l'azote, était plus élevée lorsque *Alyssum murale* était co-cultivée avec la légumineuse. Cela pourrait être lié à l'incorporation de résidus riches en azote de la légumineuse dans le sol. En effet, il est bien connu que l'activité de l'uréase est influencée par plusieurs facteurs, y compris la matière organique et la quantité d'azote ajouté (Cabrera *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 2004). Par conséquent, l'activité de cette enzyme peut être directement affectée par la variation de l'azote du sol. Les métaux lourds sont connus pour leur toxicité sur les activités enzymatiques dans le sol en raison de leur inhibition des fonctions cellulaires de base et surtout du métabolisme énergétique (Lorenz *et al.*, 2006). Cependant, l'activité de l'uréase est renforcée par la présence de Ni, car ce métal est une coenzyme de l'uréase (Dixon *et al.*, 1975 ; Lopez et Magnitskiy, 2011). Par conséquent, il semble que l'effet toxique du Ni n'a pas eu d'impact sur l'activité uréase. En outre, la diversité des plantes peut diminuer l'effet toxique des métaux lourds sur les communautés microbiennes du sol, qui ont développé des activités enzymatiques particulières en présence de différentes espèces végétales (Gao *et al.*, 2012). Ces résultats pourraient expliquer que la co-culture de la légumineuse avec une plante hyperaccumulatrice a augmenté la MBN, l'activité uréase des communautés rhizosphériques

d'*Alyssum murale* en co-culture, par rapport à la monoculture fertilisée et non fertilisée. De plus, l'activité de la FDA était également plus élevée dans le cas de la co-culture par rapport à la fertilisation minérale. La Figure 52 résume l'effet de l'introduction d'une légumineuse en co-culture avec *Alyssum murale* en comparaison avec une fertilisation minérale, sur les propriétés biologiques du sol, dans notre expérimentation au champ. Enfin, il est important de noter que, malgré l'effet non significatif des systèmes culturaux testés sur l'activité de l'ACCd, cette enzyme montrait un niveau plus bas dans le cas des traitements co-culture et fertilisation minérale. L'ACCd est responsable du clivage du précurseur de l'éthylène dans la plante, l'ACC, en l'ammoniac et en α-cétobutyrate (Honma et Shimomura, 1978). Lorsque les niveaux d'ACC sont diminués dans les tissus végétaux, les niveaux d'éthylène produit dans les tissus des végétaux diminuent à leur tour (Glick, 2014). Dans notre étude, le faible niveau d'ACCd mesuré dans les sols dans les cas de la co-culture et de la fertilisation minérale pourrait résulter d'un faible niveau d'ACC dans les tissus végétaux. Ceci impliquerait que *Alyssum murale* aurait pu être moins stressée dans le cas de ces systèmes culturaux que dans le cas des autres traitements.

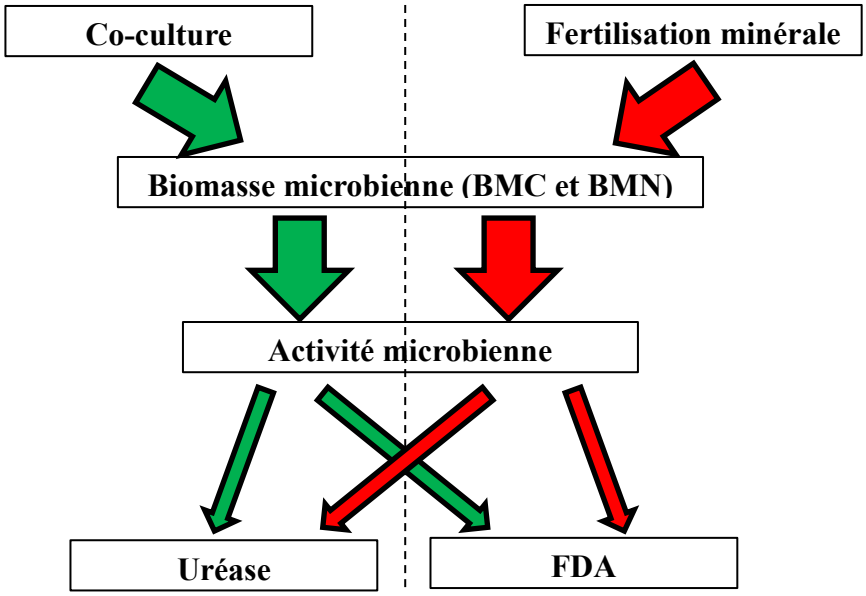


Figure 52 : Effets des systèmes de culture sur les propriétés biologiques du sol au champ. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse, les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers

Lors des expérimentations réalisées en condition contrôlées, à l'inverse de l'étude au champ, les différents systèmes de culture testés ont influencé en plus de l'uréase, les activités de l'arylsulfatase, de la β-glucosidase et de la phosphatase, ceci de différentes façons. L'activité de l'arylsulfatase s'est révélée améliorée lorsque *Alyssum murale* était cultivée en en co-culture et rotation avec la vesce et a diminué dans le cas de la fertilisation minérale. De nombreuses études ont montré une augmentation de cette activité enzymatique microbienne

dans le sol suite à l'addition de carbone organique, ce qui est bien le cas des traitements avec la légumineuse, au travers de l'incorporation des résidus de légumineuses (Knauff *et al.*, 2003). En ce qui concerne les activités de la β-glucosidase et de la phosphatase, tous les traitements plantés ont montré des valeurs positives lorsqu'elles ont été normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour le sol nu, sans couvert végétal. Mais ces deux enzymes, impliquées respectivement dans le cycle du C et P, ont montré des valeurs plus faibles dans le cas des traitements avec la légumineuse par rapport à la monoculture de *Alyssum murale*, fertilisée ou non. En effet, l'activité des microorganismes du sol dépend d'une part, de leur demande et d'autre part, de la disponibilité des nutriments dans le sol (Burns *et al.*, 2013). Ainsi, lorsque le rapport C/N du sol augmente (cas en particulier de la rotation), l'activité de la β-glucosidase diminue. À l'inverse, cette activité était significativement augmentée suite à l'apport d'une fertilisation minérale, comme l'ont montré Geisseler et Scow (2014). En effet, un certain nombre d'études ont révélé qu'une disponibilité élevée en azote minéral favorise la production d'enzymes extracellulaires impliquées dans le cycle du C (Henriksen et Breland, 1999 ; Carreiro *et al.*, 2000 ; Geisseler et Horwath, 2009). Cette même tendance a été observée, dans notre étude lors de la co-culture et de la rotation, pour l'activité de la phosphatase alcaline : l'incorporation dans le sol de résidus de légumineuse a diminué cette activité microbienne du fait de davantage de nutriments biodisponibles (Snapp *et al.*, 1998). En effet, les légumineuses libèrent des acides organiques dans le sol pendant leur croissance végétative. Ces acides organiques peuvent se complexer avec les nutriments, tel le P, liés aux particules du sol et donc augmenter leur disponibilité dans le sol (Rochester *et al.*, 2001 ; Yadav *et al.*, 2017). Ainsi, la diminution de l'activité de la phosphatase dans le sol, s'explique par le fait que lorsque les nutriments sont disponibles dans le sol, les microorganismes telluriques agiraient de manière économique, limitant la dépense d'énergie nécessaire à la synthèse de cette enzyme (Allison *et al.*, 2011). En ce qui concerne l'uréase, son activité tend à diminuer lors de l'apport de la fertilisation minérale.

Ainsi, nos résultats ont confirmé ceux obtenus par Ajwa *et al.* (1999), qui ont mis en évidence qu'une fertilisation azotée augment les activités de la β-glucosidase et de la phosphatase, mais implique une diminution de celle de l'uréase. En ce qui concerne l'activité ACCd, notre étude en conditions contrôlées, a révélé un effet positif clair des traitements avec la légumineuse sur cette enzyme. La Figure 53 résume l'effet de l'introduction d'une légumineuse avec *Alyssum murale* en comparaison avec une fertilisation minérale, sur les activités microbiennes du sol, en conditions contrôlées.

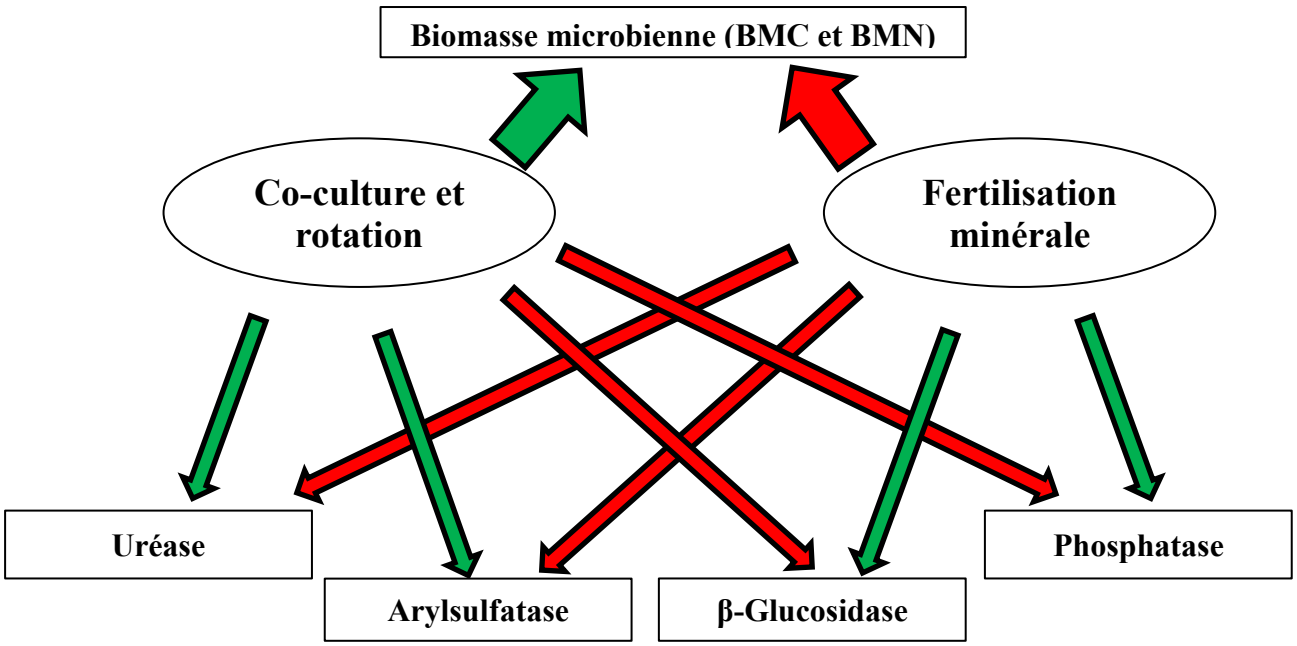


Figure 53 : Effets des systèmes de culture sur les activités microbiennes du sol, en conditions contrôlées. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse, les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers

Nous nous sommes également intéressés à la proportion des différents agrégats mais également au biofonctionnement du sol des différents traitements. Les traitements plantés montraient une proportion d'agrégats organo-minéraux supérieure en comparaison au sol nu (sans plante). Cette observation est liée, dans ce dernier cas, à l'absence de système racine qui est le facteur clé dans le phénomène de formation des agrégats et dans leur stabilité (Vergani et Graf, 2016). De plus, les microorganismes de la rhizosphère sont connus pour lier les particules du sol et donc influencer indirectement la formation et la stabilité des agrégats (Andrade *et al.*, 1998). Ainsi, les légumineuses, lorsqu'elles sont introduites dans un système de culture, fournissent *via* leurs exsudats racinaires les nutriments et l'énergie nécessaires au développement de la biomasse microbienne, qui participe à la structuration du sol et à sa stabilité (Walker 2003 ; Gao *et al.*, 2010, 2012). L'observation d'un pourcentage de micro-agrégats bactériens plus élevé, dans le cas de la rotation avec la légumineuse, confirme ce processus, tout comme la proportion de particules non agrégées qui était la plus faible pour ce traitement. En fait, il est bien connu que la qualité physique d'un sol est étroitement liée à sa structure et à la manière dont les constituants minéraux et organiques sont assemblés (Amezketa, 1999 ; Haynes, 1999). L'agrégation peut aussi être utilisée pour mesurer la résistance des sols à l'érosion et les changements dans la gestion du travail du sol (Christensen, 2001 ; Moebius *et al.*, 2007). Mais cette agrégation, bien que rendant compte de la qualité physique d'un sol, n'est pas indépendante de l'activité biologique de ce dernier. En

effet, Tiemann *et al.* (2015) ont montré que l'agrégation des sols était améliorée corrélativement avec une augmentation de la taille de la communauté microbienne du sol. Cela pourrait expliquer la proportion plus élevée de micro-agrégats bactériens dans le cas du traitement avec introduction d'une légumineuse. Les résidus de cette dernière ont soutenu, en partie, le développement de la communauté microbienne tout en améliorant la qualité de la matière organique du sol (Tiemann *et al.*, 2015). La création de liaisons organiques avec des particules de sol sont connues pour être plus fortes et beaucoup plus stables que les liaisons inorganiques, dans la plupart des sols (Körschens 2002), aboutissant à une meilleure structure de ces derniers.

3.3. Une amélioration de la diversité microbienne ?

Les études portant sur la diversité microbienne des sols sont nombreuses. Elles s'accordent toutes à souligner le fait que la structure et la diversité des communautés microbiennes dans la rhizosphère sont régies par des facteurs abiotiques et biotiques. En effet, de nombreux travaux ont montré que le sol influence, selon ses caractéristiques, la structure des communautés bactériennes mais aussi fongiques. Les caractéristiques physico-chimiques complexes des sols affectent, en effet, la physiologie des plantes et par voie de conséquence les profils d'exsudation racinaires, qui influencent à leur tour la composition du microbiome rhizosphérique. De plus, l'âge de la plante, son génotype, mais aussi l'environnement ou cette plante se développe (écosystèmes naturels ou agrosystèmes) et enfin sa conduite de culture s'il s'agit d'une espèce cultivée, vont influencer la diversité des communautés microbiennes (Philippot *et al.,* 2013). Par ailleurs, il a été montré que plus le couvert végétal montre une composition importante, en nombre d'espèces, plus la communauté microbienne est diversifiée (Tilman *et al.*, 2006).

Par contre, concernant les systèmes de culture consacrés à l'agromine, ils sont, pour la plupart, basées sur la culture d'une seule plante hyperaccumulatrice (Baker et Brooks, 1989). En effet, seules quelques études ont étudié l'impact de l'association de différentes plantes hyperaccumulatrices sur la structure génétique des communautés bactériennes de la rhizosphère (Lucisine *et al.*, 2014 ; Rue *et al.*, 2015). Ainsi, à notre connaissance, nos recherches sont les premières à cerner l'impact de l'introduction d'une légumineuse, dans des systèmes culturaux dédiés à l'agromine, sur la diversité microbienne de sols ultramafiques.

L'étude au champ a mis en évidence la présence de 41 phyla. Parmi ces derniers, 10 montraient une abondance relative supérieure à 1%, comme c'est le cas pour la plupart des sols (Janssen, 2006 ; Rastogi *et al.*, 2010). Le phylum des *Proteobacteria* était le plus

abondant, quels que soient les traitements (abondance relative > 36%). Ceci confirme les résultats obtenus par Gołębiewski *et al.* (2014) qui ont constaté que ce phylum était également dominant dans un sol multi-contaminé (Cr, Zn et Pb). Le phylum des *Actinobacteria* est également bien représenté dans nos sols et cela s'explique par le fait qu'il s'agit d'un groupe de bactéries Gram-positives adaptées à la présence d'éléments traces dans les sols (Abou-Shanab *et al.*, 2010). En ce qui concerne le phylum des *Acidobacteria*, il montre une abondance relative supérieure dans les sols non planté (sol nu) par rapport aux autres traitements. Par ailleurs, le phylum des *Chloroflexi* est le plus abondant dans les sols ayant reçu une fertilisation minérale. Ce phylum est connu, d'une part être abondant dans des conditions extrêmes et stressantes telles que l'eau salée (Yamada *et al.*, 2005) et d'autre part, comme l'un des phyla dominants dans la rhizosphère de *Alyssum murale* dans leurs habitats naturels, dans les Balkans (Lopez *et al.*, 2017). Ainsi, il se pourrait que la fertilisation minérale induise des conditions défavorables pour certains phyla mais, *a contrario*, favoriserait les *Chloroflexi* du fait de teneurs élevées en sels d'ammonitrate.

Dans notre étude en conditions contrôlées, c'est le phylum des *Actinobacteria* qui était le mieux représenté, avec une abondance relative plus faible dans les traitements avec introduction de la légumineuse et inversement, une augmentation de celle-ci dans les traitements fertilisés. En fait, la haute disponibilité en substrats (azote minéral) pourrait influencer positivement ce phylum (Li *et al.*, 2012). Il est par ailleurs également connu, que l'ajout d'amendements organiques favorise le phylum des *Actinobacteria* en raison de son rôle dans la dégradation des composés organiques (Acosta-Martínez *et al.*, 2008, Jenkins *et al.*, 2009). Ce n'est pourtant pas le cas dans notre étude, comme cela a été confirmé par Bell *et al.* (2012) et Li *et al.* (2012). En effet, ces auteurs ont constaté le même effet inexpliqué avec une diminution de la représentativité des *Actinobacteria* après ajout de matières organiques. Les *Acidobacteria* et les *Gemmatimonadetes* montrent une meilleure représentativité dans les traitements avec introduction de la légumineuse. Le phylum des *Acidobacteria* est l'un des phyla bactériens les plus abondants des écosystèmes terrestres (Barns *et al.*, 1999) et joue un rôle crucial dans le cycle du carbone en raison de la capacité des bactéries qui y appartiennent à dégrader des polysaccharides complexes dérivant des plantes tels que la cellulose et la lignine (Ward *et al.*, 2009). Par conséquent, l'augmentation de l'abondance relative de ce phylum pourrait être liée à la dégradation des résidus de légumineuse qui ont été incorporés dans le sol. Les bactéries appartenant au phylum des *Gemmatimonadetes* sont fréquemment détectées dans les bases de données des gènes d'ARNr 16S environnementaux et sont identifiés comme l'un des neuf phyla dominants trouvés dans les sols (Janssen, 2006). Dans

leur étude, DeBruyn *et al.* (2011) ont trouvé les proportions les plus élevées de *Gemmatimonadetes* dans les sols secs à arides, ce qui suggère une adaptation des bactéries appartenant à ce phylum aux environnements à faible humidité. Ainsi, suite à notre étude en conditions contrôlées, nous pourrions suggérer que l'augmentation de l'abondance relative des *Gemmatimonadetes* dans les traitements, tels la co-culture et la rotation, était due d'une part, à la présence d'une légumineuse conjointement à la plante hyperaccumulatrice, induisant des périodes avec une plus faible humidité du sol. D'autre part, ces traitements (introduction d'une légumineuse) impliquaient comme nous l'avons montré précédemment la formation de davantage de microagrégats bactériens (Saad *et al.*, 2017), ce qui corrobore les résultats de Mummey *et al.* (2006) selon lesquels un pourcentage beaucoup plus élevé de *Gemmatimonadetes* (10 à 32% de la communauté) était trouvé associées aux microagrégats du sol. Concernant les *Chloroflexi*, nos résultats en conditions contrôlées confirment les observations au champ : la fertilisation minérale induit une plus forte concentration d'ions dans le sol, ce qui favoriserait la croissance des bactéries appartenant à ce phylum. Les subphyla des *α-Proteobacteria* et les *β-Proteobacteria* étaient davantage représentés dans le cas des traitements avec introduction de la légumineuse par rapport à leurs témoins fertilisés. Or les familles bactériennes de ces deux subphyla comprennent des bactéries définies comme étant copiotrophes (Fierer *et al.*, 2007 ; Lienhard *et al.*, 2014). Il s'agit d'organismes à croissance rapide préférant les environnements riches en carbone. Ainsi, l'incorporation des résidus de légumineuses, aboutissant à des quantités plus élevées de matière organique et de N organique dans la couche arable des sols (Ludwig *et al.*, 2011), a favorisé ces deux subphyla. De plus, ces subphyla comprennent des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, ce qui explique le fait de leur abondance plus élevée dans le cas de l'introduction de légumineuse (Moulin *et al.*, 2001).

De nombreux auteurs ont pu mettre en évidence que les activités anthropiques, telles que l'utilisation d'intrants chimiques, sont à l'origine d'une modification, voire une réduction de la diversité microbienne des sols (Gans *et al.,* 2005 ; Hussain *et al.,* 2009 ; Philippot *et al.,* 2013). Ainsi, lors de leur étude sur la diversité taxonomique des bactéries telluriques, Postma-Blaauw *et al.* (2012) ont montré, au travers d'études portant sur la transformation de prairies en terres arables, que l'intensification de l'utilisation des terres (labour, fertilisation minérale, réduction de la diversité des cultures) affecte négativement la diversité des communautés bactériennes. Notre étude en conditions contrôlées, sur la base du calcul de différents indices de diversité, confirme clairement ces résultats : l'apport d'une fertilisation minérale se traduit

par une diminution de la diversité des communautés bactériennes à l'inverse des traitements où la légumineuse a été introduite.

La Figure 54 résume l'impact des systèmes culturaux étudiés sur la diversité bactérienne des sols.

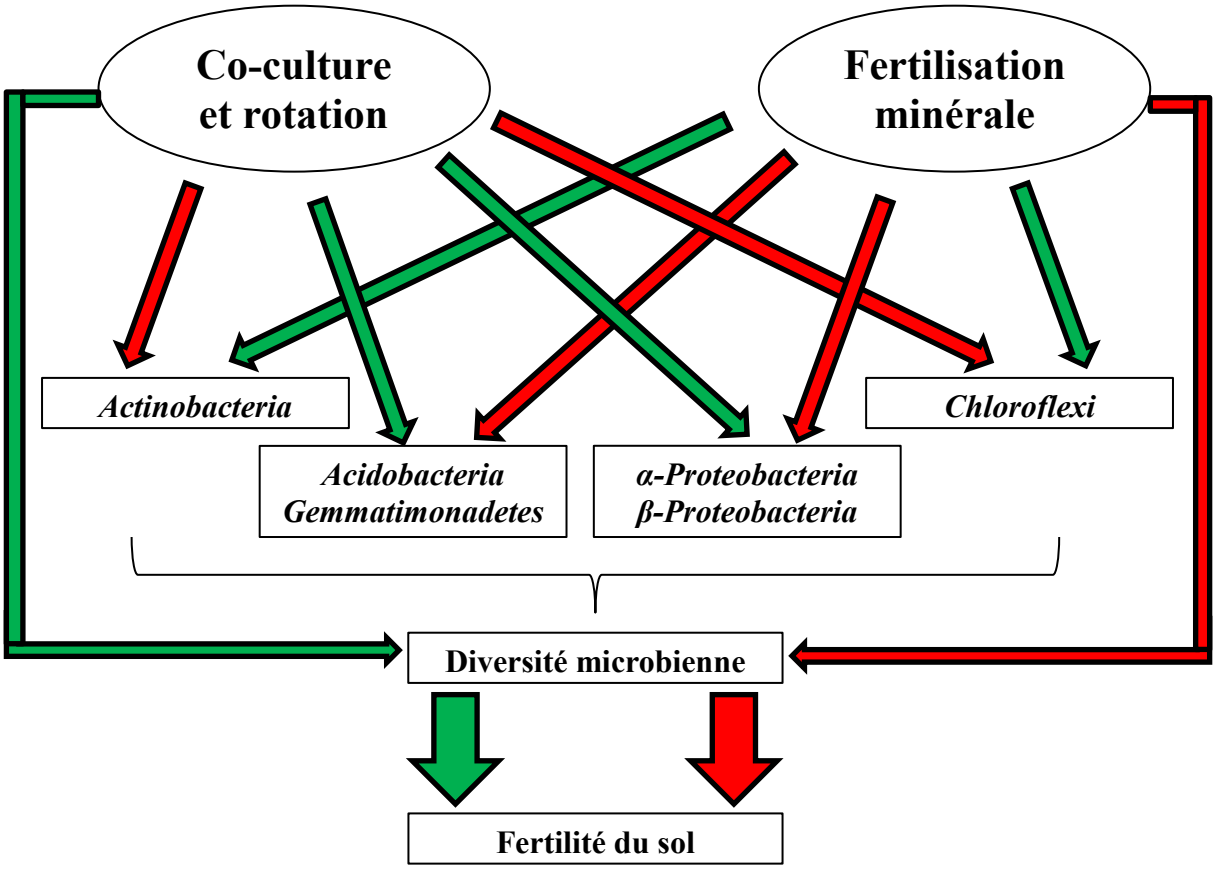


Figure 54 : Impact de nos systèmes de culture en conditions contrôlées sur la diversité microbienne du sol. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers

3.4. Une amélioration des rendements en biomasse végétale et en nickel ?

L'agromine est un procédé utilisant les plantes hyperaccumulatrices pour valoriser les métaux issus des sols contaminés (Chaney, 1983). Elle est envisagée pour les sols ultramafiques naturellement riches en Ni (Brooks *et al.*, 1998 ; van der Ent *et al.*, 2013 ; Morel, 2013). Après récolte et incinération de la biomasse végétale, il est ainsi possible d'extraire et recycler dans l'industrie les métaux. C'est l'objet du brevet international déposé par Mercier et ses collaborateurs qui portent sur la production d'un sel cristallisé de nickel à partir de plantes hyperaccumulatrices (WO2012103651 sur www.inpi.fr). De plus, il est possible de valoriser l'incinération de plantes par une récupération de l'énergie produite lors de la combustion. Morel (2013) a proposé d'adopter le terme "agromine" pour souligner le fait que la technologie repose sur un ensemble de procédés agronomiques et industriels assemblés en

filière. Pour améliorer la phytoextraction des plantes hyperaccumulatrices et ainsi obtenir une agromine efficiente, plusieurs stratégies sont envisageables. La fertilisation minérale, avec l'application d'engrais N-P-K, augmente la biomasse des plantes hyperaccumulatrices (Bani *et al.*, 2015a, b). Actuellement, l'inoculation des plantes hyperaccumulatrices, avec des souches bactériennes d'intérêt, est une voie explorée pour optimiser l'agromine (Garbisu et Alkorta, 2001 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003a, 2003b ; Lebeau *et al.*, 2008 ; Rajkumar et Freitas, 2008 ; Durand *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2015). Nous nous sommes orientés, dans le cadre de ce doctorat, vers une autre stratégie qui repose sur le développement de nouveaux systèmes culturaux avec introduction de légumineuse.

