



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>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Laboratoire Sols et Environnement UMR 1120 – INPL/INRA

UNIVERSITE AGRICOLE DE TIRANA

Département Agro-Environnement

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du

Doctorat de Sciences Agro - Environnement par

Aida BANI

Phytoextraction du Ni dans les sols ultramafiques d'Albanie

Soutenue publiquement le 31 août 2009 devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury :

Thierry BECQUER, Directeur de Recherche	IRD, Montpellier	Rapporteur, Président
Alessandro CHIARUCCI, Professeur	Université de Sienne	Rapporteur
Alfred MULLAJ, Professeur	Université de Tirana	Examineur
Guillaume ECHEVARRIA, Professeur	INPL, Nancy	Co-directeur, Membre invité
Sulejman SULÇE, Professeur	Université Agricole de Tirana,	Co-directeur
Jean Louis MOREL, Professeur	INPL, Nancy	Co-directeur

Je dédie ce travail à Besnik, mon mari et à mes enfants, Erla et Emarildo, pour avoir accepté tant de sacrifices durant les années de thèse.

Je dédie aussi ce travail à mon oncle, Estref Haxhialushi, un grand professeur de botanique albanais.

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été principalement effectués au sein du Laboratoire Sols Environnement INPL/INRA et du Département Agro-environnement, Université Agricole de Tirana.

J'adresse mes sincères remerciements à l'Ambassade française à Tirana (l'Albanie) pour la bourse du gouvernement français dont j'ai bénéficié pour effectuer ce travail.

Avant tout, je remercie messieurs les membres du jury pour leur collaboration durant l'examen de ce travail et pour m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance.

Je suis reconnaissant à Thierry BECQUER et Alessandro CHIARUCCI, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Leurs commentaires et leurs questions m'ont permis de clarifier ma rédaction et m'ont donné de nouvelles pistes de réflexion.

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur Jean Louis Morel, Professeur à l'ENSAIA, et Directeur du Laboratoire Sols Environnement, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour l'aide compétente qu'il m'a apportée. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ces années de thèse que j'ai passées à leur côté. Au cours de ces années, sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et ses précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. La confiance qu'il m'a accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes du métier d'enseignant-chercheur.

Je remercie Monsieur Sulejman Sulçe, professeur à Université Agricole de Tirana pour m'avoir donné la possibilité de faire cette thèse en France et pour avoir encadré mon travail en Albanie. Je tiens à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ma thèse

J'adresse tout particulièrement ma reconnaissance à Monsieur Guillaume Echevarria, professeur à l'ENSAIA, pour la co-direction de cette thèse aussi. Il a su me faire profiter de ses nombreuses connaissances et de sa dimension internationale au travers des publications et des conférences que nous avons pu réaliser ensemble. Par la suite nos relations ont évolué vers une amitié sincère. Je tiens enfin à te remercier pour ton implication dans ce travail de thèse, pour ton aide, ta disponibilité, tes nombreux conseils et ton soutien sans faille. Je veux exprimer ma reconnaissance pour le temps passé à corriger ma thèse et mes publications en anglais.

Je suis reconnaissant à famille Kanari pour le soutien pendant le temps que j'ai été à Nancy.

Je remercie tout le magnifique personnel de mon laboratoire, le LSE.

J'exprime ma reconnaissance à Emmanuelle Montargès-Pelletier pour notre collaboration scientifique pendant ma thèse.

Merci enfin à toute ma famille, en particulier mon mari (Besnik), mes enfants (Erla et Emarildo), mes parents, mon frère et ma sœur de m'avoir supporté et aidé.

Table des matières

Table des matières	3
Introduction générale	7
Chapitre 1 : De la géobotanique au phytomining du nickel Etude bibliographique	12
1. Introduction	13
Les roches ultramafiques	13
1.1 Croûte océanique et ophiolites.....	13
1.2 Mise en place des ophiolites	14
1.3 Phénomènes de serpentinitisation	14
1.4 Serpentinites bréchiques et opicalcites	15
1.5 Minéraux de serpentine.....	15
Sols de serpentine	16
1.6 Les Vertisols	17
a) Les caractéristiques des Vertisols.....	18
b) Dynamique minérale des Vertisols.....	19
c) Les Vertisols du bassin méditerranéen	20
1.7 Localisation du Ni dans les sols.....	21
1.8 Caractérisation des phases principales porteuses de Ni dans les sols ultramafiques (serpentine)	22
a) Les serpentines	22
b) Les chlorites.....	23
c) Les smectites	23
d) Les oxy-hydroxydes de Fe et de Mn	24
Le syndrome de serpentine	26
1.9 Quelques problèmes de serpentines	27
a) Réponses morphologiques à la serpentine.....	27
b) Taux élevés d'endémisme	28
c) Types spécifiques de végétation	28
1.10 Mécanismes de tolérance à la serpentine	28
a) Rapport Ca/Mg	28
b) Toxicité du magnésium	29
c) Exigence pour le magnésium.....	30
Bases physiologiques de la tolérance à la serpentine.....	30
1.11 Rôle physiologique du Ni dans les plantes supérieures	30

1.12	Assimilation du Ni par les plantes	31
1.13	Distribution et accumulation du Ni dans les organes des plantes	33
1.14	Distribution du Ni dans les tissus des hyperaccumulateurs	35
1.15	Transport du Ni dans les plantes	36
1.16	Localisation intracellulaire de Ni.....	37
Phytoextraction du Ni dans le sol et les facteurs contrôlant la disponibilité du Ni		39
1.17	Phytoextraction de Ni	39
1.18	Facteurs contrôlant la disponibilité et la phytoextraction du Ni des sols	41
a)	Rôle du matériel parental.....	41
b)	Rôle de la matière organique dans les sols	42
c)	Rôle des sécrétions (exsudats) de racines.....	42
d)	Effet des propriétés du sol	43
Phytomining		44
Conclusion		47
 Chapitre 2 Hyperaccumulation du Ni par les Brassicacées dans les serpentines d’Albanie et du Nord-Ouest de la Grèce		49
1.	Abstract.....	50
2.	Introduction.....	51
3.	Materials and methods.....	52
3.1	Sites investigated.....	52
3.2	Soil and plant sampling.....	58
3.3	Soil and plant analyses.....	60
4.	Results.....	61
4.1	Soil variability along the study sites.....	61
4.2	Distribution of Fe and Ni within the different mineral compartments in soils...58	
4.3	Variability of Ni availability along the Albanian and Pindus Mountains soils...60	
4.4	Uptake of Ni and other elements by hyperaccumulator plants.	62
5.	Discussion.....	66
5.1	Soil characteristics and pedological evolution.....	66
5.2	Control of Ni availability in soils	67
5.3	Ni accumulation by plants	67
5.4	Consequences for phytoextraction	69
 Chapitre 3 Pédogenèse et biodisponibilité du Ni pour les plantes hyperaccumulatrices dans une toposéquence ultramafique d’Albanie.....		70
6.	Abstract	71

7. Introduction.....	72
7.1 Materials and methods.....	74
7.2 Study area.....	74
7.3 Plant identification along the toposequence.....	75
7.4 Identification of soil minerals and location of Ni.....	75
7.5 Ni availability.....	76
8. Results.....	76
8.1 Soil genesis and functioning along the toposequence.....	76
8.2 Soil mineralogy and identification of Ni-bearing phases.....	81
8.3 Ni availability along the toposequence.....	85
8.4 Distributions of hyperaccumulator plants and Ni uptake along the toposequence	86
9. Discussion.....	87
9.1 Soil characteristics and elemental dynamics along the toposequence....	87
9.2 Mineralogy of soils and consequences on the soil catena functioning...	88
9.3 Ni availability along the toposequence.....	89
9.4 Relationships between Ni availability and uptake by hyperaccumulators plants	90
10. Conclusion.....	90
 Chapitre 4 Phytoextraction in-situ de Ni par une population naturelle d'<i>Alyssum murale</i> sur un sol ultramafique d'Albanie	
	92
11. Abstract.....	93
12. Introduction.....	94
13. Materials and methods.....	95
13.1 Site and soil characterization and experimental plot design.....	95
13.2 Fertilisation pot trial.....	99
13.3 Plant identification and harvest on experimental plots.....	100
13.4 Plant sample mineralisation, elemental analyses and statistical analysis of date	100
14. Results.....	101
14.1 Edaphic properties of the site.....	101
14.2 Localisation of Ni-bearing phases and Ni availability.....	103
14.3 Effect of fertilisation on biomass production by <i>A. murale</i> and the other dominating species.....	105
14.4 Effect of fertilisation on Ni concentration in plant tissues and on phytoextraction yield.....	107

15. Discussion.....	110
15.1 Soil characteristics and Ni availability to <i>Alyssum murale</i>	110
15.2 Effect of fertilisation on species abundance and biomass production...	111
15.3 Plant nutrition and Ni uptake by <i>A. murale</i>	112
15.4 Effect of fertilisation on Ni phytoextraction yield and perspectives for future research.....	113
 Chapitre 5 Amélioration de l'agronomie d'<i>Alyssum murale</i> pour le phytoextraction extensive : quatre ans d'expérimentation au champ.....	114
 16. Abstract.....	115
16.1 Introduction.....	116
 17. Materials and methods.....	117
17.1 Site characteristics.....	117
17.2 Soil description and properties.....	118
17.3 Characterisation of Ni availability.....	118
17.4 Agronomic trials with native stands of <i>Alyssum murale</i>	119
17.5 Identification, collection and analyses of plants in experimental plots	121
17.6 Determination of Ni yield.....	121
 18. Results.....	123
18.1 Ni availability.....	123
18.2 Plant diversity in the studied plots.....	125
18.3 Effect of management practices on species composition, biomass production, and phytoextraction yield by <i>A. murale</i> and the other dominating species	126
18.4 Plant responses to serpentine soils.....	129
18.5 Vegetation stages of <i>A. murale</i> as spring plant.....	135
18.6 Relations between LAI and biomass production of <i>A. murale</i> as a spring crop.....	135
 19. Discussion.....	137
19.1 Effect of managements practices on Ni phytoextraction yield	137
19.2 Plant nutrition and Ni uptake.....	138
19.3 Estimated Economics of Ni phytoextraction.....	139
 Conclusion générale.....	141
 Références bibliographiques.....	147
 Résumé.....	174

Introduction générale

La phytoextraction est un procédé agronomique qui conduit à l'exportation massive de composés présents dans les sols. Suggéré par Chaney (1983) pour dépolluer les sols, le procédé a été testé par Baker *et al.* (1991) puis Schwartz et Morel (1998) pour extraire des métaux comme le zinc et le cadmium. La phytoextraction a aussi été envisagée dans le but de valoriser les métaux en métallurgie (Li *et al.*, 2003) ; il s'agit alors de phytoextraction minière, *i.e.* phytomining. Les plantes utilisées pour la dépollution ou la valorisation minière sont alors, soit des espèces accumulatrices à forte production de biomasse, soit des espèces dites hyperaccumulatrices (Jaffré *et al.*, 1976) qui contiennent cent à mille fois plus de métaux que les autres végétaux. Chacun de ces deux groupes nécessite des améliorations afin d'optimiser l'extraction et de développer un procédé efficace pour extraire les métaux des sols. Pour les plantes accumulatrices à forte production de biomasse, l'amélioration des performances peut être obtenue par l'augmentation de la concentration des métaux dans les tissus en faisant appel, soit à la sélection végétale traditionnelle, soit au génie génétique, soit à des techniques d'ajout de chélatants dans les sols pour solubiliser les métaux (*i.e.* phytoextraction induite). Pour les plantes hyperaccumulatrices, le trait spécifique acquis au cours de l'évolution et qui leur confère la capacité à stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes peut être valorisé considérablement en augmentant leur production de biomasse. Dans ce cas, outre la sélection traditionnelle ou par génie génétique, l'optimisation des pratiques agronomiques reste une voie privilégiée pour l'accroissement du rendement de phytoextraction. Cela nécessite de bien connaître la réponse des plantes aux conditions de milieu, notamment la biodisponibilité des métaux (Chardot *et al.*, 2007 ; Massoura *et al.*, 2006) et aux pratiques agronomiques, *e.g.* travail du sol, fertilisation, protection de la culture, modalités de récolte) afin de définir les meilleurs itinéraires techniques pour la culture de phytoextraction.

Les sols naturellement bien pourvus en métaux et les sols contaminés à la suite d'activités industrielles constituent souvent un obstacle pour la production agricole à usage alimentaire, soit parce qu'ils contiennent des concentrations assimilables en métaux phytotoxiques, soit parce qu'ils sont à l'origine de la contamination de la chaîne alimentaire. Le nickel est l'un des métaux souvent présents en concentrations élevées dans les sols à anomalie géochimique, en particulier, dans les sols ultramafiques. Dans ces milieux, dont l'extension est considérable à l'échelle mondiale, la haute concentration en Ni rend difficile le développement d'une activité agricole intensive. Dans les Balkans, une proportion importante du territoire est couverte par des sols

développés sur roches ultramafiques. En Albanie, par exemple, dix pour cent de la surface du pays est constituée de sols ultramafiques qui sont déficients en éléments nutritifs majeurs (K et P) et qui présentent des teneurs en Ni souvent supérieures à 3 000 mg kg⁻¹. L'agriculture y est très peu productive et ces terres sont souvent délaissées et abandonnées par les agriculteurs. La phytoextraction minière peut alors représenter une alternative économique viable à l'agriculture vivrière pratiquée dans les zones ultramafiques albanaises. Les expériences de phytomining sont rares et ont essentiellement été conduites aux Etats-Unis (Li *et al.*, 2003). Elles ont démontré la faisabilité du procédé dans un contexte d'agriculture intensive et mécanisée à fort intrants. Le potentiel d'extraction du Ni dans ces conditions serait supérieur à trois cents kilogrammes de Ni brut par hectare (Chaney, communication personnelle).

Les plantes hyperaccumulatrices de métaux ont développé des mécanismes spécifiques de prélèvement de la fraction disponible des métaux du sol, conduisant à leur accumulation dans les parties aériennes. Pour le Ni, plus de quatre cents espèces, inféodées aux sols ultramafiques, ont été identifiées à ce jour (Baker, 2000) mais depuis, de nombreuses autres ont été identifiées lors de l'exploration de nouvelles zones ultramafiques (*e.g.* Reeves *et al.*, 2007) augmentant ainsi la liste incomplète datant de 2000. De nombreuses espèces hyperaccumulatrices de Ni sont présentes dans les Balkans (Stevanovic *et al.*, 2003). L'une d'elles a déjà fait l'objet de travaux de phytoextraction, *Alyssum murale* Waldst. & Kit, et notamment de phytomining intensif (Li *et al.*, 2003). Afin de développer un procédé viable de culture de phytoextraction du Ni dans les sols ultramafiques des Balkans, il est nécessaire de répondre aux questions scientifiques suivantes regroupées en trois axes principaux :

1. Quel est le potentiel de phytoextraction de plantes hyperaccumulatrices de Ni (absorption, translocation, séquestration du métal) ? Quelle est la part des caractéristiques génétiques (inter ou intra-spécifiques) et des conditions édaphiques dans l'accumulation du Ni par les plantes ? Les réponses à ces questions devraient guider le choix des espèces.
2. Comment peut-on expliquer la disponibilité du Ni dans les sols de serpentine en fonction de leur nature, de leur genèse et de leur fonctionnement ? Quels seraient les types de sols les plus adaptés à la phytoextraction de Ni tant du point de vue de la fertilité vis-à-vis des plantes hyperaccumulatrices que de la disponibilité en Ni ? Les réponses à ces questions devraient guider le choix des sols.

3. Quelles doivent-être les itinéraires techniques à mettre en œuvre pour mener à bien la culture et optimiser le rendement de phytoextraction du Ni ? En particulier quelles stratégies doivent être établies pour la fertilisation, le contrôle des adventices et la récolte ?

Ceci a permis de cerner précisément les objectifs de ce travail qui s'appuient sur les plantes hyperaccumulatrices des Balkans. En particulier il s'agit :

1. d'identifier les plantes hyperaccumulatrices les plus efficaces dans le prélèvement du Ni de sols et de comprendre les relations entre le prélèvement du métal par les plantes et sa biodisponibilité dans les sols ultramafiques. Pour cela, des couples sol-végétation ont été observés et étudiés sur deux régions caractéristiques du Nord-Ouest de la Grèce (Monts Pinde) et de l'Albanie.
2. de déterminer les types de sols les plus adaptés à la phytoextraction du Ni en ce qui concerne la fertilité physique et chimique et la disponibilité du Ni. A cette fin, une étude biogéochimique a été conduite sur les sols d'une toposéquence ultramafique représentative.
3. de rechercher les conditions d'optimisation de l'itinéraire agronomique adapté pour l'espèce retenue et pour les conditions édaphiques optimales. Dans ce but, des essais culturaux en vraie grandeur ont été conduits sur des parcelles expérimentales installées sur sol ultramafique.

Ainsi, le travail s'est appuyé sur trois approches complémentaires :

1. prospection géobotanique en Albanie et en Grèce (approche naturaliste),
2. étude *in situ* des facteurs qui influencent la biodisponibilité du Ni et le comportement des plantes sur une toposéquence ultramafique (approche biogéochimique),
3. expérience agronomique de longue durée sur un site ultramafique d'Albanie (Pojska, région de Pogradec), où ont été testés la fertilisation, le contrôle des adventices par herbicide et la date de récolte.

Le **premier chapitre** rappelle les caractéristiques des roches et des sols ultramafiques, le comportement des plantes dans ces milieux, notamment celui des plantes hyperaccumulatrices Ni. L'état de l'art insiste sur l'adaptation des plantes endémiques aux sols de serpentine (syndrome de serpentine, tolérance) ainsi que sur l'écophysiologie des plantes hyperaccumulatrices de Ni. Il se termine par les connaissances acquises sur le procédé de phytoextraction de métaux.

Le **deuxième chapitre** rapporte les résultats de la prospection géobotanique. Il est destiné à comprendre les propriétés d'hyperaccumulation des différentes populations d'espèces hyperaccumulatrices, absorption, accumulation, tolérance à certains métaux, en relation avec les propriétés des sols où elles se sont développées. Il s'agit aussi d'identifier les meilleurs candidats pour la phytoextraction.

Le **troisième chapitre** présente les facteurs qui contrôlent la biodisponibilité du Ni dans les différents types de sols ultramafiques albanais, à travers l'étude de la toposéquence de Pojska. L'intérêt s'est focalisé sur (i) la nature des phases minérales porteuses, (ii) la spéciation du Ni au sein de ces phases et (iii) les conditions physico-chimiques du milieu (pH, CEC) et (iv) le comportement *in situ* des plantes.

Le **quatrième chapitre** établit les modalités de fertilisation qui permettent d'optimiser la production de biomasse et l'extraction du Ni. Il est fondé sur une année d'essai en plein champ conduit avec les populations naturelles d'*A. murale* sur le site ultramafique de Pojska, complété par des expériences en conditions contrôlées en serre.

Enfin, le **cinquième chapitre** rapporte l'ensemble des expérimentations conduites en plein champ (quatre années) dans lesquelles une culture extensive de phytoextraction du Ni en sol ultramafique a été mise en œuvre. Cette expérience permet de définir un ensemble d'interventions de l'itinéraire technique permettant d'optimiser la phytoextraction du Ni (*i.e.* modalités d'implantation, fertilisation, contrôle des adventices, date et conditions de récolte).

A l'issue de ce chapitre, sont présentées les conclusions et les applications découlant de ces expérimentations en terme de phytoextraction du Ni.

**Chapitre 1 : De la géobotanique au phytomining
du nickel
Etude bibliographique**

1. Introduction

L'étude bibliographique est consacrée aux milieux de serpentines et aux plantes qu'ils hébergent. Dans un premier temps, seront présentés les roches ultramafiques et les sols qui résultent de leur évolution. Puis l'accent sera mis sur les plantes hyperaccumulatrices de Ni en insistant sur la géobotanique et sur leurs propriétés physiologiques, notamment celles qui conduisent à l'hyperaccumulation du Ni. Enfin, les procédés de phytoextraction et de phytomining seront exposés afin de positionner le travail dans un contexte finalisé de valorisation des sols ultramafiques par le biais des plantes hyperaccumulatrices.

Les roches ultramafiques

Une roche ultramafique ou roche ultrabasique est une roche magmatique et métamagmatique contenant généralement plus de 70 % de minéraux contenant du fer et du magnésium (d'où le terme ma-fique: Mg et Fe) et, à plus faible concentration, du silicium (moins de 45 %). Elle contient généralement plus de 18 % d'oxyde de magnésium et peu de potassium. Il s'agit de péridotites et de leurs dérivés. Une péridotite est une roche ignée essentiellement formée de péridots, minéraux à base de silicates de fer et de magnésium. La péridotite est principalement composée d'olivine (qui lui donne sa couleur verte caractéristique), de pyroxène (minéraux noirs) et de l'amphibole (blanc). La péridotite est issue d'un refroidissement lent du magma. La péridotite peut devenir de la serpentinite, sous l'effet de la chaleur et d'une hydratation, c'est le métamorphisme hydrothermal. La péridotite peut devenir de l'éclogite sous l'effet d'un métamorphisme de haute pression. Les péridotites ont une structure grenue. Elles sont le principal constituant du manteau terrestre.

1.1 *Croûte océanique et ophiolites*

Les roches ultrabasiques se rencontrent à la base de la croûte océanique qui se forme sur les rides médio-océaniques à partir de la fusion partielle des roches du manteau, par séparation des parties solides et recristallisation (Perrier 1995). Les nappes ophiolitiques, portions de la croûte océanique transportées sur les continents, comportent normalement la séquence suivante de la base vers le sommet :

- 9 à 12 km de péridotites, à composition alternée de dunites et de harzburgites, considérées comme le résidu de la fusion du manteau supérieur,
- 2,5 km de cumulats lités, formés de gabbros et de péridotites, sédimentés à la base de la chambre magmatique,

- 1 à 2 km de gabbros massifs, avec quelques sills de plagiogranites,
- des dykes volcaniques (1,2 km), des couches de basaltes en coussins, et finalement des sédiments marins pélagiques.

1.2 *Mise en place des ophiolites*

Dans la théorie de la tectonique des plaques, la croûte océanique, formée sous les dorsales et constituant le tréfonds des océans, s'enfonce finalement sous une plaque continentale ou un arc volcanique (processus de *subduction* des marges actives), et disparaît dans les profondeurs du manteau (Malpas and Robinson, 2007). Cependant, on observe dans beaucoup de chaînes de montagnes de larges fragments de croûte océanique, que l'on appelle ensembles *ophiolitiques* : on doit imaginer un mécanisme par lequel la croûte océanique est transportée sur le continent (processus d'*obduction*), au lieu de disparaître par dessous. Parmi les diverses solutions proposées, aucune ne fait encore l'unanimité : rupture de la plaque océanique plongeante, par exemple le long d'un arc ou d'une dorsale, ou sa délamination, et chevauchement sur le bord de la marge active au cours de la fermeture de l'océan. Mais on n'a jamais observé encore d'obduction actuellement active, et ces mécanismes restent hypothétiques.

1.3 *Phénomènes de serpentinitisation*

Les roches de serpentinite sont des roches métamorphiques issues des péridotites qui tirent leur nom de leur aspect semblable à celui d'écailles qui provoquent une sensation particulière au toucher, évoquant une peau de serpent. Ce processus métamorphique particulier est nommé « serpentinitisation ». Les serpentinites sont des roches jaunâtres à verdâtres (voire vert sombre) ou présentant des inclusions verdâtres (forme porphyrique). L'olivine se transforme en serpentines et brucite $\text{Mg}(\text{OH})_2$ par absorption d'eau : la densité s'abaisse de 3,3 à 2,55, d'où une augmentation de volume (25 à 53 %). On discute encore beaucoup du lieu où s'effectue la transformation : dans la plaque océanique, au fond de l'océan, lors de la mise en place, ou après la mise en place des nappes ?

Quand les olivines contiennent du fer (fayalites) et que de l'oxygène est présent, il se forme de la *magnétite* Fe_3O_4 : elle constitue alors des gisements de fer, ou se trouve disséminée dans la serpentinite. Ce minéral a une dureté nettement supérieure (5,5) à celle des serpentines ; de plus on trouve fréquemment de la chromite, dont la dureté est similaire, ce qui explique que le sciage des serpentinites puisse être plus difficile que

celui des marbres (Site de ressources pour l'enseignement de la Terre – <http://planet-terre.ens-lyon.fr>).

Dans les serpentinites, on observe habituellement un réseau de filonets blancs, constitués de carbonates, comme la calcite, mais aussi la dolomite et la magnésite.

Une autre transformation (*rodingitisation*), attribuée à des apports de calcium, se traduit par des filons ou des enclaves de couleur rose ou vert clair, contenant des grenats (dureté 6,5 à 7,5). La serpentinitisation pourrait se produire dans le plancher océanique quand les péridotites encore chaudes sont pénétrées par l'eau de mer (métamorphisme océanique). Bien que les forages sous-marins n'aient jamais atteint encore les péridotites à la base de la croûte océanique, on a rencontré des serpentinites directement au fond des océans, dans les rifts, le long de failles ou dans des diapirs : dans ces cas, la serpentinitisation semble survenir au fond de la mer, là où les roches du manteau sont dénudées par une expansion très rapide, ou bien le long de fractures.

On a également constaté une serpentinitisation active dans des massifs ophiolitiques de surface, depuis longtemps émergés : les eaux issues de ces massifs sont basiques et contiennent du calcium, ce seraient des serpentines de basse température (chrysotile et lizardite), à l'origine de la structure maillée.

1.4 *Serpentinites bréchiques et ophicalcites*

Les serpentinites montrent très fréquemment un aspect bréchique, avec un réseau de filonets de carbonates ou de serpentine : on peut supposer que cette bréchification est d'origine tectonique, soit par compression lors de la mise en place des nappes ophiolitiques, soit par extension au pied des marges passives, on suspecte également une fracturation par des fluides chargés en carbonates.

Cependant, depuis quelques années des chercheurs ont observé au sommet des ophiolites alpines et apennines des niveaux de brèches situés au sommet de la série de serpentinites massives, juste sous des sédiments pélagiques ou sous des couches de basaltes : ces brèches sont créées par altération de serpentinites au fond de la mer, ou sont franchement d'origine sédimentaire, elles sont dénommées *ophicalcites* (Perrier, 1995).

1.5 *Minéraux de serpentine*

Les roches de serpentinite sont surtout constituées (à plus de 75 %) de serpentines (antigorite, chrysotile ou lizardite) (phyllosilicate magnésien). La serpentinite est une

roche peu dure (dureté : de 4,0 à 5,0), de masse volumique : de 2,5 à 2,6 g/cm³ (<http://planet-terre.ens-lyon.fr>)

La serpentine est un minéral de la famille des phyllosilicates (ou silicate lamellaire) faisant partie du groupe de la kaolinite-serpentine. Elle cristallise dans le système cristallin monoclinique ou orthorhombique. Sa formule chimique est $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. Elle est issue de l'altération d'une roche basique, par exemple la péridotite ou les ophiolites.

La serpentine se présente sous la forme de plusieurs polymorphes :

- chrysotile, à couches courbes qui forment des spirales ;
- serpentine polygonale, semblable au chrysotile mais dont la courbure des couches n'est pas continue et l'aspect final celui d'une spirale polygonale ;
- lizardite, à couches droites, où le silicium et le magnésium sont partiellement remplacés par de l'aluminium ;
- antigorite, série polysomatique où la tendance à la courbure typique de la serpentine est inversée périodiquement, ce qui donne une structure ondulée.

Sols de serpentine

Les sols de serpentine sont formés par l'altération de surface des roches ultramafiques. Bien que la serpentine soit présente, elle n'est pas le minéral exclusif dans ces sols, malgré la dénomination « sols de serpentine ». Ce terme est, en effet, un abus de langage (Proctor, 1999) d'autant plus, qu'il concerne aussi les sols sur péridotite non serpentinisée par extension (Alexander *et al.*, 2004). Cependant, ce terme est largement reconnu et accepté dans la communauté scientifique (Brooks, 1987).

L'effet particulier des serpentines sur l'écologie des plantes n'est pas tant lié aux roches en elles mêmes, qu'au produit de leur altération, le sol de serpentine. Les sols riches en magnésium, fer et silice sont des produits caractéristiques du processus d'altération des minéraux de serpentine. La fraction argileuse du sol de serpentine consiste en des minéraux primaires de type serpentine ou chlorite (Lee *et al.*, 2003 ; Chardot *et al.*, 2007 ; Kierczak *et al.*, 2007), des montmorillonites riches en Fe (Bonifacio *et al.*, 1997). Le sol contient aussi de magnésium d'une quantité moindre que dans la roche d'origine (Kierczak *et al.*, 2007). La perte de Mg lors de l'altération est causée par la dissolution ainsi que le lessivage dans un milieu humide riche en CO₂. La montmorillonite est un des colloïdes argileux secondaires caractéristiques du sol de serpentine (Wildman *et al.* 1968b).

Les sols contenant des argiles de type montmorillonite ont une texture lourde, retiennent l'humidité et sont difficilement cultivables. Les différences entre les matériaux parentaux des sols contenant de la péridotite et ceux contenant de la serpentine sont surtout liées à l'olivine aisément altérable et au pyroxène dans la péridotite qui libère beaucoup desoxy-hydroxydes de Fe dont l'oxydation produit une couleur rouge (Alexander, 2000) et favorise l'aggrégation des particules du sol et augmente la porosité du sol. En conséquence, l'infiltration et la conductivité hydraulique sont augmentées et l'érosivité est diminuée. Les sols développés sur matériaux parentaux composés de péridotite sont généralement plus friables que ceux dans les matériaux parentaux composés de serpentinite. La plupart du fer dans la serpentinite est sous forme de magnétite et de serpentine et donc ces sols contiennent moins de Fe libre que sur péridotite : la magnétite est très résistante à l'altération et la serpentine s'altère plus lentement que l'olivine et le pyroxène. La plupart des sols de serpentine sont colluviaux ou formés sur place au-dessus de la roche mère. Les matériaux parentaux dans ces sols sont des matériaux rocheux érodés et qui sont transportés vers le bas par la gravité. Les affleurements de serpentine sont souvent raides et relativement rocheux, ce qui les rend particulièrement vulnérables à l'érosion. Les sols de serpentine alluviaux sont occasionnels, ils sont rencontrés lorsque leurs sources des matériaux sont présentées exclusivement par des produits alluviaux provenant des péridotites et des serpentinites mélangés avec des alluvions des ruisseaux. Ces sols peuvent avoir un profil plus profond, une texture plus fine (Kruckeberg, 1984).

Tous les sols riches en magnésium ayant été formé sur les roches ultramafiques, ou sur leurs dérivés, classifient comme Vertisols, Les études, pourtant, ont révélé que Vertisols sont présents bien en Albanie et occupent environ 58,000 ha, ou environ 2 pour cent de la région totale du pays (Zdruli et al 1997).

1.6 Les Vertisols

L'ordre des *verfisols* a été créé pour tenter de regrouper les sols argileux dominé par les minéraux smectite argileuse qui sont trouvés dans un climat fortement saisonnier expose d'habitude des propriétés vertic. Les propriétés de Vertic sont une combinaison de (1) les craquements profonds, quand sec (2) slickenside se croisant dans le sous-sol (la surface luisante polie et amusée, produite par une masse de sol glissant devant un autre) (3) calez a formé agrégats structurel dans le sol (25 à 100 centimètres); (4) et une

structure forte, aux noisettes à la surface de sol. Souvent, ces sols montrent le soi-disant microrelief gilgai. Le profil granulométrique est donc homogène. Par contre, les structures sont très différentes du sommet à la base du pédon. Deux ensembles des processus est rattaché à la genèse de vertisols, la formation de smectite argileuse et du développement des caractéristiques physiques typiques (Breemen & Buurman 2003).

a) Les caractéristiques des Vertisols

Horizons: les concepts classiques d'horizons A et B ne s'appliquent pas aux vertisols puisque ces horizons sont brassés continuellement. Mais cependant, comme il y a un gradient de pression dans le sol, ne serait-ce qu'à cause de la pesanteur, les structures sont très différentes. De plus, certains caractères du sol : pH, saturation du complexe, humidité, ont des gradients verticaux comme d'ailleurs la température, et la matière organique. Il y a donc des horizons très différents dans les vertisols.

La structure est très développée dans tous les horizons des vertisols. En effet, la proportion d'argile est le plus souvent supérieure à 30 % et il s'agit en grande partie d'argile gonflante, généralement de la montmorillonite. Pendant les périodes sèches, le sol se fend et son horizon de surface prend une structure polyédrique fine. Les petits polyèdres tombent dans les fentes de retrait et quand le sol se réhumecte, l'apport de matière provoque après gonflement l'apparition de fortes pressions dans les horizons profonds. Ces pressions se traduisent par des déplacements des agrégats. Les agrégats des horizons profonds à structure large gardent la trace de ces glissements: leurs faces sont lustrées et striées (slickensides). Ces phénomènes entraînent une homogénéisation rapide du profil qui peut avoir de 50 centimètres à 2 mètres d'épaisseur.

Microrelief: ces mouvements se traduisent souvent en surface par le soulèvement de certaines parties du sol alors que d'autres restent en creux (microrelief Gilgai). Dans certaines régions du monde, les différences de niveaux peuvent atteindre plusieurs centimètres. Autour de la Méditerranée, on observe tout au plus le soulèvement de mottes de plusieurs décimètres cubes qui sont vite détruites par les pluies et les labours et qui ne donnent pas des microreliefs particuliers durables. La compression des agrégats augmente leur densité et ils sont difficilement pénétrables par les petites racines. Celles-ci sont souvent brisées ou écrasées par les agrégats soumis aux pressions de gonflement. La végétation qui les recouvre est surtout saisonnière (graminées, composées); les arbres sont très rares. En surface, les vertisols sont plastiques et collants

à l'état humide; par contre, à l'état sec, leur structure superficielle est finement polyédrique. Ils sont compacts et leur teneur en eau utilisable est faible pendant la saison sèche mais élevée en période humide.

La porosité varie considérablement de nature et d'intensité suivant l'état du pédon. A sec, la macro-porosité est considérable dans les horizons de surface et jusqu'à 60-80 centimètres. Plus bas, c'est surtout la fissuration verticale qui assure la pénétration de l'air et de l'eau. Par contre, la microporosité est faible. A l'état humide, les vertisols sont pratiquement imperméables.

Matière organique et couleur : Les vertisols ont en commun une couleur assez sombre, parfois noire, due, non pas à l'accumulation de la matière organique, mais à une fixation de petites quantités de celle-ci sur l'argile par un phénomène dans lequel le type d'argile et le fer semblent jouer un rôle important. La quantité totale de matière organique est de l'ordre de 2% (Duchaufe 1972), donc assez faible; mais la polymérisation de l'humus est très poussée et les noyaux phénoliques sont prépondérants, les chaînes aliphatiques peu développées. Les acides fulviques sont en faible proportion et dans les acides humiques ce sont les gris qui dominent. C'est le fer qui constitue avec la matière organique très polymérisée des liaisons spéciales : il est intégré dans les molécules d'acide humique gris ou d'humine (Nguye, 1973), et il se trouve sous une forme peu soluble. Malgré des teneurs importantes (2 à 6 %), ce fer est très difficilement extractible, même très probablement à l'état réduit. Le C/N varie de 10 à 14 en général.

La couleur : En clair, il s'agit de couleur : gris, gris foncé, surtout en surface et parfois gris olive en profondeur. Parfois, certains horizons franchement rouges présentent des faces de glissement et tous les caractères de structure des vertisols.

b) Dynamique minérale des Vertisols

L'origine des montmorillonites : l'héritage suffit parfois à expliquer la genèse des vertisols: c'est le cas notamment des argiles de certains étages, riches en argiles gonflantes ou d'alluvions et de colluvions provenant de bassins eux-mêmes couverts de vertisols ou possédant des affleurements d'argiles de ce type. C'est alors la transformation des argiles en milieu confiné qui amplifie la proportion de montmorillonites. Enfin, sur des roches cristallines basiques (basaltes, dolérites, péridotites), l'importante proportion des cations calcium et magnésium crée un milieu

d'altération confiné et la silice libérée réédifie facilement avec les charpentes alumineuses de minéraux gonflants. La présence de fer (abondant dans ces roches) facilite probablement cette néogénèse. D'ailleurs, le fer participe souvent à l'édification des silicates dans lesquels il est piégé (montronites). En résumé, dans les climats à saisons contrastées, il y a altération intense pendant la saison humide. Les ions libérés se concentrent à la saison sèche et donnent montmorillonite et sepiolite (Milot, 1971). Cette concentration peut avoir lieu sur place sur les roches basiques ou les marnes, ou bien dans les points bas du paysage.

Le devenir et le rôle du fer : on a déjà vu qu'il était complexé, insolubilisé, intégré aussi bien dans la matière organique que dans la matière minérale. Tous les travaux récents convergent pour confirmer ce piégeage du fer. Cela explique peut-être que la mise en évidence du fer ferreux que l'on s'attend à trouver dans des sols qui sont très engorgés à la saison humide soit très difficile. Ce qui est certain, c'est que, dans de nombreux vertisols des régions humides, on rencontre de petites concrétions globuleuses d'oxydes de fer (plomb de chasse), et que dans les vertisols topomorphes développés sur des matériaux alluviaux provenant de l'érosion de sols à sesquioxides, les grains de sable sont blancs et nus, le fer ayant été mis en mouvement sous une forme qui doit bien être la forme réduite et piégée comme dit plus haut.

c) Les Vertisols du bassin méditerranéen

Il existe deux grands types de vertisols autour de la Méditerranée: les vertisols topomorphes (ou à drainage externe réduit) et les vertisols lithomorphes à drainage externe possible) ([http : //ressources. Ciheam.org](http://ressources.Ciheam.org), Options méditerranéennes - No 25)

1. Les vertisols situés dans les basfonds sont les ***vertisols topomorphes***. Leur formation peut être due à des processus variés : dans certains cas, ils prennent naissance sur des alluvions ou sur des formations sédimentaires dont les argiles sont déjà originellement gonflantes. Elles peuvent alors provoquer les phénomènes successifs de gonflement et de rétraction qui sont à l'origine de la pédogénèse des, vertisols. Dans d'autres cas, la genèse de ce type de sol est due à une accumulation relative de cations bivalents : l'argilogénèse est alors orientée vers la formation d'argiles gonflantes.

2. Sur certaines roche-mères basiques le bilan général des cations bivalents peut être le même, mais pour des raisons différentes: c'est alors la vitesse de libération des cations et de la silice à partir des minéraux qui est plus rapide que leur exportation par drainage et il se forme aussi un vertisol. On dit alors qu'il s'agit d'un *vertisol lithomorphe*. Ce sont surtout les roches éruptives basiques, en particulier les basaltes, qui donnent naissance à ces derniers sols, ainsi que les marnes et les argiles, et cela d'autant plus facilement qu'elles contiennent, au départ, une certaine quantité de montmorillonites. Ce sont ces vertisols lithomorphes qui recouvrent les portions les plus stables des bassins tertiaires.

1.7 Localisation du Ni dans les sols

Le nickel (Ni) dans les sols peut provenir directement du matériel parental (lithosphère) et/ou indirectement par dépôt anthropogénique (Kabata-Pendias, 1983). Les teneurs naturelles en Ni des sols dépendent fortement du type de roche mère, et des processus d'altération intervenant tout au long de la formation du sol. Les sols à travers le monde contiennent des taux de Ni compris entre 0,2-1000 mg kg⁻¹ (Barceloux, 1999). Les sols dérivés des roches ultramafiques présentent les teneurs en Ni les plus élevées, généralement supérieures à 1 000 mg kg⁻¹ (Baker *et al.*, 1992). Ces sols peuvent en contenir jusqu'à 27 000 mg kg⁻¹ c'est le cas des sols latéritiques du Brésil développés sur les pyroxénites. (Becquer *et al.*, 2005). Les roches ultramafiques, en particulier, les péridotites et les serpentinites sont donc les sources principales de Ni dans les sols (Uren, 1992). Les péridotites contiennent d'importantes quantités de Ni (de l'ordre de 2 500 mg kg⁻¹). Les teneurs du Ni et la concentration de ce dernier dans les zones altérées sont contrôlées par la dissolution des olivines et des ortho-pyroxènes (phases porteuses de Ni) et par la migration du Mg et de la Si dans les phases liquides, le tout dépendant de l'âge et de la durée de ces processus d'altération. Les serpentinites sont plus stables que les olivines et les pyroxènes, elles relâchent moins de Ni et de Fe dans la zone altérée. Dans les sols très altérés issus de roches ultramafiques, la plupart du Ni est associé aux minéraux secondaires de la fraction fine du sol. Ces minéraux secondaires sont principalement des minéraux silicatés tels que la serpentine, les chlorites et des oxydes de Fe et de Mn (Becquer *et al.*, 2001 ; Massoura *et al.*, 2006, Becquer *et al.*, 2006). Dans les sols jeunes ou peu altérés, les minéraux primaires et essentiellement les serpentines contiennent l'essentiel du Ni des sols. Les concentrations totales en Ni ne

dépassent alors guère celles des minéraux primaires et de la roche mère en général (Chardot *et al.*, 2007 ; Kierczak *et al.*, 2007).

Le Ni peut se retrouver en grande partie dans la fraction organique des sols, au niveau des horizons de surface (Juste *et al.*, 1995). La fraction de Ni hydrosoluble qui correspond à la quantité de Ni mobile représente des risques écotoxiques, notamment pour les plantes (L'huillier et Edighoffer, 1996). Dans les sols ultramafiques, les teneurs du Ni en solution sont environ 100 fois supérieures aux concentrations rencontrées dans les sols non contaminés (Uren, 1992). Elles peuvent atteindre des niveaux supérieurs à 3 000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Anderson *et al.*, 1973). La présence et la nature chimique du Ni en solution sont influencées par la composition chimique de la phase solide du sol c'est-à-dire par sa réactivité vis-à-vis du Ni^{2+} (Uren, 1992). La forme ionique la plus stable du Ni est l'ion Ni^{2+} . Cette forme est majoritaire pour des $\text{pH} < 7$ ou il tend à exister sous forme hydratée $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (Uren 1992). Pour des $\text{pH} \geq 8$, Ni est essentiellement présent sous forme d'hydroxyde $\text{Ni}(\text{OH})_2$ ou de complexes organique ou inorganiques soluble (McGrath, 1995; Uren, 1992).

1.8 Caractérisation des phases principales porteuses de Ni dans les sols ultramafiques (serpentine)

a) Les serpentines

Les serpentines $[\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4]$ sont des phyllosilicates trioctaédriques, basées sur une structure à deux couches (argile 1:1), ou des couches tétraédriques siliceuses alternant avec des couches octaédriques magnésiennes (brucites). Les feuillets sont maintenus entre eux par des liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles des couches octaédriques et les atomes d'oxygène des couches tétraédriques. L'épaisseur de feuillets ne permet pas l'accès de l'espace interfoliaire aux molécules d'eau et aux cations; De plus, les substitutions au sein du réseau cristallin sont très limitées. La CEC est relativement faible en comparaison avec celle des argiles 2:1.

Les minéraux les plus communs des serpentines sont la lizardite, l'antigorite et le chrysotile. Pages (1968) a montré que ces trois espèces de serpentine se distinguent par leur composition chimique. Il existe des variations de la formule idéale $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ par les substitutions et le changement de l'état de valence : (1) l'antigorite contient plus de silice que le chrysotile ou la lizardite; (2) le chrysotile contient moins de Al_2O_3 ; (3) la lizardite a un rapport $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{FeO}$ plus élevé; (4)

l'antigorite contient moins de MgO et H₂O; (5) l'antigorite contient une quantité élevée des ions trivalents dans la coordination octaédrique.

La disponibilité du Ni dans ces minéraux est donc très faible car il se trouve en substitution du Mg dans le feuillet octaédrique. Seule la dissolution de ce dernier peut entraîner sa libération, cependant, les serpentines n'offrent pas de surfaces spécifiques réactives capables de réadsorber ces cations produits de la dissolution (Massoura *et al.*, 2006).

b) Les chlorites

Les chlorites, sont des phyllosilicates basés sur une structure à quatre couches (argiles 2:1:1) (Bailey, 1988; Olson *et al.*, 2000). Les chlorites sont caractérisés par la présence d'une couche octaédrique brucitique [Mg(OH)] supplémentaire, située entre les feuillets de type 2:1. La CEC des chlorites (10-40 cmol⁺ kg⁻¹) est faible en comparaison à celle des argiles 2:1. De plus, les chlorites sont caractérisés par une surface spécifique relativement faible (100-175 m² g⁻¹) car les molécules d'eau et les cations n'ont pas d'accès à l'espace interfoliaire. Dans les milieux fortement concentrés en Ni, la substitution du Mg et du Fe par le Ni peut conduire à la formation de chlorites nickélifères (Bailey, 1988).

La dissolution des couches brucitiques des chlorites conduit à la mise en solution du Mg, du Fe et des autres cations présents dans les octaèdres. Cette réaction conduirait à la transformation progressive des chlorites vers des vermiculites (Lee *et al.*, 2003). L'adsorption du Ni sur les vermiculites néoformées dépend du pH et de la force ionique de la solution en contact. Comme pour les autres cations métalliques, l'adsorption du Ni²⁺ est plus élevée lorsque le pH est élevé et la force ionique de solution est faible. La vermiculite peut ensuite évoluer en smectite trioctaédrique à forte CEC. Cette transformation serait due à l'oxydation du Fe(II) dans les couches octaédriques des vermiculites, qui conduirait à une perte de charge et à l'affaissement des espaces interfoliaires des vermiculites (Lee *et al.*, 2003).

c) Les smectites

Les smectites sont des phyllosilicates présentant une structure à trois couches (argiles 2:1). L'organisation des feuillets ne permet pas leur assemblage par des liaisons hydrogène. Aussi, l'épaisseur des feuillets est-elle variable. Les cations présents dans la solution du sol ont de ce fait facilement accès à l'espace interfoliaire. Les smectites regroupent plusieurs minéraux de même structure cristallographique. Ceux-ci diffèrent

par la présence ou l'absence de substitutions tétraédriques. En fonction du taux des sites octaédriques, les smectites peuvent être soit dioctaédriques (deux sites sur trois sont occupés par des cations trivalents (montmorillonites), soit trioctaédriques (l'ensemble des sites sont occupés par des cations bivalents (*e.g.* saponite). Les montmorillonites vraies n'ont aucune substitution tétraédrique à l'inverse des beidellites, qui en offrent de nombreuses. Ces dernières, relativement riches en aluminium ont des propriétés qui les rapprochent de celles des vermiculites. Les formes ferrifères de beidellites (nontronites), caractéristiques des vertisols formés sur basaltes, ont une couche octaédrique riche en fer (Pedro, 1987)

Les cations libérés pendant le stade initial de l'altération dans ces smectites sont principalement Si^{4+} dans les positions tétraédriques et Mg^{2+} ou Fe^{3+} dans les positions octaédriques. Les smectites ferrifères prédominent dans les sols bien drainés (Wildman *et al.*, 1968). Les smectites magnésiennes peuvent être formées à partir d'olivine dans les péridotites. Dans les sols bien drainés ou les bassins où le Mg^{2+} s'accumule, ce dernier peut devenir un cation dominant en position octaédrique.

Le Ni localisé au niveau des espaces interfoliaires de la montmorillonite est préférentiellement sous forme hydratée $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (Pitteloud *et al.*, 2001). Le processus de sorption dominant correspond à la formation de complexes de surfaces au niveau des sites des bordures de feuillets. La dissolution des smectites évolue généralement en deux temps (Metz *et al.*, 2005). Dans le premier temps, elle est caractérisée par un échange rapide des cations situés au niveau de l'espace interfoliaire (*e.g.* Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+}) avec la solution du sol. Dans les smectites à forte teneur en Ni, l'extraction du Mg est deux fois inférieure à celle du Ni (Voskresenskaya et Coliazo, 1983). Dans un second temps, la dissolution devient congruente.

d) Les oxy-hydroxydes de Fe et de Mn

Les oxyhydroxydes (de fer, de manganèse) constituent, avec les argiles, une fraction importante du complexe d'altération. Les oxyhydroxydes de fer résultent essentiellement de l'altération des minéraux ferro-magnésiens (biotites, amphiboles, pyroxènes) : les formes ioniques, solubles ou complexées, sont minoritaires, sauf dans les sols très acides ou mal aérés. Dans les milieux bien aérés et biologiquement actifs, le fer prend rapidement la forme d'oxyhydroxydes insolubles. L'évolution des formes amorphes vers les formes cristallisées est sous la dépendance étroite de la quantité de matière organique présente dans le milieu, celle-ci jouant le rôle de frein à l'égard du

processus de cristallisation. Les oxydes ferriques restent libres et s'intègrent peu aux feuillets des argiles (des exceptions doivent cependant être signalées : les montmorillonites ferrifères des vertisols, certaines chlorites). La forme ionique échangeable (Fe^{3+}) n'existe qu'exceptionnellement en milieu aéré ; elle évolue très vite vers les ions hydroxylés complexes- $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ non échangeables - voire les hydrates ferriques - $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -amorphes. En milieu réducteur, le fer ferreux Fe^{2+} échangeable est présent en quantité d'autant plus grande que le Eh est plus bas et le pH plus acide ; lorsque le Eh est très bas et le pH voisin de la neutralité, le fer ferreux s'accumule sous une forme insoluble, $\text{Fe}(\text{CO})_3$, ou celle de sel complexe. Dans les milieux aérés, en présence de mull, l'insolubilisation est immédiate, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ s'associe aux argiles sous la forme amorphe et cryptocristalline, et joue alors fréquemment le rôle de cation de liaison au sein des agrégats argile-fer-humus (brunification). Si l'humus est un moder ou un mor, l'abondance des composés organiques complexants favorise la formation de complexes mobiles, qui migrent en profondeur et s'insolubilisent en B, par polymérisation et biodégradation partielle de l'anion complexant. Le fer s'accumule dans l'horizon B sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$, amorphe. Lorsque la matière organique est peu abondante, la cristallisation des oxydes de fer amorphes est franche et rapide; elle est favorisée par les alternances d'humectation et dessiccation, et les températures élevées du pédoclimat ; les formes cristallisées, très colorées, donnent aux sols de climats chauds, leur couleur très vive. Ils sont présents sous deux formes cristallines principales : la goethite et l'hématite.

La **goethite** ($\alpha\text{FeO.OH}$) se forme dans les milieux encore soumis à l'influence de la matière organique. L'acidité du milieu, les températures encore modérées sont de facteurs favorables (Schwertmann et Taylor, 1989) la goethite résulte d'une cristallisation progressive, intervenant au fur et à mesure que la matière organique se biodégrade. La goethite est majoritairement présente sous forme de petits cristaux aciculaires, dont la longueur varie de quelques dizaines de nm à plusieurs μm . La surface de la goethite peut être chargée positivement ou négativement en fonction du pH du milieu. Le point de charge nulle est atteint dans la valeur de pH à 8.3. En dessous de cette valeur, le minéral est chargé positivement. Les cations métalliques qui ont un rayon ionique comparable à celui de Fe^{3+} (e.g. Al, Ni, Cr, Zn) peuvent se substituer au Fe dans la structure de la goethite (Kämpf *et al.*, 2000). Ainsi des cations de Ni^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} peuvent être incorporés dans la structure des goethites de synthèse en remplacement du fer (II ou III). La substitution du Fe par le Ni entraîne une distorsion

dans la structure du minéral (Manceau *et al.*, 2000) qui limiterait l'incorporation du Ni dans la structure des goethites naturelles et synthétiques. Des travaux sur une goethite de synthèse au contact d'un milieu aqueux en présence de Ni ont montré que la sorption du Ni sur le minéral dépend fortement du pH de la solution en contact. En dessous de pH 5, le Ni n'est pas sorbé sur la goethite. La sorption devient maximale aux environs de pH 7 (Marcusen *et al.*, 2003)

L'**hématite** ($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$) se forme dans les climats chauds, elle aussi est accompagnée de la goethite (Schwertmann et Taylor, 1989); elle résulte d'une cristallisation complexe.

Les phyllo-manganates sont des oxyhydroxydes de manganèse (OHM) composés d'unités octaédriques $\text{Mn}(\text{O},\text{OH})_6$ formant une structure en feuillets. Ce sont des composés généralement minoritaires dans les sols. Le Ni est présent au niveau des sites octaédriques où il peut par exemple se substituer au lithium dans la lithiophorite (OHM présent dans les sols ultramafiques). Dans les asbolanes de Co et de Ni, le Ni peut former des couches $\text{Ni}(\text{OH})_2$ en alternance régulière de couches MnO_2 , et éventuellement des couches CoOOH ou $\text{Co}(\text{OH})_3$ (Manceau *et al.*, 1987; Manceau *et al.*, 1992 ; Manceau *et al.*, 2000). Quantin *et al.* (2001) ont montré qu'un oxyde de Mn labile comme l'asbolane et/ou la lithiophorite peut être une source de Mn, Co et Ni par suite des processus de réduction bactérienne.

Le syndrome de serpentine

Les sols de serpentine sont ubiquistes, mais ils sont répartis de façon inégale. Cependant, quelques variations se produisent entre les sites. Whittaker (1954) a identifié trois traits communs : (a) une faible productivité des plantes, (b) un taux élevé d'endémisme et (c) des types de végétation distincts de ceux des zones voisines. En s'appuyant sur ces caractéristiques, Whittaker (1954) a divisé le problème des serpentines en trois parties: i) l'édaphique, ii) la réponse au niveau d'espèce (autécologie) et iii) l'effet au niveau de la communauté (synécologie). Le facteur édaphique en milieu de serpentine est multiple comprenant des composants chimiques, physiques et biotiques. Le facteur le plus influent sur la vie des plantes est probablement chimique (Kruckeberg, 1985). Les analyses chimiques de sols de serpentine ont montré que : (1) le niveau de Mg échangé est plus élevé que les autres cations ; (2) les niveaux de Ca sont plus faibles que ceux trouvés dans les sols non serpentiniques et le rapport Ca/Mg faible est généralement inférieur à 0,7 en surface des sols et considérablement plus faible dans le sous-sol ; (3) les niveaux d'azote, de potassium et de phosphore sont

inférieurs aux besoins des plantes cultivées ; (4) les métaux lourds tels que Cr et Ni sont souvent à des concentrations élevées, alors que le Mo peut être en concentration insuffisante pour la croissance des végétaux (Walker, 1954; Kruckeberg, 1954 ; Vlamis et Jenny, 1948 ; Brooks, 1987 ; Proctor et Woodell, 1975 ; Shallari *et al.*, 1998 ; Bani *et al.*, 2007).

Les conditions physiques des sols de serpentine sont « inhospitalières » pour beaucoup de plantes. Les sols de serpentine sont souvent raides et relativement rocheux, en les faisant particulièrement vulnérable à l'érosion, qui s'ensuit dans les sols peu profonds. Combinés, ces facteurs produisent un environnement peu humide et avec de faibles niveaux nutritifs (Kruckeberg, 2002 ; Proctor et Woodell, 1975 ; Walker, 1954). Par conséquent, dans ces sites, les plantes doivent souvent tolérer la sécheresse ainsi que les contraintes chimiques de la serpentine.

Biologiquement, les sites de serpentine accueillent fréquemment une flore différente de celle des régions voisines (Stevanović *et al.*, 2003). La couverture végétale pauvre favorise l'érosion ce qui induit des températures élevées au sol (Kruckeberg 2002), d'autant plus que les roches et les sols sont de couleur en général plus sombre que les sols environnants ce qui accentue la rétention de chaleur. L'ensemble des facteurs chimiques, physique et la composante biotique du facteur édaphique produit ce que Jenny (1980) a surnommé le "syndrome de serpentine", une expression illustrant le fait que, c'est l'effet cumulative de ces contraintes auxquelles la plante doit s'adapter.

1.9 Quelques problèmes de serpentines

a) Réponses morphologiques à la serpentine

Les espèces végétales adaptées aux sols de serpentine possèdent souvent des morphologies distinctes des espèces voisines non adaptées aux sites de serpentine. Premièrement, elles possèdent typiquement un feuillage xéromorphe avec des feuilles sclérophylles de taille réduite. Deuxièmement, le port des plantes tolérantes à la serpentine est peu développé en comparaison des analogues des sols non serpentiniques. Enfin, le système racinaire des espèces des sites de serpentine est souvent plus développé dans les sols de serpentine que dans les autres sols (Pichi-Sermolli, 1948, Ritter-Studnika, 1968 ; Krause, 1958)

b) Taux élevés d'endémisme

Les systèmes de serpentine sont, d'une part, définis par la présence d'un grand nombre des espèces endémiques. Cuba et la Nouvelle Calédonie présentent un taux élevé d'endémisme dans les sols de serpentine. A Cuba, 41% des espèces endémiques de l'ensemble des Caraïbes sont localisés sur les seuls sites de serpentine qui ne couvrent que 7% de l'île. Dans les Balkans, le nombre total des espèces endémiques est estimé comme supérieur à

2200 taxons. Dans ces ensemble, 335–350 taxons (15–16 %) ont été enregistrés en milieu de serpentine ce qui est supérieur à la part que représentent ces sols dans la surface totale des Balkans (Stevanović *et al.*, 2003). Des expériences ont montré que les espèces et les variétés tolérantes à la serpentine sont limitées aux sols de serpentine en raison de leur incapacité à s'adapter aux autres environnements (Kruckeberg 1950, 1954). Ainsi, au l'évolution de la tolérance à la serpentine a rendu les espèces incapables de recoloniser leur habitat historique. Ainsi, les espèces tolérantes à la serpentine sont souvent endémiques des régions de serpentine.

c) Types spécifiques de végétation

L'aspect final du problème de serpentine identifié par Whittaker (1954) inclut la structure et la distribution des communautés de serpentine. Les paysages de serpentine sont peut être les plus surprenants à cause du contraste très marqué au niveau de la végétation entre les sols de serpentine et les autres sols, offrant ainsi une discontinuité édaphique. Dans les cas extrêmes, les sites de serpentine sont infertiles, indiquant un fort gradient écologique avec les sites adjacents.

1.10 Mécanismes de tolérance à la serpentine

Le mécanisme de tolérance à la serpentine répond à la forte teneur en Mg et à la quantité insuffisante de Ca dans le sol. Il existe plusieurs mécanismes physiologiques et évolutifs supposés responsables de la « serpentine tolérance ».

a) Rapport Ca/Mg

Des auteurs ont attribué la faible productivité des sites de serpentine au faible rapport de Ca/Mg présent dans les substrats de serpentine. Le faible rapport de Ca/Mg (<1) étant typique des substrats de serpentine, il est souvent cité comme la caractéristique plus signifiante la différenciant des sols dérivés par les matériaux parentaux non serpentine (Kruckeberg, 1984; Roberts and Proctor, 1992; Burt *et al.*, 2001). La faible

concentration du Ca et le rapport molaire Ca/Mg exceptionnellement faible des sols de serpentine sont hérités de la riche minéralogie magnésique des matériaux parentaux de serpentine (Burt *et al.*, 2001; Roberts and Proctor, 1992). Il serait la principale cause du syndrome de serpentine, et les hautes concentrations en Mg accroissent le problème en diminuant la disponibilité du Ca. Cette hypothèse est soutenue par Kruckeberg, 1954 ; Walker *et al.* 1955, qui ont montré que la croissance des plantes de milieu non serpentinique dans un sol de serpentine augmente considérablement avec l'ajout de Ca. La faible productivité des sols de serpentine est due à la faible concentration en Ca et la forte concentration en Mg (Walker, 1948). Seules les espèces tolérantes à de faibles rapports Ca/Mg pourraient survivre sur les sols de serpentine. Les espèces tolérantes à la serpentine survivent dans les sols avec des niveaux faibles en Ca, car elles sont toujours en mesure d'absorber des quantités suffisantes de Ca sans accumuler des quantités excessives en Mg même pour les sols qui ont des concentrations faibles en Ca total (Walker *et al.*, 1955 ; Reeves *et al.* 1997 ; Lombini *et al.*, 1998; Shallari *et al.*, 1998). En fait, les niveaux en Ca dans les espèces de *Alyssum* sont considérés élevés même pour les plantes qui sont cultivées dans les sols où les concentrations de Ca sont beaucoup plus élevées.

b) Toxicité du magnésium

Les sols de serpentine contiennent des concentrations potentiellement toxiques en Mg, ce qui conduit certains chercheurs à conclure que Mg est la première cause du syndrome de serpentine (Brooks, 1987; Brooks et Yang, 1984; Mars et Proctor, 1976). La comparaison de deux variétés d'une espèce, l'une tolérante et l'autre de milieu non serpentinique, a montré des différences de sensibilité à la toxicité au Mg (Proctor, 1970). Le syndrome de serpentine ne résulte donc pas nécessairement de la limitation du Ca, mais à partir d'un niveau excessif de Mg, qui perturbe l'absorption de Ca par la plante. L'analyse des tissus d'espèces endémiques de serpentine au Zimbabwe a montré que la concentration du Mg était inversement proportionnelle aux concentrations de sept autres éléments (Al, B, Co, Fe, Mn, Na et P) (Brooks et Yang, 1984). Mais aucune corrélation entre les concentrations en Ca et Mg n'a été relevée. Cependant, ces données montrent que l'absorption du Mg est si coûteuse que celle des autres éléments nutritifs est contrariée. Brooks et Yang (1984) ont alors proposé que le niveau de Mg dans les sols de serpentine et son comportement hostile, vis-à-vis des autres éléments pourrait

être le facteur le plus important dans le syndrome de serpentine. Si une tolérance à Mg est nécessaire pour que les plantes survivent et que la tolérance à Mg est héréditaire, alors le Mg doit certainement être toxique pour la plupart des plantes aux niveaux présents dans les zones de serpentine (Brooks, 1987).

c) Exigence pour le magnésium

Une autre théorie physiologique expliquant le syndrome de serpentine s'appuie sur l'exigence vis-à-vis du Mg. Certaines plantes de serpentine nécessitent des concentrations plus élevées en Mg à l'extérieur et, dans certains cas, à l'intérieur que les populations homologues non serpentiniques (Marrs et Proctor 1976). Main (1974) a montré que les variétés de serpentine de *Agropyron spicatum*, lorsqu'elles sont cultivées sur des substrats à des niveaux élevés de Mg, ont maintenu de plus faibles concentrations en Mg dans leurs tissus que les variétés de milieux non serpentiniques. Des concentrations plus élevées en Mg dans le sol sont donc nécessaires pour que la variété de serpentine acquière une quantité adéquate de l'élément. De même, *Poa curtifolia* (*Poaceae*), une endémique de serpentine, exige un niveau anormalement élevé en Mg à l'extérieur ainsi qu'à l'intérieur pour une croissance optimale (Main, 1981). La croissance de cette plante est positivement corrélée avec la concentration en Mg dans les pousses et négativement corrélée avec les niveaux en Ca. Des variétés d'*Agrostis stolonifera* tolérantes à la serpentine requièrent aussi plus de Mg et contiennent des niveaux internes plus élevés en Mg que les autres variétés (Marrs et Proctor, 1976). Enfin, Proctor & Woodell (1975) suggèrent que des études montrant des exigences anormales pour Mg par certaines espèces tolérantes à la serpentine, les concentrations létales pourraient donner un aperçu sur l'endémisme de serpentine en définissant les conditions qui restreignent les plantes tolérantes à la serpentine.

Bases physiologiques de la tolérance à la serpentine.

Il est crucial de décrire le rôle du Ni, les caractéristiques du transport et de la distribution de Ni^{2+} , ainsi que ses effets sur les divers processus physiologiques. Le Ni suscite un intérêt particulier en raison de l'existence de nombreux hyperaccumulateurs de cet élément déjà identifiés dans plus de 35 familles botaniques.

1.11 Rôle physiologique du Ni dans les plantes supérieures

Le Ni détient une place particulière parmi les métaux lourds. A la différence de Cd, Pb, Hg, Ag et d'autres métaux qui ne sont pas des composants des enzymes dans plantes, Ni intervient dans le métabolisme de l'azote chez les Légumineuses. Il est essentiel pour

les plantes à concentration faible (0.01 to $5\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) pour certaines espèces. De nombreuses expérimentations utilisant diverses espèces ont été effectuées afin de montrer que le Ni et urease sont essentiels pour les fonctions vitales de la plante. La déficience en Ni induit une telle déficience qui dérègle le métabolisme de l'azote et conduit ainsi à et a causé l'accumulation de niveaux toxiques d'urée dans les tiges; phenotypically un tel processus a été manifesté comme necroses dans les bouts de feuille ou le chlorose dans les feuilles plus vieux (Welch *et al.*, 1981 ; Walker *et al.*, 1985 ; Gerendas *et al.*, 1997 ; Gerendas *et al.*, 1999 ; Dalton *et al.*, 1985). Urease joue un rôle important dans la germination de graine (Das *et al.*, 1978, Zonia *et al.*, 1995). Les concentrations bas de Ni ont été montrées pour promouvoir la germination de graine dans le riz, le blé, l'herbe de timothy, le petit pois, le haricot, la graine de soja et le lupin. Dans quelques légumineuses, de petites quantités de Ni sont essentielles pour la croissance de nodule de racine et l'activation hydrogenase.

Le fait que plusieurs activités d'enzyme dépendent de la présence de l'ion Ni peut expliquer les effets de faibles concentrations sur la croissance de la plante et le développement d'espèces telles que le coton, le poivre doux, la pomme de terre, la tomate et le chanvre chinois (Welch *et al.*, 1991 ; Gerendas *et al.*, 1997 ; Gerendas *et al.*, 1999 ; Gerendas *et al.* 1997). De cette manière les plantes supérieures ont besoin de Ni, et par conséquent, Ni peut être classé parmi les micronutriments essentiels.

La toxicité de Ni aux concentrations élevées a été démontrée par de nombreuses expérimentations. Les niveaux critiques de la toxicité sont $>10 \text{ mg.kg}^{-1}$ DW pour les espèces sensibles et $>50 \text{ mg kg}^{-1}$ dw pour celles modérément tolérantes (Bollard, 1983; Asher, 1991). Il est évident que l'intervalle adéquate pour le nickel entre le niveau inférieur ($0.01\text{-}0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ dw) et le niveau critique supérieur ($>10 \text{ mg kg}\pm 1 \text{ dw}$) est extrêmement large comparé aux autres éléments comme Cu. Pour les espèces sensibles, la croissance des racines est affaiblie par le Ni, même au dessous de 5 mM , quand l'alimentation en Ca^{2+} est inadéquate (Gabbrielli *et al.*, 1990).

1.12 Assimilation du Ni par les plantes

La voie principale d'assimilation de Ni est l'absorption par les racines. Elle concerne la forme ionique du métal. Après solubilisation du Ni au sein de la rhizosphère l'absorption du Ni^{2+} par les racines peut procéder de la diffusion passive et du transport actif (Morel, 1985 ; Hopkins 2003). L'importance entre les voies passive et active dépend de la concentration du Ni^{2+} dans la solution nutritive (Temp *et al.* 1991). Le

transport actif est plus important aux concentrations faibles en Ni^{2+} (inférieures à 34 μM). Aux concentrations élevées, le transport passif s'accroît grâce à l'effet toxique du Ni vis-à-vis des cellules racinaires (Temp *et al.* 1991). Les voies de transport du nickel à travers la membrane plasmique peuvent être multiples et s'additionner. Elles peuvent être facilitées par différents transporteurs à différentes affinités et par divers canaux plus ou moins spécifiques à certains cations. Pour le nickel, plusieurs voies ont été identifiées chez différentes espèces hyperaccumulatrices par l'intermédiaire de tests de compétition ionique: les canaux à Ca^{2+} (Boyd, *et al.*, 1998 ; Ehlken *et al.*, 2002) et les transporteurs à Zn^{2+} et à Co^{2+} chez *Alyssum bertolinii* (Gabbrielli et Pandolfini, 1984) ; les transporteur à Zn^{2+} et à Fe^{2+} chez *Thlaspi montanum* (Boyd et Martens, 1998). En effet, ces ions présentent des caractéristiques similaires : double charge positive et rayons ioniques très proches. La majorité des transporteurs appartiendraient à la famille de transporteurs ZIP (protéines de transport du zinc et du fer) (Guerinot, 2000 *in* Hall et Williams, 2003). Chez les graminées (chez les monocotylédones), l'assimilation de Ni^{2+} ainsi et d'autres métaux lourds peut également être facilitée par les phytosidérophores (Kochian *et al.*, 2000). Dans leur étude, Skiker *et al.* (2007) ont travaillé sur les mécanismes à court terme qui régissaient l'entrée du métal dans la racine. La forte proportion de nickel adsorbé échangeable et la faible proportion de nickel symplasmique observées chez *Leptoplax emarginata* laisse supposer que l'hyperaccumulation chez cette espèce implique des mécanismes favorisant la présence de Ni autour des racines et mettant probablement en jeu le rôle de la paroi comme lieu de stockage ou/et de translocation vers les feuilles. La fonction de prélèvement de Ni des racines de *Zea mays* et de *Leptoplax emarginata* peut être décomposée en deux : une fonction d'adsorption sur les parois pecto-cellulosiques et une fonction d'absorption dans le symplasme (Skiker *et al.*, 2007). Aucun transporteur spécifique du Ni^{2+} n'a été décrit. Néanmoins, ce processus peut utiliser de divers transporteurs non spécifiques. Les facteurs plus importants qui affectent l'assimilation du métal par les plantes sont l'acidité, leur capacité d'échange des cations, les contenus en substances organiques, le potentiel d'humidité, la composition granulométrique et les concentrations des macros et micronutrients (Kukier *et al.*, 2004).