Suite à la mise en place de l'expérimentation au champ, il ressort que la fertilisation minérale améliore les rendements de biomasse de *Alyssum murale* en comparaison avec la monoculture non fertilisée. Nos résultats confirment ceux obtenus en Albanie (Bani *et al.*, 2015a) pour lesquels l'application de la même quantité d'ammonitrate (120 kg N ha^{-1}) avait entraîné une augmentation de 780% du rendement en biomasse de *Alyssum murale* par rapport aux parcelles non fertilisées (2300 kg ha^{-1} contre 272,2 kg ha^{-1}).

Notre expérimentation, réalisée au champ, a montré que la co-culture de *Alyssum murale* avec la vesce aboutissait à l'obtention de rendements en nickel les plus élevés, en comparaison avec les autres traitements. Par contre, Bani *et al.* (2015a) montraient dans leur étude que les engrais azotés augmentaient considérablement les rendements en Ni (20 kg Ni ha^{-1}) lors de leurs premiers essais. Nos résultats ne vont pas dans ce sens : c'est le traitement avec introduction de la légumineuse (la co-culture) qui a entraîné une augmentation de 35% et 493% de Ni extraits par rapport aux parcelles fertilisées et non fertilisées, respectivement. De manière surprenante, lorsque le pH du sol augmente, le Ni est davantage accumulé par les plantes, contrairement à d'autres métaux (Li et *al.*, 2003). Dans notre étude, le pH du sol atteignait la valeur de 6,17 dans le cas du système de co-culture, ce qui a favorisé l'absorption de Ni et confirme des études antérieures (Peters et *al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2003 ; Kukier *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que *Alyssum murale* et *Alyssum corsicum* accumulaient moins de Ni lorsque le pH du sol était plus acide. Par conséquent, malgré une diminution du pourcentage de Ni biodisponible du fait d'une augmentation du pH, la biomasse et les rendements de Ni ont été améliorés (Peters et *al.*, 2000). Ce phénomène, résumé dans la Figure 55 s'explique par une performance optimale du transporteur transmembranaire Ni^{2+} à pH neutre plutôt qu'à des pH acides (Sheoran et *al.*, 2016).

Notre étude en conditions contrôlées, confirme l'effet positif de la présence de la légumineuse observé au champ : les concentrations de Ni étaient plus élevées dans les tissus de *Alyssum murale* pour les traitements avec introduction d'une légumineuse.

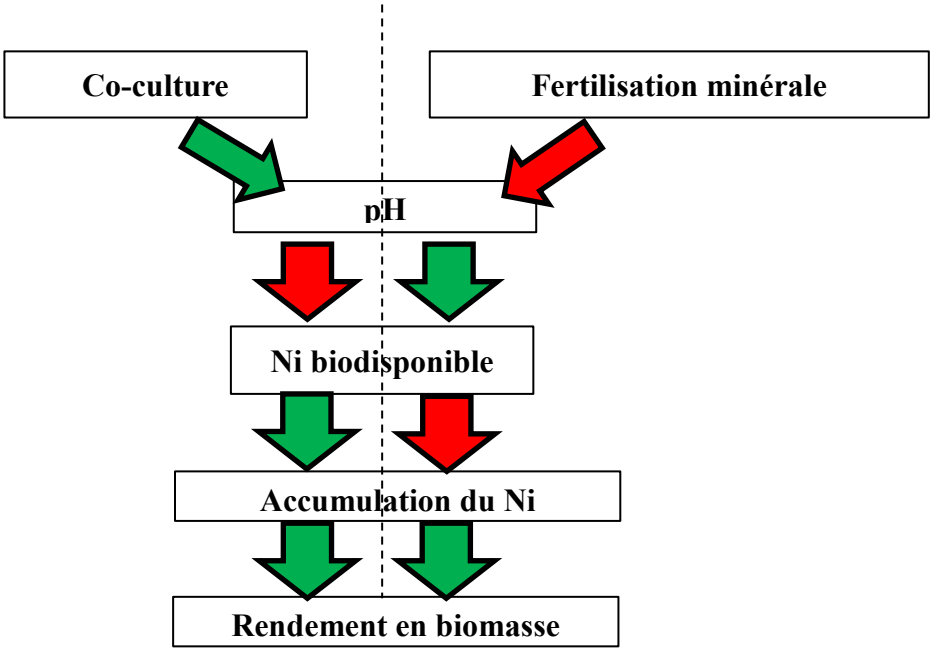


Figure 55 : Facteurs affectant l'accumulation du Ni. Les flèches vertes traduisent une augmentation des paramètres mesurés. A l'inverse les flèches rouges rendent compte d'une diminution des valeurs de ces derniers

Malgré tout, dans le cas de l'association avec une légumineuse, nous n'atteignons pas, lors de la première récolte réalisée suite à la mise en place de notre dispositif au champ, les valeurs de biomasse et de production de Ni, comme dans le cas de l'étude de Bani *et al.* (2015a). Ceci peut résulter de différences dans les caractéristiques du sol et le climat entre ce deux régions ultramafiques (Albanie, caractérisée par un climat méditerranéen et Espagne, caractérisée par un climat tempéré océanique avec des températures basses et de fortes pluies). De plus, la concentration de Ni extractible dans le sol dans le site étudié en Espagne (41 mg Ni kg^{-1} de sol sec) est également largement inférieure à celle des sols albanais (> 120 mg Ni kg^{-1} de sol sec).

Nous avons réitéré la mise en place de cet essai (sur la même parcelle) pour la campagne 2016-2017 et nos résultats montrent clairement que pour cette 2ème année, la co-culture et la rotation permettent l'obtention de rendements en biomasse plus élevés par rapport à leurs témoins non-fertilisés (Figure 56 et Photographie 18). C'est le cas, en particulier, pour la co-culture et il convient de noter que ces rendements en biomasse ont été presque doublés par rapport à la première année, pour la plupart des traitements. La même tendance a été observée en ce qui concerne les rendements de Ni (Figure 57). En effet, le traitement de la co-culture a

montré les meilleurs rendements de Ni et est signicativement plus important de ceux des témoins non fertilisés. Ces améliorations des rendements pour la deuxième année peuventt résulter du désherbage manuel des parcelles qui a été fait plus régulièrement durant toute l'année de culture. De plus, durant la première année, nous avions raisonné l'implantation de la légumineuse sur la base d'une densité de semis (30 g de semences de vesce pour 10 m^2, comme cela est préconisé pour le colza en association avec cette légumineuse). Par contre, lors de la 2ème année, l'implantation de la légumineuse a été réfléchie non pas en densité de semis, mais en quantités d'azote qui seraient restituées après destruction de la légumineuse. Ainsi, la densité de semis de la légumineuse a été doublée pour la deuxième campagne (60 kg ha^{-1} de graines de vesce au lieu de 30) ce qui correspondait à un apport théorique de 110 kg N ha^{-1} dans le cas de la co-culture et de 114 kg N ha^{-1} dans le cas de la rotation, après destruction de la légumineuse.

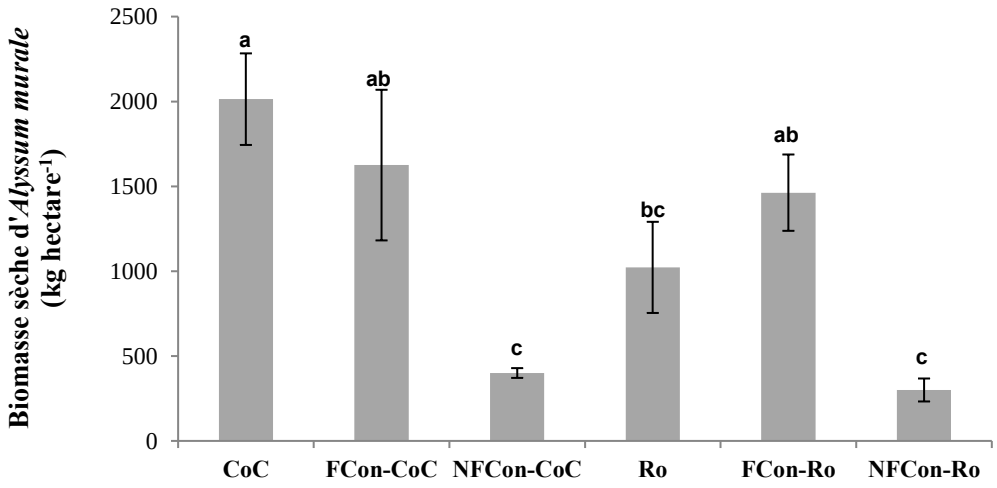
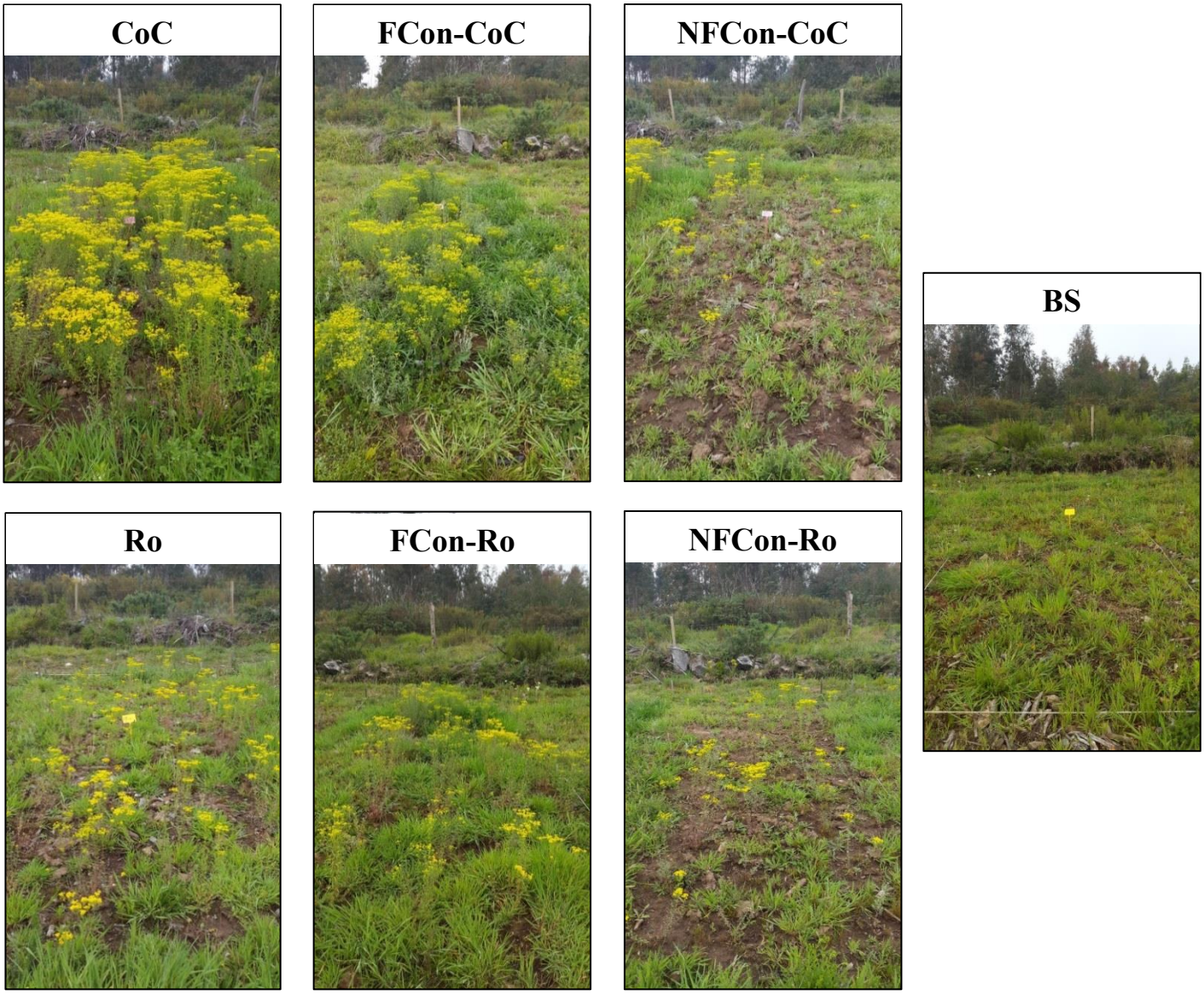


Figure 56 : Rendements de biomasses sèches de *Alyssum murale* pour la deuxième année de culture au champ en Espagne. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro et NFCon-Ro correspondent aux traitements de la co-culture, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture, rotation, témoin positif de la co-culture et témoin non fertilisé de la co-culture, respectivement. Les moyennes ± écart-types suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0.05$ (Test de comparaisons multiples de Duncan), (n = 4)



Photographie 18 : Nos sept traitements juste avant la récolte pour la deuxième année de culture au champ en Espagne. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro, NFCon-Ro et BS correspondent aux traitements de la co-culture, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture, rotation, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture et au sol nu, respectivement

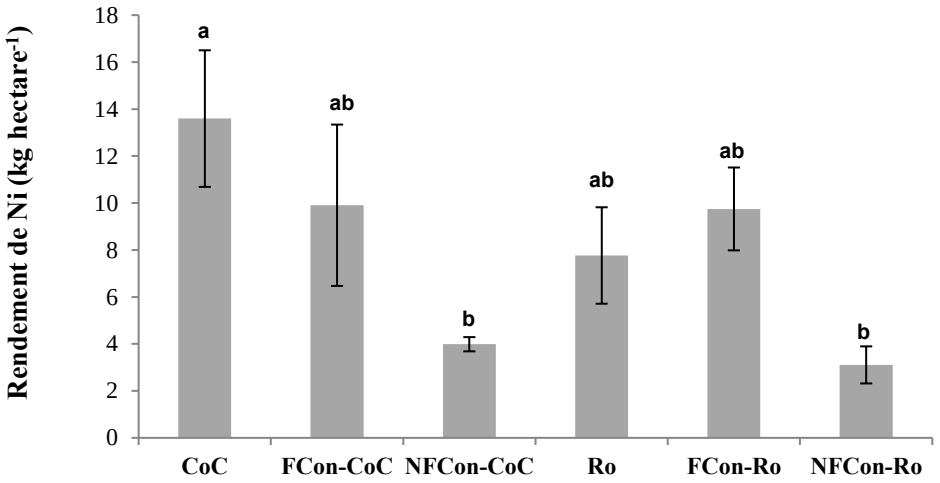


Figure 57 : Rendements de Ni pour la deuxième année de culture au champ en Espagne. CoC, FCon-CoC, NFCon-CoC, Ro, FCon-Ro et NFCon-Ro correspondent aux traitements de la co-culture, témoin positif de la co-culture, témoin non fertilisé de la co-culture, rotation, témoin positif de la co-culture et témoin non fertilisé de la co-culture, respectivement. Les moyennes ± écart-types suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0.05$ (Test de comparaisons multiples de Duncan), (n = 4)

3.5. Quelle faisabilité économique de nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine ?

Les enjeux de l'agromine sont d'extraire des quantités importantes de nickel afin de recycler ce métal dans l'industrie et alimenter différentes filières telles que celles, par exemple, de l'automobile, de l'aéronautique, mais aussi de réhabiliter les sols ultramafiques à des usages agricoles.

Nous proposons, au travers de cette thèse, la mise en place de nouveaux systèmes de culture basés sur l'introduction d'une légumineuse. Mais pour que cette nouvelle filière de production de nickel « biosourcé » soit viable, il convient de cerner si économiquement, ces systèmes de culture sont intéressants, en comparaison de systèmes culturaux intensifs basés sur l'utilisation d'intrants chimiques.

Nous nous proposons ici de faire une comparaison financière des opérations inhérentes à un système de culture « conventionnel » dédié à l'agromine avec celles nécessaires à la mise en place du nouveau système de culture que nous avons testé au champ, depuis deux années (Tableau 19).

Tableau 19 : Estimation du coût des différentes actions appliquées dans les systèmes de culture utilisés. Les prix sont issus : « du Barème d'entraide régional 2016 - Chambre d'Agriculture de la Meuse » et ceux des produis correspondent aux moins chers, trouvés en ligne, sur internet

Actions + produits	**Prix (€ par hectare)**	**Co-culture ou rotation**	**Fertilisation minérale**
Désherbage mécanique	156 €	X	X
Ajout des fertilisants (gypse + KH_2PO_4)	118 €	X	X
Travail du sol - Mélanger les fertilisants dans les 10 premiers cm du sol	136 €	X	X
Transplantation des plantes d'*Alyssum murale*	291 €	X	X
Semis de graines de la légumineuse	189 €	X	
Fertilisation minérale	236 €		X
Application d'herbicides	123 €		X
Récolte des biomasses (Fauchage + ramassage)	213 €	X	X
Transport	60 €	X	X
Graines de vesce (30 kg, Agrosemens.com)	118,51 €	X	
Fertilisation minérale (343 kg de NH_4NO_3)	120,85 €		X
Gypse (4500 kg de $CaSO_4.2H_2O$)	190,86 €	X	X
KH_2PO_4 (54 kg)	116,9 €	X	X
Herbicide (Stratos Ultra, 4 litres)	108.3 €		X
Total (€) par hectare		1589,27 €	1869,91 €
Pour une surface de 100 000 hectares (ex. Albanie) (€)		158 927 000 €	186 991 000 €
Gain (€) du nouveau système cultural		**28 064 000 €**	
Somme du temps de travail (heures à l'hectare)		30 h	36 h
Pour une surface de 100000 hectares (ex. Albanie)		3 000 000 h	3 600 000 h
Gain en temps de travail (h) du nouveau système cultural		**600 000 h**	

Il ressort clairement de cette comparaison « approximative » que l'introduction d'une légumineuse dans un système cultural dédié à l'agromine permettrait de réaliser des économies notables, en comparaison avec une culture conventionnelle basée sur l'utilisation d'intrants chimiques. A l'échelle d'un pays comme l'Albanie, où potentiellement, près de 100 000 hectares de terres ultramafiques pourraient être dédiées à l'agromine, il ressort de notre estimation que la culture de *Alyssum murale* en association avec une légumineuse permettrait d'économiser plus de 28 millions d'euros. Cette estimation, bien que perfectible, souligne donc l'intérêt de s'engager dans une agromine durable, avec limitations d'intrants.

3.6. Quels services écosystémiques des nouveaux systèmes culturaux agro-écologiques dédiés à l'agromine ?

Le concept de service écosystémique a été élaboré pour souligner l'importance du rôle du fonctionnement des écosystèmes pour les sociétés humaines (Ehrlich et Mooney, 1982). Dans un contexte de dégradation des écosystèmes et de disparition des espèces, le concept visait à

sensibiliser sur la nécessité de maintenir ce fonctionnement, en plus de la conservation de la biodiversité au sens strict. Les services écosystémiques sont les services que les humains retirent de la nature. Le mot écosystémique désigne le fonctionnement des écosystèmes dont les humains sont dépendants (Muradian et Rival, 2013). Le rôle des activités humaines pour la fourniture des services peut aussi être considéré à travers l'impact de ces dernières sur les écosystèmes. Ainsi, les hommes modifient les écosystèmes et ces derniers vont donc fournir des services différents. Néanmoins, le service est toujours considéré comme un produit de l'écosystème, qu'il y ait ou non une intervention humaine (Fisher et Turner, 2008). Les travaux qui cherchent à cartographier les services écosystémiques se basent eux sur des caractéristiques bio-physiques telles que les fonctions (Egoh *et al.*, 2008 ; Lavorel *et al.*, 2011).

La distinction entre les services intermédiaires et les services finaux peut être considérée comme relevant d'une volonté de distinguer les processus inhérents à l'écosystème (services intermédiaires) des processus qui seront directement utiles aux humains (services finaux) (Fisher et Turner, 2008). Les services intermédiaires comprennent à la fois des éléments de structure et des processus. La structure des écosystèmes est considérée comme un service dans la mesure où elle fournit la plate-forme à partir de laquelle les processus des écosystèmes se produisent (Fisher *et al.*, 2009). Les services intermédiaires reposent donc sur des interactions entre la structure et les processus des écosystèmes et conduisent eux-mêmes aux services finaux. Les services finaux résultent ainsi d'une interaction entre de multiples services intermédiaires. Ce cadre d'analyse est celui qui a été adopté pour l'évaluation des écosystèmes au Royaume-Uni (Mace et Bateman, 2011).

Les fonctions des écosystèmes sont définies comme leur potentiel à fournir des services (purification de l'eau), tandis que la structure et les processus bio-physiques sont des composantes et des dynamiques fondamentales au fonctionnement de l'écosystème (par exemple la photosynthèse et les cycles nutritifs). Selon Balmford *et al.* (2008), le concept de service est défini comme un élément de la relation être les processus écosystémiques et les bénéfices pour les humains.

Si elles sont bien gérées, les zones ultramafiques pourraient fournir de multiples services écosystémiques. En effet, tout comme dans les cas d'approches agronomiques classiques, la culture de légumineuses est envisagée également ici pour réduire ou prévenir l'érosion, enrichir le sol en matière organique après enfouissement, attirer des insectes bénéfiques mais aussi rompre les cycles d'agents pathogènes et d'insectes, tout en limitant le développement des adventices.

Ainsi, l'introduction de légumineuses dans nos systèmes de culture dédiés à l'agromine peut fournir plusieurs services écosystémiques, comme les services de production et les services de régulation.

Concernant les services écosystémiques de production de biomasse suite à l'introduction de légumineuse, il a été montré, dans notre étude au champ, une augmentation de production de la biomasse de la plante hyperaccumulatrice par rapport au témoin non fertilisé. De plus, le système de co-culture a montré un rendement plus élevé de Ni par rapport aux témoins fertilisés et nos fertilisés. Nos résultats, obtenus en fin de première année de culture, ont été validés (et même améliorés) la 2ème année, par l'obtention de rendements plus élevés en termes de biomasse pour la co-culture et la rotation, en comparaison à leurs témoins fertilisés et non fertilisés.