1.13 *Distribution et accumulation du Ni dans les organes des plantes*

Les plantes varient selon leur capacité à accumuler les métaux lourds. L'accumulation des métaux dans les organes des plantes dépend largement de leurs caractéristiques morpho-physiologiques. Les plantes peuvent être réparties en trois groupes (Baker *et al.*, 1981): (1) les **accumulateurs** capables de concentrer les métaux malgré des concentrations faibles dans le sol ; (2) les **indicateurs**, qui présentent des concentrations en métaux reflétant celles dans le sol et (3) les **excluantés**, qui tendent à limiter le transfert des métaux dans les parties aériennes quelle que soit la concentration dans le milieu.

Un quatrième groupe de plantes, beaucoup plus réduit en nombre, concerne des espèces qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité à accumuler des quantités considérables de métaux dans les tissus de leurs parties aériennes. Il s'agit des **hyperaccumulateurs**. Les hyperaccumulateurs sont définis comme des plantes qui contiennent dans leurs tissus plus de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ poids sec de Ni, Co, Cr, ou Pb, ou plus de $10000 \mu\text{g/g}^{-1}$ poids sec de Zn ou Mn (Tableau 1; Baker et Brooks, 1989). Pour le Ni, au moins 400 hyperaccumulateurs ont été identifiés. L'hyperaccumulation du Ni est un mécanisme qui pourrait conférer aux plantes la capacité de survivre dans les sols de serpentine. Cependant, la majorité des espèces tolérantes aux milieux de serpentine ne fait pas partie de cette catégorie (Proctor, 1999).

Les concentrations des métaux obtenues par la production naturelle des espèces hyperaccumulatrices peuvent être 100-1000 fois que celles obtenues par la production des plantes non accumulatrices cultivées dans les mêmes substrats. Les plantes hyperaccumulatrices peuvent être effectives dans la phytoextraction des éléments particuliers dans les sols contaminés ou minéralisés (Lasat 2002; McGrath *et al.*, 2002; Schwartz et al 2003 ; Chaney *et al.*, 2005; Chardot *et al.*, 2005 ; Banuelos, 2006 ; Bani *et al.*, 2007)). La définition la plus largement acceptée concernant « l'hyperaccumulateur » utilisant le Ni comme exemple est : « ... une plante où la concentration de Ni d'au moins de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ a été enregistrée dans la matière sèche de chaque tissu du sol ci-mentionné pour au moins un spécimen cultivé dans ses habitats » (Jaffré *et al.*, 1976). En 1885, Baumann a identifié les plantes capables d'accumuler de hauts niveaux peu communs en Zn. En 1935, Byers a étudié l'accumulation de sélénium

dans *Astragalus* spp. Une décade plus tard, Minguzzi et Vergnano (1948) ont identifié les plantes capables d'hyperaccumuler jusqu'à 1% Ni dans les parties aériennes. Plus tard, Rascio (1977) a signalé la tolérance ainsi que l'accumulation élevée dans les parties aériennes de *T. caerulescens*. En dépit de l'existence rapportée d'hyperaccumulateurs de Co, de Cu, et de Mn, l'existence de plantes hyperaccumulantes des métaux autres que Cd, Ni, Se, Hg et Zn a été mise en question et demande une nouvelle confirmation (Salt et al. 1995).

Tableau 1. Concentrations seuils pour la définition d'espèces hyperaccumulatrices pour chacun des éléments (Reeves *et al.*, 1995)

Elément	Gamme de concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$).	Concentration limite inférieure l'hyperaccumulation ($\mu\text{g g}^{-1}$).
Cadmium	0,03 – 20	100
Cobalt	0,05– 50	1000
Cuivre	1 – 100	1000
Manganèse	5 – 2000	10,000
Ni	0,2 – 100	1000
Sélénium	0,01 – 10	100
Zinc	5 – 2000	10,000

Le mécanisme d'hyperaccumulation fait l'objet d'hypothèses contradictoires. Ainsi, Boyd et Martens (1998) présument que les hyperaccumulateurs possèdent le système le plus efficace d'absorption des ions Ni^{2+} mais dont les fonctions sont inconnues jusqu'à présent. Parmi les hypothèses proposées, l'hyperaccumulation serait comme un mécanisme conférant la **tolérance** à des niveaux élevés de métaux dans l'environnement ; dans ce cas, le métal absorbé serait transféré dans les compartiments d'activité physiologique faible ou dans les organes caducs (feuilles) des plantes (Brooks *et al.* 1998). L'hypothèse de la **résistance à la sécheresse** prétend que l'accumulation de Ni dans les tissus des plantes pourrait augmenter la tolérance au déficit de l'humidité en réduisant la transpiration cuticulaire (Boyd et Martens 1998b ; Brooks *et al.*, 1998). Selon l'hypothèse de l'**allélopathie** élémentaire, les organes caducs avec un contenu élevé en métaux lourds tels enrichirait la surface du sol en métaux, empêchant la

croissance d'espèces non tolérantes aux métaux lourds (Boyd et Martens 1998b ; Brooks *et al.*, 1998 Boyd *et al.*, 2001). Selon l'hypothèse la plus largement acceptée, les concentrations élevées en métaux dans l'épiderme des tissus végétaux pourraient détourner la pénétration et la propagation des microorganismes pathogènes. Cette hypothèse soutient le point de vue selon lequel les plantes hyperaccumulatrices ont l'avantage par rapport aux espèces non accumulatrices de dépenser moins d'azote et de carbone pour les substances organiques telles que les tannins et les composés phénoliques pour la protection des tissus contre les herbivores, le plus souvent des insectes (Boyd et Martens, 1998b ; Brooks *et al.*, 1998 ; Davis *et al.* 2001 ; Sagner *et al.*, 1998 ; Davis *et al.*, 2000). Cependant, il existe plusieurs cas d'insectes adaptés et inféodés strictement aux plantes hyperaccumulatrices de Ni . C'est le cas de *Chrysolina pardalina*, un coléoptère qui se nourrit exclusivement de l'hyperaccumulateur *Berkheya coddii* (Migula *et al.*, 2007) et possédant un mécanisme d'excrétion du Ni lui permettant de résister aux fortes concentrations de l'aliment ingéré.

Cependant, lorsque l'accumulation du Ni dépasse la limite caractéristique, les mécanismes de détoxification qui maintiennent faibles les concentrations des métaux dans les plantes deviennent plus efficaces.

1.14 *Distribution du Ni dans les tissus des hyperaccumulateurs*

Le Ni dans les plantes hyperaccumulatrices est principalement localisé dans les parties aériennes (Severe *et al.*, 1974 ; Sagner *et al.*, 1998 ; Kupper *et al.*, 2001 ; Nabais *et al.*, 1996 ; Psaras *et al.*, 2001 ; Chardot *et al.*, 2007). Ainsi, pour l'hyperaccumulateur *Thlaspi pindicum* sur sol de serpentine, Ni est présent principalement dans l'enveloppe des grains avec une accumulation maximale dans l'épiderme et une quantité plus faible dans les cellules du mésophylle et les cotylédons (Psaras *et al.*, 2001 ; Brooks 1998 ; Shallari, 1997). En général, le Ni est retrouvé dans l'épiderme des feuilles, comme par exemple pour *Hybanthus floribundus* (Severne *et al.*, 1974), *T. montanum* (Heath *et al.*, 1997), et d'autres espèces du genre *Alyssum* (Broadhurst *et al.*, 2004). L'accumulation de Ni dans l'épiderme de *H. floribundus* diminuerait la transpiration cuticulaire conférant à la plante une adaptation xéromorphique (Severne *et al.*, 1974). La distribution de Ni dans différentes cellules épidermiques n'est pas uniforme. Chez *Th. montanum*, Ni est surtout dans les cellules auxiliaires, alors qu'il est absent dans les cellules stomatales de garde et cellules de base (Heath *et al.*, 1997). De même, les cellules épidermiques des feuilles de *Th. goesingense* contiennent plus de Ni que les

petites cellules entourant le complexe stomatal et les cellules de garde. Les mécanismes d'une telle distribution ainsi que de leur signification physiologique sont inconnus.

A l'intérieur des cellules, les hyperaccumulateurs *T. goesingense*, *A. bertolonii*, et *A. lesbiacum* accumulent le Ni surtout dans les vacuoles des cellules épidermiques. A l'aide de la coloration au diméthylglyoxime de petites quantités de Ni sont observées à la base des trichomes dans les espèces d'*Alyssum* (Kupper *et al.*, 2001). De son côté, l'hyperaccumulateur *Sebertia acuminata* accumule Ni surtout dans les tissus des vaisseaux de la tige et dans les fruits, à un niveau de 1,15% MS dans le phloème et 13% dans le xylème (Sagner *et al.*, 1998). L'accumulation du Ni dans les tissus de l'épiderme pourrait aussi résulter du flux de transpiration vers les stomates et donc vers l'épiderme des feuilles. Une telle hypothèse s'appuie sur le fait qu'il a été montré que d'autres métaux lourds sont non spécifiquement accumulés dans les épidermes et les trichomes (Seregin 2001).

1.15 Transport du Ni dans les plantes

Le modèle de l'accumulation de Ni dans les parois des cellules et les protoplastes de tous les tissus de racine présume que Ni est transféré par les deux voies apoplasmique et symplasmique. Les Brassicacées hyperaccumulatrices ont été étudiées comme modèles des plantes hyperaccumulatrices jusqu'à ce jour. Les résultats suivants proviennent presque essentiellement d'espèces de Brassicacées. Lorsque le Ni atteint le xylème par transport radial, il est transporté avec la sève dans le xylème (Temp *et al.*, 1991 ; Sagner *et al.*, 1998 ; Kramer *et al.*, 1996). En plus de sa forme ionique, Ni est transféré vers les parties aériennes sous forme de complexes de citrate et malate (Temp *et al.*, 1991 ; Sagner *et al.*, 1998 ; Kramer *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1997 ; Persans *et al.*, 1999 ; Kerkeb *et al.*, 2003 ; Montargès-Pelletier *et al.*, 2008). Outre les acides organiques, certaines espèces comprennent des complexes hydratés (Lee *et al.*, 1997 ; Kersten *et al.*, 1980) ainsi que des complexes de Ni avec l'histidine (Kramer *et al.*, 1996 ; Persans *et al.*, 1999). Le rôle de l'histidine dans la fixation de Ni dans les plantes hyperaccumulatrices est largement discuté. L'histidine serait impliquée dans les mécanismes de tolérance de l'*A. lesbiacum* à haute concentration de Ni (Kramer *et al.*, 1996). Le modèle inverse a été observé avec un autre hyperaccumulateur, *Th. goesingense*, où l'histidine ne contribue pas aux mécanismes de l'hyperaccumulation de Ni et de détoxification, cependant la molécule pourrait jouer un rôle dans le transfert de Ni (Persans *et al.*, 1999). Pareillement, l'histidine n'est pas associée au Ni dans les parties aériennes et

racinaires de trois espèces ayant été cultivées en présence de terre pendant plus de 5 mois : *A. murale*, *Leptoplax emarginata* et *T. caerulescens*.

Le transport du Ni à longue distance implique le xylème et le phloème. Le taux de transport de longue distance du métal est différent pour de différentes espèces de plantes. Par la baisse du taux de métaux transportés, les plantes excluantes peuvent réduire l'effet toxique. La fixation des ions métalliques dans la sève de xylème peut produire un mécanisme non spécifique de détoxification et du transport de métaux lourds pour l'accumulation et le transfert sans manifestations évidentes de toxicité. A son tour, l'efficacité du système de chélation dépend des espèces végétales et de leur métabolisme spécifique ainsi que de l'affinité des ions métalliques pour les agents chélateurs. Cette dernière caractéristique est définie par la stabilité constante du complexe correspondant.

Toutefois, des taux similaires de transport de métaux à partir des racines aux pousses ont été observés dans la plante tolérante *Th. goesingense* et la plante sensible *Th. arvense* cultivées pendant 12 h dans la solution nutritive avec du Ni^{2+} non toxique d'une concentration de 10 μM (Kramer *et al.* 1997). Il en résulte que la capacité des espèces hyperaccumulatrices de concentrer de Ni dans leurs parties aériennes s'appuie sur des mécanismes plus efficaces de détoxification que ceux des non-accumulateurs.

1.16 Localisation intracellulaire de Ni

Dans les espèces hyperaccumulatrices *A. serpyllifolium*, *A. bertolonii*, *A. lesbiacum* et *Th. i goesingense*, Ni est principalement localisé dans les vacuoles des cellules épidermales sous forme de complexes avec des acides organiques. En conséquence, la plupart du Ni est transférée dans un compartiment métaboliquement inactif. Tel compartimentage illustre un mécanisme non spécifique de désintoxication des métaux lourds (Kramer *et al.* 1997 ; Kupper *et al.* 2001 ; Brooks *et al.* 1981). Entre temps, dans le cas d'autres hyperaccumulateurs, *Hybanthus floribundus*, un contenu élevé en Ni a été retrouvé dans les parois cellulaires où Ni est fixé aux pectines (Raskin *et al.*, 2000). La fixation des ions métalliques aux composants de la paroi cellulaire dépend de l'affinité des ions métalliques pour l'acide polygalacturonique. La capacité des parois des cellules pour fixer les métaux peut générer une tolérance des plantes pour les métaux lourds. La capacité d'accumuler du Ni dans les vacuoles sous forme de complexes avec des acides organiques définit également la tolérance des plantes pour des niveaux élevés de Ni dans l'environnement. Apparemment, la compartimentation de Ni dans les vacuoles

rend les espèces de plantes plus tolérantes au Ni (Kramer *et al.*, 2000). Les plantes *Thlaspi* ont été cultivées dans la culture de sol avec l'addition de 2 g de Ni (sous forme de NiSO_4) par kg de sol pour une période de 86 jours, les plantes *Alyssum* ont été cultivées pour une période de 64 jours avec un contenu en Ni de 4 g/kg de sol (Kupper *et al.* 2001). La microanalyse aux rayons X de ces plantes a établi l'accumulation prédominante de Ni dans les vacuoles des cellules d'épiderme des feuilles. Les contenus de Ni ont été plus faibles dans la paroi cellulaire et le cytoplasme. Les variations spécifiques d'espèces dans la distribution intracellulaire de Ni peuvent résulter de différentes concentrations de sel et des périodes d'exposition. Le transfert des ions métalliques ou de leurs complexes dans la vacuole peut dépendre des transporteurs caractéristiques des protéines situés dans le tonoplaste. Ces transporteurs ont été trouvés dans *T. goesingense* et nommé *TgMTPs* (*Thlaspi goesingense* Metal tolerance Proteins). Protéines *TgMTP1t1* et *TgMTP1t2* sont codés par la séquence d'ADN *TgMTP1* et diffère dans la séquence d'acides aminés de domaine riche de l'histidine et liaison de métal, qui affecte la spécificité du métal de ces transporteurs. Ainsi, l'expression *TgMTP1t1* dans les cellules de levure transformées engendre une tolérance pour Cd, Co, et de Zn, tandis que l'expression *TgMTP1t2*, pour Ni. Par rapport aux espèces non accumulatrices *T. arvense*, *Arabidopsis thaliana* et *Brassica juncea*, le hyperaccumulatrice *T. goesingense* a maintenu un haut niveau de l'expression *TgMTP1* lançant le transfert de Ni dans la vacuole et produisant une désintoxication réussie de Ni (Persans., *et al* 2001). Dans les hyperaccumulateurs *A. murale* (Gries *et al.* 1998) et *A. lesbiacum* (Ingle, 2002), un antiport $\text{Ni}^{2+}/\text{H}^{+}$ sur le tonoplaste a produit une assimilation rapide de Ni^{2+} dans la vacuole. Par l'accumulation prédominante dans la cellule de protoplastes, Ni fondamentalement diffère de cadmium et de plomb, qui sont principalement liés par les composants de la paroi cellulaire. Désormais, le problème du transport de Ni à travers de la cellule plasmalemma à la cellule exige des recherches plus approfondies. La formation dans les vacuoles des complexes de Ni faible-soluble avec des acides organiques peut être considérée comme un mécanisme de détoxification. De plus, la tolérance des espèces hyperaccumulatrices peut dépendre de l'efficacité des transporteurs tonoplastes exliquant l'entrée de Ni dans la vacuole.

Phytoextraction du Ni dans le sol et les facteurs contrôlant la disponibilité du Ni

1.17 *Phytoextraction de Ni*

La phytoremédiation, ou l'utilisation des plantes pour la gestion de problèmes environnementaux, est une technologie émergente de décontamination. La phytoremédiation en tant que technologie environnementale de décontamination a initialement été proposée pour la décontamination des sols contaminés par les métaux (Utsunomyia, 1980; Chaney, 1983; Baker *et al.* 1991). Pour exploiter le potentiel des plantes pour la décontamination des sols et des eaux usées, différentes formes de phytoremédiation sont proposées. La phytoextraction est une technologie en voie de développement qui utilise les plantes pour absorber les éléments de sols contaminés ou minéralisés. De plus, elle stocke les métaux dans les parties aériennes qui pourraient être après récoltées pour récupérer les métaux accumulés (Chaney *et al.* 2007 ; Schwartz *et al.*, 2003). Le but de la phytoextraction est de réduire la concentration des métaux dans les sols contaminés à des niveaux maîtrisables dans une durée compatibles avec les contraintes socio-économiques et de pression foncière sur les terrains. Le processus d'extraction dépend de la capacité des plantes sélectionnées en fonction de leur capacité à accumuler les métaux sous des conditions climatiques ainsi que sous des conditions du sol spécifiques. Deux approches sont actuellement utilisées en phytoextraction. La première utilise des plantes hyperaccumulatrices, qui ont une capacité exceptionnelle d'accumuler naturellement les métaux. La seconde repose sur l'utilisation de plantes accumulatrices à forte production de biomasse. L'idée d'utiliser des plantes pour extraire des métaux des sols contaminés a été développée par Utsunomyia (1980) et Chaney (1983), et les premiers essais sur terrain de phytoextraction avec des hyperaccumulateurs (*T. caerulescens*) de Zn ont été réalisés en 1991 (Baker *et al.*, 1991). Puis la découverte de plantes hyperaccumulatrices de Cd (Schwartz et Morel, 1998) a permis de démontrer l'intérêt de cette technique pour abaisser le risque lié à la contamination des sols par ce métal (Shallari *et al.*, 1998; Schwartz 1998 ; Gérard *et al.*, 2001 ; Schwartz *et al.*, 2003). Dans les dix dernières années, de nombreux travaux ont été conduits afin d'étudier les mécanismes d'extraction des métaux et leur contrôle. Les hyperaccumulateurs de métaux possèdent un potentiel génétique valorisable pour la phytoextraction des sols contaminés ou minéralisés (Lasat, 2002; McGrath *et al.*, 2002;

Chaney *et al.*, 2005; Banuelos, 2006 ; Shallari 1998; Schwartz *et al.*, 2006 ; Chardot *et al.*, 2007 ; Bani *et al.*, 2007).

La contamination de Ni est problématique dans plusieurs sols où les boues de station d'épuration ont été utilisées pour modifier le sol (McGrath et Smith, 1990). Les émissions par les raffineries et fonderies de Ni ont aussi augmenté les concentrations de Ni (et de Co) dans les sols. Les récoltes de végétaux cultivées dans ces sols ayant un pH acide ont montré des symptômes visuelles de phytotoxicité de Ni. De plus, les rendements de plusieurs récoltes de végétaux sensibles à Ni ont considérablement été réduites apparemment à cause de la présence des contaminants du sol (Frank *et al.* 1982). Dans de tels cas, la remédiation peut être nécessaire pour atteindre des standards normaux. La phytoextraction de Ni par les plantes hyperaccumulatrices est une méthode potentielle de remédiation de ces sols (Chaney *et al.* 1998; Li *et al.* 2000). La deuxième méthode qui a été utilisée est l'utilisation des plantes récoltées d'une biomasse élevée telles que le maïs, l'orge, les pois, l'avoine, le riz et la moutarde Indienne avec une avec une méthode chimiquement améliorée pour phytoextraction (Huang *et al.* 1997; Salt *et al.* 1998; Lombi *et al.* 2001). Les caractéristiques principales de deux systèmes de phytoextraction sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2. Les caractéristiques principales de deux stratégies de la phytoextraction de métaux des sols.

La phytoextraction est chimiquement assistée	La phytoextraction est naturelle
Les plantes normalement rejettent les métaux	Les plantes hyperaccumulent naturellement les métaux
Les plantes sont d'une biomasse élevée et d'une croissance rapide	Les plantes sont d'une croissance lente et d'une faible biomasse
Les chélateurs synthétiques et les acides organiques sont utilisés pour faire augmenter l'assimilation de métaux	Une capacité naturelle pour extraire des quantités élevées de métaux des sols
Les modifications chimiques augmentent le transfert de métaux des racines aux pousses	Translocation efficace de métaux des racines aux pousses
La tolérance faible aux métaux; l'augmentation d'absorption conduisent à la mort de la plante	Une tolérance élevée ; une survie avec des concentrations élevées de métaux dans les tissus
Risque de lixiviation de métaux vers les écosystèmes aquatiques	Pas d'inconvénient environnemental concernant la lixiviation de métaux

1.18 Facteurs contrôlant la disponibilité et la phytoextraction du Ni des sols

Quoique les plantes hyperaccumulatrices aient une capacité extraordinaire à assimiler les métaux lourds, cette assimilation dépend de la biodisponibilité de métal dans le sol et particulièrement de ravitaillement de fractions moins disponibles pour les plantes (McGrath *et al.* 1997) et (Wenzel *et al.* 2003 ; Shallari *at al.*, 1998, Echevarria *et al.*, 1998 ; Gerard *et al.*, 2001 ; Shallari *et al.*, 2001, Chardot *et al.*, 2005). La disponibilité de Ni dans le sol et le transfert subséquent dans les plantes dépend de leur origine minéralogique (Kabata-Pendias, 1993, Massoura *et al.*, 2006 ; Chardot *et al.* 2007), ainsi que des caractéristiques du sol telles que le pH, le Eh, le contenu en matière organique et argile (Baker et Walker, 1989 et Nyamangara et Mzezewa, 1999). Les réservoirs importants de métaux dans les sols comprennent les métaux échangeables et organiquement bondés, les métaux associés au manganèse et aux oxydes de fer. La disponibilité aux plantes est dirigée par un équilibre dynamique incluant ces fractions, un peu plus que par le contenu en métaux totaux.

a) Rôle du matériel parental

La disponibilité du Ni dans les sols où le métal est hérité du matériel parental est principalement influencée (i) par les phases porteuses de Ni résultant des conditions climatiques et l'histoire d'altération du sol et (ii) par la spéciation du Ni au sein de la structure du minéral (Becquer *et al.* 2001; Quantin *et al.* 2001) Massoura *et al.*, 2004). Massoura *et al.*, (2006) ont confirmé que la disponibilité de Ni dans les sols est en général élevée lorsque le Ni est associé aux phyllosilicates (par ex. les smectites) ou les oxydes de fer pauvrement cristallisées. La disponibilité de Ni est extrêmement faible dans les sols ultramafiques fortement altérés alors que les oxydes de fer bien cristallisées sont la phase principale produisant de Ni, comme dans les latérites ultramafiques (Massoura *et al.* 2006). En particulier, l'association de Ni avec les oxydes de Fe amorphe et avec les argiles secondaires d'une échange élevée sont les facteurs principaux de la disponibilité de Ni dans les sols ultramafiques (Massoura *et al.*, 2006, Chardot *et al.*, 2007). Dans les sols où le Ni est d'une origine anthropique, le pH, la capacité de rétention de minéraux et les types de minéraux contrôleront la disponibilité du métal dans l'environnement.

b) Rôle de la matière organique dans les sols

La matière organique était d'un intérêt très particulier dans les études effectuées sur la sorption de métaux lourds par les sols, cela à cause de son impact significatif sur la CEC et ce qui est plus important, de la tendance de transition des cations de métal pour former des complexes stables avec des ligands organiques (Elliott *et al.* 1986; Krogstad 1983). La quantité de la matière organique dans les sols affecte la fixation de métaux lourds dans le sol et la spéciation dans la solution du sol (Lo *et al.* 1992). La matière organique peut affecter positivement ou négativement la disponibilité de métal comme résultat de la formation de complexes de métaux. McBride (1989) a suggéré la séquence suivante de l'affinité du métal avec la matière organique: $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Ca} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Mg}$. Le Ni ainsi que les autres métaux lourds forment des complexes avec de nombreux constituants organiques du sol. Cependant, ces formations complexes se déroulent dans la plus grande partie avec les acides fulviques et humiques étant présents dans la matière organique en large quantité, les combinaisons insolubles étant associées avec l'acide humique et celles solubles avec l'acide fulvique (Stevenson, 1991).

c) Rôle des sécrétions (exsudats) de racines

Les plantes peuvent modifier les conditions de la rhizosphère par les processus tels que la production des sécrétions (exsudats) de racines solubilisant les métaux ou de modification de pH, en libérant ainsi les formes nonlabiles de métaux dans la solution du sol (Morel *et al.*, 1986; Mench *et al.*, 1987; Marschener et Römheld, 1983; Adriano *et al.* 2001; Puschenreiter *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2003).

Les acides de faible poids moléculaire sont probablement les sécrétions les plus importantes dans les systèmes naturelles de phytoextraction (Mench *et al.*, 1985, 1987). Elles influent sur la capture de métaux soit en formant des complexes avec les ions de métaux ou soit en abaissant le pH autour de racines et en altérant les caractéristiques de sol. Malgré le fait que l'absorption de métaux peut être augmentée en raison de la diminution du pH (Brown *et al.*, 1994), il est clair que la capacité de complexer des acides organiques, plutôt que de leur capacité à diminuer le pH, est le principal facteur lié à la mobilisation des métaux dans le sol et leur accumulation dans les plantes (Morel *et al.*, 1986; McGrath *et al.*, 1997; Quartacci *et al.*, 2005). Les effets indirects des sécrétions de la racine sur l'activité microbienne, les propriétés physiques de rhizosphère et les dynamiques de la croissance des racines peuvent également influencer la solubilité et l'absorption des ions (Marschner, 1995; Walker *et al.*, 2003; Aboudrar

et al., 2007 ; Schwartz *et al.*, 1999). Aboudrar *et al.*, (2007) ont montré que le rhizosphère de l'hyperaccumulateur *T. caerulescens* influe sur la diversité métabolique de la communauté bactériale par les sécrétions libérées par les racines. Sterckeman *et al.* 2005, dans leur étude pour la quantification de l'effet des processus de rhizosphère sur la disponibilité de cadmium et de zinc des sols dans de diverses espèces de plantes, ont suggéré que la mobilisation du métal non labile peut être dû aux sécrétions des racines ou de la microflore ; les phytosidérophores étant responsables de la mobilisation très élevée. La disponibilité faible du Fe ou du Zn peut expliquer la mobilisation plus importante dans un sol basique.

Le rôle du processus de la rhizosphère dans l'hyperaccumulation de métal est exploré dans l'hyperaccumulateur de Ni *Thlaspi goesingense* Halacsy et dans les espèces *Silene vulgaris* L. et de *Rumex acetosella* L. se développant nativement sur le même site de serpentine. Relatif aux grandes parties du sol et à rhizosphère des espèces excluantes, Wenzel *et al.* (2003) ont significativement trouvé une augmentation de DOC ainsi que des concentrations de Ni dans les extraits d'eau de rhizosphère de *T. goesingense*, alors que le Ni échangeable a été trouvé épuisé en raison de l'absorption excessive de Ni. L'analyse chimique de spéciation a révélé que la solubilité élevée de Ni dans la rhizosphère de *Thlaspi* est conduite par la formation des complexes Ni-molécules organiques. Les complexes Ni-molécules organiques serait ainsi impliquée dans la mobilisation du Ni et induirait la dissolution de minéraux porteurs de Ni, tels que des orthosilicates du type forstérite (Mg_2SiO_4) (Wenzel *et al.*, 2003).

d) Effet des propriétés du sol

La chimie de l'interaction de métaux avec la matrice du sol est au cœur du concept de la phytoremédiation. En général, la sorption sur les particules de sol réduit l'activité de métaux dans le système. Ainsi, plus la capacité d'échange des cations (CEC) du sol est importante, plus la sorption et l'immobilisation de métaux sont grandes. Le pH du sol affecte non seulement la biocapacité du métal, mais aussi le processus de l'assimilation de métaux pour les racines.

Une question très importante qu'il faut prendre en considération concerne les interactions plante-sol-métal. Cette question qui consiste à savoir combien le pH du sol influe sur l'absorption de Ni et d'autres métaux par les plantes hyperaccumulatrices a été abordée dans l'étude publiée par Li *et al.* (2003a). Ces auteurs ont étudié l'effet de la variation du pH dans le sol sur les concentrations de Ni et Co dans les pousses de *A.*

murale et *A. corsicum*. Les résultats de cette étude ont montré que l'augmentation du pH du sol a été accompagnée par une augmentation de la concentration de Ni dans les pousses. Les plantes ont été cultivées dans des sols contaminés par de Ni et Co provenant des émissions industrielles. Toutefois, les résultats d'une autre étude ont indiqué que les hyperaccumulateurs de Ni et Co *Berkheya coddii* et *A. bertolonii* cultivés dans les sols de serpentine pouvaient réagir en diminuant l'absorption de Ni et Co comme le pH du sol augmentait (Robinson *et al.*, 1999 ; Robinson *et al.*, 1997). Ceci était en contraste avec les résultats de Li *et al.* (2003a). Ni dans les sols de serpentine faibles en matière organique est principalement associé à des oxydes de fer (Kaupenjohann et Wilcke, 1995), qui sont chimiquement très inertes comme il est démontré dans le test d'extraction DTPA pour le sol de serpentine dans l'étude de Kukier *et al.* (2003). La charge des surfaces d'oxyde ferrique et les propriétés sorbantes sont modifiées par le pH. En résumé, le système du sol sorbant étant dominé par l'oxyde ferrique et l'argile est caractérisée par une augmentation de la rétention des métaux par la phase solide du sol quand le pH augmente, alors que dans le système dominé par la matière organique, les métaux sont fortement sorbés à un faible pH, mais ils peuvent devenir plus solubles quand le pH est en augmentation. Les concentrations de métaux dans les extraits saturés des deux sols de Port Colborne contaminés par l'industrie étaient beaucoup plus élevées que celles dans le sol de serpentine. Il est en général acceptable que les métaux provenant d'une contamination récente soient plus phytodisponibles que les métaux d'origine géogénique (Sauerbeck et Hein, 1991). La forte concentration de la matière organique dans les sols contaminés par l'industrie a également été un facteur augmentant la solubilité des métaux à pH élevé.

Phytomining

La phytoextraction peut être appliquée pour des métaux qui ne peuvent pas être extraits par les technologies minières traditionnelles pour des raisons économiques (Chaney *et al.*, 1998). Il s'agit alors du «phytomining» dont la valeur économique du métal récupéré est le motif principal. L'exploitation minière commerciale de Ni est généralement réalisée avec les minerais qui ont une forte concentration de du métal ciblé et contiennent un contenu de Ni d'au moins 30 g kg⁻¹. Peu de minerais correspondant de cette nature se produisent sur la surface de la terre et certaines mines sont proches de l'épuisement. Les surfaces importantes de sols ultramafiques ne peuvent

pas être exploitées par les technologies minières actuelles et ces zones sont inhospitalières pour les plantes terrestres en raison d'une déficience importante de Ca, P et N (Nicks et Chambers, 1995, 1998).

Les zones de serpentine sont très répandues à travers le monde. En Californie et Oregon, il y a plus de 400 000 ha de sols de serpentine (Alexander, 1994) et 10 000 ha Albanie (Zdruli 1997). Dans ces sols, le Ni est généralement présent à des concentrations comprises entre 1,0 et 7,0 g kg⁻¹, ce qui est bien au-dessous du minimum de la concentration de Ni requise pour les technologies minières modernes, mais suffisant pour la croissance des hyperaccumulateurs de Ni. Ces sols pourraient être « phytominés » commercialement (Baker et Brooks, 1989; Brooks *et al.*, 1998; Chaney *et al.*, 1998 ; Nicks et Chambers, 1995 ; Bani *et al* 2007). Les premiers essais de « phytomining » de Ni ont été effectués en 1995 aux Etats-Unis avec *Streptanthus polygaloides* A. Gray, hyperaccumulateur de Ni de la famille des *Brassicaceae* endémique aux sols de serpentine en Californie. Le sol sur le site avait une concentration de Ni de 3 340 mg kg⁻¹. Au stade de récolte, la concentration de Ni dans *S. polygaloides* était de 5 300 mg kg⁻¹ en moyenne et la biomasse de 4,8 Mg ha⁻¹ sans fertilisation (Nicks et Chambers, 1995).

L'étude réalisée par Robinson *et al.* (1997) en Italie en utilisant l'hyperaccumulateur connu *Alyssum bertolonii* a fourni des données économiques comparables à la précédente. Selon ce travail, lorsque le prix du Ni est bas, à moins que la performance de phytoextraction produisant naturellement des hyperaccumulateurs soit améliorée, le Ni ne peut pas être phytominé économiquement. Bennett *et al.* (1998) ont conclu que les techniques de phytoremédiation et phytomining sont encore à leurs débuts et devront être prouvées au cours de plusieurs années avant qu'il y ait une acceptation complète scientifique et commerciale de leur valeur.