Parmi les services de régulation qui ont été fournis par nos systèmes de culture dédiés à l'agromine et dans lesquels la légumineuse a été introduite, une augmentation de la CEC a été observée. En effet, une augmentation de la CEC dans un sol, implique une rétention améliorée des éléments nutritifs pour les plantes et traduit une réduction du risque de lessivage. La fraction stable (humus) de la matière organique du sol est la fraction la plus importante contribuant à la CEC d'un sol (Coleman *et al.*, 2004). Or, le taux de matière organique a été amélioré dans le sol suite à la mise en place de la co-culture, ce qui pourrait favoriser d'une part la CEC, mais contribue d'autre part, à une amélioration de la structure du sol avec une meilleure stabilité des agrégats et une réduction de la compaction du sol (Coleman *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'augmentation de la matière organique du sol permet d'augmenter la résistance à la sécheresse dans les zones sèches voire arides. En effet, l'érosion du sol est un résultat commun des eaux de ruissellement de l'eau. Or, les résidus de plantes qui restent à la surface du sol empêchent physiquement le ruissellement de l'eau, avec une vitesse réduite du mouvement de l'eau. Corrélativement, l'eau a plus de temps pour se déplacer verticalement dans le profil du sol, plutôt qu'à la surface de ce dernier. Ainsi, l'apport de matière organique au sol, comme c'est le cas dans nos systèmes culturaux basés sur l'introduction puis l'enfouissement de la légumineuse, pourrait favoriser l'infiltration de l'eau dans le sol. En outre, ces résidus de surface limiteraient également le taux d'évaporation de l'eau du sol et amélioreraient sa structure avec une meilleure porosité permettant un stockage de l'eau durant les périodes plus sèches (Bot et Benites, 2005).

En outre, les couverts végétaux, après destruction, pourraient maintenir la température du sol et le niveau d'humidité à des niveaux plus appropriés pour l'activité microbienne, ce qui

favoriserait leur décomposition par la microflore et enrichirait, après minéralisation, le sol en matière organique. Enfin, la mise en place de couverts végétaux se substituerait à l'apport d'azote minéral limitant la contamination et l'eutrophisation des eaux souterraines (Vitousek *et al.*, 1997).

Ainsi, il ressort de nos travaux que la mise en place de nouveaux systèmes culturaux basés sur l'introduction d'une légumineuse a favorisé d'une part, les activités microbiennes du sol et d'autre part, a induit une diversité bactérienne accrue. Une communauté microbienne active et plus diversifiée est souvent considérée comme la composante indispensable d'un sol sain et productif.

La Figure 57 résume les services écosystémiques rendus par l'introduction de la légumineuse dans les systèmes de culture d'agromine.

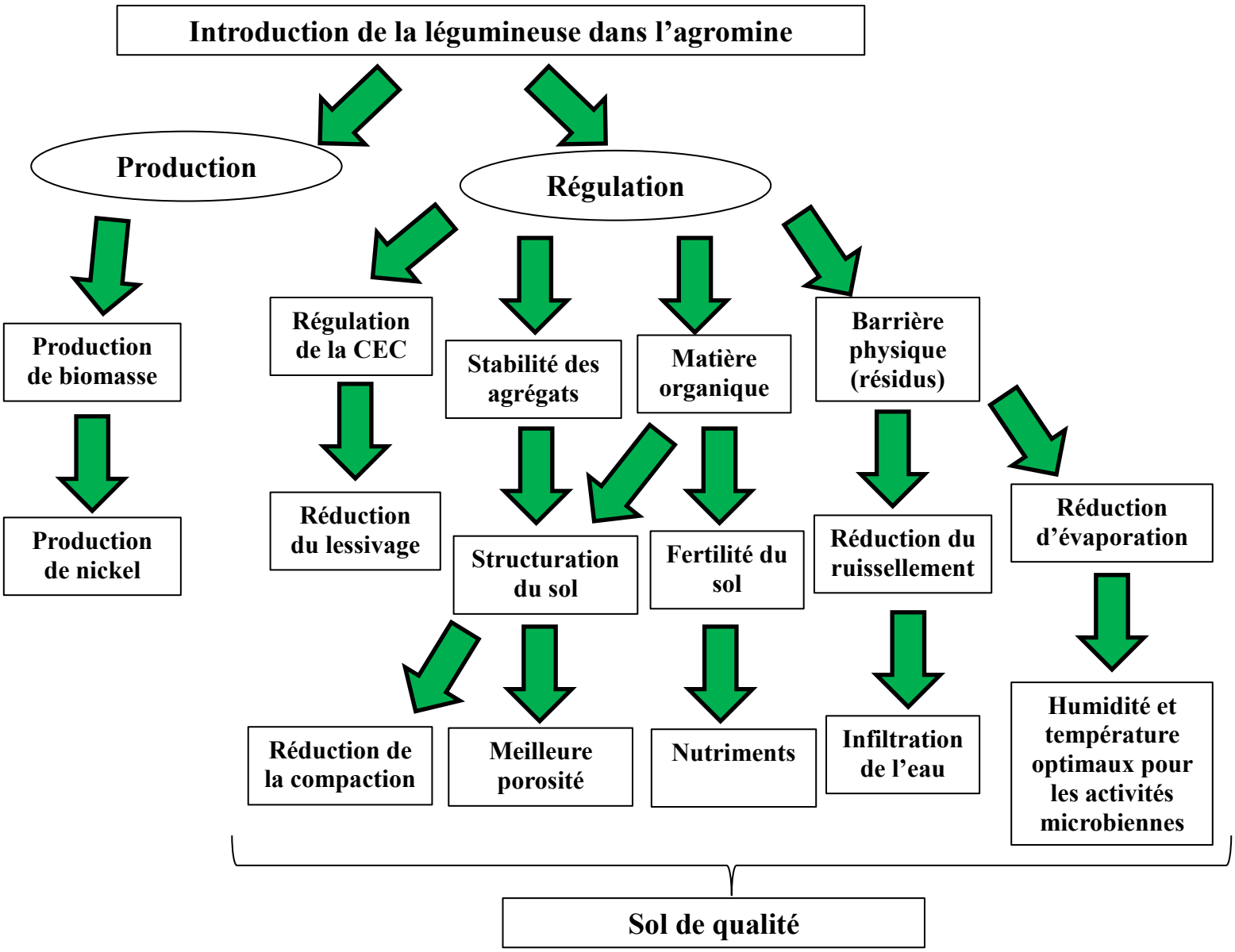


Figure 58 : Les services écosystémiques rendus par l'introduction de la légumineuse dans les systèmes de culture d'agromine

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

L'application de l'agromine à des zones ultramafiques délaissées et abandonnées constitue un enjeu majeur à la vue des surfaces potentiellement valorisables, aussi bien en Europe qu'en Asie du Sud-Est. Ce défi repose sur notre capacité à créer des conditions favorables à la croissance et au développement des plantes hyperaccumulatrices. Dans le contexte de l'économie circulaire, ces sols, souvent délaissés par leurs propriétaires, constituent pourtant une source d'éléments métalliques qui pourraient être récupérés par des plantes hyperaccumulatrices et réintroduits dans la filière de l'agromine pour nourrir les chaînes de production. Mais ces sols ultramafiques sont particuliers du point de vue de leur fertilité avec de fortes concentrations en métaux (*e.g.* Ni, Al, Fe, Mn), un pH assez bas et une quasi absence de matière organique. L'ensemble de ces propriétés physico-chimiques se traduit par, *a priori*, une difficulté à l'installation de végétaux.

Malgré tout, ce défi a été en partie relevé par la mise en place de l'agromine du nickel sur des sols ultramafiques, pourtant peu propices à l'installation des végétaux, comme cela a été le cas en Albanie (Bani *et al.* 2007 ; 2015a,b). Dans ce cadre, l'approche a consisté à l'implantation de plantes hyperaccumulatrices telles *Alyssum murale* ou au suivi du développement de couverts naturels et spontanés de cette espèce végétale, couplée à l'application importante d'intrants chimiques, tels des herbicides et une fertilisation minérale.

Notre défi, au travers de ce doctorat, a été de développer une agromine durable par la mise en place d'agro-écosystèmes basés i°) sur l'introduction d'une légumineuse en association avec la plante hyperaccumulatrice et ii°) la suppression de tout intrant chimique. Mais, créer des conditions de croissance des hyperaccumulateurs et d'extraction des métaux a nécessité de lever plusieurs verrous importants : cela a été l'objet de cette thèse.

Le premier objectif de cette thèse a été de montrer qu'une légumineuse (la lentille) pouvait tolérer des concentrations relativement élevées de Ni biodisponible lorsqu'elle était implantée sur un sol artificiellement enrichi. Malgré le stress physiologique induit par les concentrations de nickel testées, cette légumineuse a produit des nodules fonctionnels à même de fixer l'azote de l'air, bien que le nombre de nodules aient été fortement affecté. La fixation de l'azote a été également affectée et devient nulle lorsque les concentrations de Ni biodisponible atteignaient 50 mg Ni kg^{-1}de sol sec. Ainsi, les sols ultramafiques choisis pour la suite de nos travaux contenaient des teneurs en Ni inférieures à cette concentration.

Par la suite, nous avons souhaité démontrer la faisabilité de l'agromine, *in situ*, au travers de la mise en place de systèmes culturaux avec introduction d'une légumineuse. Nos résultats confirment clairement que l'introduction d'une légumineuse dans des systèmes de culture dédiés à l'agromine du Ni a amélioré à la fois la production de biomasse sèche de *Alyssum murale* mais aussi, les rendements de Ni. Plus précisément, nos résultats mettent en évidence que la mise en place d'une culture de *Alyssum murale* en association avec la vesce (système de co-culture) permet l'amélioration des rendements de Ni par rapport à la monoculture de la plante hyperaccumulatrice, fertilisée et non fertilisée. Ces observations encourageantes ont été validées lors de la deuxième année de culture au champ en Espagne ; deuxième campagne pour laquelle nous obtenons encore de meilleurs résultats.

Nos travaux ont également montré que la diversité des plantes, consistant à l'insertion d'une légumineuse dans des systèmes de culture dédiés à l'agromine, permet de modifier les processus et les caractéristiques du sol ultramafique. Nos systèmes de culture se basant sur l'introduction de la légumineuse ont, en effet, amélioré les caractéristiques physico-chimiques en liaison avec la fertilité du sol étudié. La structure du sol a été améliorée du fait d'une meilleure stabilité des agrégats qui apparaissent, en outre, de plus grande taille. De plus, ces nouveaux systèmes de culture aboutissaient à un sol avec de meilleures teneurs en carbone et azote et des concentrations plus élevées de matière organique. L'ensemble de ces éléments conduisaient ainsi à une amélioration globale de la structure du sol et du biofonctionnement de ce dernier.

Dans le cadre de ce doctorat, un volet important de nos approches a porté sur la microflore des sols étudiés. En effet, la microflore du sol remplit des fonctions et des services essentiels : décomposition de la matière organique, recyclage du carbone et de nutriments minéraux (azote, phosphore, potassium) dans le sol, voire décontamination de sols pollué. Nous avons ainsi pu mettre en évidence les effets de l'implantation des nouveaux systèmes de culture, à la fois sur la taille des communautés bactériennes, mais aussi sur les enzymes microbiennes impliquées dans les cycles biogéochimiques. En outre, la structure et la diversité des communautés bactériennes ont été modifiées lors des traitements avec introduction de la légumineuse, par rapport à la monoculture : nous avons observé, sur la base de l'étude des indices de diversité, une augmentation de la diversité alors que celle-ci est moins importante suite à l'application d'une fertilisation minérale.

D'un point de vue économique, l'introduction de la légumineuse dans les systèmes culturaux dédiés à l'agromine permet une amélioration des rendements de biomasse et de métal (Ni) extrait, tout en impliquant un gain financier et en temps consacré à leur conduite. En effet, ces nouveaux systèmes impliquent une réduction de l'application d'engrais ainsi que celle de produits phytosanitaires. Tous ces avantages conduisent, *in fine,* à une réhabilitation des sols ultramafiques avec une restauration de leurs qualités physique, chimique et biologique tout en permettant à ces sols particuliers d'offrir un certain nombre de services écosystémiques.

La Figure suivante (Figure 59) résume l'ensemble des effets de l'insertion d'une légumineuse dans un système de culture dédié à l'agromine, qui ont été étudiés dans le cadre de ce doctorat.

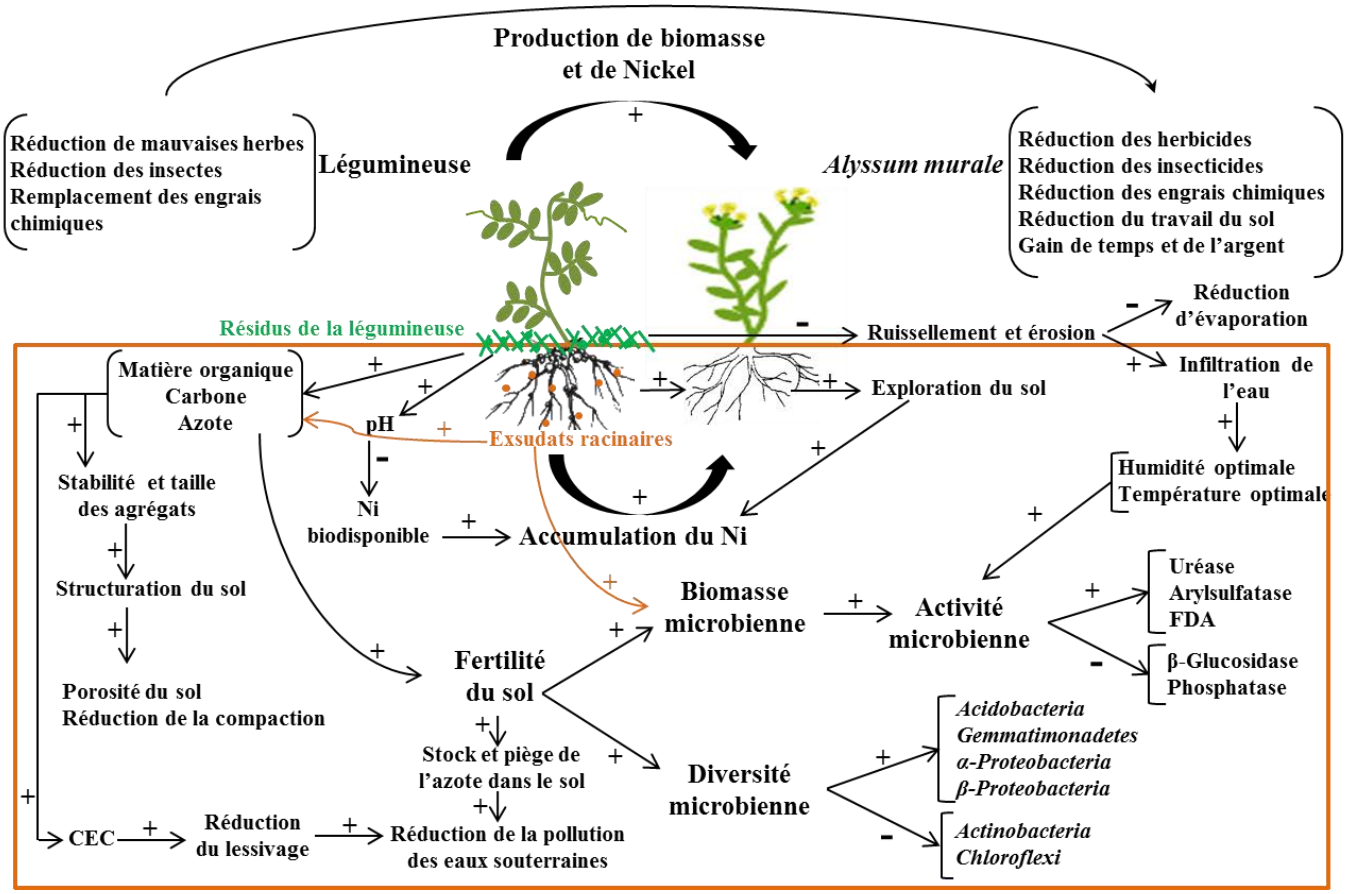


Figure 59 : Effets de l'insertion d'une légumineuse dans un système de culture dédié à l'agromine

Suite à cette thèse, de nombreuses perspectives sont envisageables, tant à courts qu'à plus longs termes, mais aussi tant d'un point de vue technique que plus fondamental.

Amélioration de la mise en place et des performances de systèmes de culture dédiés à l'agromine.

- Sélection d'individus performants

Il conviendrait, au travers de campagne de terrain et d'observations, de récupérer les graines d'individus remarquables et de mettre en place un programme de sélection d'hybrides produisant les biomasses les plus importantes, mais aussi capables de meilleures performances en termes d'hyperaccumulation du nickel.

- Mécanisation de l'implantation de la culture

En vue du développement de l'agromine sur de grandes surfaces, il conviendrait de mécaniser l'implantation de la culture. Celle-ci est, en effet, très couteuse en temps et en personnel, dans la mesure où elle se fait actuellement manuellement par repiquage de plantules âgées de deux mois et produites en plaque de germination. Plusieurs solutions seraient envisageables comme le semis après enrobage des semences de *Alyssum murale*. En effet, dans le processus d'enrobage, les semences individuelles sont encapsulées par application de matériaux solides et de liants, pour compenser les différences de taille, forme et poids. L'uniformité physique permettrait alors un ensemencement mécanique de plus grande précision. De plus, des éléments nutritifs, voire des produits de protection des plantes, pourraient être inclus dans l'enrobage, pour offrir un départ de qualité sain à la semence en phase de germination. L'autre solution pourrait consister à l'implantation de jeune plants produits en plaque de germination à l'aide de planteuses (repiqueuse à godets de plants enracinés), comme cela se fait classiquement pour des plants de tomate.

- Mise en place de systèmes de drainage efficients

Alyssum murale, espèce endémique du pourtour méditerranéen, se développe spontanément plutôt sur les sols caillouteux qui permettent un bon drainage de l'eau de pluie ou de ruissellement. Or, concernant les régions ultramafiques, comme celles du Nord-Ouest de l'Espagne caractérisées par un climat océanique et frais en hiver, la mise en place d'une culture sur buttes de *Alyssum murale* permettrait d'accélérer le réchauffement du sol, de favoriser le drainage tout en limitant les pertes en eau et le développement racinaire.

- Mécanisation de la récolte

A l'heure actuelle, que cela soit en Albanie ou en Espagne, la récolte des plants de *Alyssum murale* se réalise au stade floraison et manuellement à la faucille. Dans une perspective de développer l'agromine sur des surfaces importantes, nous pourrions envisager l'utilisation des machines utilisées pour la récolte de la lavande car elles permettent de récolter de gros volumes et d'obtenir de la biomasse végétale déjà broyée.

Approfondissement de la compréhension des processus rhizosphériques lors de la mise en place de systèmes de culture dédiés à l'agromine.

- Transferts de nutriments vers *Alyssum murale* et la communauté bactérienne de sa rhizosphère

Nous pourrions envisager de réaliser un double marquage avec l'isotope stable ^{13}C du carbone et celui ^{15}N de l'azote. L'objectif serait de mieux comprendre le fonctionnement des communautés bactériennes au sein de la rhizosphère de la plante hyperaccumulatrice par l'utilisation de cette nouvelle méthode de marquage de la biomasse microbienne par un (des) isotope(s) stable(s) (Stable Isotope Probing, SIP). Ainsi, il s'agirait d'une part, de marquer les parties aériennes de la légumineuse avec l'isotope stable ^{15}N et d'autre part, d'effectuer un marquage à l'isotope stable du carbone de *Alyssum murale.* A la récolte, nous pourrions déterminer chez *Alyssum murale*, la part d'azote venant de la minéralisation des résidus de légumineuse, mais aussi s'intéresser aux microorganismes actifs qui auraient assimiler des substrats (doublement marqués) contenus dans les rhizodépôts de l'hyperaccumulateur, dans la mesure où les bactéries capables de les assimiler vont incorporer le (les) isotope(s) dans leurs acides nucléiques. Cette étude, basée sur l'analyse de l'ADN marqué avec un(des) isotopes stables (ADN-SIP), aboutira à l'identification des microorganismes actifs de la rhizosphère de *Alyssum murale*, suite à l'amplification par PCR et au séquençage des gènes d'ARNr 16S à partir de l'ADN marqué (récupéré par ultracentrifugation et séparé sur gradient au chlorure de césium).

- Prise en compte d'indicateurs de la qualité biologique des sols supplémentaires

Nous pourrions, au-delà d'indicateurs microbiens, nous intéresser à la macro-faune présente dans les parcelles expérimentales. En effet, les macro-invertébrés du sol sont composés d'une grande diversité d'organismes visibles à l'œil nu, qui peuvent être groupés selon leur rôle principal dans l'écosystème. Ils participent activement au fonctionnement du sol et leur étude (abondance et diversité) nous permettrait de cerner l'ensemble des services écosystémiques essentiels qu'ils sont capables de rendre.

- Nous pourrions enfin évaluer l'effet du système de culture mis en place, sur la plante hyperaccumulatrice elle-même, par comparaison du transcriptome des plantes en utilisant la stratégie de RNAseq. Cette technique nous permettrait d'identifier, en particulier, les gènes dont l'expression est liée à l'hyperaccumulation du nickel.

Références bibliographiques

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, Jr. M.E. ,1992. Chapter 4 - Regulation of ethylene production by internal, environmental, and stress factors. In: Saltveit, Jr. ME. (ed). Ethylene in plant biology (Second Edition). Academic Press, New York, pp. 56-119. doi: 10.1016/B978-0-08-091628-6.50010-2

Abou Shanab, R.A., Delorme, T.A., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H., Ghozlan, H.A., 2003. Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. International Journal of Phytoremediation 5, 367-379. doi: 10.1080/15226510309359043

Abou-Shanab, R.A., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., Van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., Ghozlan, H.A., 2003. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. New Phytologist 158, 219‑224. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00721.x

Abou-Shanab, R.A., Ghanem, K., Ghanem, N., Al-Kolaibe, A., 2008. The role of bacteria on heavy-metal extraction and uptake by plants growing on multi-metal-contaminated soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24, 253‑262. doi:10.1007/s11274-007-9464-x

Abou-Shanab, R.A., van Berkum, P., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., Ghozlan, H.A., Ghanem, K., Moawad, H., 2010. Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26, 101‑108. doi:10.1007/s11274-009-0148-6

Acosta-Martínez, V., Acosta-Mercado, D., Sotomayor-Ramírez, D., Cruz-Rodríguez, L., 2008. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. Applied Soil Ecology 38, 249-260. doi:10.1016/j.apsoil.2007.10.012

Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y., Allen, V., 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. Soil Biology and Biochemistry 40, 2762–2770. doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.022

Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Soil Biology and Biochemistry 33, 943–951. doi:10.1016/S0038-0717(00)00244-3

Ahmad, E., Zaidi, A., Khan, M., Oves, M., 2012. Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. In: Zaidi, A., Wani, P.A., Khan, M.S. (eds). Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation. Springer, Vienna, pp. 29‑44. doi: 10.1007/978-3-7091-0730-0-2

Ahmad, M.S.A., Hussain, M., Ijaz, S., Alvi, A.K., 2008. Photosynthetic performance of two mung bean (*Vigna radiata*) cultivars under lead and copper stress. International Journal of Agriculture and Biology 10, 167‑172

Ajwa, H.A., Dell, C.J., Rice, C.W., 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass prairie soil as related to burning and nitrogen fertilization. Soil Biology and Biochemistry 31, 769–777. doi:10.1016/S0038-0717(98)00177-1

Akhtar, M., Yaqub, M., Iqbal, Z., Ashraf, M.Y., Akhter, J., Hussain, F., 2010. Improvement in yield and nutrient uptake by co-cropping of wheat and chickpea. Pakistan Journal of Botany 42, 4043-4049

Alamgir, M., McNeill, A., Tang, C., Marschner, P., 2012. Changes in soil P pools during legume residue decomposition. Soil Biology and Biochemistry 49, 70-77

Alexander, E.B., 1994. Serpentine Soils Mapped in California and Southwestern Oregon. Soil Horizons 35, 61. doi:10.2136/sh1994.3.0061

Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. Chemosphere 91, 869‑881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075

Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., Garbisu, C., 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. Reviews on environmental health 18, 65-73.