Afin de répondre aux besoins commerciaux de la phytoextraction, Li *et al.* (2003) ont développé une technologie commerciale utilisant les espèces végétales hyperaccumulatrices pour phytoextraire de Ni des sols contaminés en Ni et/ou riches en Ni. Un brevet a été délivré afin de réaliser la proposition de phytomining de métaux spécifiques, y compris le Ni (Chaney *et al.*, 1998).

Chaney *et al.* (1998, 2000, 2005) et ont montré que *A. murale* Waldst et *Kit. A. corsicum* Duby pourraient accumuler plus que 20 000 mg de Ni par kg de poids sec par les pousses sans aucune preuve de phytotoxicité, lorsqu'elles sont cultivées dans les sols de serpentine avec un minimum d'addition des fertilisants. De plus, avec l'utilisation

des herbicides et d'autres pratiques modernes de la gestion agricole, on peut augmenter la biomasse contenant 400 kg ha^{-1} de Ni avec un coût de production de 250 \$ à 500 \$ ha^{-1} . A ce moment, le métal de Ni a été échangé à London Metal Exchange pour plus de \$ 40 kg^{-1} , ainsi le phytomining de Ni est devenu une technologie agricole très rentable (la valeur de la récolte = \$ $16\,000 \text{ ha}^{-1}$) pour les sols contaminés ou minéralisés en Ni. Li *et al.* (2003b) ont rapporté une récupération très efficace de Ni des frênes de biomasse des pousses d'hyperaccumulateur *Alyssum* dans un four à arc électrique du complexe de fonderie d'Inco Ltd Sudbury. Des travaux récents réalisés par nos équipes ont démontré que la valorisation du Ni prélevé par des plantes d'*A. murale* est économiquement viable et profitable même avec une baisse des cours du Ni. Ce résultat encourage les travaux destinés à optimiser la phytoextraction du Ni par les plantes et sa valorisation métallurgique ultérieure.

Compte tenu de la faible productivité des sols infertiles de serpentine et de la valeur élevée du Ni qui peut être annuellement phytominé avec des introductions normales des fertilisants, le phytomining de Ni devrait émerger comme une bénéfice pour l'industrie agricole (Li *et al.*, 2003b; Chaney *et al.*, 2005). En outre, le phytomining est moins perturbateur pour la terre que l'exploitation minière des gisements latéritique de serpentine.

Certains auteurs ont exprimé leur crainte que le phytomining en grande échelle pourra mettre en danger les espèces uniques et animales qui sont endémiques aux sites ultramafiques et sites de serpentine. La technologie qui a été proposé n'est pas une menace pour la diversité car une proportion importante des zones de serpentine n'est pas capable d'être cultivée en raison de fortes pentes, des sols rocheux, la protection forestière, ou parce qu'ils sont dans les réserves naturelles protégées. Ces zones continuent d'être l'habitat pour les endémiques de serpentine. Il existe également de grandes zones de sols de serpentine qui sont actuellement utilisées pour l'agriculture à une faible productivité - en général pour le foin de l'herbe ou des pâturages - et pour cela que ces zones s'adaptent au phytomining. Les grandes surfaces de sols de serpentine arable et les sites contaminés de Ni qui existent dans le monde entier permettront la croissance rapide d'une industrie potentielle de phytomining de Ni.

Pour cette raison, il existe une grande variété de procédés pour la récupération du Ni dépendant essentiellement i) du type de minerai, ii) des concentrations de Ni dans les minerais.

Conclusion

Les milieux ultramafiques abritent des espèces végétales remarquables qui ont acquis au cours de l'évolution des propriétés physiologiques conduisant à l'accumulation de quantités considérables de Ni dans leurs parties aériennes. Les mécanismes physiologiques de l'hyperaccumulation sont en partie seulement élucidés et font l'objet de nombreux travaux au niveau mondial actuellement. Mais l'hyperaccumulation est aussi liée aux propriétés du sol qui contrôlent la disponibilité de l'élément. Les interactions entre la plante et le sol restent encore peu explorées et il est indispensable, pour prévoir l'accumulation du Ni dans les plantes, de clarifier le rôle d'une propriété fondamentale, la biodisponibilité, dans le processus global de l'hyperaccumulation. Cette clarification est indispensable dans une optique de modélisation de l'extraction du Ni par les plantes hyperaccumulatrices.

Au plan finalisé, la littérature montre que les plantes hyperaccumulatrices de métaux, que ce soit le Ni ou d'autres métaux (*e.g.* Cd, Zn) ou des non métaux (*e.g.* As) offrent un potentiel important pour extraire ces éléments des sols. Cette possible application de la phytoextraction est une voie pour décontaminer les sols pollués. Elle peut être aussi valorisée par le phytomining qui permettrait de récupérer des sols, trop faiblement pourvus en métaux pour une exploitation minière classique, des métaux d'intérêt économique. C'est notamment le cas du Ni présent dans les sols de serpentine. Les premiers travaux sur ce sujet démontrent l'intérêt de l'approche. Cependant, l'agronomie du phytomining n'est encore pas vraiment établie et des zones d'ombre subsistent en raison d'une méconnaissance de l'écophysiologie des plantes hyperaccumulatrices. Il est donc indispensable d'acquérir des données qui permettent de construire les itinéraires techniques d'une culture de phytomining applicable aux sols de serpentine. Cet objectif est particulièrement important dans la perspective de valoriser des territoires qui présentent un faible potentiel agronomique pour des productions à usage alimentaire.

Ainsi, à l'issue de cette étude bibliographique, dans l'optique de développer le phytomining du Ni des sols de serpentine, il est nécessaire de renforcer les connaissances sur :

- la géobotanique de ces milieux dans le but de mieux comprendre les interactions sol – métal (disponibilité) – hyperaccumulateur afin de déterminer la part des caractéristiques génétiques (inter ou intra-spécifiques) et des conditions

édaphiques dans l'accumulation du Ni par les plantes et de sélectionner les meilleurs candidats pour le phytomining.

- d'identifier les types de sols les plus adaptés au phytomining du Ni tant du point de vue de la fertilité vis-à-vis des plantes hyperaccumulatrices que de la disponibilité en Ni
- de conduire des essais agronomiques de longue durée permettant d'acquérir des données sur l'écophysiologie de la plantes, sa réponse aux contraintes du milieu et aux pratiques agronomiques classiques, dans le but de modéliser la culture de phytomining.

Chapitre 2

Hyperaccumulation du Ni par les Brassicacées dans les serpentines d’Albanie et du Nord-Ouest de la Grèce

*Nickel hyperaccumulation by Brassicaceae
in serpentine soils of Albania and NW Greece*

Northeastern Naturalist (2009) 16 (Special Issue 5):385–404

Abstract

Ultramafic soils are widespread in the Balkans. Albania and Greece are the richest in the number of endemics growing on serpentine and include several hyperaccumulator species. The objectives of this study were to understand the potential of Ni hyperaccumulation of these species in close relation with the characteristics of their native soil environments. Collection of both plant samples (analysis of element concentrations in aerial parts) and soil samples (analysis of total elements, DTPA-extractable Ni, Fe and Ni distribution in mineral phases) allowed evaluation of phenotypic efficacy in hyperaccumulating Ni. Nickel availability in soils is controlled by soil weathering and mineral-bearing phases. Unsurprisingly, the highest levels of Ni availability were associated with amorphous Fe-oxides in moderately weathered Cambisols or with high-exchange capacity clays in well-evolved Vertisols. The highest Ni concentrations in leaves were found in *Alyssum murale* Waldst. & Kit. in Pojska-AL (2.0 %), *Alyssum markgrafii* O. E. Schulz ex Markgraf in Gjegjan-AL (1.9 %), *Bornmuellera baldacii* (Degen) Haywood subsp. *markgrafii* in Gramsh-AL (1.4 %), and *Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz in Trigona-GR (1.4%). We identified a new member in the Albanian Ni-hyperaccumulator flora: *Thlaspi ochroleucum* in Pojska-AL (0.13 % Ni) and in Pishkash (0.14 % Ni). With regard to Ni availability in soils, *A. markgrafii*-AL is the most efficient Ni-hyperaccumulator among all species. *Alyssum murale*, which is widespread in the serpentines of the Balkans, accumulates Ni, with leaf concentration being negatively correlated to total Ca content of soils regardless of Ni availability (DTPA extractable Ni). If this is confirmed it would mean that genetic variability is not the main factor that explains the hyperaccumulation performance of this species.

Introduction

Hyperaccumulation of Ni, *i.e.* accumulation in aerial parts up to concentrations above 1,000 mg kg⁻¹ on a dry matter (DM) basis (Brooks *et al.*, 1977; Reeves, 1992), was first discovered in *Alyssum bertolonii* in Italy (Minguzzi and Vergnano, 1948). It has become recognized as an unusual response to the elevated Ni concentrations generally found in soils derived from ultramafic (*i.e.* Mg and Fe-rich) rocks, such as peridotites and serpentinites, often referred to as serpentine soils. The extreme chemical nature of such soils, with abnormally high concentrations of Ni, Cr and Co (in addition to Mg and Fe) and low concentrations of the important nutrients Ca, K and P, often leads to such areas having a characteristic flora. The serpentine flora often consists of the limited subset of a region's species that can tolerate these unusual edaphic conditions, but may also contain a significant number of endemic species of very restricted range (Reeves *et al.*, 1999), including Ni-tolerant and Ni-hyperaccumulating plants. Serpentine (ophiolithic) substrate covers large areas in the Balkans, more so than in any other part of Europe. The number of Balkan endemics growing on serpentine is ca. 335 taxa (species and subspecies) of which 123 are obligate. The richest (in number of taxa) squares are situated in NW Greece (Epirus), the island of Evvia, N Albania together with SW Serbia, and N Greece (Vourinos). They indicate important centers of plant diversity in the Balkans, and thus areas to be noted for conservation attention. Serpentine areas in the Balkans exist in large blocks or as small outcrops separated from other geological formations in C Bosnia, W and C Serbia. They extend towards NC and SE Albania to the serpentine formations of Epirus and Thessalia in Greece (Stevanović *et al.* 2003).

Although serpentine is inhabited by a smaller number of species than known from other types of geological substrates, nevertheless, the serpentine flora in the Balkans is characterized by a relatively high degree of endemism. Ultramafic outcrops in the Balkans host a rich vegetation (Stevanović *et al.* 2003) including a number of endemics and subendemics and Ni hyperaccumulators such as trans-regional endemics (*Bornmuellera baldacii* (Degen) Heywood subsp. *baldacii* – GR, AL, *Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz – GR, *Alyssum markgrafii* O. E. Schulz ex Markgraf – AL, Serbia) and regional endemics (*Alyssum heldreichii* Hausskn. – GR, *Bornmuellera tymphaea* (Hausskn.) Hausskn. – GR). Previous studies clearly evidenced a great variability in Ni concentrations in serpentine soil and serpentine plants in Albania (Shallari *et al.*, 1998; Massoura *et al.* 2004; Bani *et al.* 2008) and the Pindus Mountains

of Greece (Chardot et al. 2005; R. Reeves personal communication). Using herbarium material collected in Greece and previous studies in Albania, the authors have detected the presence of Ni-hyperaccumulators: *Alyssum markgrafii* O.E. Schulz-AL with 13,700 mg Ni kg⁻¹ DM (Brooks and Radford, 1978); *Bonmuellera baldaccii* subsp. *markgrafii* O.E. Schulz-AL with 27,300 mg Ni kg⁻¹ DM (Reeves et al., 1983); and *Bornmuellera tymphaea* Hausskn. – GR and *Leptoplax emarginata* (Boiss.) O.E. Schulz – GR with more than 1% Ni DM. This extraordinary concentration of Ni hyperaccumulators in a limited geographical area and in a limited part of the plant kingdom has led us to investigate the hyperaccumulation of Ni by the ultramafic flora of Albania and Greece more widely. The objectives of this study were to identify collection sites in which Ni-hyperaccumulator species occur and to understand the relationships between Ni uptake by native species or populations of selected Ni-hyperaccumulators and the corresponding Ni availability in soils across the two regions of Albania and Greece. This is of particular interest now that several potential applications of hyperaccumulators, such as phytoremediation and phytomining, are being extensively discussed and tested (Brooks, 1998).

Materials and methods

Sites investigated

Several serpentine areas in Albania and the Pindus Mountains of Greece were surveyed because they host a significant proportion of regional hyperaccumulating endemics with several common species in both areas. According to geographical position of the areas, grouping of serpentine formations as well as their spatial isolation they fall in the same serpentine botanical areas in the Balkans: CS Albania – NW Greece (Reeves et al., 1983, Tan et al., 1999, Stevanović et al. 2003). Both regions are located in the zone of similar climate conditions (Mediterranean climate with mountain influence). The Pindus Mountains are located in northwestern Greece and extend about 160 km from the border of Albania. Sampling of Ni hyperaccumulator species growing in those sites and their associated soils was conducted in May 2007 at eight serpentine sites in Albania and in August 2006 at five serpentine sites in the Pindus Mountains (Greece). Leaf fragments of species growing on these sites were screened for Ni accumulation using a simple semi-quantitative test: fresh Ni-rich plant material pressed against a filter paper impregnated with dimethylglyoxime produces a rose-pink colour. A positive result

generally indicates a Ni concentration of $>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ (DM basis) (Reeves et al., 1996). Plants were then identified using Flora Europea (the nomenclature used here follows Tutin et al., 1964, 1968, 1972, 1976 et 1980). Nine taxa from eight species of hyperaccumulators were sampled on the two surveys, some of them sampled at various locations, including in both countries (Table 1). Shoots and leaf materials were washed in de-ionised water and dried at 75°C for 48 h before elemental analyses.

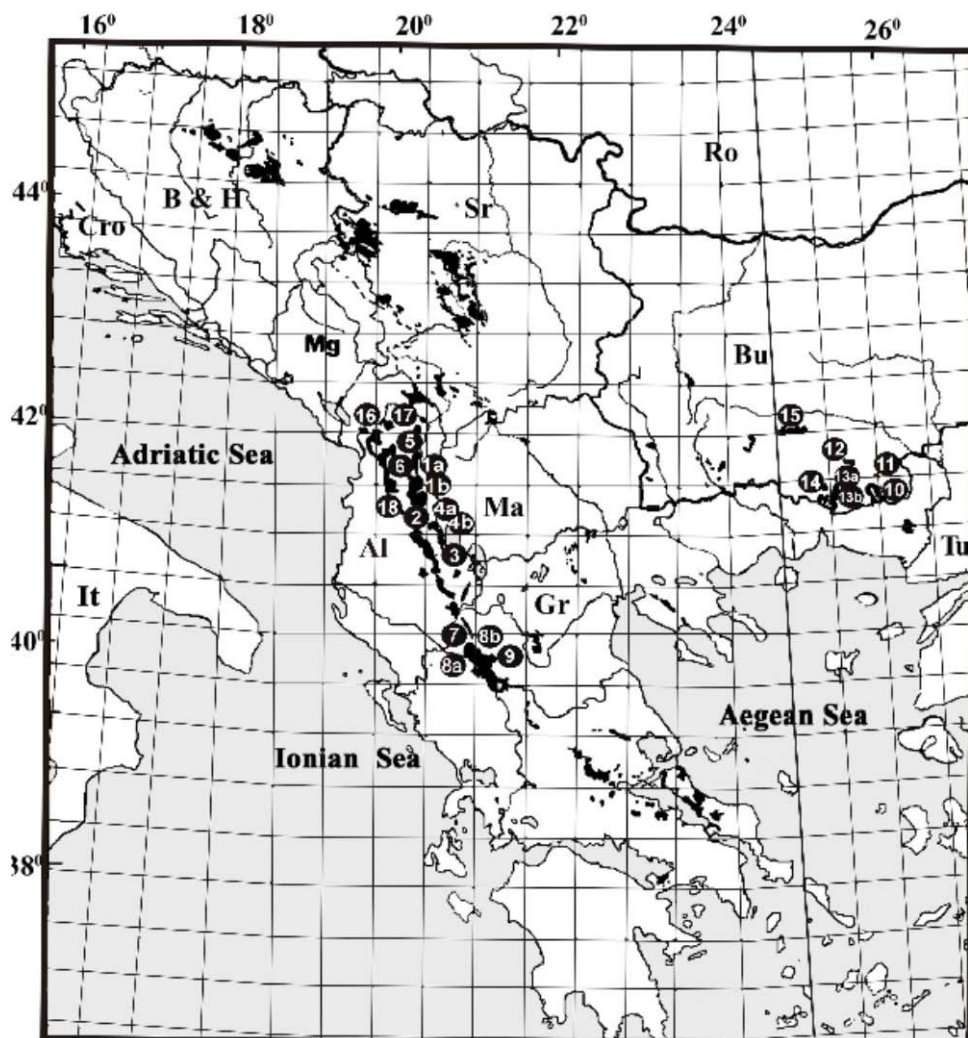


Fig. 1. Distribution of serpentine bedrock in Balkans (Stevanović et al. 2003).

- *Serpentine sites in Albania*

In the serpentine site of northeastern Albania (Gjegjan-Fushe- Arrëz), the climate data are; mean January temperature 4.9°C , mean July temperature 23.8°C , the total annual rainfall is 1800 mm. In the serpentine site of southeastern Albania they are respectively:

for Prrenjas and Pishkash: mean January temperature 5.6 °C, mean July temperature 22.5 °C, total annual rainfall 744 mm, for Pojska: mean January temperature 4.7°C, mean July temperature 22.3 °C, and total annual rainfall 707 mm.

Pojska (Pogradec district) is in the east of Albania, on the western shore of lake Ohrid at an elevation of 700 m above sea level, latitude 40°59'55.28"N and longitude 20°38'0.92" E. It is a serpentine site with high contents of Fe, Ni and Co (Anonymous, 1992). In this area, there are also Cr mines. The soils at the collection site were Hypermagnesic Hypereutric Cambisols and Cambic Hypermagnesic Hypereutric Vertisols located close to the shores of Lake Ohrid at the piedmont of ultramafic hills (Serpentinized Harzburgite).

Prrenjas: This site surrounds the city of Prrenjas at an elevation of 600 m. The parent material is rich in Fe, Ni, Cr and Co (Anonymous, 1992). Sampling was conducted on serpentine rock of Prrenjas, latitude 41°04'13"N and longitude: 20°33'53"E) and also on the Domosdova field, which contains a soil developed from a colluvium of ultramafic and magnesite origin (Hypermagnesic Hypereutric Vertisol), latitude 41°04'08"N and longitude 20°33'11"E).

Gjegjan/Fushë-Arrëz: This serpentine site is situated at the north of Albania at an elevation of 400-600 m, latitude: 41°55'47"N and longitude: 20°00'09"E. Sampling was conducted along the road from Gjegjan to Fushë-Arrëz on serpentine outcrops (villages of Gjegjan, Gjegjan-Gojan and Fushë-Arrëz), latitude 42°03'50"N and longitude 20°01'26"E).

Gramsh (Grabova): This serpentine site is situated in the east of Albania at an elevation of 1594 m, latitude 40°55'18"N and longitude 20°21'13"E. The site of sampling is a pasture with low productivity that is currently being grazed. This is the only serpentine site where we have collected *Bornmuelera baldacii* subsp. *markgrafii* Degen Heywood (Family Brassicaceae). Soil samples could not be collected on this survey.



A) Serpentine sites of Pojska 1 and 2 in Albania



B) Serpentine sites of Prenjas (Albania): Fields of Domosdova (left) and serpentine rock of Prenjas (right).



C) Serpentine sites of **Gjegjan**



D) Serpentine sites of Gramsh (left) and Pishkash (right) (Albania)

Photo 1 (A, B, C, D). Serpentine sites of Albania surveyed in this study.

- ***Serpentine sites in Pindus Mountains (Northwestern Greece)***

The four sites are located in the wide ultramafic outcrop of Pindus Mountains. Pindus mountain range has a sub-Mediterranean climate (mean January temperature 4.6 °C; mean July temperature 24.9 °C; annual rainfall varies from about 1000 mm at the coast to 2500 mm on the mountains and the rainfall in Metsovo is 1512 mm (Metsovo –

39°46'N, 21°11'E, elevation 1165m – is the nearest town center, a few kilometers away from Katara Pass). The bedrock is highly serpentinized and consists mainly of highly serpentinized harzburgite or lherzolite. All soils were all Hypermagnesian Hypereutric Cambisols.

Malakasi is situated at an elevation of 1031-1065 m, latitude 39°47.40'N and longitude 21°17.57' E. The site of sampling is a site that is currently being used for pasture. In this site, *Alyssum heldreichii*, *A. murale*, *Bornmuellera tymphaea*, *Thlaspi tymphaeum*, and *Leptoplax marginata* were collected at fruiting-seeding stage.

Katara Pass is situated at the elevation 1690 m, latitude 39°47.77'N and longitude 21°13.74' E. In this site, shoots of *A. heldreichii*, *A. murale*, *B. tymphaea*, *Th. tymphaeum* and *L. emarginata* were collected at flowering stage except for *B. tymphaea* which was at fruiting stage.

Vovoussa is situated at 1570 m elevation, latitude 39°52.11'N and longitude 21°02.99' E. In this site, shoots of *Bornmuellera baldacii* subsp. *baldacii* were collected at the seeding stage.

Trigona is situated at a much lower elevation (830 m) than the three other Greek sites, latitude 39°47.29'N and longitude: 21°25.32' E. In this site, shoots of *A. murale*, *B. tymphaea*, and *L. emarginata* were collected at the seeding stage.



Photo 2. Serpentine site and ultramafic rock in Pindus Mountains (Northwestern Greece)

Table 1: List of Ni-Hyperaccumulating taxa collected during the two surveys

Country	Genera	Species	Subspecies	Authority	Site of collection	
GR	<i>Alyssum</i>	<i>heldreichii</i>		Hauskn.	Katara	Pass, Malakasi
AL	“	<i>markgrafii</i>		O.E. Schulz ex Markgraf	Gjegjan	
AL, GR	“	<i>murale</i>		Waldst. & Kit.	Katara	Pass, Malakasi, Trigona, Gjegjan, Pishkash, Pojska, Prenjas
GR	<i>Bornmuellera</i>	<i>baldacii</i>	<i>baldacii</i>	(Degen) Heywood	Vovoussa	
AL	“	“	<i>markgrafii</i>	“	Gramsh	
GR	“	<i>tymphaea</i>		(Hauskn.) Hauskn.	Katara	Pass, Malakasi, Trigona,
GR	<i>Leptoplax</i>	<i>emarginata</i>		(Boiss.) O.E. Schulz	Katara	Pass, Malakasi, Trigona
AL	<i>Thlaspi</i>	<i>ochroleucum</i>		Boiss. & Heldr.	Pishkash, Pojska	
GR	“	<i>tymphaeum</i>		Hauskn.	Katara	Pass, Malakasi

Soil and plant sampling

At each site, and for each species, composite plant samples (whole plants) were taken with 3-5 specimens of each species on areas showing similar pedological conditions (same topography and soil type). Soil samples were also taken as composite samples collected randomly at the different precise locations of plant sampling (in a 0.5-m radius area around the plants). Soil was collected from the upper horizon at a depth of approximately 20 cm (when possible) or less, air-dried and sieved to 2-mm.



Alyssum murale (Pojska)



Alyssum markgrafii (Gjegjan)



Bornmuellera baldacii (Gramsh)



Thlaspi ochroleucum (Pishkash)

Photo 3. Serpentine plants collected along this study in serpentine site of Albania



Bornmuellera tymphaea (Greece)



Alyssum helgreichi (Greece)



Leptoplax emarginata (Greece)



Alyssum murale (Greece)

Photo 4. Serpentine plants collected along this study in serpentine site of Pindus Mountains (Northwestern Greece).

Soil and plant analyses

Total major elements and total trace elements in soil were determined in the Soil Analyses Laboratory of Arras according to standardized methods in France (AFNOR, 2004). Trace metal concentrations in shoots and leaves were analysed by plasma emission (ICP) spectrometry after digestion of plant samples in microwaves. A 0.25-g DM plant aliquot

was digested by adding 8 ml of 69% HNO₃ and 2 mL of H₂O₂. Solutions were filtered and adjusted to 25 mL with 0.1 M HNO₃. Soil pH was determined in a soil/water (1:2.5) suspension with a pH-meter. Nickel availability in different soil samples was characterised by DTPA-TEA, using the method of Lindsay and Norvell (1978). Concentration of Ni in soil extracts was determined by plasma emission spectrometry (ICP-OES). Estimation of Fe and Ni partitioning was achieved through oxalate (McKeague & Day 1966) and dithionite-citrate-bicarbonate (Mehra & Jackson 1960) extractions. This allowed us to estimate the different forms of iron (silicate, poorly crystallised and well-crystallised Fe-oxides) in the soil and to evaluate the partition of Ni between those three mineral phases. Although some imprecision is associated with this method (as for all extraction methods), it has been successfully used previously to assess Ni availability (highly significant correlations were found between isotopically-labile Ni and Ni fractions within Fe oxides extracted by oxalate “Fe_o”) in ultramafic

soils worldwide, including Albanian soils (Massoura et al., 2006). We chose five distinct soils (Prrenjas-Rock, Pojska-Soil 2, Prrenjas Domosdova, Katara Pass and Trigona) from the different areas that represented different pedological conditions to assess Fe and Ni partition according to this method.

Results

Soil variability along the study sites

Unsurprisingly, all the soils showed high total Fe contents with values exceeding 7% except for one soil at Malakasi (Table 2). All Albanian soils had Fe concentrations higher than 9%. Total Mg and Ca contents in soils displayed more varied patterns among sites and soils. The richest soils had more than 10% Mg (with values higher than 12% at Gjegjan and Vovoussa), sometimes reaching the initial content of the bedrock which usually varies between 15 to 20%. The Ca total contents were even more variable between soils. Some had strong Ca deficiency (reaching less than 0.3% at Pojska) whilst others showed quite normal values (between 2 to 4%) for non-ultramafic soils. Accordingly, Mg:Ca ratios varied from 2.6 (Fushë-Arrëz) to 40 (Pojska), a range that is commonly reported in serpentine soil material (Proctor, 1971). In Greek soils, they varied in a tighter range from 10.9 (Katara Pass) to 17.7 (Trigona) and did not reach the extreme values found in Albanian soils. Potassium total contents in soils were very low (between 0.1 to 0.8%) except at the Malakasi-Soil 2 where it reached 1.0%. This is usually a cause for nutrient deficiency in ultramafic soils (Proctor, 1971). The Mn content in soils was quite homogeneously distributed and varied between 1010 and 2860 mg kg⁻¹.

In general, trace element contents were variable but the specific ultramafic metals (i.e. Co, Cr and Ni) were found at high concentrations in all soils. Cobalt content in soils varied between 93 (Malakasi-Soil 2) and 280 mg kg⁻¹ (Pojska-Soil 2). Chromium concentrations in soils varied from 667 mg kg⁻¹ (Pojska-Soil 1) to 3250 (Pishkash) mg kg⁻¹. The soils with highest Ni contents came from eastern Albania [Pojska (3240 mg kg⁻¹), Prrenjas (3210 mg kg⁻¹) and Pishkash (3240 mg kg⁻¹)]. The Ni concentration in soil samples that came from the Gjegjan area varied from 1070 to 2580 mg kg⁻¹. In the Greek soils, it was also inferior to that from eastern Albania and comprised between 1280 and 2660 mg Ni kg⁻¹. Copper concentrations in soils were lower than 76 mg kg⁻¹, except for the Gjegjan site where the Cu concentration was 1120 mg kg⁻¹. Zinc

concentrations in soils were lower than 130 mg kg^{-1} , except for the Gjegjan soil. The latter is in use as a garden soil and has probably suffered from anthropogenic inputs because of the high concentrations in Cu and Zn, although these two elements can sometimes be found at high concentrations in ultramafic soils. The lowest trace metal concentrations were found for the soil that had the lowest concentration of total Fe (i.e. Malakasi-Soil 2). All the soils were neutral to alkaline. The range of pH values among the soils was quite narrow. The most acidic soil had a value of 6.3 (Katara Pass) which was also the soil at the highest elevation (more than 1600 m above sea level). The most alkaline soil had a value of 8.2 (Pishkash-Soil 1).

Table 2. pH, total major elements and total trace elements in Albanian and Greek soils.

Site of collection	pH	Total major elements						Total trace elements					
		Ca	Mg	Al	K	Na	Fe	Co	Cr	Mn	Cu	Zn	Ni
	water	%						mg kg ⁻¹					
Pojkska-Soil 1	7.98	0.26	10.5	1.7	0.38	0.17	9.4	182	677	1760	15.7	102	3180
Pojkska-Soil 2	6.81	0.45	7.8	2.6	0.53	0.26	11	280	2400	2610	21.6	131	3240
Prrenjas-Domosdova	7.36	0.6	5.4	3.3	0.36	0.26	9.6	267	2150	2860	21.8	104	3100
Prrenjas-Rock	7.44	0.72	9.4	2.3	0.42	0.22	9.3	222	2950	2160	24.2	112	3210
Pishkash-Soil 1(<i>A. murale</i>)	8.18	2.33	9.5	2	0.31	0.14	10.3	176	3250	1330	20.8	101	3240
Pishkash-Soil 2(<i>Th. ochroleucum</i>)	6.73	0.57	10.5	2.4	0.43	0.15	10.2	175	2060	1330	22.5	114	2640
Gjegjan	7.08	3.35	9.9	3.9	0.15	0.32	10.9	104	1100	1010	1120	816	1070
Gjegjan-Rock	7.83	1.76	12.7	3.1	0.12	0.21	9.6	162	2020	1770	76.3	107	2580
Gjegjan-Gojan	6.61	1.75	5.8	5.7	0.39	0.39	9.9	169	1930	2550	66.9	107	1670
Fushë-Arrëz	7.74	3.46	9.1	6.2	0.19	0.26	7	100	1550	1220	56.3	87	1370
Vovoussa	6.72	1.33	16.9	1.8	0.19	0.11	9.2	201	2670	2160	-	78	2610
Trigona	7.02	0.44	7.8	2.6	0.42	0.16	10	175	2170	1620	-	107	2660
Katara Pass	6.3	0.95	10.4	4	0.77	0.45	7.5	102	1380	1820	-	104	1160
Malakasi-Soil 1	7	0.62	8	3	0.65	0.43	7.4	117	1100	1490	-	89	2340
Malakasi-Soil 2	6.76	0.54	7	3.9	0.97	0.74	5.8	93	1750	1310	-	82	1280

Distribution of Fe and Ni within the different mineral compartments in soils

In all soils, both total Fe and Ni contents were much higher than in typical non-ultramafic soils. Since the distribution of Fe in the mineral phases seems to influence Ni chemical availability (Massoura et al., 2006; Chardot et al., 2007) in soils, we characterized the mineral pools under which Fe and Ni were present in these soils. The results from oxalate and DCB extractions (Figure 1) showed that the fraction of free Fe of the total Fe content in surface horizons of the Albanian soils represented 48% in Prrenjas-Rock, 56% in Pojska-Soil 2, and 20% in Prrenjas-Domosdova (a soil with less total Fe content and high secondary clay content than other soils, as it was a Vertisol). In these soils, free Fe was mainly present as well-crystallized Fe oxides (i.e. Fe-included in the crystal lattice of oxides) extracted by DCB. The fraction of amorphous Fe-oxides (oxalate-extracted) represented less than 15% of total Fe in the three soils. The fraction of free Fe in the surface horizon of Pindus Mountains soils represented 47% of total Fe in Katara Pass and 25% in Trigona. In these soils, free Fe was mainly present as well-crystallized Fe-oxides but the fraction of amorphous Fe-oxides was more important than in the Albanian soils.

In contrast with Fe distribution, most of the Ni associated with Fe oxides (Figure 2) in Albanian soils was found in the amorphous phase (two-thirds or more). The latter fraction represented 30% of total soil Ni in Prrenjas-Rock, 34% in Pojska-Soil 2, and 26% in Prrenjas-Domosdova). In Greek soils, this trend was even more pronounced than in Albanian soils. In the Greek soils, more than two-thirds of total soil Ni was found with the clay fraction. Nickel associated with well-crystallized oxy-hydroxides was also quite low compared to Albanian soils (5% of total Ni in Trigona and 0% in Katara Pass).

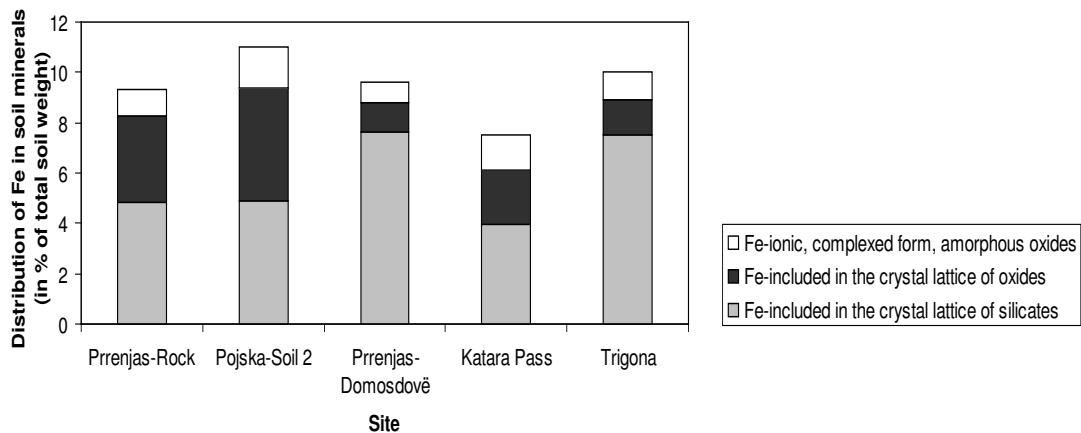


Figure 1. Distribution of Fe within the different mineral compartments in the surface horizons of five representative serpentine soils from Albania and Pindus Mountains (Greece).