Allen, D.E., Singh, B.P., Dalal, R.C., 2011. Soil Health and Climate Change. Soil Health and Climate Change 29, 25‑46. doi:10.1007/978-3-642-20256-8

Allison, S.D., Weintraub, M.N., Gartner, T.B., Waldrop, M.P., 2011. Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. Soil Enzymology

22, 229–243. doi:10.1007/978-3-642-14225-3
Altieri, M., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystem. Agriculture, Ecosystem and Environment 74, 19-31. doi:10.1016/S0167-8809(99)00028-6
Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, Á., Cabello-Conejo, M.I., Kidd, P., 2016. Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. Science of Total Environment 548-549, 370-379. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.147
Amarger, N., Mariotti, A., Mariotti, F., Durr, J.C., Bourguignon, C., Lagacherie, B., 1979. Estimate of symbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in ^{15}N Natural abundance. Plant and Soil 52, 269‑280. doi: 10.1007/BF02184565
Amezketa, E., 1999. Soil aggregate stability: A review. Journal of Sustainable Agriculture 14, 83-151. doi: 10.1300/J064v14n02_08
Anderson, T.-H., Domsch, K.H., 1989. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. Soil Biology and Biochemistry 21, 471‑479. doi:10.1016/0038-0717(89)90117-X
Anderson, T.H., Domsch, K.H., 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. Soil Biology and Biochemistry 42, 2039‑2043. doi:10.1016/j.soilbio.2010.06.026
Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J., 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. Plant and Soil 202, 89-96. doi: 10.1023/A:1004301423150
Andrews, S.S., Karlen, D.L., Cambardella, C., 2004. The Soil Management Assessment Framework: A Quantitative Soil Quality Evaluation Method. Soil Science Society of America Journal 68, 1945-1962. doi:10.2136/sssaj2009.0029
Anne Schneider, C.H., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Éditions Quæ 471.
Antoun, H., Kloepper, J., 2001. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Encyclopedia of Genetics 63, 49. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073504
Aon, M.A., Colaneri, A.C., 2001. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. Applied Soil Ecology 18, 255–270. doi:10.1016/S0929-1393(01)00161-5
Arias, M.E., Gonzalez-Perez, J. a, Gonzalez-Vila, F.J., Ball, A.S., 2005. Soil health -- a new challenge for microbiologists and chemists. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology 8, 13‑21
Arnold, S.L., Doran, J.W., Schepers, J., Wienhold, B., Ginting, D., Amos, B., Gomes, S., 2005. Portable probes to measure electrical conductivity and soil quality in the field. Communications in Soil Science and Plant Analysis 36, 2271-2287. doi: 10.1080/00103620500196689
Arnon, D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. Plant Physiology 24, 1-15. doi:10.1104/pp.24.1.1
Aspiras, R.B., Allen, O.N., Harris, R.F., Chesters, G., 1971. The role of microorganisms in the stabilization of soil aggregates. Soil Biology and Biochemistry 3, 347-353. doi: 10.1016/0038-0717(71)90045-9
Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., Keller, H., 2010. The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. New Phytologist 187, 449–460. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03272.x
Baker, A.J.M., Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1, 81‑126
Balmford, A., Rodrigues, A.S.L., Walpole, M., ten Brink, P., Kettunen, M., Braat, L., de Groot, R., 2008. The Economics of Biodiversity and Ecosystems: Scoping the Science. Cambridge, UK: European Commission
Bani, A., 2009. Phytoextraction du Ni dans les sols ultramafiques d'Albanie. Nancy-Université INPL
Bani, A., Echevarria, G., Montargès-Pelletier, E., Gjoka, F., Sulçe, S., Morel, J.L., 2014. Pedogenesis and nickel biogeochemistry in a typical Albanian ultramafic toposequence. Environmental Monitoring and Assessment 186, 4431‑4442. doi: 10.1007/s10661-014-3709-6
Bani, A., Echevarria, G., Mullaj, A., Reeves, R., Louis Morel, J., Sulçe, S., 2009. Nickel Hyperaccumulation by Brassicaceae in Serpentine Soils of Albania and Northwestern Greece. Northeastern Naturalist 16, 385-404. doi:10.1656/045.016.0528

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L. 2015a. Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. International Journal of Phytoremediation 17, 117-127. doi: 10.1080/15226514.2013.862204

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of Alyssum murale on an ultramafic site (Albania). Plant and Soil 293, 79‑89. doi:10.1007/s11104-007-9245-1

Bani, A., Echevarria, G., Zhang X., Benizri E., Laubie B., Morel, J.L., Simonnot M.O., 2015b. The effect of plant density in nickel-phytomining field experiments with *Alyssum murale* in Albania. Australian Journal of Botany 63, 72‑77

Bani, A., Imeri, A., Echevarria, G., Pavlova, D., Reeves, R.D., Morel, J.L., Sulçe, S., 2013. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. Fresenius Environmental Bulletin 22, 1792-1801

Barbaroux, R., 2010. Développement d'un procédé hydrométallurgique récupération du nickel. Nancy-Université INPL

Barbaroux, R., Mercier, G., Blais, J.F.,Morel, J.L.,.Simonnot, M.O., 2011. A new method for obtaining nickel metal from the hyperaccumulator plant *Alyssum murale*. Separation and Purification Technology. 83, 57-65. doi: 10.1016/j.seppur.2011.09.009

Barns, S.M., Cain, E.C., Sommerville, L., Kuske, C.R., 2007. *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. Applied and Environmental Microbiology 73, 3113‑3116. doi:10.1128/AEM.02012-06

Barns, S.M., Takala, S.L., Kuske, C.R., 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. Applied and Environmental Microbiology 65, 1731–1737.

Bartram, A.K., Lynch, M.D.J., Stearns, J.C., Moreno-Hagelsieb, G., Neufeld, J.D., 2011. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. Applied and Environmental Microbiology 77, 3486–3852

Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. European Journal of Soil Biology 37, 85–93. doi:10.1016/S1164-5563(01)01071-8

Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. Applied Soil Ecology 19, 135-145. doi:10.1016/S0929-1393(01)00185-8

Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 35, 1183‑1192. doi:10.1016/S0038-0717(03)00179-2

Bazzigalupi, O., Deroche, M.E., Lescure, J.C., Bachelier, C., Tardif, S., 1992. Activité nitrate réductase *in vitro* de jeunes plantules de blé (*Triticum aestivum* L.) cultivées dans les conditions de détermination de la faculté germinative et après amélioration de la nutrition et de l'éclairement. Agronomie. 12, 711‑721

Becerra-Castro, C., Kidd, P., Kuffner, M., Prieto-Fernández, Á., Hann, S., Monterroso, C., Sessitsch, A., Wenzel, W., Puschenreiter, M., 2013. Bacterially induced weathering of ultramafic rock and its implications for phytoextraction. Applied and Environmental Microbiology 79, 5094-5103. doi:10.1128/AEM.00402-13

Bechet, B., Carré, F., Florentin, L., Leyval, C., Montanarella, L., Morel, J.L., Raimbault, G., Rodriguez, F., Rossignol, J.P., Schwartz, C., 2009. Caractéristiques et fonctionnement des sols urbains. In Cheverry, C., Gascuel, C. M. (Eds),"sous les pavés, la terre", Omniscience, pp. 45-77

Bédoussac, L., Justes, E., 2010a. Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. Plant and Soil 330, 37-54

Bell, L.W., Sparling, B., Tenuta, M., Entz, M.H., 2012. Soil profile carbon and nutrient stocks under long-term conventional and organic crop and alfalfa-crop rotations and re-established grassland. Agriculture, Ecosystems and Environment 158, 156–163. doi:10.1016/j.agee.2012.06.006

Bengough, A.G., Croser, C., Pritchard, J., 1997. A biophysical analysis of root growth under mechanical stress. Plant and Soil 189, 155‑164. doi:10.1023/A:1004240706284

Benizri, E., Amiaud, B., 2005. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. Soil Biology and Biochemistry 37, 2055–2064. doi:10.1016/j.soilbio.2005.03.008

Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A., 2001. Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology 11, 557‑574. doi:10.1080/09583150120076120

Benizri, E., Nguyen, C., Piutti, S., Slezack-Deschaumes, S., Philippot, L., 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. Soil Biology and Biochemistry 39, 1230‑1233. doi:10.1016/j.soilbio.2006.12.026

Berazaín, R., 2007. Nickel localization in tissues of different hyperaccumulator species of *Euphorbiaceae* from ultramafic areas of Cuba. Plant and Soil. 293, 99‑106. doi: 10.1007/s11104-007-9227-3

Berazaín, R., De La Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Díez-Garretas, B., Sánchez-Mata, D., Asensi, A., 2007. Nickel localization in tissues of different hyperaccumulator species of Euphorbiaceae from ultramafic areas of Cuba. Plant and Soil 293, 99-106. doi:10.1007/s11104-007-9227-3

Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x

Bergey, D.H., 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 2: The *Proteobacteria*, Part C - The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- and *Epsilonproteobacteria*, Springer-Verlag New York Inc

Bibi, M., Hussain, M., 2005. Effect of copper and lead on photosynthesis and plant pigments in black gram (*Vigna mungo* L.). The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 74, 1126‑1133. doi: 10.1007/s00128-005-0698-8

Biederbeck, V.O., Zentner, R.P., Campbell, C.A., 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. Soil Biology and Biochemistry 37, 1775-1784. doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.011

Bohren, C.F., Huffman, D.R., 2008. Absorption and scattering of light by small particles. John Wiley and Sons 544 pp

Bolan, N.S., Hedley, M.J., White, R.E., 1991. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume pastures. Plant and Soil 1324, 53-63

Bot, A., Benites, J., 2005 The importance of soil organic matter: key to drought-resistant soil and sustained food production. FAO Soils Bull 1–80. doi: 10.1080/03650340214162

Boyd, R.S., 2004. Ecology of metal hyperaccumulation. New Phytologist. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01079.x

Boyd, R.S., Jaffré, T., 2009. Elemental Concentrations of Eleven New Caledonian Plant Species from Serpentine Soils: Elemental Correlations and Leaf-Age Effects. Northeastern Naturalist 16, 93-110. doi:10.1656/045.016.0508

Boyd, R.S., Martens, S.N., 1998. Nickel hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. montanum (*Brassicaceae*): A constitutive trait. American Journal of Botany 85, 259‑265. doi:10.2307/2446314

Brahima, S., Jokea, D., Ann, C., Jean-Paul, N., Marjo, T., Arja, T., Sirpac, K., Frank, V., Karen, S., Jaco, V., 2010. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. Journal of Plant Physiology 167, 247‑254. doi: 10.1016/j.jplph.2009.09.015

Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., Lebeau, T., 2009. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. Chemosphere 74, 280-286. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.013

Breitenbeck, G.A., Hutchinson, R.L., Boquet, D.J., 1994. Nitrogen status of cotton following winter cover crops. Proceedings - Beltwide Cotton Conferences, San Diego, CA, USA. pp. 1505-1507. National Cotton Council, Memphis, USA

Bremer, C., Braker, G., Matthies, D., Reuter, A., Engels, C., Conrad, R., 2007. Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of nirK-type denitrifier communities in soil. Applied and Environmental Microbiology 73, 6876–6884. doi:10.1128/AEM.01536-07

Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D.S., 1985. Chloroform fumigation and the

release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. Soil Biology and Biochemistry 17, 837–842. doi:10.1016/0038-0717(85)90144-0

Brooks, R.R., 1987 . Serpentine and its vegetation: A multicliscipliniary approach. Discoides Press, Kent, UK.Burger, M., Jackson, L.E., 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. Soil Biology and Biochemistry 35, 29‑36. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00233-X

Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., Robinson, B.H., 1998. Trends in Plant Science Perspectives. Elsevier 3, 359-362.

Broos, K., Beyens, H., Smolders, E., 2005. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil Biology and Biochemistry 37, 573‑579

Brown, R.B., 1998. Soil Texture, Soil and Water Science. Fact Sheet SL-29, Department, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida

Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1994. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and Bladder Campion for Zinc- and Cadmium-contaminated soil. Journal of Environmental Quality 23, 1151-1157. doi:10.2134/jeq1994.00472425002300060004x

Burger, M., Jackson, L.E., 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. Soil Biology and Biochemistry 35, 29‑36. doi:10.1016/S0038-0717(02)00233-X

Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. Soil Biology and Biochemistry. doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.009

Cabello-Conejo, M.I., Becerra-Castro, C., Prieto-Fernàndez, A., Monterroso, C., Saavedra-Ferro, A., Mench, M., Kidd, P.S., 2014. Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. Plant and Soil 379, 35‑50. doi:10.1007/s11104-014-2043-7

Cabrera, M.L., Kissel, D.E., Bock, B.R., 1991. Urea hydrolysis in soil: Effects of urea concentration and soil pH. Soil Biology and Biochemistry 23, 1121‑1124. doi:10.1016/0038-0717(91)90023-D

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 2010; doi:10.1038/nmeth.f.303

Carreiro, M.M., Sinsabaugh, R.L., Repert, D.A., Parkhurst, D.F., 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. Ecology 81, 2359–2365. doi:Doi 10.2307/177459

Carter, M.R., 2002. Soil quality for sustainable land management: Organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions, in: Agronomy Journal. p. 38-47. doi:10.2134/agronj2002.3800

Centofanti, T., Siebecker, M.G., Chaney, R.L., Davis, A.P., Sparks, D.L., 2012. Hyperaccumulation of nickel by Alyssum corsicum is related to solubility of Ni mineral species. Plant and Soil 359, 71-83. doi: 10.1007/s11104-012-1176-9

Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Sparks, D.L., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. Journal of environmental quality 36, 1429-1443. doi:10.2134/jeq2006.0514

Chaney, R.L., Chen, K.Y., Li, Y.M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 2008. Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in Alyssum species and cabbage grown in nutrient solution. Plant and Soil 311, 131‑140. doi:10.1007/s11104-008-9664-7

Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology 8, 279‑284. doi:10.1016/S0958-1669(97)80004-3

Chardot, V., Echevarria, G., Gury, M., Massoura, S., Morel, J.L., 2007. Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). Plant and Soil 293, 7‑21. doi:10.1007/s11104-007-9261-1

Chardot, V., Massoura, S.T., Echevarria, G., Reeves, R.D., Morel, J.L., 2005. Phytoextraction potential of the nickel hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. International Journal of Phytoremediation 7, 323-335.

Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols : Évaluation et implications. Etude et Gestion Des Sols 3, 261–278.

Christensen, B.T., 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. European Journal of Soil Science 52, 345-353. doi: 10.1046/j.1365-2389.2001.00417.x

Chu, J., Zhang, T., Chang, W., Zhang, D., Zulfiqar, S., Fu, A., Hao, Y., 2016. Impacts of cropping systems on aggregates associated organic carbon and nitrogen in a semiarid highland agroecosystem. Public Library of Science one 11, 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0165018

Chung, H., Zak, D.R., Reich, P.B., Ellsworth, D.S., 2007. Plant species richness, elevated CO_2, and atmospheric nitrogen deposition alter soil microbial community composition and function. Global Change Biology 13, 980–989. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01313.x

Coleman, D.C., Crossley, D.A., Hendrix, P.F., 2004. Fundamentals of Soil Ecology, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam–Boston, 386 pp

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024

Constantin, J., Beaudoin, N., Launay, M., Duval, J., Mary, B., 2012. Long-term nitrogen dynamics in various catch crop scenarios: Test and simulations with STICS model in a temperate climate. Agriculture, Ecosystems and Environment 147, 36-46. doi: 10.1016/j.agee.2011.06.006

Coppens, F., Garnier, P., Findeling, A, Merckx, R., Recous, S., 2007. Decomposition of mulched versus incorporated crop residues: Modelling with PASTIS clarifies interactions between residue quality and location. Soil Biology and Biochemistry 39, 2339-2350. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.04.005

Corre-Hellou, G., Brisson, N., Launay, M., Fustec, J., Crozat, Y., 2007. Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea–barley intercrops given different soil nitrogen supplies. Field Crops Research 103, 76-85. doi: 10.1016/j.fcr.2007.04.008

Corre-Hellou, G., Fustec, J., Crozat, Y., 2006a. Interspecific competition for soil N and its interaction with N_2 fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. Plant and Soil 282, 195-208

Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. Plant physiology 110, 715‑719. doi:doi: 10.1104/pp.110.3.715

Czarnes, S., Dexter, A.R., Bartoli, F., 2000. Wetting and drying cycles in the maize rhizosphere under controlled conditions. Mechanics of the root-adhering soil. Plant and Soil 221,253-271. doi: 10.1023/A:1004747323220

De Antoni Migliorati, M., Bell, M., Grace, P.R., Scheer, C., Rowlings, D.W., Liu, S., 2015. Legume pastures can reduce N2O emissions intensity in subtropical cereal cropping systems. Agriculture, Ecosystems and Environment 204, 27-39. doi:10.1016/j.agee.2015.02.007

DeBruyn, J.M., Nixon, L.T., Fawaz, M.N., Johnson, A.M., Radosevich, M., 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. Applied and Environmental Microbiology 77, 6295–6300. doi:10.1128/AEM.05005-11

Degens, B.P., Harris, J. a., 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry 29, 1309-1320. doi:10.1016/S0038-0717(97)00076-X

DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R, L.M., Barazesh, J.M., Anderson, B.E., Beyersdorf, A.J., Ziemba, L.D., Bergin, M., Nenes, A., Konstantinidis, K.T., 2013. Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 2575‑80. doi:10.1073/pnas.1212089110

Delmont, T.O., Simonet, P., Vogel, T.M., 2012. Describing microbial communities and performing global comparisons in the ’omic era. The ISME Journal 6, 1625‑1628. doi:10.1038/ismej.2012.55

Deng, S., Popova, I.E., Dick, L., Dick, R., 2013. Bench scale and microplate format assay of soil enzyme activities using spectroscopic and fluorometric approaches. Applied Soil Ecology 64, 84–90. doi:10.1016/j.apsoil.2012.11.002

Dick, L.K., Jia, G., Deng, S., Dick, R.P., 2013. Evaluation of microplate and bench-scale β-glucosidase assays for reproducibility, comparability, kinetics, and homogenization methods in two soils. Biology and Fertility of Soils 49, 1227‑1236. doi:10.1007/s00374-013-0820-8

Dieng, A., Baudoin, E., Thioulouse, J., Brunet, D., Toucet, J., Sylla, S.N., Brauman, A., 2015. Soil organic matter quality, structure and activity of the denitrifiers community as influenced by decaying mulched crop residues. Applied Ecology and Environmental Research 13, 655-675. doi: 10.15666/aeer/1303_655675

Dixon, N.E., Gazzola T.C., Blakeley, R.L., Zermer, B., 1975. Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? Journal of the American Chemical Society 97, 4131‑3

Dodson, J.R., Hunt, A.J., Parker, H.L., Yang, Y., Clark, J.H., 2012. Elemental sustainability: Towards the total recovery of scarce metals, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 51, 69-78. doi: 10.1016/j.cep.2011.09.008

Doelman, P., Haanstra, L., de Ruiter, E., Slange, J., 1985. Rate of microbial degradation of high concentrations of α-hexachlorocyclohexane in soil under aerobic and anaerobic conditions. Chemosphere 14, 565-570. doi:10.1016/0045-6535(85)90249-8

Doran, J.W., Safley, M., 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. Biological indicators of soil health. doi:10.2134/jeq1998.00472425002700050038x

Dray, S., Dufour, A.B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. Journal of Statistical Software 22, 1-20

Durand, A., Piutti, S., Rue, M., Morel, J.L., Echevarria, G., Benizri, E., 2016. Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. Plant and Soil 399, 179-192. doi:10.1007/s11104-015-2691-2

Eapen, S., D’Souza, S.F., 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. Biotechnology Advances 23, 97-114. doi:10.1016/j.biotechadv.2004.10.001

Echevarria, G., Baker, A.J.M., Bani A., Benizri, E., Houzelot, V., Laubie, B., Kidd, P.S., Morel, J.L., Pons, M.N., Simonnot, M.O**.,** van der Ent, A., Zhang, X. 2015. Agromining for nickel: a complete chain that optimizes ecosystem services rendered by ultramafic landscapes. 13th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE) July 12–16, 2015

Echevarria, G., Massoura, S., Sterckeman, T., Becquerm, T., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2006. Assessment and control of the bioavailability of Ni in soils. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 643-651.

Echevarria, G., Morel, J.-L., Fardeau, J.C., Leclerc-Cessac, E., 1998. Assessment of phytoavailability of nickel in soils. Journal of Environmental Quality 27,1064-1070. doi: 10.2134/jeq1998.00472425002700050011x

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461

Egoh, B., Reyers, B., Rouget, M., Richardson, D.N., Le Maitre, D.C., van Jaarsveld, A.S., 2008. Mapping ecosystem services for planning and management, Agriculture, Ecosystems and Environment, 127, 135-140. doi: 10.1016/j.agee.2008.03.013

Ehrlich, P.R., Mooney, H.A., 1983. Extinction, Substitution, and Ecosystem Services. BioScience 33., 248-254

Eijsackers, H., 2004. Chapter 1 Leading concepts towards vital soil. Developments in Soil Science 29, 1-20. doi:10.1016/S0166-2481(04)80005-9

Eisenhauer, N., Lanoue, A., Strecker, T., Scheu, S., Steinauer, K., Thakur, M.P., Mommer, L., 2017. Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. Scientific Reports 7, 44641. doi:10.1038/srep44641

Epelde, L., Becerril, J.M., Blanco, F., Kowalchuk, G.A., Garbisu, C., 2012a. Links between pseudometallophytes and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. Pedobiologia 55, 219-225. doi:10.1016/j.pedobi.2012.03.005

Ernst, W.H.O., Krauss, G.J., Verklej, J.A.C., Wesenberg, D., 2008. Interaction with heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. plant cell and environment 31, 123‑143

Evans, J., Scott, G., Lemerle, D., Kaiser, A., Orchard, B., Murray, G.M., Armstrong, E.L., 2003. Impact of legume « break » crops on the yield and grain quality of wheat and relationship with soil mineral N and crop N content. Australian Journal of Agricultural Research 54, 777-788. doi:10.1071/AR02224

Everhart, J.L., McNear, D., Peltier, E., van der Lelie, D., Chaney, R.L., Sparks, D.L., 2006. Assessing nickel bioavailability in smelter-contaminated soils. Science of the Total Environment 367, 732-744. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.12.029

Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Jebara, M., Jebara, S.H., 2014. Bacteria associated with different legume species grown in heavy-metal contaminated soils. International Journal of Agricultural Policy and Research 2, 460‑467. doi: 10.15739/IJAPR.018

Fatoba, P.O., Udob, P.O., Emem, G., 2008. Effects of some heavy metals on chlorophyll accumulation in *Barbula lambarenensis.* Ethnobotanical Leaflets. 12, 776‑783

Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. Ecology 88, 1354–1364. doi:10.1890/05-1839

Fierer, N., Leff, J.W., Adams, B.J., Nielsen, U.N., Bates, S.T., Lauber, C.L., Owens, S., Gilbert, J.A., Wall, D.H., Caporaso, J.G., 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 21390–21395. doi:10.1073/pnas.1215210110

Fisher, B., Turner, R.K., 2008. Ecosystem services: Classification for valuation. Biological Conservation 141, 1167-1169

Fisher, B., Turner, R.K., Morling, P., 2009. Defining and classifying ecosystem services for decision making. Ecological Economics 68, 643–653

Fließbach, A., Mäder, P., 1997. Carbon source utilization by microbial communities in soils under organic and conventional farming practice. Microbial Communities - Functional versus Structural Approaches. 109–120.

Fornara, D.A., Tilman, D., 2008. Plant functional composition influences rates of soil carbon and nitrogen accumulation. Journal of Ecology 96, 314-322

Fujita, K., Ofosu-Budu, K.G., Ogata, S., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. Plant and Soil 141, 155-175

Furukawa, K., 2003. « Super bugs » for bioremediation. Trends in Biotechnology. doi:10.1016/S0167-7799(03)00054-4

Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. Agronomy for Sustainable Development A review 30, 57‑66. doi: 10.1051/agro/2009003

Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309, 1387–1390. doi:10.1126/science.1112665

Gao, Y., Miao, C.Y., Xia, J., Mao, L., Wang, Y., Zhou,P., 2012. Plant diversity reduces the effect of multiple heavy metal pollution on soil enzyme activities and microbial community structure. Frontiers of Environmental Science and Engineering 6, 213-223. doi: 10.1007/s11783-011-0345-z

Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., Shi, W., 2010. Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. Journal of Environmental Sciences 22, 1040‑1048. doi:10.1016/S1001-0742(09)60215-1

Garbisu, C., Alkorta, I., 2001. Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. Bioresource Technology 77, 229-236. doi:10.1016/S0960-8524(00)00108-5

Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. Applied and Environmental Microbiology 57, 2351‑2359. doi:0099-2240/91/082351-09$02.00/0

Geisseler, D., Horwath, W.R., 2009. Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. Pedobiologia 53, 87–98. doi:10.1016/j.pedobi.2009.06.002

Geisseler, D., Scow, K.M., 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. Soil Biology and Biochemistry 75, 54–63. doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.023

Gendre, D., Czernic, P., Conéjéro, G., Pianelli, K., Briat, J.F., Lebrun, M., Mari, S., 2007. TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator Thlaspi caerulescens, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. Plant Journal 49, 1-15. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02937.x

Ghosh, M., Singh, S.P., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. Applied Ecology and Environmental Research 3, 1-18. doi:10.1007/s10681-014-1088-2

Gillot, M.A., Dufresne, F., Guerin, C., Willocquet, B., 2002. Notes et Documents N° 87, ISEE, IEOM, Édition : Juin 2002

Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41, 109‑117. doi:10.1139/m95-015

Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiology Letters 251, 1‑7. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.030

Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169, 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria, in: New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research. p. 329‑339. doi:10.1007/978-1-4020-6776-1_8

Gobat, J.-M., Michel, A., Matthey, W., 2010. Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes. Collection gérer l'environnement 14, 846.

Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A., Wróbel, B., 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. Microbial Ecology 67, 635–647. doi:10.1007/s00248-013-0344-7

Gomez, E., Ferreras, L., Toresani, S., 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. Bioresource Technology 97, 1484–1489. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.021

Gonzalez-Prieto, S.J., Carballas, M., Carballas, T., 1991. Mineralization of a nitrogen-bearing organic sustrate model ^{14}C, ^{15}N-glycine in two acid soils. Soil Biology and Biochemistry 23, 53-63

Görres, J.H., Dichiaro, M.J., Lyons, J.B., Amador, J.A., 1998. Spatial and temporal patterns of soil biological activity in a forest and an old field. Soil Biology and Biochemistry 30, 219-230

Goux, X., Calusinska, M., Fossépré, M., Benizri, E., Delfosse, P., 2016. Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor - Appearance of mesophilic anaerobic conditions and establishment of the methanogenic microbial community. Bioresource Technology 212, 217-226. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.040

Gove, B., Hutchinson, J.J., Young, S.D., Craigon, J., McGrath, S.P., 2002. Uptake of metals by plants sharing a rhizosphere with the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. International Journal of Phytoremediation 4, 267‑281. doi:10.1080/15226510208500087

Grayston, S.J., Campbell, C.D., 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). Tree Physiology 16, 1031–1038. doi:10.1093/treephys/16.11-12.1031

Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 1997. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Applied Soil Ecology 5, 29–56. doi:10.1016/s0929-1393(96)00126-6

Gregorich, E.G., Drury, C.F., Baldock, J.A., 2001. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. Canadian Journal of Soil Science 81, 21–31. doi:10.4141/S00-041

Griffiths, B., Ritz, K., Ebblewhite, N., Dobson, G., 1999. Soil microbial community structure - Effects of substrate loading rates. Soil Biology and Biochemistry 31, 145–153. doi:10.1016/S0038-0717(98)00117-5

Gusmão, L.A.I., Figueira, E., De Almeida, M.P., Pereira, S.I.A., 2005. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. Canadian. Journal of Microbiology 51, 7‑14

Haas, D., Keel, C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing Peudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual review of phytopathology 41, 117-53. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656

Håkansson, I., Lipiec, J., 2000. A review of the usefulness of relative bulk density values in studies of soil structure and compaction. Soil and Tillage Research. doi:10.1016/S0167-1987(99)00095-1

Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Turkington, T.K., Blackshaw, R.E., Lupwayi, Z.N., Smith, G.E., Klein-Gebbinck, H., Dosdall, L.M., Hall, L.M., Willenborg, C.J., Kutcher, H.R., Malhi, S.S., Vera, C.L., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Grant, C.A., Mclaren, D.L., 2012. High-yield no-till canola production on the Canadian prairies. Canadian Journal of Plant Science 92, 221‑233. doi:10.4141/cjps2011-125

Harris, J., 2009. Soil microbial communities and restoration ecology: facilitators or followers? Science (New York, N.Y.) 325, 573–574. doi:10.1126/science.1172975

Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research, in: Plant and Soil. p. 7‑14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z

Haslmayr, H.P., Meißner, S., Langella, F., Baumgarten, A., Geletneky, J., 2014. Establishing best practice for microbially aided phytoremediation. Environmental Science and Pollution Research 21, 6765-6774. doi:10.1007/s11356-013-2195-7

Hattori, T., 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. Reports of the Institute for Agricultural Research, Tohoku University 37, 23-36.

Haynes, R.J., 1999. Labile organic matter fractions and aggregate stability under short-term, grass-based leys. Soil Biology and Biochemistry 31, 1821-1830. doi: 10.1016/S0038-0717(99)00102-9

Heckman, J.R., Angle, J.S., Chaney, R.L., 1987. Residual effects of sewage sludge on soybean II. Accumulation of soil and symbiotically fixed nitrogen. Journal of Environmental Quality 16, 117‑124

Henriksen, T.M., Breland, T.A., 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. Soil Biology and Biochemistry 31, 1121–1134. doi:10.1016/S0038-0717(99)00030-9

Henry, J.R., 2000. An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercury. Usepa 1-31.

Henry, S., Texier, S., Hallet, S., Bru, D., Dambreville, C., Chèneby, D., Bizouard, F., Germon, J.C., Philippot, L., 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates. Environmental Microbiology 10, 3082–3092. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01599.x

Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., Tang, X., Zhang, F., 2011. P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. Plant Physiology 156, 1078-1086. doi: 10.1104/pp.111.175331

Hinsinger, P., Gobran, G.R., Gregory, P.J., Wenzel, W.W., 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root mediated physical and chemical processes. New Phytologist 168, 293-303. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x

Hirsch, A.M., Fang, Y.W., 1994. Plant hormones and nodulation - whats the connection. Plant. Molecular Biology 26, 5‑9. doi: 10.1007/bf00039514

Högberg, P., 1997. Tansley Review No. 95 ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. New Phytologist 137, 179‑203. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x

Honma, M., Shimomura, T., 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agricultural and Biological Chemistry 42, 1825-1831. doi:10.1271/bbb1961.42.1825

Hooper, D.U., Bignell, D.E., Brown, V.K., Brussard, L., Mark Dangerfield, J., Wall, D.H., Wardle, D. a., Coleman, D.C., Giller, K.E., Lavelle, P., Van Der Putten, W.H., De Ruiter, P.C., Rusek, J., Silver, W.L., Tiedje, J.M., Wolters, V., 2000. Interactions between Aboveground and Belowground Biodiversity in Terrestrial Ecosystems: Patterns, Mechanisms, and Feedbacks. BioScience 50, 1049. doi:10.1641/0006-3568(2000)050[1049:IBAABB]2.0.CO;2

Houot, S., Chaussod, R., 1995. Impact of Agricultural Practices on the Size and Activity of the Microbial Biomass in a Long-Term Field Experiment. Biology and Fertility of Soils 19, 309-316

Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., Khalid, A., 2009. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. Advances in Agronomy 102, 159–200. doi:10.1016/S0065-2113(09)01005-0

Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Sessitsch, A., 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator Thlaspi goesingense. Applied and Environmental Microbiology 70, 2667-2677. doi:10.1128/AEM.70.5.2667-2677.2004

Innes, L., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D., 2004. The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility. Biology and Fertility of Soils 40, 7–13. doi:10.1007/s00374-004-0748-0

Isaac, M.E., Hinsinger, P., Harmand, J.M., 2012. Nitrogen and phosphorus economy of a legume tree-cereal intercropping system under controlled conditions. Science of the Total Environment 434, 71‑78. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.12.071

Ives, A.R., Carpenter, S.R., 2007. Stability and diversity of ecosystems. Science (New York, N.Y.) 317, 58–62. doi:10.1126/science.1133258

Jabeen, R., Ahmad, A., Iqbal, M., 2009. Phytoremediation of heavy metals: Physiological and molecular mechanisms. Botanical Review 75, 339-364. doi:10.1007/s12229-009-9036-x

Jaffré, T., Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., 1976. Sebertia acuminata: A Hyperaccumulator of Nickel from New Caledonia. Science 193, 579-580. doi:10.1126/science.193.4253.579

Jamont, M., Piva, G., Fustec, J., 2013. Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? Plant and Soil 371, 641-653

Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology. doi:10.1128/JCM.01228-07

Janssen, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology. doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006

Jaworski, E.G., 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochemical and Biophysical Research Communications 43, 1274-1279. doi:10.1016/S0006-291X(71)80010-4

Jenkins, S.N., Waite, I.S., Blackburn, A., Husband, R., Rushton, S.P., Manning, D.C., O'Donnell, A.G., 2009. Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 95, 319–334. doi:10.1007/s10482-009-9317-8

Jenkinson, D.S., Ladd, J.N., 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. Soil biochemistry 5, 415-471.

Jiang, C. ai, Wu, Q.T., Sterckeman, T., Schwartz, C., Sirguey, C., Ouvrard, S., Perriguey, J., Morel, J.L., 2010. Co-planting can phytoextract similar amounts of cadmium and zinc to mono-cropping from contaminated soils. Ecological Engineering 36, 391–395. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.005

Jiang, C.A., Wu, Q.T., Goudon, R., Echevarria, G., Morel, J.L., 2015. Biomass and metal yield of co-cropped *Alyssum murale* and *Lupinus albus.* Australian Journal of Botany 63, 159-166. doi: 10.1071/BT14261

Jones, D.L., Prabowo, A.M., Kochian, L. V, 1996. Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations: The effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress. Plant and Soil 182, 239-247. doi:10.1007/BF00029055

Justes, E., Bedoussac, L., Corre-Hellou, G., Fustec J., Hinsinger, P., Jeuffroy, M., H.,Journet, E.P., Louarn, G., Naudin, C., Pelzer, E., 2014. Les processus de complémentarité de niche et de facilitation déterminent le fonctionnement des associations végétales et leur efficacité pour l'acquisition des ressources abiotiques. Innovations Agronomiques 40, 1-24.

Kabata-Pendias, A., 2000. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, USA. 432 pp.

Kabata-Pendias, A., 2011. Trace elements in soils and plants, CRC Press. doi:10.1201/b10158-25

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants, New York. doi:10.1201/b10158-25

Kalyuzhnaya, M.G., Hristova, K.R., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L., 2008. Characterization of a

novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: Implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. Journal of Bacteriology 190, 3817‑3823. doi:10.1128/JB.00180-08

Kampfer, P., 2010. Actinobacteria, in: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. p. 1819‑1838. doi:10.1007/978-3-540-77587-4

Kandeler, E., Tscherko, D., Bruce, K.D., Stemmer, M., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D., Amelung, W., 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biology and Fertility of Soils 32, 390-400. doi:10.1007/s003740000268

Karpenstein-Machan, M., Stuelpnagel, R., 2000. Biomass yield and nitrogen fixation of legumes monocropped and intercropped with rye and rotation effects on a subsequent maize crop. Plant and Soil 218, 215-232. doi: 10.1023/A:1014932004926

Kennedy, A.C., 1998. Biological Indicators of Soil Health. Journal of Environment Quality 27, 1275. doi:10.2134/jeq1998.00472425002700050038x

Kennedy, N., Brodie, E., Connolly, J., Clipson, N., 2004. Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. Environmental Microbiology 6, 1070–1080. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00638.x

Kerley, S.J., Jarvis, S.C., 1999. The use of nitrogen-15 natural abundance in white clover (*Trifolium repens* L.) to determine nitrogen fixation under different management practices. Biology and Fertility of Soils 29, 437‑440. doi: 10.1007/s003740050578

Kevrešan, S., Petrović, N., Popović, M., Kandrač, J., 1998. Effect of heavy metals on nitrate and protein metabolism in sugar beet. Biologia Plantarum 41, 235‑240 doi: 10.1023/A:1001818714922

Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18, 355-364. doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.006

Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C., 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. Environmental and Experimental Botany 67, 243-259. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.06.013

Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Herzig, R., Janssen, J.O., Kolbas, A., Müller, I., Neu, S., Renella, G., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M., 2015. Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. International Journal of Phytoremediation 17, 1005-1037. doi:10.1080/15226514.2014.1003788

Kidd, P.S., Álvarez-López, V., Becerra-Castro, C., Cabello-Conejo, M., Prieto-Fernández, Á., 2017. Chapter Three – Potential role of plant-associated bacteria in plant metal uptake and implications in phytotechnologies. Advances in Botanical Research 83, 87-126. doi: 10.1016/bs.abr.2016.12.004

Kidd, P.S., Monterroso, C., 2005. Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp. lusitanicum on mine-spoil soils from Spain. Science of the Total Environment 336, 1-11. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.06.003

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 41. doi:10.1093/nar/gks808

Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology 7, 39‑44. doi:10.1016/0167-7799(89)90057-7

Knauff, U., Schulz, M., Scherer, H.W., 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. European Journal of Agronomy 19, 215–223. doi:10.1016/S1161-0301(02)00035-7

Körschens, M., 2002. Importance of soil organic matter (SOM) for biomass production and environment (a review). Archives of Agronomy and Soil Science 48, 89-94. doi: 10.1080/03650340214162

Krämer, U., 2010. Metal hyperaccumulation in plants. Annual review of plant biology 61, 517‑34. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112156

Krupa, Z., Siedlecka, A., Maksymiec, W., Baszyilski, T., 1993. *In vivo* response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. The Journal of Plant Physiology142, 664‑668. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80899-0

Kukier, U, Chaney, R. 2004. In Situ Remediation of Nickel Phytotoxicity for Different Plant Species. Journal of Plant Nutrition 27, 465‑495. doi: 10.1081/PLN-120028874

Kukier, U., Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S., Roseberg, R.J., 2004. The effect of pH on metal accumulation in two *Alyssum* species. Journal of Environmental Quality 33, 90‑102

Kuo, S., Sainju, U.M., Jellum, E.J., 1997. Winter cover crop effects on soil organic carbon and carbohydrate in soil. Soil Science Society of America Journal 61, 145-152. doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100010022x

Kuperman, R.G., Carreiro, M.M., 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. Soil Biology and Biochemistry 29, 179‑190. doi:10.1016/S0038-0717(96)00297-0

Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. Soil Biology and Biochemistry 42, 1363-1371. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.04.003

L'Huillier, L., Edighoffer, S., 1996. Extractability of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni-rich ultramafic soils of New Caledonia. Plant and Soil 186, 255‑264. doi: 10.1007/BF02415521

Ladd, J.N., Van Gestel, M., Jocteur Monrozier, L., Amato, M., 1996. Distribution of organic 14C and 15N in particle-size fractions of soils incubated with 14C, 15N-labelled glucose/NH4, and legume and wheat straw residues. Soil Biology and Biochemistry 28, 893-905. doi:10.1016/0038-0717(96)00069-7

Lagomarsino, A., Grego, S., Marhan, S., Moscatelli, M.C., Kandeler, E., 2009. Soil management modifies micro-scale abundance and function of soil microorganisms in a Mediterranean ecosystem. European Journal of Soil Science 60, 2-12. doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01113.x

Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C.A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R.I., Mellado-Vázquez, P.G., Malik, A.A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B.C., Trumbore, S.E., Gleixner, G., 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. Nature Communications 6, 6707. doi:10.1038/ncomms7707

Larson, W.E., Pierce, F.J., 1991. Conservation and enhancement of soil quality. Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World：Proceedings of the International Workshop on Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World, Chiang Rai, Thailand, 15-21 September 1991.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology 75, 5111–5120. doi:10.1128/AEM.00335-09

Lavelle, P., Lattaud, C., Trigo, D., Barois, I., 1995. Mutualism and biodiversity in soils. Plant and Soil 170, 23-33

Lavorel, S., Grigulis, K., Lamarque, P., Colace, M.P., Garden, D., Girel, J., Douzet, R., Pellet, G., 2011. Using plant functional traits to understand the landscape-scale distribution of multiple ecosystem services. Journal of Ecology 99, 135-147

Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. Environmental Pollution 153, 497-522. doi:10.1016/j.envpol.2007.09.015

Leckie, S.E., Prescott, C.E., Grayston, S.J., Neufeld, J.D., Mohn, W.W., 2004. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. Soil Biology and Biochemistry 36, 529-532. doi:10.1016/j.soilbio.2003.10.014

Lee, K.H., Larue, T.A., 1992. Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv sparkle. Plant Physiology 100, 1759‑1763

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature 442, 806–809. doi:10.1038/nature04983

Lemanceau, P., Maron, P.A., Mazurier, S., Mougel, C., Pivato, B., Plassart, P., Ranjard, L., Revellin, C., Tardy, V., Wipf, D., 2015. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge

in agroecology. Agronomy for Sustainable Development 35, 67-81. doi:10.1007/s13593-014-0247-0

Li, L., Li, S.M., Sun, J.H., Zhou, L.L., Bao, X.G., 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 11192-11196

Li, L., Sun, J., Zhang, F., Guo, T., Bao, X., Smith, F.A., Smith, S.E., 2006. Root distribution and interactions between intercropped species. Oecologia 147, 280-290

Li, L., Sun, J., Zhang, F., Li, X., Rengel, Z., Yang, S., 2001. Wheat/maize or wheat/soybean strip intercropping II. Recovery or compensation of maize and soybean after wheat harvesting. Field Crops Research 71, 173‑181. doi:10.1016/S0378-4290(01)00157-5

Li, N.Y., Li, Z.A., Zhuang, P., Zhou, B., McBride, M., 2009b. Cadmium uptake from soil by maize with intercrops. Water, Air, and Soil Pollution 199, 45-56

Li, R., Khafipour, E., Krause, D.O., Entz, M.H., de Kievit, T.R., Fernando, W.G.D., 2012. Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities. PloS One 7, e51897. doi:10.1371/journal.pone.0051897

Li, Y.M., Chaney, R., Brewer, E., Roseberg, R., Angle, J.S., Baker, A., Reeves, R., Nelkin, J., 2003. Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: Economic and technical considerations. Plant and Soil 249, 107-115. doi:10.1023/A:1022527330401

Li, Y.M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Nelkin, J., 2003. Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. Environmental Science and Technology 37, 1463‑1468. doi:10.1021/es0208963

Lienhard, P., Terrat, S., Prévost-Bouré, N.C., Nowak, V., Régnier, T., Sayphoummie, S., Panyasiri, K., Tivet, F., Mathieu, O., Levêque, J., Maron, P.A., Ranjard, L., 2014. Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. Agronomy for Sustainable Development 34, 525–533. doi:10.1007/s13593-013-0162-9

Ligero, F., Caba, J.M., Lluch, C., Olivares, J., 1991. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. Plant Physiology 97, 1221‑1225

Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42, 421‑428. doi: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x

Lipton, D.S., Blanchar, R.W., Blevins, D.G., 1987. Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings. Plant Physiology 85, 315-7. doi:10.1104/pp.85.2.315

Liu, L., Greaver, T.L., 2010. A global perspective on belowground carbon dynamics under nitrogen enrichment. Ecology Letters 13, 819–828. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01482.x

Liu, L., Zhang, Q., Hu, L., Tang, J., Xu, L., Yang, X., Yong, J.W.H., Chen, X., 2012. Legumes can increase cadmium contamination in neighboring crops. Public Library of Science One 7. doi:10.1371/journal.pone.0042944

Liu, W., Zhang, C., Hu, P., Luo, Y., Wu, L., Sale, P., Tang, C., 2016. Influence of nitrogen form on the phytoextraction of cadmium by a newly discovered hyperaccumulator *Carpobrotus rossii*. Environmental Science and Pollution Research 23, 1246-1253. doi: 10.1007/s11356-015-5231-y

Liu, Y. guo, Ye, F., Zeng, G. ming, Fan, T., Meng, L., Yuan, H. shan, 2007. Effects of added Cd on Cd uptake by oilseed rape and pai-tsai co-cropping. Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition) 17, 846‑852. doi:10.1016/S1003-6326(07)60186-1

Lizarazo, C.I., Yli-Halla, M., Stoddard, F.L., 2015. Pre-crop effects on the nutrient composition and utilization efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) and narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 311‑327. doi: 10.1007/s10705-015-9743-0

Lopez, M.A., Magnitskiy, S., 2011. Nickel: The last of the essential micronutrients. Agronomía Colombiana. 29, 49‑56

Lopez, S., Piutti, S., Vallance, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Benizri, E., 2017. Nickel drives bacterial community diversity in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale*. Soil Biology and Biochemistry 114, 121-130. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.07.010

Lorenz, N., Hintemann, T., Kramarewa, T., Katayama, A., Yasuta, T., Marschner, P., Kandeler, E., 2006. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. Soil Biology and Biochemistry 38, 1430‑1437. doi:10.1016/j.soilbio.2005.10.020

Lucisine, P., Echevarria, G., Sterckeman, T., Vallance, J., Rey, P., Benizri, E., 2014. Effect of hyperaccumulating plant cover composition and rhizosphere-associated bacteria on the efficiency of nickel extraction from soil. Applied Soil Ecology 81, 30–36. doi:10.1016/j.apsoil.2014.04.011

Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 86, 1-25. doi:10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e

Ludwig, B., Geisseler, D., Michel, K., Joergensen, R.G., Schulz, E., Merbach, I., Raupp, J., Rauber, R., Hu, K., Niu, L., Liu, X., 2011. Effects of fertilization and soil management on crop yields and carbon stabilization in soils. A review. Agronomy for Sustainable Development 31, 361–372. doi:10.1051/agro/2010030

Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual review of microbiology 63, 541‑556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918

Lupwayi, N.Z., Harker, K.N., O'Donovan, J.T., Turkington, T.K., Blackshaw, R.E., Hall, L.M., Willenborg, C.J., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Grant, C.A., 2015. Relating soil microbial properties to yields of no-till canola on the Canadian prairies. European Journal of Agronomy 62, 110–119. doi:10.1016/j.eja.2014.10.004

Lupwayi, N.Z., Kennedy, A.C., 2007. Grain legumes in Northern Great Plains: Impacts on selected biological soil processes. Agron. J. 99, 1700-1709. doi:10.2134/agronj2006.0313s

Lupwayi, N.Z., Rice, W.A., Clayton, G.W., 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. Soil Biology and Biochemistry 30, 1733-1741. doi:10.1016/S0038-0717(98)00025-X

Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H., 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. Chemosphere 75, 719-725. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.056

Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y.M., Freitas, H., 2011. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-Effects on plant growth and Ni uptake. Journal of Hazardous Materials 195, 230-237. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.034

MacArthur, R.H., Wilson, E.O., 1967. The theory of island biogeography by Robert H. MacArthur and Edward O. Wilson, Monographs in population biology: 1.