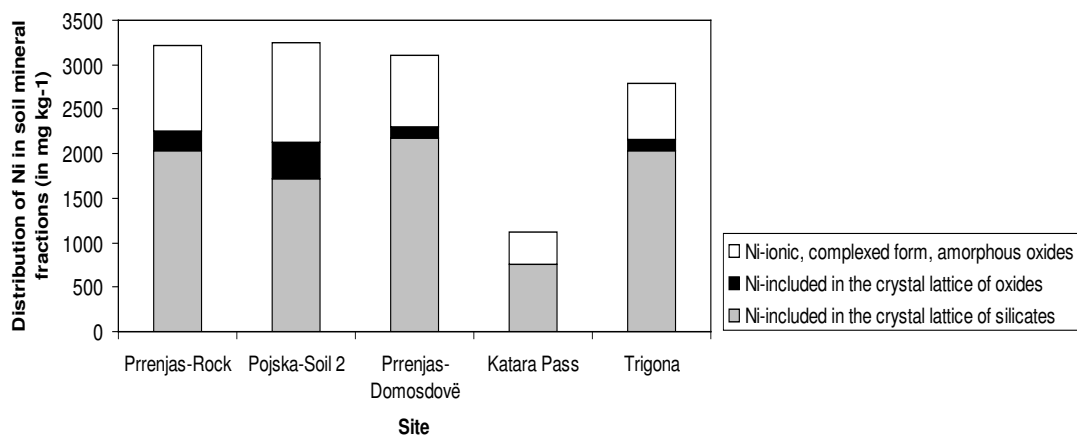


Figure 2. Distribution of Ni within the different mineral compartments in the surface horizons of five representative serpentine soils Albania and Pindus Mountains (Greece).

Variability of Ni availability along the Albanian and Pindus Mountains soils.

DTPA-extractable Ni (Ni_{DTPA}) was chosen as an estimate of soil Ni chemical availability. Although it only reflects the potential pool of available Ni (R. Chaney, 2008, personal communication), it allows relative comparison of soils. It has also been correlated to isotopically labile Ni (Echevarria et al., 1998). We used this measurement as the indicator of the relative variability of Ni availability of the different serpentine soils (Figure 3). The amounts of DTPA-extracted Ni were higher for the soils of southeastern Albania: Pojska-Soil 2 (285 mg kg^{-1}), Pojska-Soil 1 (96 mg kg^{-1}), Prrrenjas-rock (81 mg kg^{-1}), and Pishkash (95 mg kg^{-1}). The amounts of DTPA-extracted Ni were lower in soils of the Gjegjan area in northern Albania, although the soil of Gjegjan-Gojan was an exception (66 mg kg^{-1}). The amounts of DTPA-extracted Ni were also high in Pindus Mountains soils. DTPA-extracted Ni in soils varied from 126 mg kg^{-1} (Malakasi-Soil 1) to 48 mg kg^{-1} (Malakasi-Soil 2).

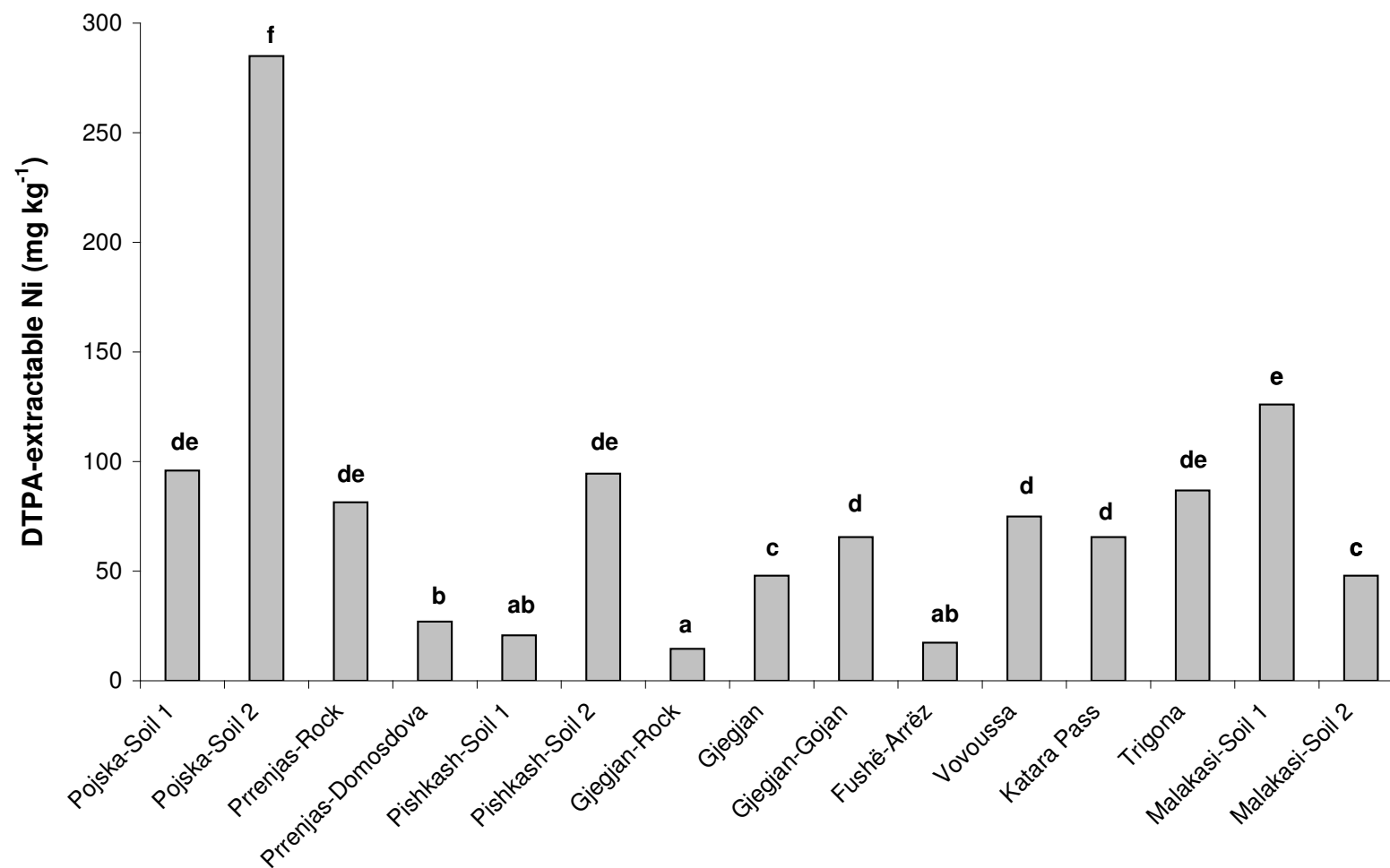


Figure 3. Soil Ni availability assessed by DTPA-TEA extraction in the surface horizons of serpentine soils from Albania and Pindus Mountains (Greece). Letters indicate significant difference between soils at the 5% confidence interval (ANOVA – Newman-Keuls test).

Uptake of Ni and other elements by hyperaccumulator plants.

Sampling at the Albanian and Greek sites allowed for collection of nine taxa: eight plant species and two subspecies of one of them. Species were each identified according to the Flora Europaea. Analysis of metals performed on shoots and leaf material showed different plant responses to the presence of trace metals in soils collected at the different sites (Table 3). Leaves were preferred because they reveal the highest Ni (and possibly Co) concentrations in hyperaccumulating Brassicaceae and especially the genera studied here (Psaras et al., 2000; Broadhurst et al., 2004). For the first time we have analysed Ni in freshly collected plant parts of the taxon *Bornmuellera baldacii* subsp. *markgrafii* from Albania: Ni concentration in shoots was 12,215 mg kg⁻¹. With the help of the dimethylglyoxime filter paper test (Reeves et al., 1996), we also identified a new member of the Albanian Ni-hyperaccumulating flora which has already been recorded in neighbouring countries (e.g. Greece); *Thlaspi ochroleucum*. Analyses of acid-digested shoots by inductively-coupled plasma (ICP) emission spectroscopy confirmed Ni concentrations of 1,355 mg kg⁻¹ in Pojska-Soil 2 and 1,134 mg kg⁻¹ in Pishkash-Soil 2 in *Th. Ochroleucum*. The plant specimens collected from the field were already in the end of fruiting stage and most of the leaves were dry or had fallen from stems. This may explain such concentrations of Ni in shoots of *Th. ochroleucum*. Highest Ni values in plants were recorded for *Alyssum murale* which was the dominant species on all serpentine sites in Albania and Greece, but Ni concentration in this species was highly dependent on the site of collection. The highest Ni concentration in shoots of *A. murale* was observed in Pojska-Soil 1 (13,676 mg kg⁻¹), followed by Prrenjas-Domosdova (11,234 mg kg⁻¹). For *A. markgrafii*, which was the second richest plant, the highest Ni concentration was found in Gjegjan-Gojan (12,387 mg kg⁻¹). High Ni values in shoots were also recorded for *B. tymphaea* in Malakasi-Soil 1 (11,774 mg kg⁻¹) and *L. emarginata* also in Malakasi-Soil 1 (9,509 mg kg⁻¹DM). *Thlaspi* species - *Th. ochroleucum* and *Th. tymphaeum* - had much lower concentrations of Ni than the other taxa, but we were not able to perform any statistical comparison between species due to the limited number of sites of collection for each species. Leaves exhibited the highest concentrations among all taxa for *A. murale* with 20,135 mg kg⁻¹ in Pojska-Soil 1 and 15,698 mg kg⁻¹ in Prrenjas-Domosdova, two contrasted soils. The concentration of Ni in leaves of *A. murale* was the lowest in Gjegjan (4,729 mg

kg⁻¹). It was intermediate in the three Greek soils, ranging from 10,740 mg kg⁻¹ in Malakasi-Soil 2 to 13,595 mg kg⁻¹ in Trigona. The highest Ni concentration in leaves of *A. markgrafii* was close to that of *A. murale* and was observed at Fushë-Arrëz: 19,145 mg kg⁻¹, followed by Gjegjan-Gojan with a Ni concentration of 16,094 mg kg⁻¹. *Alyssum heldreichii* was sampled at Katara Pass (11,819 mg kg⁻¹) and Malakasi-Soil 1 (5,463 mg kg⁻¹) and its Ni concentrations were lower than those of *A. murale* from the same locations. Leaves of *B. tymphaea* showed Ni concentrations from 9,641 mg kg⁻¹ in Malakasi-Soil 1 to 13,806 mg kg⁻¹ in Trigona. For *B. baldacii*, Ni concentration in leaves of the Albanian subspecies from Gramsh was 14,055 mg kg⁻¹; Ni concentration in leaves of the Greek subspecies *baldacii* from Vovoussa was 10,956 mg kg⁻¹. *Leptoplax emarginata* was also a substantial hyperaccumulator and exhibited its highest concentration of Ni in leaves at Trigona (13,674 mg kg⁻¹) and its lowest at Katara Pass (5,682 mg kg⁻¹).

The ratio of Ni concentration in plant shoots to its concentration in soil varied from 0.35 for *Th. ochroleucum* (Pojska-Soil 2) to 13.9 for *A. markgrafii* (Fushë Arrëz). This ratio represented the transfer factor since soil was sampled around the roots of plant species and was in a range reported for serpentines hyperaccumulator plants (Nanda Kumar et al 1995, Reeves 2002, Shallari et al 1998). For the three species of *Alyssum* (highest ratios), the ratios reached 10.2 for *A. heldreichii* (Katara Pass), 6.3 for *A. murale* (Pojska-Soil 1), and 13.9 for *A. markgrafii*. This ratio can be interpreted as an indication of optimal hyperaccumulation conditions due to high availability of Ni in the soil of origin and high accumulation potential of the plant. Moreover, Ni accumulation in leaves of hyperaccumulators did not respond to Ni chemical availability in soils or to any other expected parameter (e.g. soil pH). There was, however, a significant correlation between Ni concentration in leaves of *A. murale* and total Ca contents in soils (Figure 4). Calcium concentrations in leaves were extremely high despite low concentrations of this element in all soils: about 0.9-4.3% for *A. murale*. For *A. markgrafii* it was also extremely high 2.5-3.2%, and for *B. baldacii* it was still high with 1.2% (Table 3). In general, Ca concentrations were higher for the *Alyssum* species and lower for the *Bornmuellera*, *Leptoplax*, and *Thlaspi* species, but with large variability and not enough samples for statistical comparisons. However, resulting Ca concentrations in leaves were not correlated with Ni concentrations. For Mg, the mean concentration for *A. heldreichii* was 0.65-0.71%, for *A.*

murale 0.46-0.57%, for *A. markgrafii* 0.43-0.52% and the highest values were found in *B. baldacii* subsp. *baldacii* (1.2%) and *Th. ochroleucum* (0.9%). Hyperaccumulator plants showed a different uptake pattern in response to the high concentration of Mg and the low concentration of Ca in soils than the other non-accumulator species (Bani et al., 2007), especially the species from the genus *Alyssum*. All nine hyperaccumulators had a much lower Mg:Ca ratio in leaves than in the soil, with specimen sometimes showing a ratio lower than 0.1 (except for *Th. ochroleucum* at Pojska-Soil 2 for which Mg:Ca ratio was close to 1). The Mg:Ca ratios were markedly lowest for the *Alyssum* species. No particular trend was observed concerning Fe and Mn accumulation by the nine taxa despite reported Mn accumulation in *Alyssum* leaves (Broadhurst et al. 2004). Zinc absorption was also very similar to what can be observed in crops. Cobalt concentration in shoot tissues varied from 8.2 to 90 mg kg⁻¹ showing typical values of accumulating plants. Maximum concentrations were observed with *A. murale* collected at Pojska-Soil 1 (90 mg kg⁻¹), at Prenjas-Domosdova (70 mg kg⁻¹), and at Pishkash (38 mg kg⁻¹). Lower values for Co were recorded from *A. murale* in Prenjas. *Alyssum markgrafii* at the Gjegjan site varied from 12 to 27 mg kg⁻¹. Co concentration in plant tissues of *Th. ochroleucum* varied from 8 to 15 mg kg⁻¹ from Pishkash to Pojska. *Bornmuellera baldacii* subsp. *baldacii* (Vovoussa) was the highest Co accumulator in Greek sites with 42.7 mg kg⁻¹.

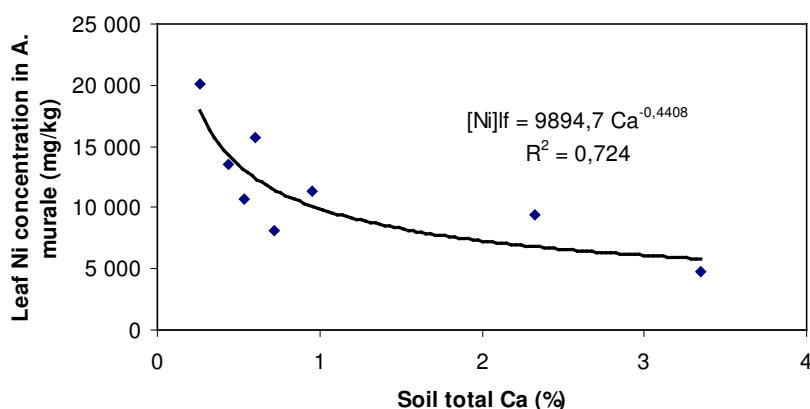


Figure 4. Relationship between Ni concentration in leaves of *A. murale* from all locations in Albania and Greece and total concentration of Ca in soils.

Table 3. Concentration of Ni, Co, Mn, Zn, Fe, Ca and Mg in leaves of the different taxa of Ni hyperaccumulators from Albanian and Greek serpentine soils. Results are given as mean values of three replicates $\pm$ standard deviations

		Ni	Ca	Mg	Co	Fe	Mn	Zn
Species		10^3 mg kg^{-1}			mg kg^{-1}			
<i>A. heldreichii</i>	Katara Pass	11.8 ± 0.4	14.4 ± 1.2	7.0 ± 0.5	16 ± 2.9	687 ± 323	39 ± 5.7	173 ± 25
“	Malakasi-Soil 1	5.4 ± 0.1	26.9 ± 1.7	6.5 ± 0.6	16 ± 0.5	832 ± 114	73 ± 3.7	102 ± 5
<i>A. markgrafii</i>	Gjegjan-Gojan	16.0 ± 1.5	32.0 ± 3.6	4.3 ± 0.1	12 ± 1.1	792 ± 463	70 ± 5.4	332 ± 20
“	Fushë-Arrëz	19.1 ± 0.7	25.0 ± 1.6	5.6 ± 0.1	25 ± 1.0	556 ± 133	69 ± 4.8	250 ± 22
”	Gjegjan	15.4 ± 4.7	29.3 ± 1.7	4.6 ± 1.1	19 ± 6	1351 ± 407	103 ± 20	376 ± 21
<i>A. murale</i>	Pojaska-Soil 1	20.1 ± 1.4	19.1 ± 4.2	5.7 ± 0.5	90 ± 28	562 ± 248	30 ± 2	310 ± 26
“	Prenjas-Domosdova	15.6 ± 1.1	34.8 ± 0.7	4.6 ± 0.8	70 ± 5.6	923 ± 300	121 ± 6.4	208 ± 14
“	Prenjas-rock	8.1 ± 4.1	24.5 ± 2.2	5.7 ± 1.6	28 ± 14	1138 ± 715	55 ± 32	135 ± 8.3
“	Pishkash-Soil 1	9.3 ± 1.1	34.2 ± 3.3	4.7 ± 0.2	38 ± 8.9	1261 ± 141	68 ± 4	183 ± 21
“	Gjegjan	4.7 ± 2.3	22.2 ± 1.4	3.5 ± 0.3	15 ± 6.3	792 ± 107	31 ± 2.6	292 ± 83
“	Katara Pass	11.3 ± 1.4	42.9 ± 5.4	2.1 ± 0.1	12 ± 1.4	535 ± 149	442 ± 11	192 ± 63
“	Malakasi-Soil 2	10.7 ± 0.5	27.9 ± 1.0	5.6 ± 0.06	14 ± 0.4	879 ± 1	38 ± 27	211 ± 2
“	Trigona	13.5 ± 0.1	9.2 ± 0.1	7.1 ± 0.06	8.8 ± 0.9	450 ± 32	17 ± 1.5	163 ± 4
<i>B. baldacii</i>	Gramsh	14 ± 4.3	11.1 ± 3	7.3 ± 2.4	9.9 ± 2.6	380 ± 418	42.8 ± 9.6	161 ± 72
“	Vovoussa	10.9 ± 0.2	15.8 ± 0.2	12 ± 0.7	43 ± 3.5	940 ± 586	85.6 ± 5.9	188 ± 6
<i>B. tymphaea</i>	Malakasi-Soil 1	9.6 ± 2.0	16.7 ± 0.8	3.6 ± 0.3	8.3 ± 4.6	667 ± 39	63.0 ± 36	211 ± 3
“	Trigona	13.8 ± 0.2	16.4 ± 0.6	6.6 ± 0.2	7.9 ± 0.7	444 ± 447	34.8 ± 2.3	168 ± 5
<i>L. emarginata</i>	Katara Pass	5.6 ± 0.4	23.3 ± 0.8	2.5 ± 0.2	11 ± 0.7	417 ± 20	53.4 ± 2.3	134 ± 7
“	Malakasi-Soil 1	11.7 ± 0.2	10.1 ± 0.2	6.7 ± 0.2	6.9 ± 0.2	249 ± 45	31.9 ± 1.6	117 ± 2
“	Trigona	13.6 ± 0.2	8.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	5.9 ± 0.2	359 ± 99	30.8 ± 1	140 ± 3
<i>Th. ochroleucum</i>	Pishkash-Soil 2	1.1 ± 6	9.1 ± 1.5	9.4 ± 0.6	8.2 ± 1.7	2904 ± 145	55.9 ± 1.5	113 ± 3.5
“	Posjka-Soil 2	1.3 ± 0.1	8.1 ± 0.7	7.9 ± 0.9	16 ± 3.9	1587 ± 114	107 ± 9.4	112 ± 11
<i>Th. tymphaeum</i>	Katara Pass	6.4 ± 0.2	13.8 ± 0.7	3.2 ± 0.6	6.4 ± 2.9	570 ± 274	30 ± 2.3	300 ± 39
“	Malakasi-Soil 2	7.0 ± 0.3	55.1 ± 0.5	3.9 ± 1.7	5.7 ± 1.5	1688 ± 804	37 ± 4.5	219 ± 54

Discussion

Soil characteristics and pedological evolution

The serpentine soils of Albania and the Pindus Mountains (Greece) are ultramafic soils that contain elevated levels of metals, such as Mn, Ni, Cr, Co, Fe. Surface horizons of the soils we collected were characterized by extremely high Mg:Ca ratios which are toxic to unadapted plant species. In general, the Mg:Ca ratio observed in ultramafic soils is reported within the range from 2.5 to 47 (Proctor 1971). Mg:Ca ratios in the ultramafic soils in this study reached 30 in Albania and 17.7 in Greece, and were typical of serpentine soils (Reeves et al. 1997). Levels of Co in these soils were high and also typical of serpentine soils in the Mediterranean area (Reeves et al., 1997; Wenzel and Jockwer, 1999). Besides the fact that all soils have a marked ultramafic origin, the presence of such typical elements (i.e. Mg, Fe, Ni, Cr) can also inform about pedogenesis of the soil since their behavior during weathering is quite peculiar for most of them. Therefore, they are indicators of pedological processes (Massoura et al., 2006; Kierczak et al., 2007). The soils of these areas have a similar geological background. Well-serpentinized harzburgite seems to dominate on most of the areas. However, climate conditions are quite different, mostly because of the variation in average elevation of the sites. The sites in Albania (apart from Gramsh) are from relatively low elevation, whereas Greek sites are from moderate to high elevation. This has a direct consequence in weathering intensity of the soils and therefore on their mineralogy, pH, nutrient fertility and Ni availability.

The analysis of Fe partitioning clearly shows some distinct stages of weathering among the five soils. Slightly weathered soils have almost all Fe included in primary silicate minerals. Moderately weathered soils have a much higher proportion of free Fe but have a large proportion of amorphous Fe oxides (soils from Katara Pass and Trigona). More intensely weathered soils have a higher proportion of free Fe which is also dominated by well-crystallized Fe oxides (Massoura et al., 2006). This is the case of two Albanian soils (called Prrrenjas-Rock and Pojska-Soil 2). Another possibility for well-evolved soils is the accumulation of secondary clay minerals (e.g. smectites) in Vertic soils (Lee et al., 2003, Hseu et al., 2007). These minerals then hold most of the Fe. The soil at Prrrenjas-

Domosdova is a clear example of such soils. According to the Fe distribution pattern, we can say that the Greek soils are less evolved Cambisols than the soils collected in Albania.

Control of Ni availability in soils

Although soil pH was quite high (neutral to slightly alkaline) and varied moderately among soils, Ni availability varied considerably and therefore could have been mainly influenced by pedogenesis and Ni-bearing minerals (Massoura et al., 2006). Nickel availability as assessed by DTPA extraction was variable among soils. The pH values of the Greek soils (6.3-7.0) in general were lower than Albanian serpentine soils (6.7-8.2) probably because of the higher elevation and rainfall intensity affecting soil processes. Interestingly, Ni chemical availability in these Greek soils was often higher than in Albanian soils but with at least several exceptions. In this case, the direct effect of pH on Ni availability could be interpreted as the main factor. However, Ni partition between mineral phases plays the most important role in ultramafic soils (Massoura et al., 2006). In particular, the association of Ni with amorphous Fe oxides (slightly weathered soils) and with secondary high-exchange clays (Vertisols) are the main factors of Ni availability in ultramafic soils (Massoura et al., 2006). In this case, the Greek soils are also the least weathered soils of all in the point of view of Fe speciation. This factor is acting in the same way as pH, which is probably not the dominant factor. Nickel is clearly associated with unweathered clay minerals and amorphous Fe oxides in the Cambisols according to weathering intensity. It seems that the crystallization of Fe oxides during pedogenesis is a process that segregates Ni (divalent ion as opposed to FeIII) as Ni seldom enters significantly into goethite particles (Bani et al., 2007). The soil with the highest amount of Ni associated with the amorphous Fe oxides is unsurprisingly the soil with the highest chemical availability of Ni. For the rest of the soils, there is no clear link between the two parameters.

Ni accumulation by plants

Distribution in different area of Ni hyperaccumulators depends mainly on the biology of the species. Therefore, it is influenced by edaphic factors such as climate, soil pH, etc. *Bornmuellera baldacii* is a high elevation species in both countries and only found at elevations higher than 1500 m. *Alyssum markgrafii* is endemic to Albania and is only found

in the North and the center of Albania. It appears from the work of Brooks et al. (1979) and some other studies that many of the *Alyssum* species in section *Odontarrhena* are both serpentine-endemic and invariably Ni-hyperaccumulators. This is the case for *A. markgrafii* in Albania, which strongly accumulates Ni despite being in the presence of limited available pools (DTPA-extractable Ni) in soils. *Alyssum murale* is also reported in Albania elsewhere than on serpentines, such as on calcareous soils (National Herbarium of Albania, Tirana). The Ni-hyperaccumulators, *Bornmuellera baldacii* subsp. *markgrafii* and *Thlaspi ochroleucum*, in Albania contain high concentrations of Ni and according to the definition of Brooks et al. (1977) they are classified as Ni hyperaccumulators. We report Ni hyperaccumulation by Albanian specimens of *Thlaspi ochroleucum* in two different sites for the first time. Nickel concentrations in leaf tissues of the Ni hyperaccumulator flora of Albania and the Pindus Mountains was high but did not reflect the availability of Ni in soils as assessed by DTPA (no statistical relationship was found). It could also have depended on the abilities of different populations of plants. All plants collected in this study accumulate Ni at high concentrations except the two species of *Thlaspi* that did not reach 10,000 mg kg⁻¹ on any of the sites. All species had an opposite Mg:Ca ratio in their leaves compared to that of their respective soils, because of the exceptional ability of *Alyssum* species to take up Ca, even from soils that have low total Ca concentrations. This point was made by Reeves et al. 1997, and reiterated by others (Lombini et al.1998; Shallari et al. 1998). This remarkable Ca uptake ability is probably an important feature in Ni-hyperaccumulator physiology (Broadhurst et al., 2004; Chaney et al., 2008). *Alyssum murale* showed differences in uptake between the two countries and this could be due to genetic variation within this species, which is very widespread across the Balkans. The highly significant correlation we found suggests that the difference among sites is not as important as the nutrient balance of the soils. Unlike what was found with *Thlaspi caerulescens* (Chardot et al., 2007), *A. murale* does not fully respond to chemical availability of Ni but mainly to the Ca contents of soils. In particular, the role of Ca in Ni uptake probably needs more thorough attention in future ecophysiological research on Ni hyperaccumulators. Previous work (Kukier et al., 2004) showed that in Ni-rich non-ultramafic soils, increasing soil pH through liming increased Ni uptake by two species of *Alyssum* (including *A. murale*). However, the same authors showed a decrease of Ni uptake

by these plants when liming an ultramafic soil. The Ca competition in such Ca-deficient soils, and probably the Mg:Ca ratio of the soil solution in these soils, must have a strong influence in Ni absorption, translocation and hyperaccumulation. Our plants reached extremely high Ca concentrations in leaves (>4%), especially on such low-Ca soils.

Consequences for phytoextraction

Some soils (Trigona, Pojska-Soil 2 and Prrrenjas-Domosdova) are highly suitable for profitable phytoextraction (e.g., phytomining) and it appears that these soils display two distinct situations that favor Ni availability. These are the moderately weathered soils, with most of Ni in poorly crystallized Fe-oxides (e.g. Trigona), and the more evolved soils, with significant accumulation of Ni in secondary high-charge phyllosilicates (e.g. Prrrenjas-Domosdova). These soils are also Ca-deficient, which seems to enhance Ni accumulation in leaves.

Maximal ratio of Ni concentration in plants/Ni concentration in soil varied from 13.9 for *A. markgrafii*, 6.3 for *A. murale*, 6.9 for *Th. tymphaeum*, 5.0 for *B. tymphaea*, and 4.0 for *L. emarginata*. *Alyssum markgrafii*-AL, *Th. tymphaeum* – GR, and *B. tymphaea* –GR are the most efficient Ni-hyperaccumulators among the species. It is clear that the endemic *A. markgrafii* and also some efficient populations of *A. murale*, *L. emarginata*, and *B. tymphaea*-GR, display the best Ni-efficiency for use in phytomining.

Chapitre 3

**Pédogenèse et biodisponibilité du Ni pour les
plantes hyperaccumulatrices dans une
toposéquence ultramafique d’Albanie**

*Pedogenesis and nickel availability for
hyperaccumulators in an Albanian ultramafic
toposequence*

Abstract

The ultramafic soil toposequence of Pojska (Albania) is located on the serpentized peridotite outcrop of Shebenik and hosts two of the Albanian Ni-hyperaccumulator species (*i.e. Alyssum murale* Waldst. & Kit., *Thlaspi ochroleucum* Boiss. & Heldr.). The aim of this study was to relate the variability of Ni bioavailability along the ultramafic toposequence to pedogenesis and consequent soil mineralogy. “Hyper”magnesian Hypereutric Cambisols (Soils I & II) dominate upslope and “Hyper”magnesian Cambic Vertisols (Soil III) or Fluvic Cambisols (Soil IV) occur downslope. Mineralogy of the soils shows abundance of primary serpentine all over the sequence. They are predominant upslope but secondary smectites dominate in the Vertisols. Free Fe oxihydroxides are abundant in all soils but slightly more abundant in the upslope soils. Whereas serpentines hold Ni in a similar and restricted range in every soil (approx. 0.3%), Ni contents in smectites may vary a lot and Mg-rich and Al-poor smectites in the Vertisol could hold up to 4.9% Ni in weight. Ni was probably sorbed onto amorphous Fe oxihydroxides and was also included in secondary smectites, probably sorbed onto the mineral surfaces or located on internal exchangeable sites. High availability of Ni in soils was confirmed by DTPA extractions. However, it varied significantly along the toposequence, being higher in upslope soils, where Ni-bearing amorphous Fe oxides were abundant and total organic carbon higher, and sensibly lower downslope on the Vertisols: Ni_{DTPA} varied from 285 mg kg⁻¹ in the surface of soil I (upslope) to 95.9 mg kg⁻¹ in the surface of soil IV (downslope). *Th. ochroleucum* occurred only upslope (0.13 % Ni). Concentration of Ni in *A. murale* shoots varied from 0.7% (soil I) to 1.36 % (Soil III). Amazingly, Ni uptake by *A. murale* was negatively correlated to availability, suggesting the existence specific edaphic conditions that affect the ecophysiology of *A. murale* upslope.

Introduction

Ultramafic terrain occupies less than 1% of the earth's land surface, but is locally abundant in ophiolite belts along tectonic plate margins (Brooks, 1987; Coleman and Jove, 1991). Serpentinite is a metamorphic rock formed from a low temperature hydrothermal alteration of igneous ultramafic rocks, classified as peridotites (O'Hanley, 1996). Ultramafic rocks and especially serpentinites contain very high magnesium (18–24%) and high iron (6–9%) but very low Ca (1–4%) and aluminium (1–2%) (Alexander, 2004). Serpentinite consists mainly of serpentine group minerals formed from original olivines and pyroxenes. Serpentine group minerals, as well as olivines which are the main minerals of ultrabasic rocks, are usually unstable in soil conditions and form secondary phyllosilicates (Bonifacio et al., 1997; Lee et al., 2003). Iron released from olivine and serpentine can be bound in a great range of secondary minerals according to temperature and drainage conditions. Despite differences due to climate, chemistry and mineralogy of soils developed from ultrabasic rocks are strongly affected by the parent rock mineralogy. Soils with either peridotite or serpentinite parent materials are commonly called serpentine soils. (Alexander 2004a). Under temperate climate Mg plays a leading role among exchangeable cations although Ca binds preferentially than Mg to soil Cation Exchange Capacity (Lee et al., 2001; Chardot et al., 2007; Kercziak et al., 2007). Magnesium is indeed partially leached during soil formation in temperate climates (incomplete hydrolysis) and a variety of clay phases, such as vermiculites and smectites, is produced; while under tropical climate Mg is almost all leached (complete hydrolysis) and so is Si leading finally to the accumulation of free Fe oxides (Becquer et al., 2006).

Serpentine soils share a number of chemical particularities including a low calcium-to-magnesium ratio with Ca at significantly lower concentrations than in other soils in surrounding areas. They also frequently contain elevated levels of heavy metals, such as Fe, Ni, Cr, and Co, which could be toxic for most of the plants when the concentration surpasses a certain level. Serpentine soils are often deficient in essential plant nutrients such as N, K, and P (Brooks 1987, Proctor & Woodell 1975, Vlamis & Jenny 1948, Walker 1954). In serpentine soils, Cr and Ni distribution and mineral speciation strongly depends on the climatic conditions (Massoura et al., 2006). Under tropical climate, ultramafic soil

composition is dominated by Fe and Mn oxides (Lee et al., 2001). The main Ni and Cr bearing phase in these ferralsols is usually goethite (Becquer et al., 2006). Therefore, in tropical conditions, ultramafic derived soils are Cr- and Ni-rich (Becquer et al., 2006) and these two elements may be released as a consequence of microbial activity on oxide weathering (Amir and Pineau, 2003).

The flora and vegetation of serpentine soils are related with the serpentine problem. (Whittaker et al., 1954; Proctor et Woodell, 1975; Brooks 1987). The existence of plants hyperaccumulating metals (Ni) (Jaffré et al 1976) and the identification of metal hyperaccumulators, plants capable of accumulating extraordinarily high metal levels, demonstrates that in these soils Ni can be phytoavailable and plants have the genetic potential and can be effective in phytomining or phytoextraction of particular elements from contaminated or mineralized soils (e.g., Lasat, 2002; McGrath et al., 2002; Chaney et al., 2005; Banuelos, 2006).

One of several Albanian ophiolitic massifs is the ultramafic complex of Shebeniku that covers a surface of 260 km². It is located in the ophiolitic belt of central-eastern Albania. This massif is composed of ultramafic rock, harzburgite (80%) and Iherzolites – harzburgites that have been strongly serpentized (5-10 -80 % in the most serpentised parts (Hotolisht) (Manika, 1994). This area is a mountain area with altitudes ranging from 300 up to 2500 m a.s.l., thus giving birth to a wide variety of soils. Within this range is the typical toposequence of Pojska at the foot of ultramafic hills at the approximate elevation of 700 m a.s.l. which is highly representative of the agricultural soils of the district of Pogradec and Prrenjas. The aim of this study was to relate the variability of Ni availability along the ultramafic toposequence to the genesis, the mineralogy and functioning of the soil cover. Finally, the distribution pattern and the Ni uptake of the native hyperaccumulators species were studied in this well-described soil toposequence as a step to understand the behaviour of this plant *in situ* before assessing potential applications to phytomining.