Mace, G.M., Bateman, I., 2011. Conceptual framework and methodology. In The UK National Ecosystem Assessment technical report, ch. 2. Cambridge, UK: UNEP-WCMC

Manaa, A., Gharbi, E., Mimouni, H., Wasti, S., Aschi-Smiti, S., Lutts, S., Ben Ahmed, H., 2014. Simultaneous application of salicylic acid and calcium improves salt tolerance in two contrasting tomato (Solanum lycopersicum) cultivars. South African Journal of Botany 95, 32-39. doi:10.1016/j.sajb.2014.07.015

Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2000. Influence of organic and mineral fertilizers on soil biological and physical properties. Bioresource Technology 72, 9–17. doi:10.1016/S0960-8524(99)00094-2

Maron, P.A., Mougel, C., Ranjard, L., 2011. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. Comptes Rendus – Biologies 334, 403-11. doi:10.1016/j.crvi.2010.12.003

Marstorp, H., Guan, X., Gong, P., 2000. Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. Soil Biology and Biochemistry 32, 879-882. doi:10.1016/S0038-0717(99)00210-2

Massoura, S.T., Echevarria, G., Becquer, T., Ghanbaja, J., LeclercCessac, E. and Morel, J.-L., 2006. Control of nickel availability by nickel bearing minerals in natural and anthropogenic soils. Geoderma, 136, 28‑37

McHardy, A.C., Rigoutsos, I., 2007. What's in the mix: phylogenetic classification of metagenome sequence samples. Current Opinion in Microbiology. doi:10.1016/j.mib.2007.08.004

McNear, D.H., Chaney, R.L., Sparks, D.L., 2010. The hyperaccumulator *Alyssum murale* uses complexation with nitrogen and oxygen donor ligands for Ni transport and storage. Phytochemistry 71, 188-200. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.10.023

McVay, K.A., Radcliffe, D.E., Hargrove, W.L., 1989. Winter legume effects on soil properties and nitrogen fertiliser requirement. Soil Science Society of America Journal 53, 1856-1862

Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. doi:10.1111/1574-6976.12028

Menezes de Sequeira, E., Pinto da Silva, A.R., 1992. Ecology of serpentinized area of North-East Portugal. In: Roberts, B.A., Proctor, J., (eds.), The ecology of areas with serpentinized rocks: a world view: 169‑197. Kluwer, Dordrecht

Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M., 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. Environmental Microbiology 3, 691‑698. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00243.x

Michael, G., Schumacher, H., Marschner, H., 1965. Aufnahme von Ammonium- und Nitratstickstoff aus markiertem ammoniumnitrat und deren verteilung in der pflanze. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 110, 225-238. doi: 10.1002/jpln.19651100308

Mie, G., 1908. Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. Annals of Physics, Leipzig, 25, 377-445

Miller, P.R., Gan, Y., McConkey, B.G., McDonald, C.L., 2003. Pulse crops for the Northern Great Plains: I. Grain productivity and residual effects on soil water and nitrogen. Agron. J. 95, 972-979. doi:10.2134/agronj2003.9720

Minasny, B., McBratney, A.B., 2001. The Australian soil texture boomerang: a comparison of the Australian and USDA/FAO soil particlesize classification systems. Australian Journal of Soil Research 39, 1443-1451

Moebius, B.N., Van Es, H.M., Schindelbeck, R.R., Idowu, O.J., Clune, D.J., Thies, J.E., 2007. Evaluation of laboratory-measured soil properties as indicators of soil physical quality. Soil Science 172, 895‑912. doi:10.1097/ss.0b013e318154b520

Moënne-Loccoz, Y., Défago, G., 2004. Life as a Biocontrol Pseudomonad, in: Pseudomonas. Springer US, Boston, MA, p. 457-476. doi:10.1007/978-1-4419-9086-0_15

Mohan, S.B., Cole, J.A., 2007. The dissimilatory reduction of nitrate to ammonia by anaerobic bacteria, in: Biology of the Nitrogen Cycle. p. 93‑106. doi:10.1016/B978-044452857-5.50008-4

Mokgehle, S.N., Dakora, F.D., Mathews, C., 2014. Variation in N_2 fixation and N contribution by 25 groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties grown in different agro-ecologies, measured using ^{15}N natural abundance. Agriculture, Ecosystems and Environment 195, 161‑172. doi:10.1016/j.agee.2014.05.014

Morel, J.L., 2013. Using plants to “micro-mine” metals. In: http://www.inra.fr/en/Scientists-Students/Biomass/All-the-news/Using-plants-to-micro-mine-metals

Morel, J.L., Chenu, C., Lorenz, K., 2014. Ecosystem services provided by soils of urban, industrial, traffic, mining, and military areas (SUITMAs). Journal of Soils and Sediments 15, 1659‑1666. doi:10.1007/s11368-014-0926-0

Morel, J.L., Habib, L., Plantureux, S., Guckert, A., 1991. Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. Plant and Soil 136, 111-119. doi: 10.1007/BF02465226

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C., 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of *Proteobacteria*. Nature 411, 948–950. doi:10.1038/35082070

Müller, A., 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. FEMS Microbiology Ecology 36, 11‑19. doi:10.1016/S0168-6496(01)00112-X

Mummey, D., Holben, W., Six, J., Stahl, P., 2006. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. Microbial Ecology 51, 404‑411. doi:10.1007/s00248-006-9020-5

Munns, D.N., 1977. Mineral nutrition and the legume symbioses. A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV, Wiley, New York. 353‑391

Muradian, R., Rival, L., 2013. Governing the Provision of Ecosystem Services. Studies in Ecological Economics – Springer 4.

Nascimento, C.W.A. Do, Xing, B., 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. Scientia Agricola 63, 299‑311. doi:10.1590/S0103-90162006000300014

Nicks, L. and Chambers, M.F., 1995. Farming for metals. Mining Environmental Management. 3, 15-

18
Nkrumah, P.N., Baker, A.J.M., Chaney, R.L., Erskine, P.D., Echevarria, G., Morel, J.L., van der Ent, A., 2016. Current status and challenges in developing nickel phytomining: an agronomic perspective. Plant and Soil. doi:10.1007/s11104-016-2859-4

Nolot, J.M., Debaeke, P., 2003. Principes et outils de conception, conduite et évaluation de systèmes de culture. Cahiers Agricultures 12, 387‑400.

Nunan, N., Daniell, T.J., Singh, B.K., Papert, A., McNicol, J.W., Prosser, J.I., 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. Applied and Environmental Microbiology 71, 6784–6792. doi:10.1128/AEM.71.11.6784-6792.2005

Nyagumbo, I., Mkuhlani, S., Pisa, C., Kamalongo, D., Dias, D., Mekuria, M., 2016. Maize yield effects of conservation agriculture based maize–legume cropping systems in contrasting agro-ecologies of Malawi and Mozambique. Nutrient Cycling in Agroecosystems 105, 275‑290. doi:10.1007/s10705-015-9733-2

O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., Harker, K.N., Clayton, G.W., Moyer, J.R., Dosdall, L.M., Maurice, D.C., Turkington, T.K., 2007. Integrated approaches to managing weeds in spring-sown crops in western Canada. Crop Protection 26, 390‑398. doi:10.1016/j.cropro.2005.09.018

O'donovan, J.T., Grant, C.A., Blackshaw, R.E., Harker, K.N., Johnson, E.N., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Turkington, T.K., Lupwayi, N.Z., Stevenson, F.C., McLaren, D.L., Khakbazan, M., Smith, E.G., 2014. Rotational effects of legumes and non-legumes on hybrid canola and malting barley. Agronomy Journal 106, 1921‑1932. doi:10.2134/agronj14.0236

Ofosu-Budu, K.G., Noumura, K., Fujita, K., 1995. Nitrogen fixation, N transfer and biomass production of soybean cv. bragg or its super-nodulating NTS-1007 and sorghum mixing-cropping at two rates of N fertilizer. Soil Biology and Biochemistry 27, 311-317

Oline, D.K., 2006. Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. Applied and Environmental Microbiology 72, 6965‑6971. doi:10.1128/AEM.00690-06

Pajuelo, E., Rodriguez-Llorente, I.D., Dary, M., Palomares, A.J., 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction. Environmental Pollution 154, 203‑211. doi: 10.1016/j.envpol.2007.10.015

Pal, A., Dutta, S., Mukherjee, P.K., Paul, A.K., 2005. Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. Journal of Basic Microbiology 45, 207‑218. doi:10.1002/jobm.200410499

Pal, A., Wauters, G., Paul, A.K., 2007. Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. Plant and Soil 293, 37‑48. doi:10.1007/s11104-007-9195-7

Pan, S.W., Wei, S.Q., Yuan, X., Cao, S.X., 2008. Mechanisms of the removal and remediation of phenanthrene and pyrene in soil by *dwarf lilyturf*. Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica 28, 3654–3661. doi:10.1016/S1671-2927(08)60185-6

Pascual, J., Wüst, P.K., Geppert, A., Foesel, B.U., Huber, K.J., Overmann, J., 2015. Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in Acidobacteria subdivision 4. Systematic and Applied Microbiology 38, 534‑544. doi:10.1016/j.syapm.2015.08.001

Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Guillaumaud, N., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., Philippot, L., Poly, F., Prosser, J.I., Le Roux, X., 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. Environmental Microbiology 8, 1005–1016. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.00992.x

Pattison, A.B., Moody, P.W., Badcock, K.A., Smith, L.J., Armour, J.A., Rasiah, V., Cobon, J.A., Gulino, L.M., Mayer, R., 2008. Development of key soil health indicators for the Australian banana industry. Applied Soil Ecology 40, 155‑164. doi:10.1016/j.apsoil.2008.04.002

Paulo, J., Ribeiro, J.R., Diggle, P.J., 2016. geoR: Analysis of Geostatistical Data. R package version 1.7-5.2. http://CRAN.R-project.org/package=geoR

Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier Jr., M.H., 1998. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. Journal

of Molecular Biology 277, 573‑592. doi:10.1006/jmbi.1998.1609
Pelzer, E., Bazot, M., Makowski, D., Corre-Hellou, G., Naudin, C., Al Rifaï, M., Baranger, E., Bedoussac, L., Biarnès, V., Boucheny, P., Carrouée, B., Dorvillez, D., Foissy, D., Gaillard, B., Guichard, L., Mansard, M-C., Omon, B., Prieur, L., Yvergniaux, M., Justes, E., Jeuffroy, M.H., 2012. Pea–wheat intercrops in low-input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. European Journal of Agronomy 40, 39-53
Peoples, M.B., Chalk, P.M., Unkovich, M.J., Boddey, R.M., 2015. Can differences in ^{15}N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? Soil Biology and Biochemistry 87, 97‑109. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.04.010
Perucci, P., 1992. Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. Biology and Fertility of Soils 14, 54–60. doi:10.1007/BF00336303
Pessoa-Filho, M., Barreto, C.C., dos Reis Junior, F.B., Fragoso, R.R., Costa, F.S., de Carvalho Mendes, I., de Andrade, L.R.M., 2015. Microbiological functioning, diversity, and structure of bacterial communities in ultramafic soils from a tropical savanna. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 107, 935‑949. doi:10.1007/s10482-015-0386-6
Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S., Roseberg, R.J., 2000. Effect of the pH of pH-buffered nutrient solutions on Ni accumulation by hyperaccumulator species p. 50. In 2000 Agronomy abstracts. ASA, Madison, WI
Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.K., 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. Nature Reviews Microbiology 11(11):789-99. doi: 10.1038/nrmicro3109
Podile, A., Kishore, G., 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria . Plant-Associated Bacteria. Part 2: Rhizosphere Bacteria 195‑230. doi:10.1094/Phyto-71-642
Poschenrieder, C., Tolra, R., Barcelo, J., 2006. Can metals defend plants against biotic stress? Trends in Plant Science 11, 288‑295. doi:10.1016/j.tplants.2006.04.007
Postgate, J., 1998. Nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 112 pp
Postma-Blaauw, M., de Goede, R.G.M., Bloem, J., Faber, J.H., Brussaard, L., 2012. Agricultural intensification and de-intensification differentially affect taxonomic diversity of predatory mites, earthworms, enchytraeids, nematodes and bacteria. Applied Soil Ecology v. 57, 39-49–2012 v.57. doi:10.1016/j.apsoil.2012.02.011
Powlson, D.S., Prookes, P.C., Christensen, B.T., 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. Soil Biology and Biochemistry 19, 159‑164. doi:10.1016/0038-0717(87)90076-9
Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.D., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electron. Journal of Biotechnology 93, 285‑321
Proctor, J., Woodell, S.R.J., 1975. The ecology of serpentine soils. Advances in Ecological Research 9, 255‑366
Rajakaruna, N., Tompkins, K.M., Pavicevic, P.G., 2006. Phytoremediation: An Affordable Green Technology For The Clean-Up Of Metal-Contaminated Sites In Sri Lanka. Ceylon Journal of. Science 35, 25‑39.
Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends in Biotechnology. doi:10.1016/j.tibtech.2009.12.002
Rajkumar, M., Freitas, H., 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of Ricinus communis in soil contaminated with heavy metals. Chemosphere 71, 834‑842. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.038
Ramette, A., 2009. Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75, 2495‑2505. doi:10.1128/AEM.02409-08
Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mougel, C., Thioulouse, J., Nazaret, S., 2001. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

Fingerprints: Biological and Methodological Variability. Applied and Environmental Microbiology 67, 4479‑4487. doi:10.1128/AEM.67.10.4479-4487.2001

Raous, S., Echevarria, G., Sterckeman, T., Hanna, K., Thomas, F., Martins, E.S., Becquer, T., 2013. Potentially toxic metals in ultramafic mining materials: identification of the main bearing and reactive phases. Geoderma, 192, 111‑119. doi:10.1016/j.geoderma.2012.08.017

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. Annual Review of Microbiology 57, 369‑394. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090759

Rastogi, G., Osman, S., Kukkadapu, R., Engelhard, M., Vaishampayan, P.A., Andersen, G.L., Sani, R.K., 2010. Microbial and mineralogical characterizations of soils collected from the deep biosphere of the former Homestake gold mine, South Dakota. Microbial Ecology 60, 539‑550. doi:10.1007/s00248-010-9657-y

Redin, M., Recous, S., Aita, C., Dietrich, G., Skolaude, A.C., Ludke, W.H., Schmatz, R., Giacomini, S.J., 2014. How the chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. Soil Biology and Biochemistry 78, 65-75

Reeves, R.D., Adigüzel, N., 2008. The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of turkey and adjacent areas : A Review with new data. Turkish Journal of Biology 32, 143‑153.

Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Bgrhidi, A., Berazain, R., 1996. Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. New Phytologist 133, 217‑224. doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb01888.x

Rengel, Z., Damon, P.M., 2008. Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. Plant Physiology 133, 624-636

Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. The Journal of cell biology 17, 208‑212. doi:10.1083/jcb.17.1.208

Richau, K.H., Kozhevnikova, A.D., Seregin, I. V., Vooijs, R., Koevoets, P.L.M., Smith, J.A.C., Ivanov, V.B., Schat, H., 2009. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. New Phytologist 183, 106‑116. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x

Robertson, P.G., 1997. Nitrogen use efficiency in row-crop agriculture: crop nitrogen use and soil nitrogen loss. Agricultural Ecology. Academic Press, San Diego pp. 347‑365

Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., De Dominicis, V., 1997. The nickel hyperaccumulator plant Alyssum bertolonii as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. Journal of Geochemical Exploration. doi:10.1016/S0375-6742(97)00010-1

Rochester, I., Peoples, M., 2005. Growing vetches (*Vicia villosa* Roth) in irrigated cotton systems: Inputs of fixed N, N fertilizer savings and cotton productivity. Plant and Soil 271, 251‑264. doi:10.1007/s11104-004-2621-1

Rochester, I.J., Peoples, M.B., Hulugalle, N.R., Gault, R.R., Constable, G.A., 2001. Using legumes to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. Field Crops Research 70, 27–41. doi:10.1016/S0378-4290(00)00151-9

Rodrigues, J., Houzelot, V., Ferrari, F., Laubie, B., Simonnot, M.-O., Pons, M.-N., Echevarria, G., Morel, J.-L., 2016. Life cycle assessment of agromining chain highlights role of erosion control and bioenergy. Journal of Cleaner Production 139, 770-778. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.08.110

Rodrigues, M., Dimande, P., Pereira, E.L., Ferreira, Q.I., Freitas, S., Correia, C.M., Moutinho-Pereira, J., Arrobas, M., 2015. Early-maturing annual legumes: an option for cover cropping in rainfed olive orchards. Nutrient Cycling in Agroecosystems 103, 153‑166. doi: 10.1007/s10705-015-9730-5

Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology advances 17, 319‑339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2

Roesch, L., Fulthorpe, R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A., Kent, A., Daroub, S., Camargo, F., Farmerie, W., Triplett, E., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. The ISME Journal 1, 283‑290. doi:10.1038/ismej.2007.53

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2010. The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. Soil Biology and Biochemistry 42, 516–520. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.026

Roy, B.K., Prasad, R., Gunjan, R., 2009. Heavy metal accumulation and changes in metabolic parameters in *Cajanus cajan* grown in mine spoil. Journal of Environmental Biology 31, 567‑573

Rue, M., Vallance, J., Echevarria, G., Rey, P., Benizri, E., 2015. Phytoextraction of nickel and rhizosphere microbial communities under mono- or multispecies hyperaccumulator plant cover in a serpentine soil. Australian Journal of Botany 63, 92‑102. doi:10.1071/BT14249

Rühlemann, L., Schmidtke, K., 2015. Evaluation of monocropped and intercropped grain legumes for cover cropping in no-tillage and reduced tillage organic agriculture. European Journal of Agronomy 65, 83–94. doi:10.1016/j.eja.2015.01.006

Ruttens, A., Colpaert, J. V., Mench, M., Boisson, J., Carleer, R., Vangronsveld, J., 2006. Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. II: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on metal leaching. Environmental Pollution 144, 533‑539. doi:10.1016/j.envpol.2006.01.021

Saad, R.F., Kobaissi, A., Amiaud, B., Ruelle, J., Benizri, E., 2017. Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulator plant cropped with a legume. Unpublished results

Saad, R., Kobaissi, A., Robin, C., Echevarria, G., Benizri, E., 2016. Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining. Environmental and Experimental Botany 131, 1-9. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.06.010

Saad, R.F., Kobaissi, A., Machinet, G., Villemin, G., Echevarria, G., Benizri. E., 2017. Improving the structure and the biofunctioning of an ultramafic soil with agro-ecological agromining. Unpublished results

Sainju, U.M., Whitehead, W.F., Singh, B.P., 2003. Cover crops and nitrogen fertilization effects on soil aggregation and carbon and nitrogen pools. Canadian Journal of Soil Science 83, 155-165. doi: 10.4141/S02-056

Sanaullah, M., Blagodatskaya, E., Chabbi, A., Rumpel, C., Kuzyakov, Y., 2011. Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. Applied Soil Ecology 48, 38–44. doi:10.1016/j.apsoil.2011.02.004

Sánchez-Peinado, M. del M., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C., Rodelas, B., 2010. Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* communities in a soil microcosm. Environmental Science and Pollution Research 17, 779‑790. doi:10.1007/s11356-009-0180-y

Sandaa, R.A., Enger, O., Torsvik, V., 1999. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal-contaminated soils. Applied and environmental microbiology 65, 3293‑7.

Scalise, A., Tortorella, D., Pristeri, A., Petrovičová, B., Gelsomino, A., Lindström, K., Monti, M., 2015. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding durum wheat in a rotation under rainfed conditions. Soil Biology and Biochemistry 89, 150‑161. doi:10.1016/j.soilbio.2015.07.003

Schneider, A., Huyghe, C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Éditions Quæ 471.

Schröder, D., Köpke, U., 2012. Faba bean (*Vicia faba* L.) intercropped with oil crops – a strategy to enhance rooting density and to optimize nitrogen use and grain production? Field Crops Research 135, 74-81

Schutter, M., Dick, R., 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. Soil Biology and Biochemistry 33, 1481–1491. doi:10.1016/S0038-0717(01)00057-8

Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 60, 182‑194. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.012

Sessitsch, A., Puschenreiter, M., 2008. Endophytes and Rhizosphere Bacteria of Plants Growing in Heavy Metal-Containing Soils Introduction : Heavy Metal Contamination of Soils. Soil Biology 13, 317‑332. doi:10.1007/978-3-540-74231-9_15

Shallari, S., Echevarria, G., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2001. Availability of nickel in soils for the hyperaccumulator *Alyssum murale* (Waldst. & Kit.). South African Journal of Science 97, 568-

570.
Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J.L., 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. Science of the Total Environment 209, 133‑142. doi:10.1016/S0048-9697(97)00312-4
Sharma, J., Subhadra, A.V., 2010. The effect of Mercury on nitrate reductase activity in bean leaf segments (*Phaseolus vulgaris*) and its chelation by phytochelatin synthesis. Life Science and Medical Research 13
Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2016. Factors Affecting Phytoextraction: A Review. Pedosphere 26, 148-166. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60032-7
Shili-Touzi, I., 2009. Analyse du fonctionnement d'une association de blé d'hiver (Triticum aestivum L.) et d'une plante de couverture sur une échelle annuelle par modélisation et expérimentation. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).
Sieverding, E., Leihner, D.E., 1984. Influence of crop rotation and intercropping of cassava with legumes on VA mycorrhizal symbiosis of cassava. Plant and Soil 80, 143-146. doi: 10.1007/BF02232949
Simonin, P., 2017. Observation des pratiques de fertilisation azotée par un outil d'aide à la décision pour le colza. Oilseeds and fats, Crops and Lipids 24, D105. doi: 10.1051/ocl/2016056
Singer, A.C., Bell, T., Heywood, C.A., Smith, J.A.C., Thompson, I.P., 2007. Phytoremediation of mixed-contaminated soil using the hyperaccumulator plant Alyssum lesbiacum: Evidence of histidine as a measure of phytoextractable nickel. Environmental Pollution 147, 74‑82. doi:10.1016/j.envpol.2006.08.029
Singer, S., Ewing, M., 2000. Soil quality, in: Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 271‑278.
differing resource quality inputs in a tropical dryland agroecosystem. Soil Biology and Biochemistry 39, 76–86. doi:10.1016/j.soilbio.2006.06.013
Sinsabaugh, R.S., 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. Biology and Fertility of Soils 17, 69–74. doi:10.1007/BF00418675
Snapp, S.S., Mafongoya, P.L., Waddington, S., 1998. Organic matter technologies for integrated nutrient management in smallholder cropping systems of southern Africa. Agriculture, Ecosystems and Environment 71, 185–200. doi:10.1016/S0167-8809(98)00140-6
Španiel, S., Kempa, M., Salmerón-Sánchez, E., Fuertes-Aguilar, J., Mota, J.F., Al-Shehbaz, I.A., German, D.A., Olšavská, K., Šingliarová, B., Zozomová-Lihová, J., Marhold, K., 2015. AlyBase: database of names, chromosome numbers, and ploidy levels of Alysseae (Brassicaceae), with a new generic concept of the tribe. Plant Systematics and Evolution 301, 2463‑2491. doi:10.1007/s00606-015-1257-3
Spehn, E.M., Joshi, J., Schmid, B., Alphei, J., Körner, C., 2000. Plant diversity effects on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. Plant and Soil 224, 217–230. doi:10.1023/A:1004891807664
St. Luce, M., Grant, C.A., Zebarth, B.J., Ziadi, N., O'Donovan, J.T., Blackshaw, R.E., Harker, K.N., Johnson, E.N., Gan, Y., Lafond, G.P., May, W.E., Khakbazan, M., Smith, E.G., 2015. Legumes can reduce economic optimum nitrogen rates and increase yields in a wheat-canola cropping sequence in western Canada. Field Crops Research 179, 12-25. doi: 10.1016/j.fcr.2015.04.003
Stevenson, F.C., van Kessel, C., 1996. The nitrogen and non-nitrogen rotation benefits of pea to succeeding crops. Canadian Journal of Plant Science 76, 735-745
Sutton, M.A., Oenema, O., Erisman, J.W., Leip, A., van Grinsven, H., Winiwarter, W., 2011. Too much of a good thing. Nature 472, 159-162
Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry 4, 479–487. doi:10.1016/0038-0717(72)90064-8
Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. Applied and environmental microbiology 75, 748‑57. doi:10.1128/AEM.02239-08
Tandy, S., Healey, J.R., Nason, M.A., Williamson, J.C., Jones, D.L., 2009. Heavy metal fractionation during the co-composting of biosolids, deinking paper fibre and green waste. Bioresource Technology 100, 4220‑4226. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.046

Tang, Y.T., Deng T.H.B., Wu Q.H., Wang S.Z., Qiu R.L., Wei Z.B., Guo X.F., Wu Q.T., Lei M., Chen T.B., 2012. Designing cropping systems for metal---contaminated sites: A review. Pedosphere 22, 470‑488

Tanimoto, E., 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. Critical Reviews in Plant Sciences 24, 249‑265. doi:10.1080/07352680500196108

Thakur, M.P., Milcu, A., Manning, P., Niklaus, P.A., Roscher, C., Power, S., Reich, P.B., Scheu, S., Tilman, D., Ai, F., Guo, H., Ji, R., Pierce, S., Ramirez, N.G., Richter, A.N., Steinauer, K., Strecker, T., Vogel, A., Eisenhauer, N., 2015. Plant diversity drives soil microbial biomass carbon in grasslands irrespective of global environmental change factors. Global Change Biology 21, 4076–4085. doi:10.1111/gcb.13011

Thijs, S., Sillen, W., Rineau, F., Weyens, N., Vangronsveld, J., 2016. Towards an enhanced understanding of plant-microbiome interactions to improve phytoremediation: Engineering the metaorganism. Frontiers in Microbiology. doi:10.3389/fmicb.2016.00341

Thomsen, M., Faber, J.H., Sorensen, P.B., 2012. Soil ecosystem health and services - Evaluation of ecological indicators susceptible to chemical stressors. Ecological Indicators 16, 67‑75. doi:10.1016/j.ecolind.2011.05.012

Tiemann, L.K., Grandy, A.S., Atkinson, E.E., Marin-Spiotta, E., McDaniel, M.D., 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. Ecology Letters 18, 761-771. doi: 10.1111/ele.12453

Tilman, D., Hill, J., Lehman, C., 2006. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. Science 314, 1598–1600. doi:10.1126/science.1133306

Tilman, D., Reich, P.B., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T., Lehman, C., 2001. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. Science (New York, N.Y.) 294, 843–845. doi:10.1126/science.1060391

Tisdall, J.M., Oades, J.M., 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. Journal of Soil Science 33, 141‑163. doi:10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x

Treseder, K.K., 2008. Nitrogen additions and microbial biomass: A meta-analysis of ecosystem studies. Ecology Letters. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01230.x

Tumi, A.F., Mihailovic, N., Gajic, B.A., Niketic, M., Tomovic, G., 2012. Comparative Study of Hyperaccumulation of Nickel by *Alyssum murale.* Populations from the Ultramafics of Serbia. Pol. J. Environ. Stud. 21, 1855‑1866.

Tuna, A.L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., Yagmur, B., 2007. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. Environmental and Experimental Botany 59, 173‑178. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.12.007

Valentine, R.C., 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. Advances in Virus Research 8, 287-318.

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Chaney, R.L., Anderson, C.W.N., Meech, J.A., Erskine, P.D., Simonnot, M.O., Vaughan, J., Morel, J.L., Echevarria, G., Fogliani, B., Rongliang, Q., Mulligan, D.R., 2015. Agromining: Farming for metals in the future? Environmental Science and Technology 49, 4773‑4780. doi:10.1021/es506031u

van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant and Soil 362, 319‑334. doi:10.1007/s11104-012-1287-3

van Loon, L.C., Bakker, P. a, Pieterse, C.M., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual review of phytopathology 36, 453‑483. doi:10.1146/annurev.phyto.36.1.453

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry 19, 703‑707. doi:10.1016/0038-0717(87)90052-6

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. Environmental Science and Pollution Research 16, 765‑794. doi:10.1007/s11356-009-0213-6

Velasquez, E., Lavelle, P., Andrade, M., 2007. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. Soil Biology and Biochemistry 39, 3066‑3080. doi:10.1016/j.soilbio.2007.06.013

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New Phytologist. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x

Verchot, L.V., Dutaur, L., Shepherd, K.D., Albrecht, A., 2011. Organic matter stabilization in soil aggregates: Understanding the biogeochemical mechanisms that determine the fate of carbon inputs in soils. Geoderma 161, 182‑193. doi:10.1016/j.geoderma.2010.12.017

Vergani, C., Graf, F., 2016. Soil permeability, aggregate stability and root growth: a pot experiment from a soil bioengineering perspective. Ecohydrology 9, 830-842. doi: 10.1002/eco.1686

Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. doi:10.1023/A:1026037216893

Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A.G., Pigna, M., 2010. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10, 268‑292. doi:10.4067/S0718-95162010000100005

Virmani, S.M., Sahrawat, K.L., Burford, J.R., 1982. Physical and Chemical Properties of Vertisols and their Management, in: Twelfth International Congress of Soil Science. p. 80‑93.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human Domination of Earth's Ecosystems, Science 25, 494-499

Voisin, A.S., Cazenave, A.B., Duc, G., Salon, C., 2013. Pea nodule gradients explain C nutrition and depressed growth phenotype of hypernodulating mutants. Agronomy for Sustainable Development 33, 829‑838. doi:10.1007/s13593-013-0146-9

Walker, T.S., 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiology 132, 44-51. doi: 10.1104/pp.102.019661

Wang, H., Feng, T., Peng, X., Yan, M., Tang, X., 2009. Up-regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* L. by exogenous salicylic acid. Ecotoxicology and Environmental Safety 72, 1354‑1362. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.03.008

Wang, H.B., Wong, M.H., Lan, C.Y., Baker, A.J.M., Qin, Y.R., Shu, W.S., Chen, G.Z., Ye, Z.H., 2007. Uptake and accumulation of arsenic by 11 Pteris taxa from southern China. Environmental Pollution 145, 225‑233. doi:10.1016/j.envpol.2006.03.015

Wang, W.J., Smith, C.J., Chen, D., 2004. Predicting soil nitrogen mineralization dynamics with a modified double exponential model. Soil Science Society of America Journal 68, 1256. doi:10.2136/sssaj2004.1256

Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Letters To Nature 345, 63‑65. doi:10.1038/346183a0

Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M., Xie, G., Haft, D.H., Sait, M., Badger, J., Barabote, R.D., Bradley, B., Brettin, T.S., Brinkac, L.M., Bruce, D., Creasy, T., Daugherty, S.C., Davidsen, T.M., DeBoy, R.T., Detter, J.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Ganapathy, A., Gwinn-Giglio, M., Han, C.S., Khouri, H., Kiss, H., Kothari, S.P., Madupu, R., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Paulsen, I., Penn, K., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Selengut, J.D., Shrivastava, S., Sullivan, S.A., Tapia, R., Thompson, S., Watkins, K.L., Yang, Q., Yu, C., Zafar, N., Zhou, L., Kuske, C.R., 2009. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. Applied and Environmental Microbiology 75, 2046–2056. doi:10.1128/AEM.02294-08

Watteau, F., Villemin, G., Bartoli, F., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2012. 0–20 μm aggregate typology based on the nature of aggregative organic materials in a cultivated silty topsoil. Soil Biology and Biochemistry 46, 103-114. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.11.021

Wei, S., Zhou, Q., 2004. Identification of weed species with hyperaccumulative characteristics of heavy metals. Progress in Natural Science 14, 495‑503. doi:10.1080/10020070412331343851

Wei, Z.B., Guo, X.F., Wu, Q.T., Long, X.X., Penn, C.J., 2011. Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by co-cropping with chelator application and assessment of associated leaching risk. International Journal of Phytoremediation 13, 717‑729. doi:10.1080/15226514.2010.525554

Weigand, S., Auerswald, K., Beck, T., 1995. Microbial biomass in agricultural topsoils after 6 years of bare fallow. Biology and Fertility of Soils 19, 129‑134. doi:10.1007/BF00336148

Weil, R.R., Magdoff, F., 2004. Significance of soil organic matter to soil quality and health, Soil organic matter in sustainable agriculture. doi:10.1201/9780203496374.ch1

Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J., Wang, J.X., Lee, E.R., Block, K.F.,

Sudarsan, N., Neph, S., Tompa, M., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R., 2007. Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. Nucleic Acids Research 35, 4809‑4819. doi:10.1093/nar/gkm487

Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., Vangronsveld, J., 2009. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. Trends in Biotechnology. doi:10.1016/j.tibtech.2009.07.006

Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52, 487-511. doi: 10.1093/jexbot/52.suppl_1.487

Whiting, S.N., Leake, J.R., McGrath, S.P., Baker, A.J.M., 2001. Hyperaccumulation of Zn by Thlaspi caerulescens can ameliorate Zn toxicity in the rhizosphere of cocropped Thlaspi arvense. Environmental Science and Technology 35, 3237‑3241. doi:10.1021/es010644m

Whittaker, R.H., 1954. The Ecology of Serpentine Soils. Ecology 35, 258‑288. doi: 10.2307/1931126

Wu, Q.-T., Hei, L., Wong, J.W.C., Schwartz, C., Morel, J.-L., 2007. Co-cropping for phyto-separation of zinc and potassium from sewage sludge. Chemosphere 68, 1954‑1960. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.047

Yadav, A.N., Verma, P., Kour, D., Rana, K.L., Kumar, V., Singh, B., 2017. Plant microbiomes and its beneficial multifunctional plant growth promoting attributes. International Journal of Environmental Sciences and Natural Resources 3, 1–8. doi:10.19080/IJESNR.2017.03.555601

Yamada, T., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H., 2005. Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to *Chloroflexi* subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. Applied and Environmental Microbiology 71, 7493‑7503. doi:10.1128/AEM.71.11.7493-7503.2005

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1996. Soil pH increase due to biological decarboxylation of organic anions. Soil Biology and Biochemistry 28, 617‑624. doi:10.1016/0038-0717(95)00180-8

Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18, 339‑353. doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.007

Yasir, M., Azhar, E.I., Khan, I., Bibi, F., Baabdullah, R., Al-Zahrani, I.A., Al-Ghamdi, A.K., 2015. Composition of soil microbiome along elevation gradients in southwestern highlands of Saudi Arabia. BMC Microbiology 15, 65. doi:10.1186/s12866-015-0398-4

Zahran, H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. In: Journal of Biotechnology. pp 143–153

Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D., Tilman, D., 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? Ecology 84, 2042–2050. doi:10.1890/02-0433

Zdruli, P., 1997. Benchmark Soils of Albania: Resource assessment for sustainable land use. PhD thesis. Published by the USDA Natural Resources Conservation Service (NRCS), Washington DC and the International Fertilizer Development Center (IFDC), Muscle Shoals, Alabama. 2 Volumes. 293 pp

Zelles, L., Bai, Q.Y., 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. doi:10.1016/0038-0717(92)90191-Y

Zengin, F.K., Munzuroglu, O., 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 47, 157‑164

Zhang, C.C., Postma, J.A., York, L.M., Lynch, J.P., 2014. Root foraging elicits niche complementarity-dependent yield advantage in the ancient ‘three sisters’ (maize/bean/squash) polyculture. Annals of Botany-London 114, 1719-1733

Zhang, H., 1994. Organic matter incorporation affects mechanical properties of soil aggregates. Soil and Tillage Research 31, 263‑275. doi:10.1016/0167-1987(94)90085-X

Zhang, W., Parker, K.M., Luo, Y., Wan, S., Wallace, L.L., Hu, S., 2005. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. Global Change Biology 11, 266‑277. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.00902.x

Zhang, X., Houzelot, V., Bani, A., Morel, J.-L., Echevarria, G., Simonnot, M.O., 2014. Selection and combustion of Ni-hyperaccumulators for the phytomining process. International Journal of

Phytoremediation 16, 1058-1072. doi: 10.1080/15226514.2013.810585
Zhang, X., Laubie, B., Houzelot, V., Plasari, E., Echevarria, G., Simonnot, M.O., 2016. Increasing purity of ammonium nickel sulfatehexahydrate and production sustainability in anickel phytomining process. Chemical Engineering Research and Design 106, 26‑32. doi: 10.1016/j.cherd.2015.12.009
Zhao, J., Zeng, Z., He, X., Chen, H., Wang, K., 2015. Effects of monoculture and mixed culture of grass and legume forage species on soil microbial community structure under different levels of nitrogen fertilization. European Journal of Soil Biology 68, 61‑68. doi:10.1016/j.ejsobi.2015.03.008
Zheng, Y.-K., Qiao, X.-G., Miao, C.-P., Liu, K., Chen, Y.-W., Xu, L.-H., Zhao, L.-X., 2016. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. Annals of Microbiology 66, 529‑542. doi:10.1007/s13213-015-1153-7
Zornoza, R., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arcenegui, V., García-Orenes, F., Mataix-Beneyto, J., Morugán, A., 2007. Evaluation of soil quality using multiple lineal regression based on physical, chemical and biochemical properties. Science of the Total Environment 378, 233‑237. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.01.052
Zul, D., Denzel, S., Kotz, A., Overmann, J., 2007. Effects of plant biomass, plant diversity, and water content on bacterial communities in soil lysimeters: Implications for the determinants of bacterial diversity. Applied and Environmental Microbiology 73, 6916–6929. doi:10.1128/AEM.01533-07

ANNEXES

Annexe 1 : Analyses du sol agricole

Analyse de terre

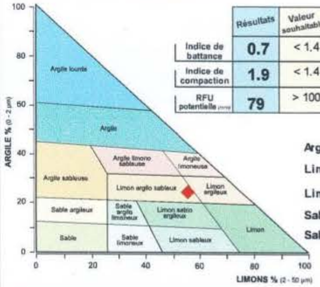
FRANCE analyse — L'analyse de terre rentable

DISTRIBUTEUR : **ENSAIA**, 2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172, 54505 VANDOEUVRE LES NANCY

ANALYSE RÉALISÉE POUR : **ENSAIA**, 2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172, 54505 VANDOEUVRE LES NANCY

Parcelle : **1644** — N° échantillon : **4611012** — Reçu le : 27/12/2012 — Expédié le 23/01/2013

ANALYSE GRANULOMÉTRIQUE



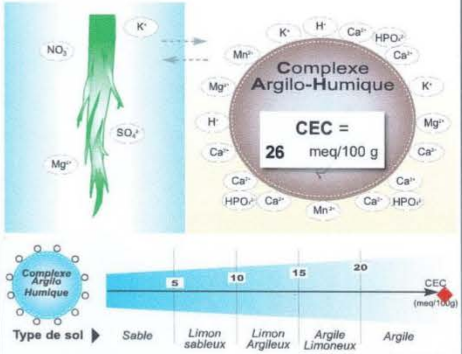
	Résultats	Valeur souhaitable	Faible	Moyen	Elevé
Indice de battance	0.7	< 1.4			
Indice de compaction	1.9	< 1.4			
RFU potentielle (mm)	79	> 100			

Argile :	36.7 %
Limons Fins :	24.7 %
Limons Grossiers :	26.8 %
Sables Fins :	5.2 %
Sables Grossiers :	2.0 %

MATIÈRE ORGANIQUE (MO)

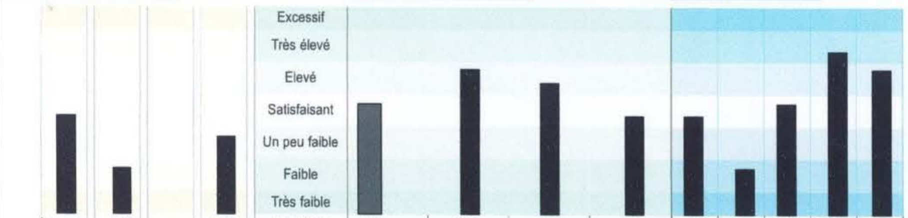
	Résultats	Valeur souhaitable	Faible	Moyen	Elevé
MO %	4.6	3			
IAB %	0.7	1.5			
C/N	9.2	8 à 10			

CAPACITÉ D'ÉCHANGE EN CATIONS (CEC)



EQUILIBRE CHIMIQUE		H^+	Ca^{++}	K^+	Mg^{++}	Na^+	Taux de saturation
Répartition des cations en % de la CEC	Actuelle	11.8	77.8	2.6	7.4	0.4	88.2
	Optimum	< 15	81.4	1.2	2.4	<=5	85

BILAN ACIDE-BASE — ELÉMENTS MAJEURS — OLIGO-ÉLÉMENTS



	Acidité active	Acidité de réserve	Oxyde de calcium	Phosphore Olsen	Potasse	Magnésie	Sodium	Zinc EDTA	Manganèse EDTA	Cuivre EDTA	Fer EDTA	Bore eau bouillante
Résultats	6.4	5.3	5661	63	314	384	29	3.4	9	4.5	107.4	0.90
Eléments nutritifs exprimés en ppm	pH eau	pH KCl	CaO ppm	P_2O_5	K_2O	MgO	Na_2O	Zn	Mn	Cu	Fe	B
T renforcement	6.4-6.9		5925	20	150	125		3	14	2	20	0.3
T impasse				70	200	165						
Assimilabilité				■ (élevée)	■ (faible)	■ (élevée)		■ (élevée)	■ (moyenne)	■ (élevée)	■ (élevée)	■ (élevée)
Facteur de blocage				/	Argile	/		/	MO	/	/	/

Assimilabilité des réserves :
- faible (risque de blocage)
- moyenne
- élevée : bonne disponibilité des réserves

	Résultat	Norme	Trop faible	Normal	Trop élevé
K_2O/MgO	0.8	1.2			
CaO/MgO	14.7	47.4			

	Résultat	Norme	Trop faible	Normal	Trop élevé
P_2O_5/Zn	19	6.7			
Cu / MO	0.98	0.8			

*Méthode d'analyses :CEC Metson (NF X 31.130). Matières organiques : carbone Anne x 1,72 (NF X31.109). pH eau : extraction eau, "acidité active" (NF X 31.103). pH KCl : extraction KCl "acidité totale" (NF X 31.104). CaCO3 total (NF x 31.105). CaCO3 actif (NF X 31.106). Cations échangeables Ca2+, K+, Na+,Mg2+, extraits à l'acétate d'ammonium (NF X 31.108). Phosphore : méthode Olsen (extraction bicarbonate de sodium), méthode Joret-Hébert (extraction oxalate d'ammonium, NF X 31.161). Oligos : Cu, Mn, Fe, et Zn extraits au chélate EDTA (NF X 31.120). Bore soluble à l'eau bouillante (NF X 31.122). IAB : Indice d'activité biologique basé sur les paramètres régissant la vie microbienne du sol (pH,% CaCO3, % d'argile, % MO, régime de restitution des résidus de récolte, fréquence d'apports organiques). FRANCE Analyse® est une marque AGRO-Systèmes.

AGRO-Systèmes - 34 route de Saint Roch - 37390 LA MEMBROLLE S/ CHOISILLE - Tél : 02 47 87 47 87 - Fax : 02 47 87 47 88 - E-mail : info@agro-systemes.com - Site Internet : www.agro-systemes.com - © AGRO-Systèmes 8/2009 FRANCE_ANALYSE_GRANULO_2012_COMIFER

ENSAIA
2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172
54505 VANDOEUVRE LES NANCY

Parcelle : 1644
N° échantillon : **4611012**

AGRÉMENT	INTERPRÉTATION
Analyse réalisée par **SAS Laboratoire**, agréé par le Ministère de l'Agriculture	*Interprétation et conseils de fumure réalisés par* ***AGRO-Systèmes*** *selon les* ***normes COMIFER 2007/2009.***

HISTORIQUE DE FERTILISATION

	Culture	Rdt	Résidus	Apport Minéral P_2O_5	Apport Minéral K_2O	Apport Organique
Antéprécédent	BLE	60	Ramassés	NON	NON	NON
Précédent	COLZA D'HIVER	20	Ramassés	NON	NON	OUI

Nombre d'années sans apport P : 0 — Nombre d'années sans apport K : 0

INFORMATIONS SOL

- Type de sol : ARGILE LOURDE
- Profondeur : Moyen
- % cailloux : Non
- Terre fine : 2600T/ha

PRÉLÈVEMENT

- Préleveur : NON RENSEIGNE
- Type prélèvement
- Profondeur de prélèvement 20 cm
- Longitude :
- Latitude :
- Date de prélèvement

CONSEIL CHAULAGE (kg CaO / ha)

Entretien CaO	Correction CaO	Apport total CaO	
300	700	1000	1ère année
300	/	300	2ème année
300	/	300	3ème année
900	**700**	**1600**	Total

Le conseil de chaulage est calculé en fonction du pH actuel, du % Ca / CEC et de l'objectif de pH. Cet objectif devrait être atteint sur 3 ans avec 1600 Kg CaO / ha (ou équivalents CaO dans le cas d'utilisation de produits calco-magnésiens).

CONSEIL ORGANIQUE (kg MO / ha)

	Entretien MO conseillé	Correction MO conseillée	Apport total MO conseillé	Apports MO prévus (effluents ...)
1ère année	/	/	/	/
2ème année	/	/	/	/
3ème année	/	/	/	/
Total	/	/	/	/

Le bilan humique annuel est déficitaire : -470 kg MO/ha/an. Cela devrait se traduire par une légère diminution du %MO.Compte tenu du %MO actuel , l'amendement organique n'est pas indispensable sur cette parcelle. Veillez à maintenir ce capital organique en surveillant le bilan humique (équilibre entre les pertes d'humus et les restitutions d'humus).

CONSEILS P K Mg — CONSEILS OLIGO-ÉLÉMENTS

Interprétation COMIFER normes 2007/2009

Classe d'exigence (pour P_2O_5, K_2O, MgO) ou de sensibilité des cultures à la carence en oligo-éléments : **faible** ■ **moyen** ■■ **Elevé** ■■■

1ère CULTURE BLE 70 Qx Résidus : Ramassés

	PHOSPHORE P_2O_5	POTASSE K_2O	MAGNÉSIE MgO
EXIGENCE DE LA CULTURE	■	■	■
T Renforcement / T Impasse	20/70	150/200	
Exportations (kg / ha) (1)	45	35	10
Coeff multiplicateur (2)	0.8	0	
Report des pailles du précédent	8	65	3
Conseil de fumure (kg / ha)	45	---	---

	Zn	Mn	Cu	Fe	B	Mo
sensibilité de la culture	■	■■■	■■■	■	■	■
Guide d'apport		I	AS			
Dose (kg / ha)		Fol				

Manganèse : apport foliaire conseillé si conditions favorables à la carence (sol sec, sol soufflé en sortie d'hiver).
Conseil K : Le report des pailles n'est pas pris en compte car le résultat est supérieur à T impasse.

2ème CULTURE POIS DE PRINTEMPS 35 Qx Résidus : Enfouis

	PHOSPHORE P_2O_5	POTASSE K_2O	MAGNÉSIE MgO
EXIGENCE DE LA CULTURE			
T Renforcement / T Impasse			
Exportations (kg / ha) (1)			
Coeff multiplicateur (2)	0	0	
Conseil de fumure (kg / ha)	---	---	---

	Zn	Mn	Cu	Fe	B	Mo
sensibilité de la culture						
Guide d'apport						
Dose (kg / ha)						

3ème CULTURE BLE 70 Qx Résidus : Ramassés

	PHOSPHORE P_2O_5	POTASSE K_2O	MAGNÉSIE MgO
EXIGENCE DE LA CULTURE	■	■	■
T Renforcement / T Impasse	20/70	150/200	
Exportations (kg / ha) (1)	45	35	10
Coeff multiplicateur (2)	1	1	
Conseil de fumure (kg / ha)	45	35	---

	Zn	Mn	Cu	Fe	B	Mo
sensibilité de la culture	■	■■■	■■■	■	■	■
Guide d'apport		I	AS			
Dose (kg / ha)		Fol				

Manganèse : apport foliaire conseillé si conditions favorables à la carence (sol sec, sol soufflé en sortie d'hiver).

(1) Exportations calculées selon les normes COMIFER 2007. (2) Coefficients multiplicateurs des exportations calculés selon les normes COMIFER 2009.

	PHOSPHORE P_2O_5	POTASSE K_2O	MAGNÉSIE MgO
Dose totale / Dose moyenne	90 / 30	35 / 12	
Somme des pertes	90	70	20
Renforcement (+) / Destockage (-)	0	-35	-20

Oligo-éléments : conseil établi en fonction de la teneur du sol et de la sensibilité de la culture à la carence. Le conseil peut être "Impératif" (**I**) ou "A surveiller" (**AS**), il est proposé en Kg d'élément pur dans le cas d'un apport au sol (Cu, Zn ou bore). Pour le manganèse, un apport foliaire est recommandé en cas de besoin (**FOL**).