Materials and methods

Study area

The study was conducted in Pojska (Pogradec, East of Albania), a wide ultramafic area. The area was located above the Ohrid lake surrounded by ultramafic hills. The climate is Mediterranean with a continental and mountain influence with an average of 730 mm annual rainfall and a mean temperature of ca. 10°C. The studied soils are developed on a serpentinite bedrock (very well serpentinitised harzburgite). A toposequence was studied across the whole outcrop from hill slope (750 m) down to the base of the ultramafic site at the mouth of the stream that drains the area (700 m). Latitude of the site: 40°59' N and Longitude: 20°38' E. Four representative pedons (related to topographic position; from soil I down to soil IV) were selected and described in opened pits along the toposequence. Soil horizons were each fully characterized and samples of each horizon were taken (except for soil IV which was made of disturbed material in which we only collected the Ap horizon – 0-20 cm), air-dried and sieved at 2-mm. Physico-chemical analyses were carried out at The Laboratoire d'analyse des sols (INRA-Arras) according to French normalised methods (AFNOR, 2004). Taxonomic classifications of the four soils have been carried out according to WRBSR-FAO classification. On May 12th, 2007 a survey of the distribution of the Ni hyperaccumulators *Alyssum murale* Waldst. & Kit. and *Thlaspi ochroleucum* Boiss. & Heldr. over the toposequence was realised.



Photo 1. Toposequence of Pojska (Pogradec, Albania)

Plant identification along the toposequence.

The flora of the toposequence was surveyed to collect Ni hyperaccumulator (nomenclature used here follows Tutin *et al.* (1993). The plant species were sampled at site (Table 4). *Alyssum murale* and *Thlaspi ochroleucum* were the only two hyperaccumulators species along this toposequence. The shoots and especially the leaves of the two plant species were individually collected at each of the four locations (whenever it was possible). Plant samples were taken, rinsed with deionised water and dried at 80°C for 24 h. Trace metal contents, Fe, Mn, Ca and Mg contents in plants samples were determined by plasma emission spectrometry (ICP-OES, Varian) after acid digestion of plant samples in microwave. A 0.5-g DM plant aliquot was digested by adding 8 ml of 69% HNO₃, 2 ml H₂O₂. Solutions were filtered and adjusted to 25 ml with 0.1 M HNO₃. Certified reference materials (*A murale* samples analysed in other laboratories) were analysed in order to control the quality of data.

Identification of soil minerals and location of Ni

X-Ray diffraction (XRD) analysis was performed on the selected samples on the < 50-µm fraction using a D8 Bruker diffractometer with Co Kα1 radiation (lambda= 1.7902 Å). The diffractometer is equipped with a (θ, 2θ) goniometer and a position sensitive detector (PSD). X-ray diffractograms were collected on powder samples at room atmosphere and temperature, within the 2theta range [3, 65°], with 0,035° step and 2s collecting time.

The soil samples were observed by transmission electron microscope (Phillips CM 20). The finely powdered soil samples were suspended in ethanol under ultrasonication (frequency 42 kHz, power 52.9 W). A drop of suspension was then deposited on a carbon-coated film supported by copper grid, and the preparation was observed with a transmission electron microscope (TEM; Philips CM 20) at an accelerating voltage of 200 kV. EDX analyses of selected particles were carried out using an EDAX spectrometer mounted on the Phillips CM 20 TEM, using an ultrathin window and a Si/Li detector. The diameter of the electron beam was 10 nm.

Selective dissolution of Fe oxides was carried out using two chemical reactants to characterise the degree of crystallisation and therefore the degree of evolution of the soils. An oxalate extraction was performed (McKeague & Day, 1966) for amorphous ferrous oxy-hydroxides. The dithionite-citrate-bicarbonate (DCB) extraction was used for well-crystallised Fe oxy-hydroxides (Mehra & Jackson, 1960). Nickel concentrations were measured in each of the extraction solutions with ICP-OES (Massoura et al., 2006). This allows the characterisation of the different forms of free Fe in the soil and to evaluate the distribution of Ni within these different phases. The DCB and Oxalate extractions such as the determination of Ni and Fe were carried out in the certified Laboratoire d'analyse des sols (INRA-Arras).

Ni availability

To monitor Ni availability in the soil samples, two chemical extractions were carried out in the samples of each horizon of the four soils of toposequence: water-extractable and DTPA-extractable Ni (according to the method of Lindsay and Norvell, 1978). The water extraction solution consisted of 2.5g soil sample and 50 ml deionised water. The soil water solution was shaken for 20h, then the suspension was centrifuged at 5000 g for 20 min, filtered through a 0.2- μ m porosity cellulose nitrate filter. The DTPA-TEA extraction solution consisted of 0.005 M DTPA with 0.01 M CaCl_2 and 0.1 M triethanolamine (TEA) at pH 7.3 (Lindsay & Norvell, 1978). Soil samples from each horizon of the four pedons were extracted with the DTPA-TEA solution. Extractions were performed in triplicate. A mass ratio of 1:10 soil: DTPA-TEA solution was shaken for 2 h; then the suspension was centrifuged at 4,000 g for 20 min, filtered through a 0.2- μ m porosity cellulose nitrate filter (SARTORIUS). The quantity extracted per kg of soil is noted Ni_{DTPA} . Concentration of Ni in soil extracts were determined by plasma emission spectrometry (ICP-OES, Varian).

Results

Soil genesis and functioning along the toposequence

Selected soil chemical properties of the soil samples are in Table 1. Differences in chemical properties between soils can be attributed to mineralogical differences. The Ca total content along the toposequence was low and some soils had strong Ca deficiency (reaching

less than 0.3 %). The exchangeable Mg:Ca ratio was 1.7 in the surface of soil I and 6.8 in soil II. The soils found in the upper part of the toposequence were Magnesic Hypereutric Cambisols (WRBSR-FAO classification) (Soils I and II). These soils occur in the steepest part of the hill (soil I) or at the very beginning of the colluvium deposit at the foot of the hill (Soil II). The total Mg:Ca ratio was 17 and 28 respectively in soil I and II. The pH of soil I was neutral and varied from 6.8 in A₁ horizon to 7.1 in the B_w/C horizon. In soil II, it was more frankly alkaline and varied from 7.4 in surface to 7.7. in depth. The soils from the toposequence have highly saturated cation exchange capacities (CEC) that are dominated by Mg²⁺. We propose the term “hypermagnesic” for soils II to III to express the extremely high Mg:Ca ratio in the CEC of these soils that are higher than 6 (Chardot et al., 2007). The soils found in the site III and IV were classified respectively Hypermagnesic Hypereutric Vertisol and Hypermagnesic Hypereutric fluvic Cambisols. Soil III, was located in a downslope area (glacis) dominated by colluvial deposits. Soil IV was strongly affected by the alluvial deposits of a small stream and consisted of coarser material. The total Mg:Ca ratio was 20 and 40 in the surface of soil III and IV. The exchangeable Mg:Ca ratio was 7.4 in the surface of soil III and 6.4 in soil IV. Their pH varied from 7.5 in the Ap horizon to 7.9 in the C horizon of soil III and it was 8.0 in the surface Ap horizon of soil IV, being the highest of the toposequence.

Magnesium contents are lower and Si contents are higher in downslope soils (especially at soil III) whereas Fe is relatively enriched in upslope soils (Figure 1). The original Mg:Si ratio in the bedrock is 1.14. In soil IV that is very close to the bedrock in terms of origin (coarse eroded stone particles and sands), the Mg:Si ratio is 0.57 (50% loss of Mg as compared to the substrate). From Soil I to soil III, there is a regular decrease of the Mg:Si ratio from 0.48 (soil I A₁ horizon) to 0.28 (Soil III B horizon) which corresponds respectively to a loss of Mg twice as fast as the loss of Si up to three times as fast (if one considers that Si is stable in soils). As far as the Fe:Si ratio is concerned, the trend towards Fe enrichment is general in all soils but much more pronounced in upslope soils (0.77 in the B_w/C horizon of soil I as compared with 0.33 in the bedrock). It decreases regularly down the soil catena and is lowest at soil III (B horizon). These results make sense with mineralogical data (Table 2).

The four soils contain high levels of metals that are typical from serpentines, such as Ni, Co, Cr and are also rather infertile with regards to K and P total contents and availability. Total Ni content was high and quite evenly distributed in all soils of the toposequence (Table1). The highest concentrations of Ni are found in B horizons but with limited variations. The Cr contents are higher within the upper and well drained soils.

Table 1. Physico-chemical characteristics of the different sampled horizons of the four pedons along the toposequence in Pojska.

Horizon			Particle size distribution			CaCO ₃ total	pH	Org C	Org Matter	N	P	C/N	CEC	Exchangeable cations				Total major elements						Total trace elements					
			Clay	Silt	Sand		water			total	Olsen			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ²⁺	Na ²⁺	Ca	Mg	Al	K	Na	Fe	Co	Cr	Mn	Cu	Zn	Ni
			%			g/kg	H ₂ O	%						cmol+/kg				%						mg kg ⁻¹					
Soil I	A ₁	0-15	46.5	40.7	12.8	<1	6.81	6.56	11.4	0.53	0.02	12	33	11.5	19.8	0.47	0.04	0.45	7.79	2.6	0.5	0.26	11.4	280	2400	2610	21,6	131	3240
	B _w	20-30	54.1	31.8	14.1	<1	7.08	2.97	5.5	0.25	0.01	12	37.7	6.32	31.1	0.48	0.05	0.25	7.49	2.8	0.5	0.20	13.2	247	1980	2180	20,3	114	3700
Soil II	A _p	0-20	52.8	31.7	15.5	<1	7.35	3.53	6.1	0.31	0.02	11	37.3	4.68	32.1	0.57	0.05	0.26	7.44	3.0	0.6	0.24	10.8	207	1830	2080	20,1	122	3210
	A/B	20-30	53.6	25.8	20.6	<1	7.55	2.22	1.1	0.20	0.01	11	39.7	3.09	39.4	0.59	0.06	0.17	7.15	2.8	0.5	0.20	11.1	164	803	1590	19,6	105	3200
	B _w	35-45	50.5	29.8	5.8	<1	7.66	1.77	3.0	0.15	0.01	11	38.3	2.69	41.5	0.57	0.07	0.16	7.61	2.9	0.5	0.21	11.0	147	787	1380	19,4	99	3140
Soil III	A _p	0-30	51.6	27.7	20.7	<1	7.45	2.74	4.7	0.23	0.01	12	38.9	5.42	40.5	0.37	0.08	0.3	6.01	2.7	0.5	0.20	9.9	207	1600	2060	23	130	3150
	B _{1g}	30-50	52.2	14.8	33.0	<1	7.75	1.36	2.4	0.10	0.01	13	43.8	3.41	49.4	0.37	0.09	0.18	5.56	2.6	0.4	0.20	10.8	224	1610	2920	13	95	3050
	B ₂	50-70	37.4	11.9	50.7	1.0	7.62	0.38	0.7	0.05	0.01	8	42.4	1.47	48.6	0.32	0.09	0.11	7.00	1.9	0.2	0.10	12.1	160	1490	1460	11	91	3300
	B/C	70-120	57.5	23.3	19.2	<1	7.87	0.34	0.6	0.04	0.01	8	38.9	1.14	50.5	0.42	0.11	0.15	4.61	4.0	0.6	0.30	9.7	134	1170	1320	11	91	2070
Soil IV	A _p	0-10	32.0	32.0	36.0	<1	7.98	2.75	4.8	0.23	0.02	12	28.1	3.79	24.4	0.53	0.03	0.26	10.5	1.7	0.4	0.17	9	182	677	1760	15, 7	102	3180

Figure 2a

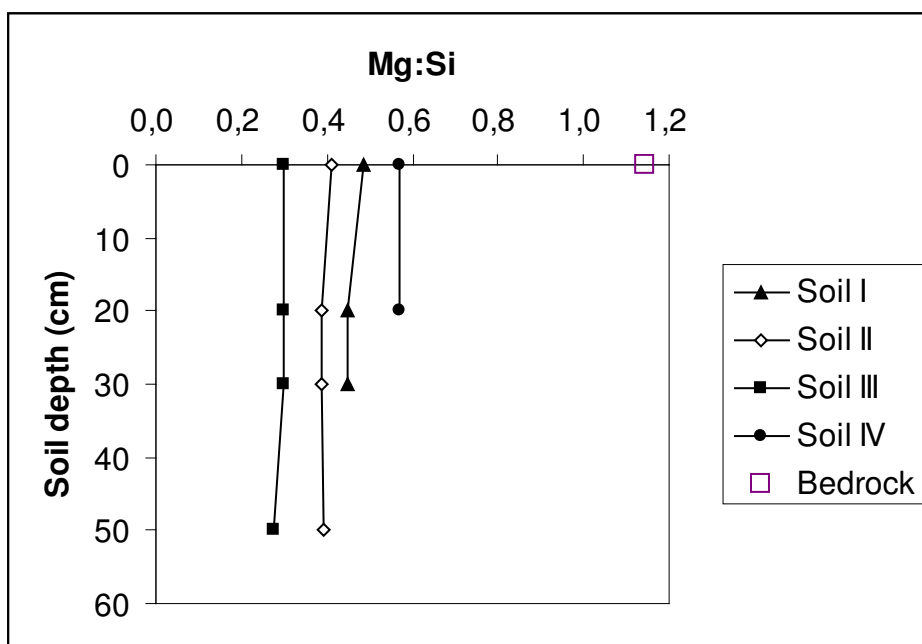


Figure 2a

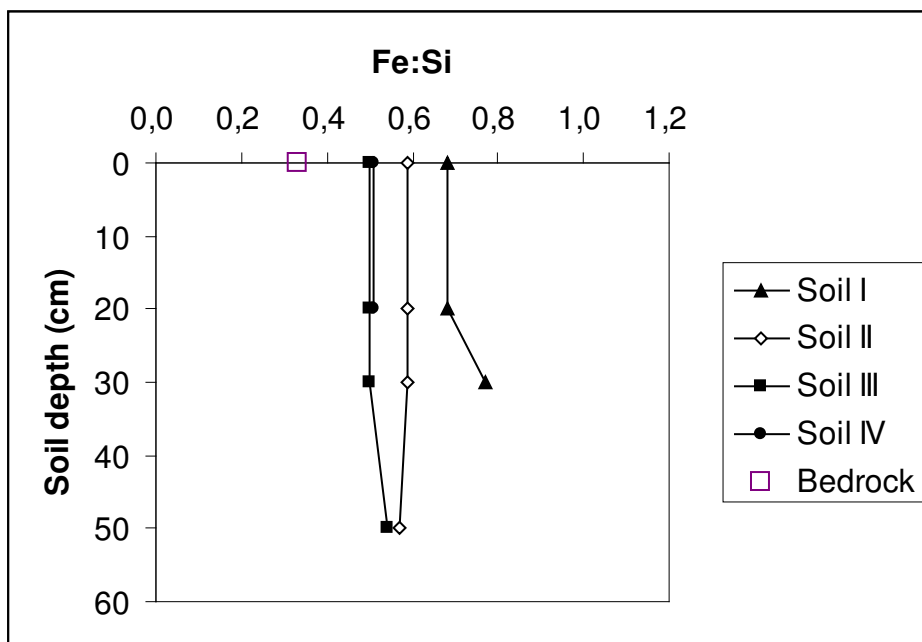


Figure 2b

Figure 1: Evolution of the elemental ratios with depth in the four soils of the toposequence of Pojska. Figure 2a: Mg:Si ratio ; Figure 2b: Fe:Si ratio.

Soil mineralogy and identification of Ni-bearing phases.

The XRD analyses on the B horizons of the four soils of the toposequence indicate the presence of various mineral phases varying from primary serpentine (non-chrysotile type) to secondary smectite and Fe-oxihydroxides (Table 2). Serpentine (mostly lizardite/antigorite as confirmed by MET observations) was present as the major mineral phase in soils I and II and chlorite was the other primary mineral detected in these soils. Smectite was the dominant secondary mineral in these two soils, but much less abundant than serpentine. In soil I, goethite was significantly present whereas it was only detected as traces in soil II. In soil III, smectite was the predominant mineral, and serpentine (lizardite/antigorite) was also present as one of the major mineral phases, but no goethite (the Vertisol is affected by temporary waterlogging conditions) nor chlorite were detected in this soil. The mineralogy of soil IV is mostly dominated by the same type of serpentines as in the other soils. Soil IV is composed of fresh coarse alluvial material. We also detected some traces of quartz, plagioclases (feldspars), mica and illite in many of the samples.

The TEM-EDX study of the mineral particles was carried out on the B horizons of soils I, II and III as well as on the A_p and B/C horizons of soil III and on the crushed bedrock (Table 3). The composition of the bedrock was typically that of serpentinite rocks (21 % Si, 24% Mg, 7% Fe, 0.3% Ni, 0.04 % Ca and 0.05 % Al). The serpentine particles spotted in every soil revealed similar concentrations of Ni (0.6-0.9 %) with no significant differences among soils but with a significant difference with the serpentine in the bedrock (0.3 %), thus showing some weathering signs. In soil I, the Ni bearing phases were serpentine (0.65 % Ni) and Fe oxihydroxides – probably goethite – (1.3 % Ni). In soil III, Ni was more concentrated in Mg-rich smectites than in any other type of mineral: 1.9 % Ni in the A_p horizon, 3.1 % Ni in the B horizon and 1.6 % Ni in the B/C horizon (Table 2). Al-rich or Al=Mg smectites had significantly lower Ni contents, always below 1.0 %.

The results from oxalate and DCB extraction showed that the fractions of free Fe (Fe_d) in relation to total Fe in the surface horizons were respectively, 55 %, 43 %, 30 % and 42% in soils I, II, III and IV (Figure 2). In the soils of Pojska, free Fe was mainly present as well crystallized oxi-hydroxides except for soil III. The fractions of amorphous Fe oxi-hydroxides (Fe_o) in relation to total Fe in the surface horizons were respectively 15 %, 15 %, 15 % and 15 % in soils I, II, III and IV.

13 %, 15 % and 15% for soils I, II, III and IV. In the surface horizons of the four soils, although free Fe was mainly under well-crystallised forms (Fig.2), Ni was mainly associated with both silicates and amorphous Fe-oxides. The fraction of Ni in the amorphous Fe-oxides represented respectively 47 %, 39 %, 34 % and 31% of total Ni in soils I to IV, thus showing a decrease when going downslope where it was more frequently associated with phyllosilicates. Ni in amorphous Fe-oxides was also correlated (only four points) to DTPA-extractable Ni in the four soils ($R^2=0.88$).

Table 2 Abundance of minerals in the B horizons of the four soils of the toposequence of Pojska determined by X-ray diffraction of fine powder (<50 μm)

	Soil I	Soil II	Soil III	Soil IV	Bedrock
Serpentine	+++	+++	++	+++	+++
Smectite	+	+	+++		
Fe oxihydroxide	+	(+)			
Chlorite	(+)	(+)		(+)	
<i>Quartz</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	
<i>Amphibole</i>	(+)				
<i>Mica</i>		(+)		(+)	
<i>Illite</i>		(+)		(+)	
<i>Feldspar</i>	(+)	(+)	(+)		

+++ most abundant:

++ very abundant:

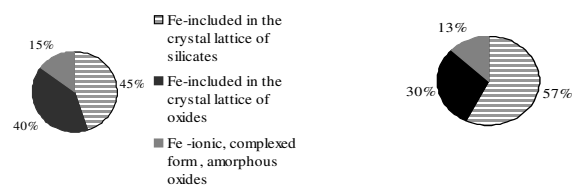
+ abundant:

(+) traces

Table 3. Identification by MET-EDX of Ni-bearing phases and their Ni content (in % of mass) in the horizons of the toposequence of Pojska. For smectite particles, they have been grouped according to their Mg:Al ratio. The number of observations for each type of minerals is given between brackets.

		Ni Concentration
Ni-bearing phases		%
Bedrock	Serpentine [8]	0.30 ± 0.17
	Serpentine [3]	0.65 ± 0.18
	Fe Oxide [3]	1.33 ± 1.00
Soil I Horizon B _w	Fe-rich smectite [?]	1.05 ± 0.14
	Serpentine [5]	0.85 ± 0.17
	Fe oxide + smectite[2]	0.68 ± 0.04
	Chlorite	0.49
Soil II Horizon B _w	Smectite Al=Mg	0.5
	Serpentine [8]	0.69 ± 0.28
	Al-rich smectite [3]	0.44 ± 0.22
	smectite Mg = Al [3]	1.00 ± 0.24
Soil III Horizon A _p	smectite Mg $\geq$ Al [1]	1.87
	Serpentine [3]	0.60 ± 0.31
	Al-rich smectite [6]	0.57 ± 0.17
Soil III Horizon B _w	smectite Mg = Al [3]	0.72 ± 0.28
	smectite Mg $\geq$ Al [3]	3.12 ± 2.50
	Serpentine [4]	0.66 ± 0.12
	Al-rich smectite [1]	0.66
Soil 3 horizon B/C	smectite Mg = Al [4]	0.99 ± 1.00
	smectite Mg $\geq$ Al [3]	1.55 ± 0.54

Figure A)



Soil I

Soil II

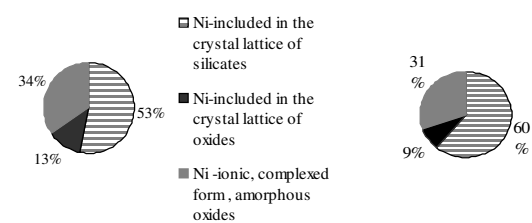
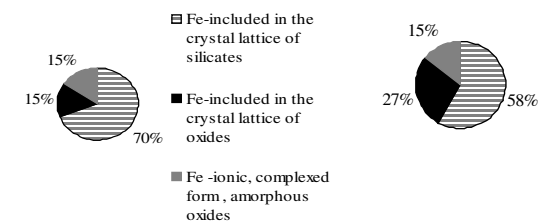


Figure B)



Soil III

Soil IV

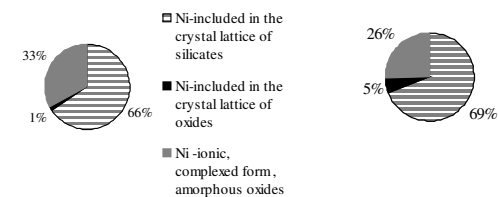


Figure 2: Distribution of Fe and Ni within the different mineral compartments in the surface horizons of the four soils of the toposequence of Pojska; Figure A) soil I and II, Figure B) soil III and IV.

Ni availability along the toposequence

DTPA-extractable Ni varied considerably among the soils of the toposequence of Pojska (Figure 3). The amount of Ni extracted by DTPA (Ni_{DTPA}) was always higher in the surface horizons than in B horizons. In soil I (285 mg kg^{-1}) it was the highest and in soils III and IV, it was lowest (117 mg kg^{-1} and 96 mg kg^{-1} respectively). Water-extractable Ni in surface horizons of the soils varied from 5.5 mg kg^{-1} (soil I) to 6.8 mg kg^{-1} (soil II) (4.0 mg kg^{-1} and 5.9 mg kg^{-1} in soils III and IV respectively). There was no trend along the toposequence and the amounts of Ni extracted by water were quite similar from one soil to another.

In the soils of Pojska the organic carbon was highest in the soils where Ni availability was also the highest (soils I & II). The relationships between Ni_{DTPA} and Org C can be best described with a linear regression (Figure 4):

$$Ni_{DTPA-TEA} = 43.1 \text{ Org C} + 8.16$$

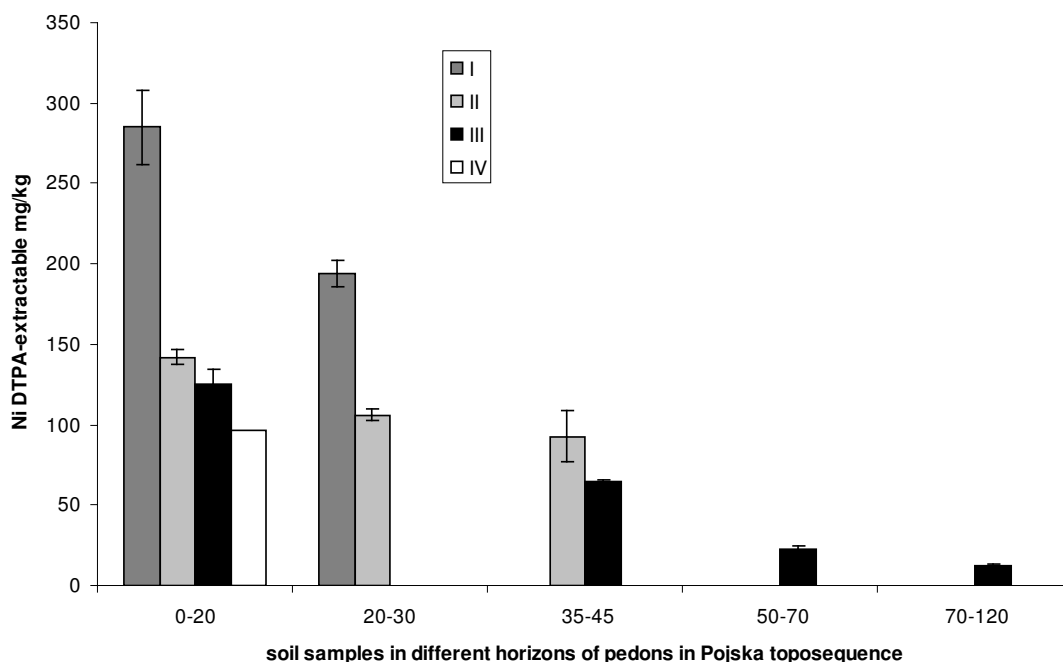


Figure 3: DTPA extractable Ni in the different horizons of the four soils of the toposequence of Pojska.

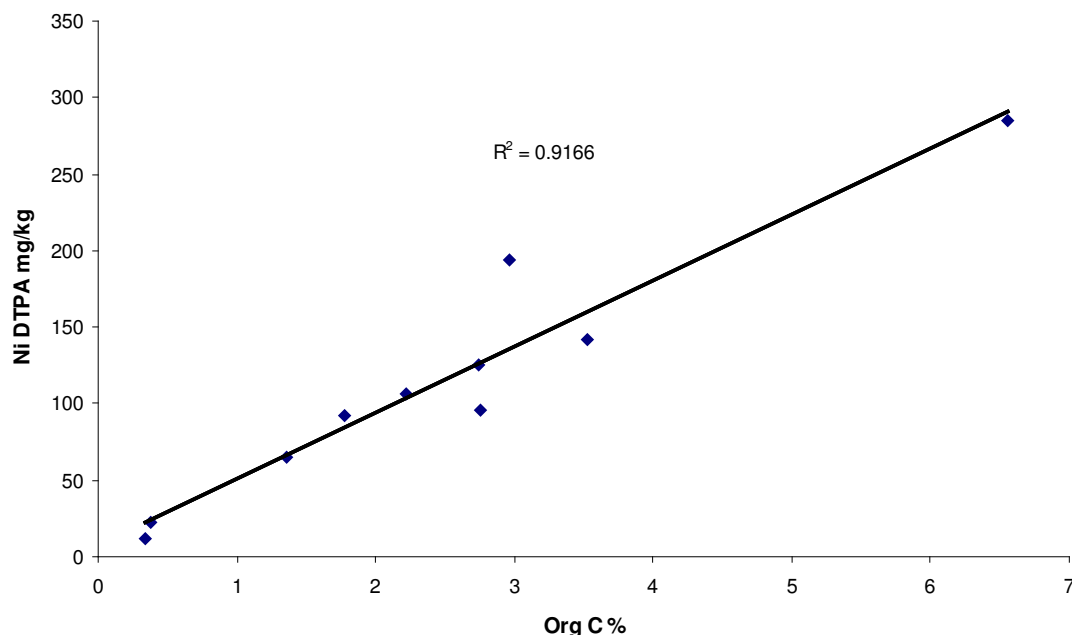


Figure 4: The relations between chemically-available Ni (DTPA-extractable) and soil total organic carbon (Org C) in the four soils of the toposequence of Pojska.

Distributions of hyperaccumulator plants and Ni uptake along the toposequence

Alyssum murale (soil I-IV) and *Th. ochroleucum* (soil I) were the only Ni hyperaccumulator species that were identified in toposequence. Nickel content in plant tissues depended on the species and also from the collection site for *A. murale*. Extremely high Ni concentrations in shoots were recorded for *A. murale* in soils III and IV (1.35 and 1.36 % respectively) and they were lower in soils I and II (0.79 and 0.59 % respectively). Concentration of Ni in *Th. ochroleucum* shoots was 0.14 %, reaching of course hyperaccumulation levels but it was indeed much lower than *A. murale*.

Concentration of Ni and other elements in leaves only was also determined because they reveal the highest Ni (and possibly Co) concentrations in hyperaccumulating shoots. Highest Ni values in leaves were recorded for *A. murale*, also on soil IV (20,135 mg kg⁻¹) and highest Co (90 mg kg⁻¹) showing typical values of hyperaccumulating plants (Table 4). For *A. murale* the ratio Mg:Ca in plants was lower than 1 (0.15-0.59) and for *Th. ochroleucum* it was slightly higher (0.97). Calcium concentrations in leaves were

extremely high despite the low exchangeable amounts of this element in soils: about 1.4-3.5% for *A. murale* and 0.8 for *Th. ochroleucum*. Magnesium concentrations were also high as expected but always lower than Ca.

Table 4. Concentrations of Ni, Co, Ca, Mg, Fe, and Mn, in leaves of *Alyssum murale* and *Thlaspi ochroleucum* collected in the toposequence of Pojska. Results are given as mean values of three replicates $\pm$ standard deviations.

Species	Soil	Ni	Co	Ca	Mg	Fe	Mn
		mg kg ⁻¹					
<i>A. murale</i>	<i>I</i>	12542 $\pm$ 660	8.6 $\pm$ 0.2	35334 $\pm$ 144	3539 $\pm$ 486	988 $\pm$ 489	53 $\pm$ 30
<i>A. murale</i>	<i>II</i>	11019 $\pm$ 181	7.9 $\pm$ 0.7	14002 $\pm$ 298	6515 $\pm$ 1152	409 $\pm$ 94	26 $\pm$ 4
<i>A. murale</i>	<i>III</i>	16290 $\pm$ 895	9.3 $\pm$ 0.5	17252 $\pm$ 1537	7930 $\pm$ 469	368 $\pm$ 98	27 $\pm$ 4
<i>A. murale</i>	<i>IV</i>	20135 $\pm$ 1469	90 $\pm$ 28	19150 $\pm$ 4292	5778 $\pm$ 514	561 $\pm$ 248	30 $\pm$ 2
<i>Th. ochroleucum</i>	<i>I</i>	1355	15.9	8115	7903	15868	106

Discussion

Soil characteristics and elemental dynamics along the toposequence

In this toposequence we have identified three soil types. The most weathered soils in terms of pedogenesis were the Cambisols and especially the Vertisol. The Fluvisol was by far the least weathered and the closest in terms of particle size distribution and mineralogy to the bedrock. Moreover, there seems to be a redistribution of Si and Mg at the level of the catena from Cambisols down to Vertisols, Ca and Fe being relatively enriched in Cambisols (Especially in upper soil I). One reasonable hypothesis is that this impoverishment is at least partly due to the leaching of colloidal smectites from Cambisols down to the Vertisol and not only to the single leaching of Mg²⁺. Iron segregation in the Cambisols (especially soil I) is more developed than in downslope soils, thus showing more advanced weathering of serpentine in such soils (with even a slight acidification in surface). This could be a double process of (i) serpentine dissolution and release of both Mg and Si in draining water and (ii) serpentine weathering into smectite and subsequent downslope leaching of secondary smectites. Nickel shows a regular distribution in all four soils and does not seem to follow redistribution (Ni loss might be compensated by the relative enrichment within

secondary smectites and Fe oxihydroxides. Several works have been carried out to explain soil formation on serpentine in temperate or Mediterranean environments (Bonifacio et al., 1997; Caillaud et al., 2004, 2009; Kercziak et al., 2007; Lee et al., 2003). In general, in the coldest areas, soils are more acidic and leaching of Mg is noted intensely everywhere (Kierczak et al., 2007). Whereas Fe is not concentrated in cold temperate soils, it is enriched from bedrock in soils from NW Italy with similar Mediterranean environmental conditions (Bonifacio et al., 1997; Kierczak et al., 2007).

Mineralogy of soils and consequences on the soil catena functioning

Olivines and pyroxenes are never found in this catena. This is due to the high degree of serpentinisation of the bedrock and also to the warmer climate than in other All serpentines spotted in the four soils contain at least twice as much Ni (0.6-0.9 %) as in the bedrock As in our study, Istok and Harward (1982) found smectite, chlorite, and serpentine within poorly drained soils, but found only serpentine and chlorite in well-drained upland soils. All serpentines spotted in the four soils contain at least twice as much Ni (0.6-0.9 %) as in the bedrock (0.3 %) sampled from the R horizon of soils I and II, thus showing some preliminary steps of weathering and probable dissolution of brucite in these primary serpentines. Chlorite is found in all well-drained soils at traces. It was not spotted in the bedrock although it must be primary; no vermiculite was found however that could derive from chlorite weathering (Bonifacio et al., 1997; Lee et al., 2003).

In Cambisols, apart from the overall change of serpentine composition described above, smectites are significantly formed. An important proportion of Fe-smectites are found in soil I, thus showing more intense evolution of neo-formed smectites as compared to the Vertisol. Moreover, Fe-oxihydroxides are more present in this soil than in the Vertisol. They are almost mainly under the form of well-crystallised goethite (XRD data confirmed by DCB and oxalate extractions). In the Vertisol, smectite enrichment from both weathering of serpentine and leaching from upslope leads to predominance of smectites and especially Mg-rich smectites. Poor drainage in this soil probably prevents from further weathering of smectites through Mg loss. Free Fe is much less crystallized in this soil as in well-drained Cambisols due to the hydromorphic conditions.

Our results here confirm several observations made by the previously cited works and also bring new insights for Mediterranean climates as it points out the possible transfer of secondary smectites within the slope and thus the formation of Vertisols. Ultramafic vertisols in downslope soils of this ultramafic area of Albania represent more than 10,000 ha and cover the main flat lands in the Prrenjas and Pogradec districts (Zdruli 1997).