FRACTIONNEMENT DE LA MATIÈRE ORGANIQUE

AGRO Systèmes
L'agronomie sûre et simple

Date de prélèvement :	
Date de réception :	
Date d'édition :	23/01/2013

ANALYSE RÉALISÉE POUR :
ENSAIA
2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172
54505 VANDOEUVRE LES NANCY

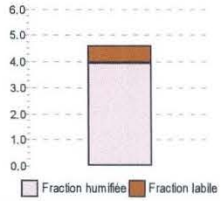
ORGANISME :
ENSAIA
2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172
54505 VANDOEUVRE LES NANCY
247032 - Technicien : NON RENSEIGNE

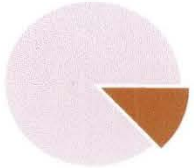
Nom de parcelle		Caractéristiques physico-chimiques				Informations sol et culture :			
1644		CEC =	26.0 meq / 100g			Type de sol :	ARGILE LOURDE	Travail du sol :	Labour
N° échantillon :	4611012	pH =	6.4	Ca CO_3 =	0	Culture :	BLE		
N° analyse de terre :									
Date analyse de terre :	27/12/2012	MO =	4.6 %	C/N =	9.2	Résidus :	Ramassés	Apport organique :	

Définition : Le fractionnement granulométrique de la matière organique permet d'isoler la part humifiée de la MO (fraction fine de moins de 50 µm) de la part labile (fraction grossière de plus de 50 µm). La fraction humifiée de la MO correspond à la partie "inerte" et stabilisée , constituant la fraction "humus stable" du complexe argilo-humique. Elle évolue très lentement.
La fraction labile de la MO correspond au pool de matière organique en cours de transformation, son carbone évoluera par minéralisation sous forme de CO_2 et son azote sous forme d'azote minéral.

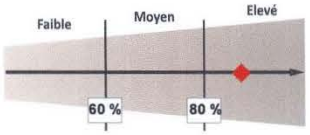
Fraction humifiée et fraction labile de la Matière Organique

MO = 4.6 % - C/N = 9.2





MO humifiée = 86.3% - C/N = 9.0
MO labile = 13.7% - C/N = 12.1

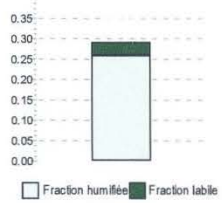


MO humifiée = 86.3 % de la MO totale

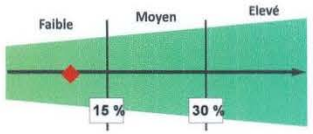
Interprétation :
La proportion de MO humifiée est élevée, le potentiel de dégradation de la MO du sol semble donc limité. De plus, la fraction labile de la MO présente un C/N relativement élevé, ce qui est caractéristique d'une MO peu évoluée qui se dégrade mal. Cela peut expliquer le taux élevé de MO. Afin d'améliorer la dégradation de la MO labile et ainsi améliorer la dynamique globale de la MO du sol, des apports de produits organiques à dominante animale (engrais organiques) sont recommandés. La forte dégradabilité de cette MO animale devrait permettre d'améliorer l'équilibre MO labile / MO humifiée.

Fraction humifiée et fraction labile de l'azote total

N total = 0.29 %



N humifiée = 89.4%
N labile = 10.6%



Azote labile = 10.6 % de l'azote total

Interprétation :
La proportion d'azote labile étant faible, le potentiel de fourniture en azote minéral par le sol est limité. Ce faible potentiel s'explique également par le C/N relativement élevé de la MO labile, signe de blocage de cette MO. L'apport de produits organiques avec une fraction significative d'origine animale peut aider à lever ce blocage. L'incorporation de légumineuse dans la rotation ou l'implantation de CIPAN pourrait permettre de compenser, voire d'améliorer ce potentiel de fourniture en azote minéral.

FRACTIONNEMENT DE LA MATIÈRE ORGANIQUE
AGRO Systèmes
L'agronomie sûre et simple
Date de prélèvement :
Date de réception :
Date d'édition : 23/01/2013
ANALYSE RÉALISÉE POUR : ENSAIA 2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172 54505 VANDOEUVRE LES NANCY
ORGANISME : ENSAIA 2 AV DE LA FORET DE HAYE BP172 54505 VANDOEUVRE LES NANCY 247032 - Technicien : NON RENSEIGNE
Nom de parcelle 1644 | N° échantillon : 4611012 | N° analyse de terre : | Date analyse de terre : 27/12/2012
Caractéristiques physico-chimiques: CEC = 26.0 meq / 100g | pH = 6.4 | Ca CO_3 = 0 | MO = 4.6 % | C/N = 9.2
Informations sol et culture : Type de sol : ARGILE LOURDE | Travail du sol : Labour | Culture : BLE | Résidus : Ramassés | Apport organique :
Définition : Le fractionnement granulométrique de la matière organique permet d'isoler la part humifiée de la MO (fraction fine de moins de 50 µm) de la part labile (fraction grossière de plus de 50 µm). La fraction humifiée de la MO correspond à la partie "inerte" et stabilisée , constituant la fraction "humus stable" du complexe argilo-humique. Elle évolue très lentement.
La fraction labile de la MO correspond au pool de matière organique en cours de transformation, son carbone évoluera par minéralisation sous forme de CO_2 et son azote sous forme d'azote minéral.
Fraction humifiée et fraction labile de la Matière Organique
MO = 4.6 % - C/N = 9.2
MO humifiée = 86.3% - C/N = 9.0
MO labile = 13.7% - C/N = 12.1
MO humifiée = 86.3 % de la MO totale
Interprétation : La proportion de MO humifiée est élevée, le potentiel de dégradation de la MO du sol semble donc limité. De plus, la fraction labile de la MO présente un C/N relativement élevé, ce qui est caractéristique d'une MO peu évoluée qui se dégrade mal. Cela peut expliquer le taux élevé de MO. Afin d'améliorer la dégradation de la MO labile et ainsi améliorer la dynamique globale de la MO du sol, des apports de produits organiques à dominante animale (engrais organiques) sont recommandés. La forte dégradabilité de cette MO animale devrait permettre d'améliorer l'équilibre MO labile / MO humifiée.
Fraction humifiée et fraction labile de l'azote total
N total = 0.29 %
N humifiée = 89.4%
N labile = 10.6%
Azote labile = 10.6 % de l'azote total
Interprétation : La proportion d'azote labile étant faible, le potentiel de fourniture en azote minéral par le sol est limité. Ce faible potentiel s'explique également par le C/N relativement élevé de la MO labile, signe de blocage de cette MO. L'apport de produits organiques avec une fraction significative d'origine animale peut aider à lever ce blocage. L'incorporation de légumineuse dans la rotation ou l'implantation de CIPAN pourrait permettre de compenser, voire d'améliorer ce potentiel de fourniture en azote minéral.
AGRO-Systèmes - 34, route de Saint Roch - 37390 LA MEMBROLLE / CHOISILLE
Tél : 02 47 87 47 87 - Fax : 02 47 87 47 88- email : info@agro-systemes.com - site : www.agro-systemes.com
© AGRO-Systèmes - 10/2009 - Fractionnement Matière Organique - 4-02-2010
Analyse réalisée par SAS Laboratoire, selon la méthode de tamisage sous eau (méthode INRA)

Annexe 2 : Analyses du sol ultramafique

LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le 16/06/16

RAPPORT D'ESSAI

ENSAIA LSE
M RAMEZ SAAD
2 AV DE LA FORET DE HAYE
TSA 40602
54505 VANDOEUVRE LES NANCY

Numero Echantillon: 200448351
Soumission: 100135278
Date de Reception: 03/05/16
Date de mise en analyse: 23/05/16

Accréditation CofracN°1-1380
Portée disponible sur
www.cofrac.fr

Version: 1 Votre Reference: SOL EB+RSA 16-21

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du Laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation identifiés par le symbole

SOL-0102 Broyage échantillon (diamètre < 250µm) (NF ISO 11464)

Broyage (< 250 µm)	fait	-

SOL-0201 Teneur en eau résiduelle à 105°C (NF ISO 11465) - g/kg

Humidité	23.7	g/kg

SOL-0302 Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation (NF X 31-107) - g/kg

Argile (< 2 µm)	175	g/kg
Limons fins (2/20 µm)	181	g/kg
Limons grossiers (20/50 µm)	125	g/kg
Sables fins (50/200 µm)	216	g/kg
Sables grossiers (200/2000 µm)	303	g/kg

SOL-0405 Carbone (C) organique et azote (N) total (NF ISO 10694 et NF ISO 13878) - g/kg

Carbone (C) organique	17.5	g/kg
Azote (N) total	1.26	g/kg
C/N	13.9	-
Matière organique	30.2	g/kg
Traitement Carbone	Par correction calcaire	-

SOL-0406 Carbone (C) total et azote (N) total (NF ISO 10694 et NF ISO 13878) - g/kg

Carbone (C) total	17.5	g/kg
Azote (N) total	1.26	g/kg

SOL-0501 pH eau (NF ISO 10390)

pH	5.76	-

Ce rapport d'essai ne doit pas etre reproduit sinon en entier sans l'autorisation écrite du laboratoire.
Ce rapport ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse.

Sauf indication contraire (p_sec) les résultats sont exprimés par rapport à un sol séché à l'air.

LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le 16/06/16

RAPPORT D'ESSAI

ENSAIA LSE
M RAMEZ SAAD
2 AV DE LA FORET DE HAYE
TSA 40602
54505 VANDOEUVRE LES NANCY

Numero Echantillon: 200448351
Soumission: 100135278
Date de Reception: 03/05/16
Date de mise en analyse: 23/05/16

Accréditation CofracN°1-1380
Portée disponible sur
www.cofrac.fr

Version: 1 Votre Reference: SOL EB+RSA

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du Laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation identifiés par le symbole

SOL-0604 Phosphore (P2O5) - méthode Olsen (NF ISO 11263) - g/kg

Phosphore (P2O5)	0.023	g/kg

SOL-0710 Capacité d'échange cationique cobaltihexamine (spectrocolorimétrie) (NF ISO 23470) - cmol+/kg

CEC cobaltihexamine	11.7	cmol+/kg

SOL-0719 Ca, Mg, Na, K, Fe, Mn, Al échangeables à la cobaltihexammine (ICP-AES/EAF) (NF ISO 23470) - cmol+/kg

Calcium (Ca)	5.29	cmol+/kg
Magnésium (Mg)	14.8	cmol+/kg
Sodium (Na)	0.138	cmol+/kg
Potassium (K)	0.156	cmol+/kg
Fer (Fe)	0.0123	cmol+/kg
Manganèse (Mn)	0.0852	cmol+/kg
Aluminium (Al)	0.022	cmol+/kg

SOL-0905 Si, Al, Fe méthode Tamm en obscurité (ICP-AES) (méth. INRA) - g/100g

Silicium (Si)	0.135	g/100g
Aluminium (Al)	0.23	g/100g
Fer (Fe)	0.892	g/100g

SOL-0910 Si, Al, Fe méthode Merha-Jackson (ICP-AES) (méth. INRA) - g/100g

Silicium (Si)	0.233	g/100g
Aluminium (Al)	0.307	g/100g
Fer (Fe)	3.39	g/100g

Ce rapport d'essai ne doit pas etre reproduit sinon en entier sans l'autorisation écrite du laboratoire.
Ce rapport ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse.

Sauf indication contraire (p_sec) les résultats sont exprimés par rapport à un sol séché à l'air.

LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le 16/06/16

RAPPORT D'ESSAI

ENSAIA LSE
M RAMEZ SAAD
2 AV DE LA FORET DE HAYE
TSA 40602
54505 VANDOEUVRE LES NANCY

Numero Echantillon: 200448351
Soumission: 100135278
Date de Reception: 03/05/16
Date de mise en analyse: 23/05/16

Accréditation CofracN°1-1380
Portée disponible sur
www.cofrac.fr

Version: 1 Votre Reference: SOL EB+RSA

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du Laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation identifiés par le symbole

SOL-1029 ICP1-Eléments traces totaux HF : Cr, Cu, Ni, Zn, Co (ICP-AES) (NF X 31-147/NF ISO 22036) - mg/kg

Chrome (Cr)	2030	mg/kg
Cuivre (Cu)	17.1	mg/kg
Nickel (Ni)	969	mg/kg
Zinc (Zn)	80.8	mg/kg
Cobalt (Co)	90.7	mg/kg

SOL-1030 ICP2-Eléments traces totaux HF : Pb, Cd, Tl, Mo (ICP-MS) (NF X 31-147/selon NF EN ISO 17294-2) - mg/kg

Plomb (Pb)	4.7	mg/kg
Cadmium (Cd)	0.069	mg/kg
Thallium (Tl)	0.102	mg/kg
Molybdène (Mo)	0.222	mg/kg

SOL-1031 ICP3-Eléments totaux HF : Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P2O5 (ICP-AES) (NF X 31-147/NF ISO 22036)

Aluminium (Al)	4.47	g/100g
Calcium (Ca)	3.57	g/100g
Fer (Fe)	9.27	g/100g
Potassium (K)	0.23	g/100g
Magnésium (Mg)	8.75	g/100g
Manganèse (Mn)	16600	mg/kg
Sodium (Na)	0.7	g/100g
Phosphore (P2O5)	0.044	g/100g

Ce rapport d'essai ne doit pas etre reproduit sinon en entier sans l'autorisation écrite du laboratoire.
Ce rapport ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse.

Sauf indication contraire (p_sec) les résultats sont exprimés par rapport à un sol séché à l'air.

LABORATOIRE
D'ANALYSES DES SOLS
D'ARRAS

ENVOI DES RESULTATS

Le 16/06/16

RAPPORT D'ESSAI

ENSAIA LSE
M RAMEZ SAAD
2 AV DE LA FORET DE HAYE
TSA 40602
54505 VANDOEUVRE LES NANCY

Numero Echantillon: 200448351
Soumission: 100135278
Date de Reception: 03/05/16
Date de mise en analyse: 23/05/16

Accréditation CofracN°1-1380
Portée disponible sur
www.cofrac.fr

Version: 1 Votre Reference: SOL EB+RSA

L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence du Laboratoire pour les seuls essais couverts par l'accréditation identifiés par le symbole

SOL-1406 Azote minéral (N de NO3 et N de NH4) sur extrait 1/10 au KCl 0.5 mol/l (méth. INRA) - mg/kg

Azote nitrique (N deNO3) sur extait 1/10	1.49	mg/kg
Azote ammo (N de NH4) sur extrait 1/10	10.8	mg/kg

SOL-1505 Conductivité totale sur extrait 1/5 (m/v) à 25°C (méth. INRA) - mS/cm

Conductivité	1.35	mS/cm

SOL-1761 ICP8-éléments extraits DTPA : Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Cr, Fe, Mn (ICP-AES) (NF X 31-121/NF ISO 22036) - mg/kg

Cadmium (Cd)	0.0176	mg/kg
Cuivre (Cu)	0.737	mg/kg
Nickel (Ni)	24.8	mg/kg
Plomb (Pb)	0.217	mg/kg
Zinc (Zn)	0.377	mg/kg
Chrome (Cr)	<0.2	mg/kg
Fer (Fe)	86.5	mg/kg
Manganèse (Mn)	29.7	mg/kg

SOL-4214 Eau régale (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) (ICP-AES) (ISO 11466/NF ISO 22036) - mg/kg

Cadmium (Cd) p_sec	0.0389	mg/kg
Chrome (Cr) p_sec	912	mg/kg
Cuivre (Cu) p_sec	15.4	mg/kg
Nickel (Ni) p_sec	861	mg/kg
Plomb (Pb) p_sec	10.4	mg/kg
Zinc (Zn) p_sec	41.8	mg/kg

Richard Antoine
pour le Directeur du Laboratoire

Fin du rapport de l'échantillon 200448351

Ce rapport d'essai ne doit pas etre reproduit sinon en entier sans l'autorisation écrite du laboratoire.
Ce rapport ne concerne que les échantillons soumis à l'analyse.

Sauf indication contraire (p_sec) les résultats sont exprimés par rapport à un sol séché à l'air.

Laboratoire d Analyses des Sols d Arras 273 Rue de Cambrai 62000 Arras

Annexe 3 : Analyses de l’eau du réseau urbain

Tableau 20 : Analyses de l'eau du réseau urbain

Elément	Aluminium	Arsenic	Bore	Calcium	Cadmium	Cobalt
Concentrations (mg L^{-1})	0.003	0.000	0.016	40.143	0.000	0.000

Elément	Chrome	Cuivre	Fer	Potassium	Magnésium	Manganèse
Concentrations (mg L^{-1})	0.000	0.085	0.010	1.904	3.971	0.003

Elément	Molybdate	Sodium	Nickel	Phosphore	Plomb	Soufre
Concentrations (mg L^{-1})	0.001	10.523	0.001	0.003	0.001	15.820

Elément	Zinc
Concentrations (mg L^{-1})	0.064

Annexe 4 : Biolog EcoPlate

Tableau 21 : Composition d'une microplaque Biolog Ecoplate de 96 puits

A1 Water	**A2** β-Methyl-D-Glucoside	**A3** D-Galactonic Acid γ-Lactone	**A4** L-Arginine	**A1** Water	**A2** β-Methyl-D-Glucoside	**A3** D-Galactonic Acid γ-Lactone	**A4** L-Arginine	**A1** Water	**A2** β-Methyl-D-Glucoside	**A3** D-Galactonic Acid γ-Lactone	**A4** L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	**B2** D-Xylose	**B3** D-Galacturonic Acid	**B4** L-Asparagine	**B1** Pyruvic Acid Methyl Ester	**B2** D-Xylose	**B3** D-Galacturonic Acid	**B4** L-Asparagine	**B1** Pyruvic Acid Methyl Ester	**B2** D-Xylose	**B3** D-Galacturonic Acid	**B4** L-Asparagine
C1 Tween 40	**C2** i-Erythritol	**C3** 2-Hydroxy Benzoic Acid	**C4** L-Phenylalanine	**C1** Tween 40	**C2** i-Erythritol	**C3** 2-Hydroxy Benzoic Acid	**C4** L-Phenylalanine	**C1** Tween 40	**C2** i-Erythritol	**C3** 2-Hydroxy Benzoic Acid	**C4** L-Phenylalanine
D1 Tween 80	**D2** D-Mannitol	**D3** 4-Hydroxy Benzoic Acid	**D4** L-Serine	**D1** Tween 80	**D2** D-Mannitol	**D3** 4-Hydroxy Benzoic Acid	**D4** L-Serine	**D1** Tween 80	**D2** D-Mannitol	**D3** 4-Hydroxy Benzoic Acid	**D4** L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	**E2** N-Acetyl-D-Glucosamine	**E3** γ-Hydroxybutyric Acid	**E4** L-Threonine	**E1** α-Cyclodextrin	**E2** N-Acetyl-D-Glucosamine	**E3** γ-Hydroxybutyric Acid	**E4** L-Threonine	**E1** α-Cyclodextrin	**E2** N-Acetyl-D-Glucosamine	**E3** γ-Hydroxybutyric Acid	**E4** L-Threonine
F1 Glycogen	**F2** D-Glucosaminic Acid	**F3** Itaconic Acid	**F4** Glycyl-L-Glutamic Acid	**F1** Glycogen	**F2** D-Glucosaminic Acid	**F3** Itaconic Acid	**F4** Glycyl-L-Glutamic Acid	**F1** Glycogen	**F2** D-Glucosaminic Acid	**F3** Itaconic Acid	**F4** Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	**G2** Glucose-1-Phosphate	**G3** α-Ketobutyric Acid	**G4** Phenylethyl-amine	**G1** D-Cellobiose	**G2** Glucose-1-Phosphate	**G3** α-Ketobutyric Acid	**G4** Phenylethyl-amine	**G1** D-Cellobiose	**G2** Glucose-1-Phosphate	**G3** α-Ketobutyric Acid	**G4** Phenylethyl-amine
H1 α-D-Lactose	**H2** D,L-α-Glycerol Phosphate	**H3** D-Malic Acid	**H4** Putrescine	**H1** α-D-Lactose	**H2** D,L-α-Glycerol Phosphate	**H3** D-Malic Acid	**H4** Putrescine	**H1** α-D-Lactose	**H2** D,L-α-Glycerol Phosphate	**H3** D-Malic Acid	**H4** Putrescine

Polymères **Carbohydrates** **Acides carboxyliques** **Amines/amides** **Acides aminés**

Agromine associant plantes hyperaccumulatrice de nickel et légumineuse, comme service écosystémique des sols ultramafiques

L'application de l'agromine à des zones ultramafiques délaissées constitue un enjeu majeur à la vue des surfaces potentiellement valorisables. Par contre, les sols ultramafiques sont particuliers avec de fortes concentrations en métaux et une quasi absence de matière organique. Malgré tout, la mise en place de l'agromine a déjà donné de bons résultats, couplée avec l'application d'herbicides et une fertilisation minérale. Notre défi a été de développer une agromine durable par la mise en place d'agro-écosystèmes basés sur l'introduction d'une légumineuse en association avec une plante hyperaccumulatrice et la suppression de tout intrant chimique. Nos résultats ont confirmé clairement que l'introduction d'une légumineuse dans l'agromine a amélioré la production de biomasse de *Alyssum murale* et les rendements de nickel par rapport à sa monoculture fertilisée et non fertilisée. Nos travaux ont également montré que l'insertion d'une légumineuse dans l'agromine permet d'améliorer la structure du sol avec des agrégats plus stables. De plus, de meilleures teneurs en carbone, azote et en matière organique ont été détectées. L'ensemble de ces éléments conduit ainsi à une amélioration globale de la structure du sol, de sa fertilité et de son biofonctionnement. Corrélativement, nos résultats ont mis en évidence les effets positifs de ces nouvelles pratiques, à la fois sur la taille, la diversité et les acitivités liées aux cycles biogéochimiques des communautés bactériennes. D'un point de vue écononique, l'introduction de la légumineuse dans l'agromine implique un gain financier et de temps du fait de la réduction de l'application d'engrais et de produits phytosanitaires. Enfin, tous ces avantages conduisent à une réhabilitation des sols ultramafiques avec une restauration de leurs qualités physique, chimique et biologique, tout en permettant à ces sols particuliers d'offrir plusieurs services écosystémiques.

Mots-clés : Agromine, *Alyssum murale*, Légumineuse, fertilité du sol, services écosystémiques

Assessment of ecosystem services rendered by agromining of nickeliferous soils: testing the association of leguminous and hyperaccumulator plants

The application of agromining to abandoned ultramafic areas is a major challenge in the presence of potentially recoverable areas. Howerver, ultramafic soils are particular in terms of their fertility with high concentrations of metals and a near absence of organic matter. Nevertheless, this challenge was partly met by the application of chemical fertilizers and herbicides. Our challenge, through this PhD, was to develop a sustainable agro-ecosystem based on the introduction of a legume in association with the hyperaccumulating plant and then the reduction of any chemical input. Our results clearly confirmed that the introduction of a legume into these new cropping systems improved both the biomass production of *Alyssum murale* and the Ni yields in comparison to the fertilized and non-fertilized monoculture. Our work has also shown that the insertion of a legume into agromining cropping systems improves the structure of the soil due to stable and larger aggregates. In addition, higher levels of carbon and nitrogen and higher concentrations of organic matter were detected. These results led to an overall improvement of the soil structure, its fertility and its biofunctioning. Our results showed positive effects of these new cropping systems, both on the size of the bacterial communities and on the microbial enzymes involved in the soil biogeochemical cycles. In addition, the structure and diversity of bacterial communities were modified with the insertion of the legume, compared to the monoculture. Economically, the introduction of legume into cropping systems dedicated to Ni agromining involves a gain of money and time due to reduced application of mineral fertilizers as well as products of phytosanitary. Finally, all these benefits lead to the rehabilitation of ultramafic soils with the restoration of their physical, chemical and biological qualities while allowing these particular soils to offer many ecosystem services.

Keywords: Agromining, *Alyssum murale*, legumes, soil fertility, Ecosystem services