Ni availability along the toposequence

The nature of Ni bearing phases and, more generally speaking, of soil mineralogy, is linked with Ni availability. Mineral pools of available Ni are amorphous Fe oxi-hydroxides and Mg-rich smectites. As observed for other soils, Ni fate is strongly related to free Fe fate (Massoura *et al.*, 2006; Chardot *et al.*, 2007). This confirms the findings of previous study with the samples from temperate or Mediterranean ultramafic regions for which a significant fraction of Fe was found in the oxalate fraction. The proportion of total Ni associated with amorphous Fe oxides (and most probably sorbed onto their surface) in Soils I and II was higher than in soils III and IV and so was Ni chemical availability assessed by DTPA; Fe geochemistry thus governs the fate of Ni in these soils (Becquer *et al.*, 2006; Massoura *et al.*, 2006).

The role of smectites in Ni availability in soil III is evident. Organic carbon also influences statistically Ni availability. The correlations between levels of carbon and DTPA-TEA extractable Ni ($r^2 = 0.915$) show the significance of this relation. The higher concentrations of extractable Ni in surface horizons drive this influence of the organic matter on Ni availability in the soil. Ni biogeochemical recycling could be the mechanism behind this relationship.

Soil IV has the least available fraction of all soils. Soil I has the highest. Therefore, the more the soil is weathered, the higher the availability of Ni. Also, biogeochemical recycling of Ni seems to be important and organic matter may also contribute to host a significant fraction of available Ni after litter recycling.

Relationships between Ni availability and uptake by hyperaccumulators plants

The distributions and the abundance of *A. murale* in the ultramafic site of Pojska do not depend from Ni availability as it was found everywhere. The distributions of *Th. ochroleucum* could be due to a lower pH (Chardot et al., 2005). Thlaspi species are likely to react positively to metal availability (Schwartz *et al.*, 1999). *Th. ochroleucum* accumulates Ni almost in the same level in two locations of Albania in the same pH conditions (Bani et al., 2009).

Nickel uptake by *A. murale* was negatively correlated to availability, suggesting either the existence of genetical differences along the toposequence or the existence of specific edaphic conditions that affect the growth of *A. murale* upslope. Lower Ni uptake by *A. murale* in sites I and II can be explained by a lower pH value (Kukier et al., 2004) by limiting water availability due to landscape position or by the existence of two genotypes of *A. murale* in this area. On soil IV, which we estimate the most suitable in terms of physical constraints, there is a higher uptake of Ni as well as a higher uptake of other trace elements (e.g. Co).

Conclusion

A typical soil catena from of Eastern Albania from (Pojska in the region of Pogradec, Albania) was studied as representative for mediterranean ultramafic landscapes. The toposequence developed on highly serpentinised peridotite (in which serpentine was by far the dominant mineral) was composed of Hypermagnesian Hypereutric Cambisols, Vertisols and Fluvisols. Vertisols are located in the colluvial areas at the foot of the hills. The weathering of serpentine minerals in such soils was expressed as the double process of (i) serpentine dissolution and release of both Mg and Si and (ii) serpentine weathering into smectites and subsequent downslope transport and accumulation in foothill soils. All serpentines contain at least twice as much Ni (0.6-0.9 %) as in the bedrock thus showing the first steps of weathering. In Cambisols, dominant minerals are serpentines followed by smectites (Fe-smectites) and Fe-oxihydroxides (well-crystallised goethite). In the Vertisol, the dominant minerals are smectites (especially Mg-rich smectites).

Ni availability is linked with the nature of Ni bearing phases (soil mineralogy) but also total organic carbon (significant correlation). Mineral sources of available Ni are amorphous Fe oxy-hydroxides (readily available) in Cambisols and Mg-rich smectites in Vertisols. Therefore, in mediterranean ultramafic context, the more the soil is weathered, the higher the availability of Ni. The distributions of *Th. ochroleucum* in only upslope Cambisols could be due to a lower pH (Chardot et al., 2005) or to a higher level of Ni availability in the soils. Nickel uptake by *A. murale* was not correlated with the amount of chemically available Ni in the soils; it maybe depends on genotypic differences or more probably on specific edaphic conditions (pH value, Ca content of soils).

Chapitre 4

**Phytoextraction in-situ de Ni par une population
naturelle d'*Alyssum murale* sur un sol ultramafique
d'Albanie**

***In-situ phytoextraction of Ni by a native population
of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania)***

[Plant Soil \(2007\) 293:79–89](#)

Abstract

Ultramafic outcrops are widespread in Albania and host several Ni hyperaccumulators (*e.g.* *Alyssum murale* Waldst. & Kit.). A field experiment was conducted in Pojske (Eastern Albania), a large ultramafic area in which native *A. murale* was cultivated. The experiment consisted in testing the phytoextraction potential of already installed natural vegetation (including *A. murale*) on crop fields with or without suitable fertilisation. The area was divided into six 36-m² plots, three of which were fertilised in April 2005 with (NPK+S). The soil (Magnesian Vertic Cambisol) was fully described as well as the mineralogy of horizons and the localisation of Ni bearing phases (TEM-EDX and XRD). Ni availability was also characterised by Isotopic Exchange Kinetics (IEK). The flora was fully described on both fertilised and unfertilised plots and the plant composition (major and trace elements) and biomass (shoots) harvested individually were recorded.

The soil had mainly two Ni-bearing phases: Mg smectite (1.3% Ni) and serpentine (0.7% Ni), the first one being the source of available Ni. Ni availability was extremely high according to IEK and confirmed by Ni contents in *T. nigrescens* reaching 1 442 mg kg⁻¹ (A new hyperaccumulator?). Total biomass yields were 6.3 t ha⁻¹ in fertilised plots and 3.2 t ha⁻¹ in unfertilised plots with a highly significant effect: fertilisation increased dramatically the proportion of *A. murale* in the plots (2.6 t ha⁻¹ vs 0.2 t ha⁻¹). Ni content in the shoots of *A. murale* reached 9 129 mg kg⁻¹ but metal concentration was not significantly affected by fertilisation. Phytoextracted Ni in total harvest reached 25 kg Ni ha⁻¹ on the fertilised plots. It was significantly lower in unfertilised plots (3 kg Ni ha⁻¹). Extensive phytomining on such sites could be promising in the Albanian context by domesticating already installed natural populations with fertilisation.

Introduction

Serpentine substrate covers large areas in Balkans, more than in any other part of Europe. Biodiversity in the area is high, with a great number of interesting local and regional endemics. More than 300 endemic taxa occur on serpentine in Balkans. The high number of endemics indicates the importance of serpentine habitats as centers for floristic differentiation and speciation. Serpentine areas in Balkans exist in large blocks or as small outcrops. Ultramafic substrate in Albania cover 30% of the areas and they extend towards NC & SE. Ultramafic outcrops host a rich vegetation (Shallari *et al.*, 1998) including a certain number of endemic and subendemic (Stevanović *et al.*, 2003) such as trans-regional endemics (*e.g. Polygonum albanicum*, *Bornmuellera baldacii*, *Alyssum markgrafii* or *Viola dukadjinica*) or regional endemics (*e.g. Alyssum smolikanum*, *Viola albanica*, *Festucopsis serpentine*).

Hyperaccumulation is a mechanism that is believed to allow plants to survive on serpentine soils (Brady *et al.* 2005). Hyperaccumulators are defined as plants that contain in their tissue more than 1000 mg kg⁻¹ dry weight of Ni, Co, Cu, Cr, Pb, or more than 10000 mg kg⁻¹ dry weight of Zn, or Mn (Baker & Brooks, 1989). Aside from metal tolerance, hyperaccumulation is thought to benefit the plant by means of allelopathy, defense against herbivores, or general pathogen resistance (Boyd & Jaffré, 2001; Boyd & Martens 1998a; Davis *et al.* 2001). There are at least 400 known Ni hyperaccumulators. The Ni hyperaccumulator *Alyssum murale* Waldst. & Kit., is widely present on ultramafic regions and industrial areas of Albania. The need to manage the Ni polluted soils necessitates the study of the behaviour of this hyperaccumulator plant in conditions *in situ*. Previous studies clearly evidenced a great variability in phytoextraction potential by different Albanian populations of *A murale* depending on the site of collection (Massoura *et al.*, 2004, Shallari *et al.*, 1998). This variability probably results from the interrelationships between the ecophysiology of specific populations and the edaphic characteristics of their native site.

Phytoextraction employs metal hyperaccumulator plant species to transport high quantities of metals from soils into the harvestable parts of roots and aboveground shoots (Kumar *et al.*, 1995, Chaney *et al.*, 1997). Effective phytoextraction requires both plant genetic ability and the development of optimal agronomic management practices (Li *et al.*

2000). It has been well-documented that modifying soil fertility may affect the efficiency of phytoextraction of heavy metals such as Ni, Zn, Co, Cd with a single crop (Bennett *et al.* 1998; Li *et al.*, 2003a; Kukier *et al.*, 2004). But the effects of fertilisation are less predictable when dealing with a native vegetation cover. However, there is an evident need of fertilisation and phytoextraction yield improvement (Robinson *et al.*, 1997) to achieve sufficient Ni extraction. Such extensive practices of phytoextraction could be more easily implemented in a country such as Albania (small surfaces, limited investment capacity of farmers).

This paper reports the first findings of an *in situ* experimental work aiming at studying the response of a native vegetation cover, including *A. murale*, to agronomic practices in the view of optimising the phytoextraction yield of Ni. The objectives were (i) to optimise extensive phytoextraction methods that would be adapted in the Albanian context and (ii) to understand the relationships between the ecophysiology and the mineral nutrition of stands of native *A. murale* and other species, and the specific properties of a soil which displays high Ni availability. The soil of the site was therefore carefully studied to identify the factors influencing plant growth and Ni uptake and 36-m² experimental plots were designed to study the effect of mineral fertilisation on species distribution, specific biomass yield, mineral nutrition and Ni phytoextraction.

Materials and methods

Site and soil characterization and experimental plot design

An *in situ* field experiment was conducted in Pojske (500 m) (Pogradec, East of Albania), a wide ultramafic area in which native *A. murale* population were grown. The experiment was carried out in spring 2005. The experimental area was a colluvial downslope (10-15%) above the lake surrounded by ultramafic hills. The parent material was colluvium of ultramafic and magnesite origin. Climatic data for Pojska in 2005 are given in Table 1.

Table 1. Monthly climatic parameters at Pojska in 2005

	Max	Min	Average		Potential
	temperature	temperature	temperature	Rainfall	evapotranspiration
Month	(°C)	(°C)	(°C)	(mm)	Penman (mm)
Jan	5.6	3.8	0.9	62	4
Feb	4.8	-5.3	-0.2	71	1.2
Mar	9.8	-1.5	4.1	77.4	16.5
Apr	14.6	2.5	8.6	33.9	34.5
May	21.4	7.4	14.4	55.1	57.2
Jun	24	9.5	16.8	30.2	67.2
Jul	26.8	11.9	19.4	19.5	77.2
Aug	27	9.8	18.4	13.5	73.2
Sep	22.3	7.5	14.9	47.3	59.2
Oct	16.4	3.2	9.8	61.4	0
Nov	11.3	2.3	6.8	80.4	27
Dec	7.7	-0.7	3.5	179.4	14.1

The soil profile was described and samples were taken from the three horizons identified in the field (0-20cm, 20-35 cm, > 50 cm). Analyses of Ni-bearing phases with transmission electron microscopy, coupled with X-ray spectroscopy (TEM-EDX) techniques, were performed to identify the minerals and their elemental composition. X-Ray diffraction (XRD) was run on the 50µm fraction to determine mineralogy. Ni availability in different soil samples of surfaces was characterised by Isotopic Exchange Kinetics (see complete details and procedure in Echevarria *et al.*, 1998). DTPA-extractable Ni was determined using the method of Lindsay and Norvell (1978). Concentration of Ni in soil extracts were determined by plasma emission spectrometry (ICP).

The experimental site was already covered by spontaneous native ultramafic vegetation in March 2005 (an abandoned cropped field which had hardly received any fertiliser in the past). The experimental area was divided into six 36-m² plots, three of which were fertilised in April 2005 with the following regime: 120 kg ha⁻¹ N, P, K (NH₄NO₃, K₂SO₄ and Ca (H₂PO₄)₂). The rest of the plots did not receive any fertiliser.

Soil surface samples (0-20 cm) were taken on each plot before fertilisation, during vegetation period (May) and after harvest (June), for full characterisation (including mineral fertility and Ni availability). Soil samples were air dried and sieved (2 mm) prior to analyses.



Photo1. Ultramafic site of Pojska, (Pogradec, Albania)



A)



B)

Photo 2 (A and B). In - situ field experiment in Pojske.

Fertilisation pot trial

A greenhouse pot experiment was undertaken simultaneously in which *A. murale* was treated with different combinations of nutrients to determine the optimal fertilisation regime on this soil and to orientate the fertilisation on the field. Four addition treatments of 0:0:0, 50:40:40, 100:80:80, 120:120:120 kg of N:P:K per ha (1kg per ha corresponds to 0,33 mg kg⁻¹). The experiment was conducted in a well-ventilated unheated greenhouse. Soil from A_p horizon in Pojska similar to that of the experimental plot was sieved (2 mm) and airdried before experiment. For each fertilisation treatment, four replicates of 1-kg pots were made. Five plants were sown per pot. Pots were daily watered to 100% of the water holding capacity and cultivated for three months after germination. After three months, plants were harvested (cut at 1 cm above ground surface) and the plant samples were rinsed in deionised water before drying at 80°C for 24h.



Photo 3. Greenhouse pot experiment with *A. murale*.

Plant identification and harvest on experimental plots

The flora of each plot was fully described in June 2005 prior to harvest (with the help of European Flora). 12 plant species were sampled at site (Table 5) and the plant composition was carefully recorded. *A. murale*, *C. gryllus*, *T nigriscens* were the most frequent species in site; the other species were much rarer. The shoots of plants of the three dominant species were individually collected and biomass yields were carefully recorded for each plot. The rest of the biomass from other species was pooled together. Total root biomass (all species) was also sampled on 900-cm² areas located in the center of each plot. For each plot and species (1-m² surface in the centre of the plot), plant samples were taken, rinsed with deionised water and dried at 80°C for 24h.

Plant sample mineralisation, elemental analyses and statistical analysis of data

Trace metal contents in plants samples were analysed by plasma emission (ICP) spectrometry after digestion of plant samples in microwaves. A 0.25-g DM plant aliquot was digested by adding 8 mL of 69% HNO₃, 2ml H₂O₂. Solution were filtered and adjusted to 25 mL with 0.1M HNO₃. Certified reference materials (V463 maize) were analyzed in order to control the data quality. We have also double-checked the high concentrations with dilutions of some Alyssum samples.

Digestion of plants samples, to determine N contents in harvested biomass, was made in digestion tubes using 4 mL of 98% H₂SO₄, 1 g of potassium sulfate-catalyst mixture, 6 ml H₂O₂. Digestion tubes were heated in digestion block to 350°. After digestion, samples were diluted to 25ml with deionised water. Total N was determined using Kjeldhal method. Analyses of variance and Newman-Keuls Test were used to test significance of the differences between treatments.

Results

Edaphic properties of the site

The parent material is strongly weathered serpentine mixed with colluvium. The pattern of pedogenesis is strongly related to climate. The main phase in the weathering process is recombination of Si and Mg to smectite clays at the base of slopes and excess Mg is precipitated. This phase occurs in dry conditions and leads to the formation of soils that are hypermagnesian, including vertisols dominated by smectites. Soils on down slopes are less shallow (>50cm) than upslope. They are stony and have numerous fragments of weathering rock on the surface. The clay content is high, but there is still a substantial proportion of sand (Table 2). The soil had a neutral pH (ranging from 6.9 to 7.3) and a high CEC, which was dominated by Mg^{2+} ions: there was relatively a low concentration of Ca^{2+} . In the soil, total Ca concentration was 0.24-0.32%, whilst total Mg concentration was 6.7-8.3%. The Mg:Ca ratio was therefore extremely high: 29. According to FAO WRBSR (1998) the soil at the experimental site was classified as Magnesian (Hypermagnesian) Hypereutric Vertisol.

Table 2. Physico-chemical characteristics of the three horizons of the soil at experimental site

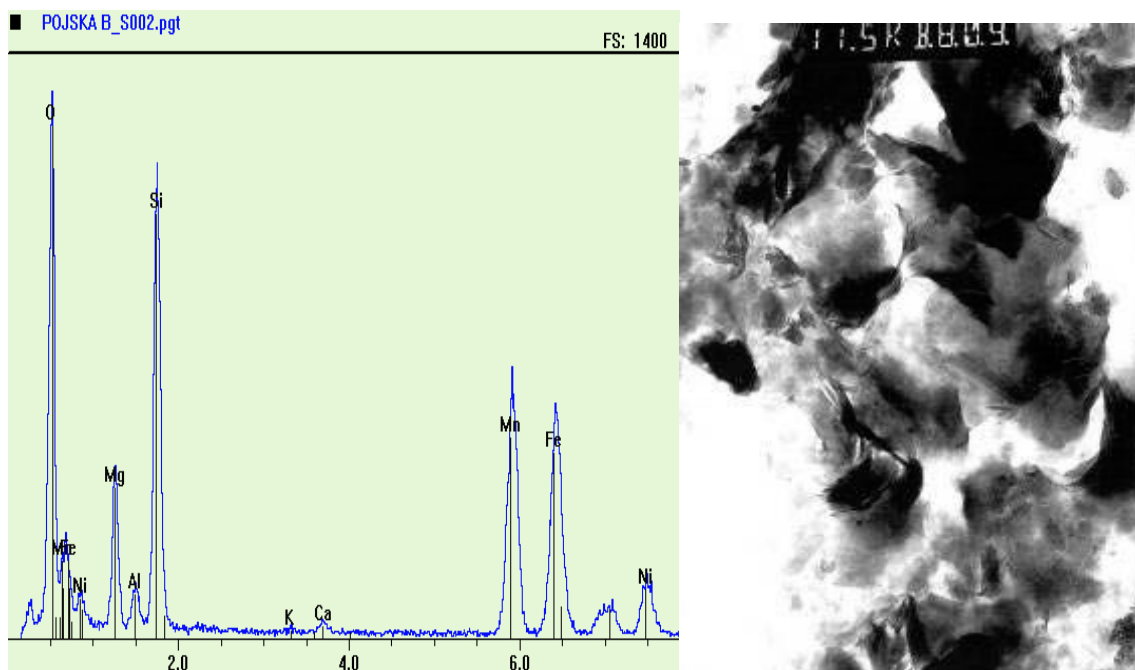
Horizon	Particle size distribution (g kg ⁻¹)			pH	Organic	C/N	CEC	Exchangeable cations				Total major elements			Total trace elements			
				water	C		(Metson)											
	Clay	Silt	Sand					Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca	Mg	Fe	Co	Cr	Mn	Ni
	g kg ⁻¹				g kg ⁻¹		cmol+ kg ⁻¹					g kg ⁻¹			Mg kg ⁻¹			
A _P (0-25 cm)	447	239	314	6.9	27	10	39.2	5.39	41.3	0.51	0.07	2.9	72	98	215	1420	2260	3440
B _S (35-50 cm)	532	167	301	7.3	33	15	42.5	5.56	55.8	0.39	1.36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BC	438	139	423	7.5	35	8.7	43.3	1.63	51.4	0.4	0.12	1.2	79	118	224	1210	2110	3500

ND: not determined

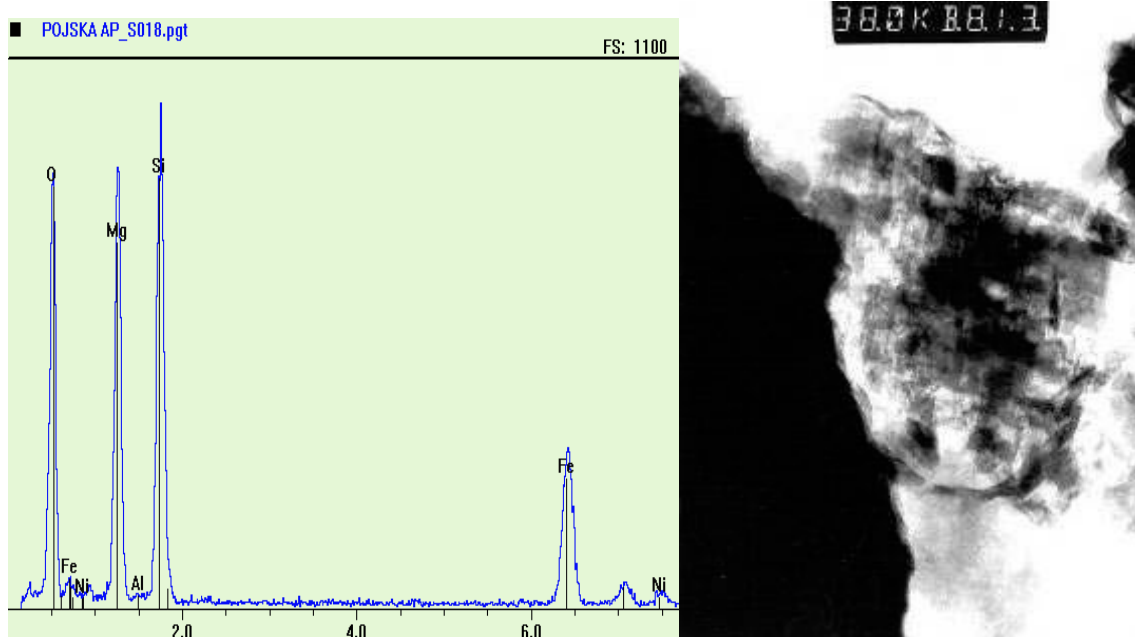
Localisation of Ni-bearing phases and Ni availability

XRD analyses of the three horizons revealed that chlorite, smectite and serpentine (undetermined type) were the three predominant minerals in the soil. TEM and EDX observations and analyses showed that the last two were both Ni-bearing phases (Figure 1). It was also shown that serpentines were mainly of the antigorite or lizardite type with very scarce chrysotile particles. Chlorite and serpentine were the main primary minerals occurring in soils derived from ultramafic rocks and smectite was the main secondary phyllosilicate occurring in soil. Two types of smectites could be distinguished according to their Mg and Al content. The average Ni concentration in Mg-rich smectites was highest (1.3%). It was lower in serpentines (0.7%) and in Al-rich smectites (0.5%) (Decarreau et al. 1987) (Table 3). The highest Ni concentrations were observed in some particles of a Mg-rich and Al-poor smectite also rich in Mn (19.5%), thus reaching 4.9% Ni in weight (Figure 1A).

Ni availability as assessed by IEK can be described with the intensity factor (*i.e.* Ni concentration in solution) on one hand and the labile pools in the solid phase that are distributed according to their average time of exchange with the soil solution (*i.e.* E_t). Both are important for the definition of the possibility of root absorption of Ni by plants. Both intensity and labile pools were extremely high in this soil (Table 4). On average on the plots prior to fertilisation, C_{Ni} values were 0.25 mg l^{-1} and instantaneously exchangeable Ni ($E_{0-1\text{min}}$) was higher than 100 mg kg^{-1} . Medium term labile pools were also high and all the parameters showed an extremely high and well-buffered Ni availability in this soil. The DTPA-extractable Ni has confirmed the results of IEK, The amount of Ni extracted by DTPA roughly corresponds to the same amount (Figure 2) as the exchangeable Ni ($E_{0-1\text{min}}$). DTPA-extractable Ni was higher after plant harvest than during plant growth but this was only a trend with no significant difference.



A



B

Figure 1 A & B : TEM pictures (right) and EDX spectra (left) of typical smectite (A) and non-chrysotile serpentine (B) found in the two lower soil horizons of the Magnesic (Hyperamagnesic) Hypereutric Vertisol at experimental site in Pojske (Albania).

Table 3. : Ni concentrations in the main Ni bearing minerals of the soil (all three horizons) at experimental site. Results are given as mean $\pm$ standard deviation

	Ni concentration (%)
Al-rich smectites (n = 10)	0.54 $\pm$ 0.18
Mg-rich smectites (n = 19)	1.30 $\pm$ 1.04
Serpentines (n = 16)	0.73 $\pm$ 0.34

Table 4. Ni available compartments in surface soils (averaged sample) prior to culture as assessed by Isotopic Exchange Kinetics Methods (IEK).

Total soil Ni (mg kg ⁻¹)	3440
C _{Ni} (Water soluble Ni in mg l ⁻¹)	0.251
E _{0-1min} (Ni exchangeable within 1 min in mg kg ⁻¹)	124
E _{1min-24h} (Ni exchangeable between 1 min and 24 h in mg kg ⁻¹)	119
E _{24h-3mo} (Ni exchangeable between 24 h and 3 mo in mg kg ⁻¹)	119
E _{3mo-1yr} (Ni exchangeable between 3 mo and 1 yr in mg kg ⁻¹)	46

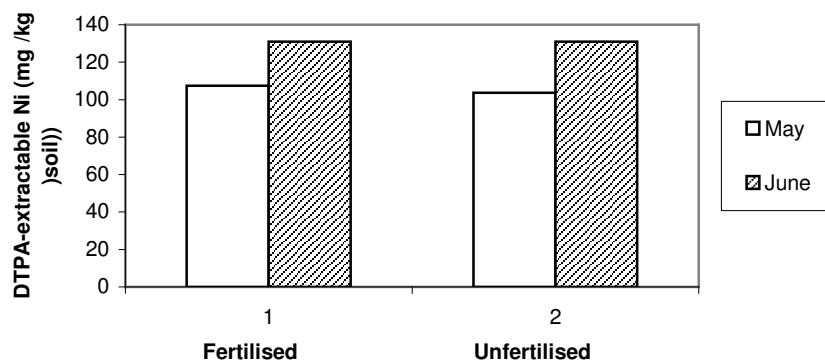


Figure 2. Evolution of the DTPA- extractable Ni during culture in surface soil samples of the fertilised and unfertilised plots. There were no significant differences between fertilised and unfertilised soils and between May and June extractions (ANOVA, p=0.05)

Effect of fertilisation on biomass production by *A. murale* and the other dominating species

Alyssum murale (Brassicaceae), *Chrysopogon gryllus* (Poaceae) and *Trifolium nigriscens* (Fabaceae) were the most frequent species in this site but other species were reported on the

plots although their contribution to biomass production was negligible (Table 5). The overall vegetation responded dramatically to fertilisation by doubling the biomass yield. The results showed that in fertilised plots we obtained a total biomass of 6.3 t ha⁻¹ (dry weight) whereas in unfertilised plots it was only of 3.2 t ha⁻¹ (Table 6) thus showing a highly significant difference (p<0.01) between fertilised and unfertilised plots. However, the contribution of each of the species varied according to fertilisation. In unfertilised plots, *C. gryllus* accounted for most of the biomass whereas, in fertilised plots, *A. murale* was the main contributor (more than half of the biomass). *A. murale* biomass abundance was dramatically increased from 6.1% to 40.7% whereas *C. gryllus* biomass abundance decreased from 77.5% to 54.5%. *T. nigricens* dramatically decreased in abundance in fertilised plots (16.3% to 4.8%). In greenhouse experiment we found that biomass production (p<0.01) affected by fertilisation and shoot biomass yield so, but did not affect shoot Ni concentration and therefore total amount of phytoextracted Ni was increased. The significant differences were between unfertilised pots and fertilised pots, but had not significant differences between fertilised pots.

Table 5. List of plant species collected on the experimental plots in late June 2005 prior to harvest.

Species	Family
Dominant species	
<i>Alyssum murale</i> Waldst. et Kit	Poaceae
<i>Chrysopogon gryllus</i> (L.) Trin.	Brassicaceae
<i>Trifolium nigricens</i> Viv	Fabaceae
Accompanying species	
<i>Cichorium intybus</i> L.	Compositae
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Fabaceae
<i>Aegilops geniculata</i> Roth.	Poaceae
<i>Viola arvensis</i> Murray	Violaceae
<i>Petrorrhagia prolifera</i> L.	Caryophyllaceae
<i>Vicia villosa</i> Roth.	Fabaceae
<i>Dasyphyrum villosum</i> (L.) P. Condargy	Poaceae
<i>Centaurea solstitialis</i>	Asteraceae
<i>Lolium perenne</i> L.	Poaceae

Effect of fertilisation on Ni concentration in plant tissues and on phytoextraction yield

The chemical analyses of plant tissue showed the differences between three dominant species of experimental site. There were differences for nitrogen concentration. The mean N concentration in *A. murale* was 0.85% in unfertilised plots and 1% in fertilised plots. *C. gryllus* had the lowest value 0.60%, whilst *T. nigriscens* had the highest value 1.5%.

Ca concentrations in shoots were about 0.6% for *A. murale* whilst for *C. gryllus* the value was 0.24% and for *T. nigriscens* it was 0.86% (Table 7). For Mg, the mean concentration for *A. murale* was the lowest (0.28%) in fertilised plots, for *C. gryllus* it reached 0.52% and the highest value was found in *T. nigriscens* (0.81%). *A. murale* showed a different uptake pattern in response to the high concentration of Mg and the low concentration of Ca in soils than the two other species. It had a much lower Mg:Ca ratio in shoots than *C. gryllus* and *T. nigriscens*. So *A. murale* had a Mg:Ca quotient much lower than 1, the highest being 2.2 for *C. gryllus*. Fertilisation tended to decrease this ratio in all three species.

The mean Ni content in the above ground part of *A. murale* was 9 129 mg Ni kg⁻¹ for fertilised plots and 8 483 mg Ni kg⁻¹ for unfertilised plots. The fertilisation increased slightly the Ni concentration in plant tissue but with no significant effect. The Ni concentrations in above ground parts of *A. murale* were on average 2.9 times higher than in the soil. This ratio (*i.e.* transfer factor) shows an indication of optimal hyperaccumulation conditions due to high availability of Ni. The higher concentration of Ni was found in above ground parts of plants than roots, inverse was found for Mn and Fe. It was observed that the concentration of Ni in *C. gryllus* and *T. nigriscens* tissue was extremely high (> 1000 mg kg⁻¹ in some plots for *T. nigriscens*) for such plants that are not considered as Ni-hyperaccumulators. The Cr contents in these two plants was reasonably low (between 6 and 9 mg kg⁻¹). The hypothesis of soil particle contamination of plant aerial parts was therefore discarded.

There were strong differences in Ni phytoextraction yield (Table 6) between fertilised plots and unfertilised plots. The total phytoextraction yield (Sum of phytoextraction by the three species) was 24.9 kg Ni ha⁻¹ in the fertilised plots, whilst it was 3.1 kg Ni ha⁻¹ in

unfertilised plots with a highly significant difference ($p < 0.001$). The contribution of *A. murale* was 22.6 kg ha^{-1} (91%) in fertilised plots and that of *C. gryllus* was 2.2 kg ha^{-1} (8.7%). In unfertilised plots, the low total phytoextraction yield was recorded with a much lower contribution of *A. murale* (54%). The relative and net increase in biomass production of *A. murale* was the main reason for increase of phytoextraction yield since the Ni concentration in shoots was not significantly affected by fertilisation.

The phytoextraction yield in pots in greenhouse experiment was 9.9 mg Ni/pot in the unfertilised treatment, 17.2 mg Ni/pot in the $50:40:40 \text{ kg ha}^{-1}$ NPK treatment, 19.9 mg Ni/pot in $100:80:80 \text{ kg ha}^{-1}$ NPK treatment, and 19.0 mg Ni/pot in the $120:120:120 \text{ kg ha}^{-1}$ NPK treatment (Table 8).

Table 6. Biomass production and phytoextraction yield (per ha) of the three main species grown on fertilised and unfertilised plots. Values for each species within a plot are given as mean values $\pm$ standard deviation. For the sum of biomass and phytoextraction yield (*i.e.* ‘Total’), different letters indicate statistical difference at the $p < 0.01$ level for biomass and at the $p < 0.001$ for phytoextraction yield (ANOVA and Newman Keuls Test).

Species	Plots	Biomass (t ha ⁻¹)	Ni phytoextraction yield (kg ha ⁻¹)
<i>Alyssum murale</i>	Fertilised	2.56 $\pm$ 0.70	22.60 $\pm$ 0.44
<i>Chrysopogon gryllus</i>		3.43 $\pm$ 0.35	2.17 $\pm$ 0.15
<i>Trifolium nigriscens</i>		0.30 $\pm$ 0.20	0.17 $\pm$ 0.12
Total		6.30 a	24.93 a
<i>Alyssum murale</i>	Unfertilised	0.20 $\pm$ 0.44	1.67 $\pm$ 0.12
<i>Chrysopogon gryllus</i>		2.53 $\pm$ 0.32	0.83 $\pm$ 0.49
<i>Trifolium nigriscens</i>		0.53 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.30
Total		3.27 b	3.10 b

Table 7. Concentration of Ni, Mn, Cr Fe, Ca and Mg in harvested parts of plants on fertilised and unfertilised plots. Results are given as mean values $\pm$ standard deviation as there were no significant differences between fertilised and unfertilised plots (ANOVA).

Species	Plots	Ni mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Cr mg kg ⁻¹	Fe %	Ca %	Mg %
<i>Alyssum murale</i>	Fertilised	9129 $\pm$ 1275	10 $\pm$ 2	-	0.04 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.07
<i>Chrysopogon gryllus</i>		648 $\pm$ 50	52 $\pm$ 25	8.7 $\pm$ 0.4	0.19 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.08
<i>Trifolium nigriscens</i>		727 $\pm$ 497	22 $\pm$ 4	8.3 $\pm$ 0.6	0.11 $\pm$ 0.05	0.86 $\pm$ 0.12	0.67 $\pm$ 0.18
Roots (all species)		1132 $\pm$ 73	29 $\pm$ 1	ND	0.13 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.06
<i>Alyssum murale</i>	Unfertilised	8483 $\pm$ 477	5.5 $\pm$ 2.2	-	0.02 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.16	0.49 $\pm$ 0.14
<i>Chrysopogon gryllus</i>		337 $\pm$ 148	35.0 $\pm$ 17.4	7.5 $\pm$ 9.0	0.18 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.12
<i>Trifolium nigriscens</i>		910 $\pm$ 585	24.7 $\pm$ 8.5	6.4 $\pm$ 3.1	0.11 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.11
Roots (all species)		896 $\pm$ 199	35.0 $\pm$ 10.0	ND	0.21 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.10

Table 8. Biomass production, Ni content in shoots of *A. murale* and phytoextraction yield as affected by fertilisation level in pot experiments with the surface soil from Pojske. Values with the same letter indicate no significant difference (ANOVA, Newman-Keuls test at the $p=0.05$ level)

Fertilisation treatment (N:P:K)	Biomass yield (g kg ⁻¹)	Ni concentration (mg kg ⁻¹)	Ni phytoextracted (mg kg ⁻¹)
0:00:00	0.87 c	11 385 a	9.9 b
50:40:40	2.04 b	8 454 ab	17.2 a
100:80:80	2.95 a	6 772 b	19.9 a
120:120:120	3.04 a	6 261 b	19.0 a

Discussion

Soil characteristics and Ni availability to *Alyssum murale*

The serpentine soil in Pojske is a clayey and Mg-saturated soil that contains elevated levels of heavy metals, such as Mn, Ni, Cr, Co that are typical from ultramafic environments. The three soil horizons are characterised by extremely high magnesium-to-calcium ratios which are toxic to unadapted plant species. In general, the Mg:Ca ratio observed in ultramafic soils was between 2.5 and 47 (Proctor, 1971). Soil mineralogy was simple and homogenous through the soil profile. Although soil pH was quite high (neutral to slightly alkaline), Ni availability in this soil was very high and therefore mainly influenced by the Ni-bearing minerals. This is in agreement with a previous study which showed that Ni availability in the soil is generally much higher when Ni is associated with poorly crystallized Fe oxides or high charge phyllosilicates such as smectites despite of high pH values (Massoura *et al.*, 2006). We suggest in the present case that the availability of Ni from primary clay minerals (*e.g.* serpentines) was low and attributed to the presence of Ni in the crystal lattice. Subsequently, the Ni in secondary clay minerals (smectites) was probably sorbed onto the mineral surfaces or located on internal exchangeable sites, and therefore, its availability was very high. This soil is then highly suitable for profitable phytoextraction (*e.g.* phytomining) as it will supply over the long term large and accessible quantities of labile Ni with a high buffer capacity (Echevarria *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2000).

The presence of high Ca concentrations in soils may inhibit both Ni and Co hyperaccumulation by *Alyssum*. Acceptable Ca concentrations in soil were reported to range from 0 to such a value that exchangeable soil Ca is less than 20% of exchangeable soil Mg.(Chaney *et al.*, 1998). In our soil, the Ca:Mg ratio was close to 13% in the surface horizon and therefore matched these recommended values. For phytomining with *A. murale*, the optimal pH was defined within the following range: 4.5 to 6.2; and preferably between 5.2 and 6.2. In a previous study, it was shown that pH favoured Ni phytoextraction yield by *A. murale* on an industrially contaminated soil (Kukier *et al.*, 2004). But this effect was not observed during the same study on a serpentine soil in which the dominant Ni-bearing phases seemed to be Fe oxides. The phases that bear available Ni in our soil (*i.e.* high-Mg smectites) are different from that previous serpentine soil, and are not believed to strongly modify their Ni retention capacity with pH. Moreover, the pH in the soil is neutral and the *A. murale* population used here is native to this soil. We therefore believed that soil conditions were optimal for Ni phytoextraction with *A. murale*.

Effect of fertilisation on species abundance and biomass production

A. murale, *C. gryllus* and *T. nigricens* were the most frequent spontaneous species in this site. According to what was expected on such soils with low potassium and phosphorus availability, the overall vegetation responded dramatically to fertilisation by doubling the biomass yield. Unexpectedly, the contribution of each of the species varied according to fertilisation and *A. murale* was highly favoured by fertilisation compared to the two other species. It is obvious that N fertilisation tended to decrease the biomass production of the *Leguminosa* in this competition context, however, the decrease of abundance of the *Poacea* was a surprise. In this experimental study of phytoextraction with natural hyperaccumulator stands, the next step in improving hyperaccumulator biomass would be to apply selective herbicides to control the population of *C. gryllus*. This practice has been implemented in 2006 and the plots have now all been subdivided to include a new treatment with an anti-monocots herbicide. The fertilisation treatment seemed to control quite efficiently the population of *T. nigricens* and less that of *C. gryllus*. In terms of ecological adaptation, *A. murale* is therefore a more competitive species than the two others. However, anti-monocots herbicide treatments were included in the plots in 2006 to allow for the full

development of *A. murale* (unpublished data). Soil management practices (fertilisation herbicide treatment) have been applied from others in serpentine and Ni contaminated soil to improve Ni phytoextraction. Li *et al.* 2003b in developing a commercial technology using hyperaccumulator plant species (*A. murale*) to phytoextract Ni reached a biomass of 20 t ha⁻¹. In our experiment (extensive technology), in which we stimulated natural vegetation stands with fertilisation (and later with herbicide treatment), *A. murale* biomass reached 3.7 t ha⁻¹ and was therefore much lower than with intensive management (Li *et al.*, 2003b) but we need more references on several years before making reliable comparisons with other *in-situ* experimental data.

Plant nutrition and Ni uptake by *A. murale*

Walker *et al.* (1955) surmised that serpentine-tolerant species survive on soils with depleted levels of Ca because they are still able to absorb quantities of Ca without taking up excessive quantities of Mg. The Ca concentration in plant tissue of *A. murale* was higher than Mg concentration, whilst in the two other species it was inverse. This confirms the ability of *A. murale* to accumulate Ca and its positive response to Ca fertilisation (Kukier *et al.*, 2004). Fertilisation seems to improve plant uptake of Ca and to limit excess uptake of Mg for all species. This is probably a reason for the extreme increase in biomass yield after fertilisation. It was observed that the concentration of Fe and Mn in above ground parts of *A. murale* were lower in comparisons with two others species. In analysing tissues of a number of serpentine endemics from Zimbabwe, Brooks and Yang (1984) found the concentration of Mg in plant tissue to be inversely proportional to the concentration of other nutrients: Fe, Co, Mn. These data suggest that the uptake of Mg comes at a cost to the plant so that the uptake of other element nutrients is forfeited. So, Brooks and Yang (1984) proposed that the heightened level of Mg in serpentine soils and its antagonistic behaviour toward other elements could be the most important factor in serpentine syndrome. The low Cr concentration in *T. nigricens* and *C. gryllus* and trace quantities of this element in *A. murale* confirmed Brooks (1987) findings, that serpentine plants without exception contain only trace quantities of Cr. Ni uptake by the two non-hyperaccumulator species was therefore extremely and surprisingly high. However, it is clear from the bioavailability data that these two species in other conditions could display much lower Ni concentrations in

their tissues as opposed to a truly Ni hyperaccumulator such as *A. murale*. Nevertheless, *C. gryllus* contributed roughly to 10% of the Ni phytoextraction yield in the fertilised plots. Ni concentrations in *A. murale* were high, but not excessively, with regard to the high level of Ni availability in this soil. The latter species is genetically highly variable as it is widespread all over ultramafics in the Balkans and Turkey. The Albanian populations of *A. murale* collected *in situ* varied from 1508 to 8463 mg kg⁻¹ (Shallari *et al.*, 1998) except in one site in Prrenjas (Roger Reeves, personal communication).. For phytoextraction purposes, the reasons that determine the level concentration of Ni in the total biomass harvested on the field should be investigated.

Effect of fertilisation on Ni phytoextraction yield and perspectives for future research

A. murale was evidenced with great phytoextraction potential in situations where native vegetation stand is enhanced with simple low-cost agronomic actions (fertilisation). The fertilisation nearly doubled the total biomass harvested but dramatically increased by 10- to 15-fold the phytoextraction yield. Shoot Ni in field-grown plants reached 1% and was not affected or diluted by fertilisation. Phytoextracted Ni in harvested biomass reached 28 kg Ni ha⁻¹ in one of the three fertilised plots with an average of 25 kg Ni ha⁻¹. With a price of Ni at 30 USD per kg, a reasonable income per ha would be 750 USD, provided that all the Ni contained in the biomass is recovered. This is why we started investigating the performance of low-cost phytoextraction with limited agronomic actions adapted to the Albanian context to see if extensive phytoextraction was feasible as an alternative to intensively managed phytoextraction (Li *et al.*, 2003b). The first answer after one year of experiment is positive, however, we need to better understand the relationships between fertilisation and species distribution to clearly define pest control and its consequences on phytoextraction yield by stands of *A. murale* alone. Also, we need to improve the level of Ni concentration in the shoots of *A. murale* shoots through agronomic practices and possibly to compare it with sown accessions of *A. murale*.

Chapitre 5

**Amélioration de l'agronomie d'*Alyssum murale*
pour le phytoextraction extensive : quatre ans
d'expérimentation au champ**

***Improving the agronomy of Alyssum murale
for extensive phytomining : a four-year field study***

Abstract

There are large areas of ultramafic soils in Albania that are currently being used for agriculture with low productivity. These areas could sometimes be suitable for phytomining provided that Ni availability is high and soil deep enough. This is why we started investigating (field experiment) the performance of a low-cost phytoextraction with limited agronomic actions adapted to the Albanian context. We have been studying several soil management practices which may affect the efficiency of Ni phytoextraction in native covers of *A. murale* on 18-m² plots in natural conditions. In soil fertility management studies, we have used 120 kg ha⁻¹ PK and 60 kg ha⁻¹ N in early vegetation period and 60 kg ha⁻¹ N two weeks later. We found that NPK application significantly increased shoot biomass yield, without reducing shoot Ni concentration. In weed control practices we have used the anti-monocots herbicide (FocusTM ultra) to allow for the full development of *A. murale*. We have carried out a number of field and laboratory trials to define the optimal harvest time. In this three-year experiment, the biomass yields in fertilised and herbicide treated plots have progressively improved: 2.6-3.7-6.0 t ha⁻¹. So have phytoextracted Ni: 22.6-29.5-69 kg ha⁻¹. Such crop management practice studies have improved phytoextraction efficiency. When fertilization and harvest conditions were optimized, herbicide control proved little efficiency. Extensive phytomining on such sites could be promising in the Albanian context by domesticating already installed natural populations with fertilization and possibly no herbicide treatment.

Introduction

Development of a technology for using hyperaccumulator plant species to phytoextract Ni from Ni-rich soils requires (1) plant genetic ability and (2) development of optimal agronomic management practices. In this paper, we report on recent progress made by us in the development of extensive Ni phytoextraction technology. Phytoextraction is the removal of metals from soil using plants. The process relies on the ability of a plant crop to remove and concentrate heavy metals from metalliferous and contaminated soils (Baker *et al.*, 1994, Chaney, 1983; Chaney *et al.*, 1997). Phytomining is the phytoextraction of metals for commercial gain. The basis for any phytoextraction operation is the plants used. They belong to a group of plants that have some very peculiar properties. These are known as hyperaccumulators. These plants take up extraordinary quantities of metals, far more than are required for plant growth. The phenomenon of plants accumulating inordinate concentrations of heavy metals was termed hyperaccumulation. Ni hyperaccumulation has been defined as the accumulation of at least 1000 mg kg^{-1} Ni in the dry biomass of plants grown on a natural substrate (Brooks *et al.*, 1977; Jaffré *et al.*, 1976). Most known hyperaccumulators accumulate nickel, and occur mainly on ultramafic (serpentine) soils. The occurrence of hyperaccumulators is largely restricted to metalliferous soils that often support an endemic flora, distinct from surrounding soils. Heavy metal tolerant plants have different metal tolerance strategies. Some plants accumulate metal ions in their shoots, while others exclude the metal from the above ground parts (Baker *et al.* 1990). In order to meet commercial phytoextraction requirements, Li *et al.*, 2003 have made progress in developing a commercial technology using hyperaccumulator plant species to phytoextract nickel from contaminated and/or Ni-rich soils. Li *et al.* (2003b) showed that *Alyssum murale* Waldst. & Kit. and *Alyssum corsicum* Duby could accumulate higher than $20\,000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ shoots when grown on serpentine soils with minimal addition of fertilizers. Further, *Alyssum murale* Waldst. & Kit. and *Alyssum corsicum* Duby with modern use of herbicides and other agricultural management practices, could reach a biomass production of 20 Mg ha^{-1} and the phytoextraction of Ni can be $400 \text{ kg Ni ha}^{-1}$ (Li *et al.*, 2003).

In Albania, ultramafic rock cover 10% of the surface and magnesium-rich arable Vertisols were estimated at about 10,000 ha out of 700,000 ha total agricultural land of the country

(Zdruli *et al.* 1997). In those soils Ni is usually present at concentrations often reaching 3,000 mg kg⁻¹, thus in the normal range for serpentine. The Albanian flora contains a wide range of Balkan endemic taxa, including some serpentine-obligate (Tan *et al.* 1999, Stevanović *et al.* 2003). A substantial proportion of serpentine areas in Albania are not arable because of steep slopes, or rocky soils. These areas will continue to be habitat for serpentine endemics and native species. There are also large areas of serpentine soils that are currently being used for agriculture of low productivity (pasture) and these areas could be suitable for phytomining. Moreover, Albania host the most efficient Ni-accumulators of the species *A. murale* (Bani *et al.*, 2009) and the genetic resource is available locally. This is why we started investigating the performance of low-cost phytoextraction with limited agronomic actions, adapted to the Albanian context, to see if extensive phytoextraction was feasible as an alternative to intensively managed phytoextraction.

This work was aimed at studying the performance of Ni accumulation by a native stand of hyperaccumulator *A. murale* on a typical ultramafic Vertisol from Albania, according to the improvement of agronomic practices including the effect of (i) fertilization, (ii) pest control, (iii) phenological stage of plants at harvest, (iv) distribution of Ni and other elements in the plant organs and (v) renewing plant stands (tilling and sowing) or managing perennial stands. This was achieved by setting in situ agronomic experimental plots over a four-year study period on a Vertisol where a native stand of *A. murale* was already growing spontaneously. The final aim was to improve the agronomy of *A. murale* for optimising extensive phytoextraction methods for phytomining that would be adapted in the Albanian context.

Materials and methods

Site characteristics

The experiment was carried in an ultramafic outcrop located in Pojska (Pogradec, East of Albania). The plots are located at the altitude of 700 m. Latitude: 40°59' N and Longitude: 20°38' E. The climate is Mediterranean characterized by annual rainfall averages of ~ 707 mm and a mean temperature of ~ 10.6°C. January is the coldest month with an average temperature of 4.7° C. July is the hottest month with 22.3° C. The site selected for the

experiment was located on a colluvium at the foot of the ultramafic hills a few hundred meters away from the shore of the lake Ohrid. The site consists of agricultural fields cultivated extensively on which spontaneous native ultramafic vegetation is widely present and, in particular, specimens of *Alyssum murale* Waldst. & Kit. are widespread.

Soil description and properties

The soil profile was described and samples were taken from the horizons identified in the field (0–30 cm, 30–50 cm, >50–70 cm, 70–120 cm). Physico-chemical characteristics of the soil were determined in The Soil Analyses Laboratory of Arras in France according to standardized methods (AFNOR, 2004) and summarized in Table 1. All soil characteristics confirmed its ultramafic nature: low concentration of Ca, K and P and elevated Ni, Cr, Co, Mn, Fe (Table 1). The soil contains total Ni up to 3150 mg kg⁻¹, Cr up to 1600 mg kg⁻¹, Co up to 224 mg kg⁻¹ and Mn up to 2920 mg kg⁻¹. This soil had a high total Fe content (10 %) in relation to its ultramafic origin. It had 6% Mg and a strong Ca deficiency (0.3 %), even more pronounced than usual serpentine soils of the area (Bani et al., 2009): The Mg:Ca ratio was high (20 as total concentration and 7.4 as exchangeable cations), within the range reported in serpentine soil material (Proctor, 1971). Potassium total content in soils was very low (0.5%) and so was exchangeable K (0.37 cmol+ kg⁻¹). The soil has a clayey texture all along the profile, except at the depth of 50 – 70 cm where it is a bit more sandy and it is alkaline (pH 7.5 in the surface to pH 7.9 in depth). According to FAO WRBSR (1998) the soil at the experimental site was classified as Magnesian (Hypermagnesian) Hypereutric Vertisol.

Characterisation of Ni availability

In the samples of each horizon of the pedon (initial characterization of the soil profile) and the samples of the surface horizon of each plot (agronomic experiment), Ni-water extractable and DTPA-extractable Ni (Lindsay & Norvell, 1978) were measured to describe the hydrosoluble and available Ni. Soil samples were air-dried and sieved (2 mm) prior to analyses. The water extraction solution consisted of 2.5g soil sample and 50 ml deionised water. The soil water solution was shaken for 20h, then the suspension was centrifuged at 5000 g for 20 min, filtered through a 0.2µm porosity cellulose nitrate filter. The DTPA–

TEA extraction solution consisted of 0.005 M DTPA with 0.01 M CaCl₂ and 0.1 M triethanolamine (TEA) at pH 7.3 (Lindsay & Norvell, 1978). Soil samples from each horizon were extracted with the DTPA–TEA solution. Extractions were performed in triplicate. A ratio of 1:10 soil:DTPA-TEA solution was shaken for 2 h; then the suspension was centrifuged at 5,000g for 20 min, filtered through a 0.2 mm porosity cellulose nitrate filter (SARTORIUS). The quantity extracted per kg of soil is noted Ni_{DTPA}. Concentration of Ni in soil extracts were determined by plasma emission spectrometry (ICP).

Agronomic trials with native stands of *Alyssum murale*

An experiment was conducted between 2005 and 2008. The experimental site was already covered by spontaneous native ultramafic vegetation in March 2005 (an abandoned cropped field) and was divided into six 36-m² plots, three of which were fertilized (F) at once in April 2005 with 120 kg ha⁻¹ of N, P, K (NH₄NO₃, K₂SO₄ and Ca(H₂PO₄)₂) and three were not fertilized (NF). In 2006 the experimental site, was divided into twelve 18-m² plots, 3 of which were only fertilized (the same regime of fertilisation) (FNH), 3 were fertilized and treated with anti-monocots herbicide (FocusTM ultra 33 mL in 3L water for 108 m²) (FH), 3 were only treated with herbicide (NFH) and 3 were not treated (NFNH). Plants were harvested for the first and second year in June 28th. In 2007, they were twelve 18-m² plots as in 2006, but the regime of fertilization was 100 kg ha⁻¹ PK and for N, 60 kg ha⁻¹ were brought in early vegetation period and 60 kg ha⁻¹, two weeks later. In order to determine optimal conditions for harvest, samples of *A. murale* plants were harvested at the different development stages on FH plots to determine Ni concentration in plants shoots of three randomly sampled plants. According to results (see Results and Discussion sections) harvesting time was set on the June 14th.

In 2008 soils were tilled to prepare appropriate seed bed. Seeds, that had been previously collected when mature, were hand sown on all plots in September 20th. The experimental area in 2008 was divided into six 36-m² plots, three of which were fertilized in April 10th with 100 kg ha⁻¹ P, K and 50 kg ha⁻¹ N and treated with anti-monocots herbicide (FH). A second N fertilization was brought (50 kg ha⁻¹ N) two weeks later. Three other plots were not treated. During the vegetation period (*i.e.* in May 18th, June 5th and June 20th) the treated plots of experiment were irrigated by water coming from a natural stream of this area

(influenced by ultramafic geology). In 2008, we also observed the vegetation stages of *A. murale*. It is currently accepted that plants are in a determined vegetation stage when 80% of the individuals have reached this stage. At each different vegetation stage, the vegetation biomass, the Leaf Area Index and the Ni content in shoots, were also determined. The harvesting date was July 8th 2008, when the biomass was considered high enough (no flowering occurred in newly planted plots).



Photo 1. A four-year in-situ experiment in Pojske (Albania)

Identification, collection and analyses of plants in experimental plots

The flora of the site was surveyed in each plot and was fully described prior to harvest with the help of Albanian Flora (Vangjeli *et al.* 1994). The plant species were sampled (Table 3) and the plant composition was carefully recorded. *Alyssum murale* Waldst. & Kit., *Chrysopogon gryllus* (L.) Trin. and *Trifolium nigriscens* Viv. were the most frequent species in experimental site, the other species were much rarer.

The shoots of plants species were individually collected and biomass yields were carefully recorded for each plot (a 1-m² surface was completely harvested in the centre of the plot). The rest of the biomass from other species was pooled together. For each plot and species plant samples were taken, rinsed with deionised water and dried at 80°C for 24 h. Trace metal contents in plants samples were analyzed by plasma emission (ICP) spectrometry after digestion of plant samples in microwave: A 0.5-g DM plant aliquot was digested by adding 8 ml of 69% HNO₃, 2 mL H₂O₂. Digestion solutions were filtered and adjusted to 25 mL with 0.1 M HNO₃. Nitrogen (N) was analyzed using Kjeldahl after digestion of plant samples in mineralization bloc (Bremner et Keeney, 1982). Total phosphorus (P) content in plants solutions were analyzed using colorimetry of malachite green (Veldhoven and Mannaerts, 1987) after acid digestion (same digestion procedure as for the determination of metal content). Certified reference materials (*A. murale*, that was analyzed in some others laboratories) were analyzed in order to control the data quality.

Determination of Ni yield

The Ni yield (kg Ni ha⁻¹) in each plots and each treatment was calculated according to Ni concentration in shoots of *A. murale* (mg kg⁻¹) and biomass production (t ha⁻¹).

Table 1. Physico-chemical characteristics of the four horizons of the soil at the experimental site of Pojskë (Albania)

	Particle size distribution			pH	CO	MO	N	P	C/N	CEC	Exchangeable cations				Total major elements					Total trace elements									
	Clay	Silt	Sand								Mg		Na		Ca	Mg	Al	K	Na	Fe	Co	Cr	Mn	Cu	Zn	Ni			
											Ca ²⁺	2 ⁺	K ²⁺	2 ⁺															
Horizon	%			H ₂ O	%					cmol+ kg ⁻¹				%						mg kg ⁻¹									
0 -30 cm	51.6	27.7	20.7	7.45	2.74	4.7	0.23	0.01	12	38.9	5.4	40.5	0.37	0.08	0.3	6.01	2.7	0.5	0.2	10	207	1600	2060	23	130	3150			
30-50 cm	52.2	14.8	33	7.75	1.36	2.4	0.1	0.01	13	43.8	3.4	49.4	0.37	0.09	0.18	5.56	2.6	0.4	0.2	11	224	1610	2920	13	95	3050			
50-70 cm	37.4	11.9	50.7	7.62	0.38	0.7	0.05	0.01	8.3	42.4	1.5	48.6	0.32	0.09	0.11	7	1.9	0.2	0.1	12	160	1490	1460	11	91	3300			
70-120 cm	57.5	23.3	19.2	7.87	0.34	0.6	0.04	0.01	8.3	38.9	1.1	50.5	0.42	0.11	0.15	4.61	4	0.6	0.3	10	134	1170	1320	11	91	2070			

Results

Ni availability

DTPA-extractable Ni (Ni_{DTPA}) was chosen as an estimate of Ni phytoavailability in the soils. It has also been correlated to isotopically-labile Ni in a wide array of soils (Echevarria *et al.*, 1998; Echevarria *et al.*, 2006). The amount of Ni extracted by DTPA was around 120 mg kg^{-1} in Pojska surface soil (Fig. 1) and roughly corresponds to the same amount as the exchangeable Ni ($E_{0-1 \text{ min}}$) (Bani *et al.* 2007). Ni was also the metal with the highest bioavailability (especially in the surface horizon) among other elements presents in the soil (Fig. 1). Water-extractable Ni was relatively high at the surface of the pedon and reached more than 5 mg kg^{-1} . It also followed the same trend as DTPA-extractable Ni and decreased strongly with depth.

Ni availability was always higher after plant harvest (June) than during plant growth in spring (Fig. 3). The same pattern was observed between water-extractable and DTPA-extractable Ni (Fig. 3 & 4). There were no significant differences between fertilized and unfertilized soils in spring conditions but there were differences after harvest, which were significant in 2006 and even more visible in 2007.

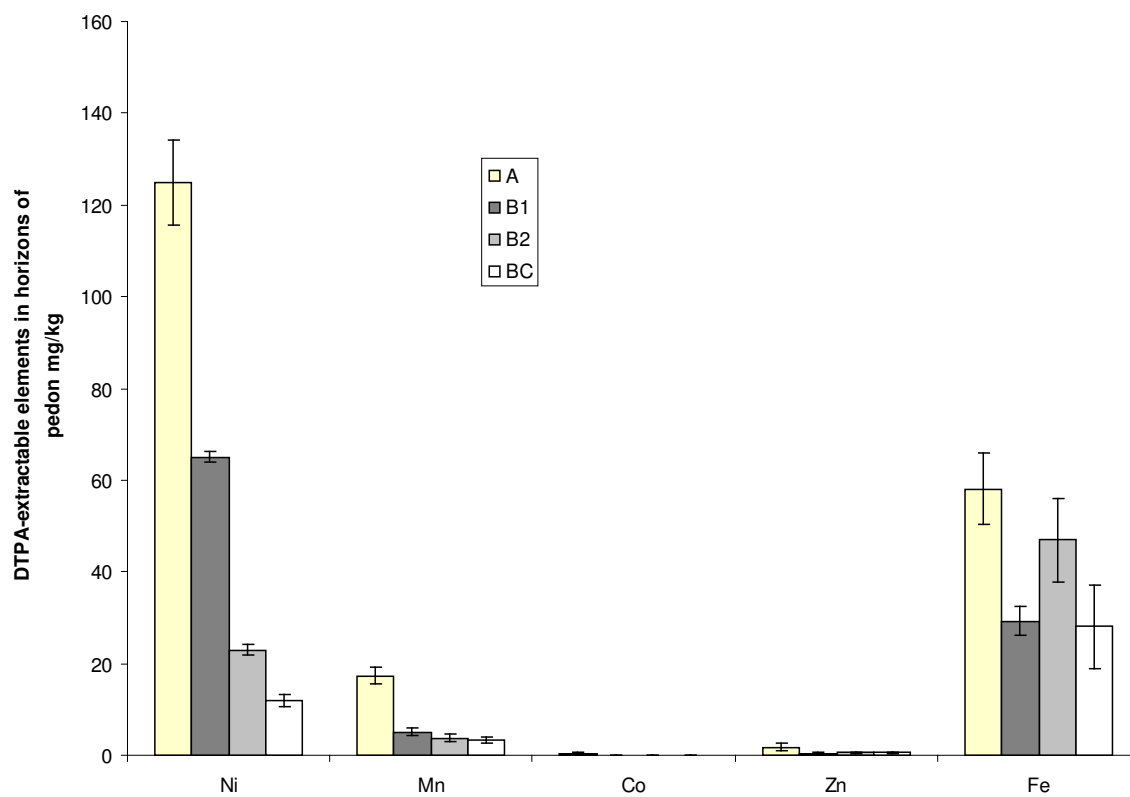


Figure 1. Ni, Mn, Co, Zn, Fe DTPA- extractable in horizons of the Vertisol pedon in Pojska.

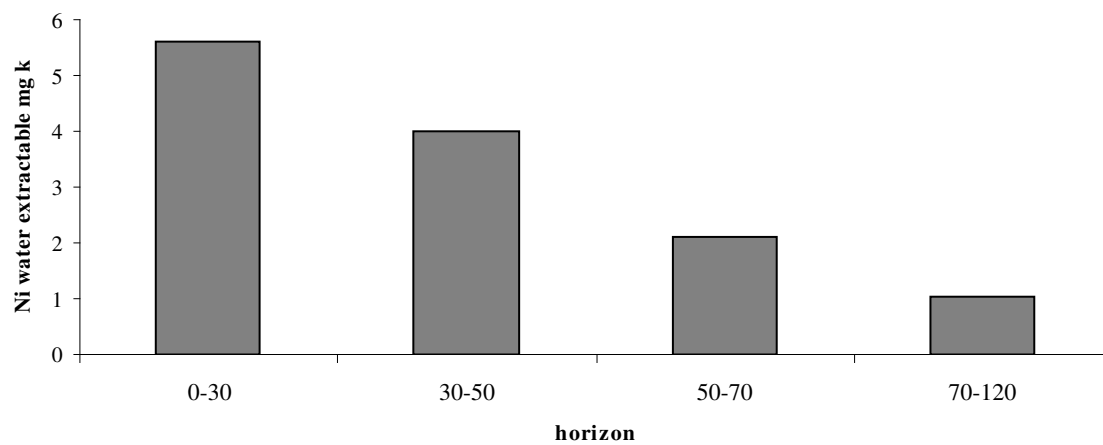


Figure 2. Water-extractable Ni in the four horizons of the Vertisol pedon in Pojska.

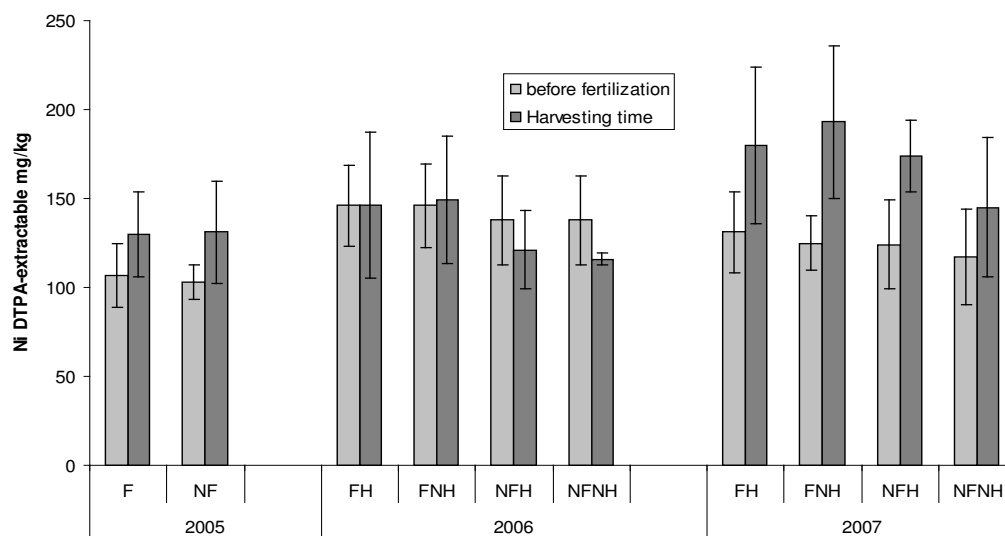


Figure 3. Evolution of the DTPA-extractable Ni during culture in surface soil samples of plots in Pojska experimental site.

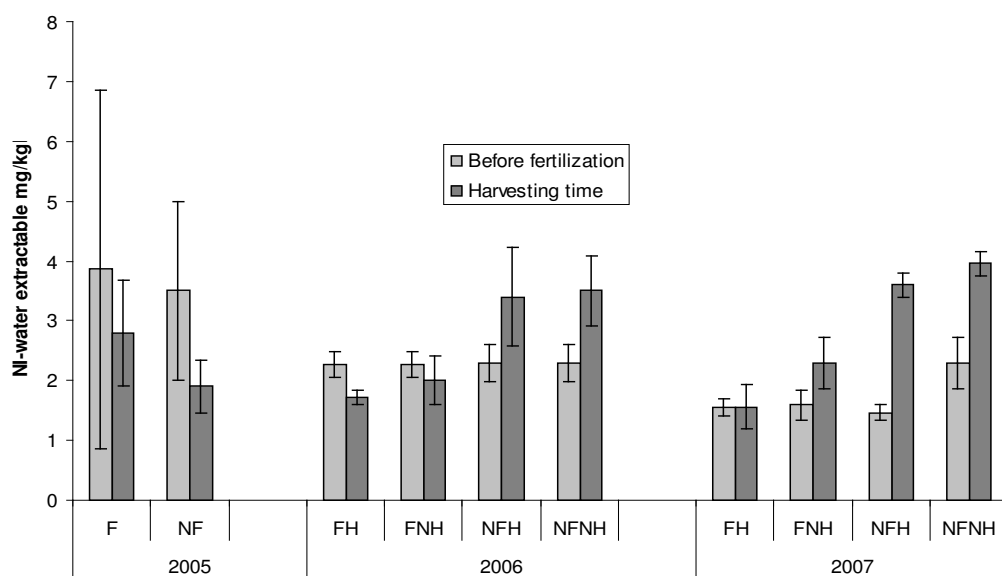


Figure 4. Evolution of the water-extractable Ni during culture in surface soil samples of the plots of the experimental site of Pojska.

Plant diversity in the studied plots

The area of study hosted at least 16 different plant species which are listed below (Table 2). The most common species were *Alyssum murale* Waldst. et Kit, *Chrysopogon gryllus* (L.) Trin and *Trifolium nigriscens* Viv. However, several Poaceae were common secondary

species on the site over the four years of the experiment: *Lolium perenne* L., *Aegilops geniculata* Roth. And *Dasypyrum villosum* (L.) P. Cond..

Table 2. List of plant species collected on the experimental plots of Pojska (Albania).

Nr.	Species	Family	Biological	Chorological	Lifespan
			form	form	
1	<i>Alyssum murale</i> Waldst. et Kit	Brassicaceae	H	Sub-ballk	perennial
2	<i>Chrysopogon gryllus</i> (L.) Trin	Poaceae	H	EuJ-SibJ	perennial
3	<i>Trifolium nigriscens</i> Viv.	Fabaceae	Th	Eu-Med	annual
4	<i>Lolium perenne</i> L.	Poaceae	H	Eu-Az	perennial
5	<i>Aegilops geniculata</i> Roth.	Poaceae	Th	Med-Tur	annual
6	<i>Dasypyrum villosum</i> (L.) P. Cond.	Poaceae	Th	Eu-Med	biennial
7	<i>Poa trivialis</i> L.	Poaceae	H	Eu-Az	perennial
8	<i>Centaurea solstitialis</i> L.	Asteraceae	H	Med	biennial
9	<i>Minuartia hybrida</i> L.	Caryophyllaceae	Th	Paleotemp	perennial
10	<i>Lotus corniculatus</i> L.	Fabaceae	H	Paleotemp	perennial
11	<i>Consolida regalis</i> S.F.Gray	Ranunculaceae	Th	Eu-Med	annual
12	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	H	Eu-Az	perennial
13	<i>Petrorhagia prolifera</i> L.	Caryophyllaceae	Th	Eu-Med	perennial
14	<i>Tragopogon pratensis</i> L.	Asteraceae	H	Sub-ballk	annual
15	<i>Bromus racemosus</i> L.	Poaceae	H	ND	annual
16	<i>Vicia villosa</i> Roth.	Fabaceae	Th	Eu-Med	biannual

H: Hemicryptophyte

TH: Therophyte

Effect of management practices on species composition, biomass production, and phytoextraction yield by *A. murale* and the other dominating species

A. murale, *C. gryllus* and *T. nigriscens* were the most frequent species in this site in the first year (2005) but other species were reported on the plots although their contribution to biomass production was negligible (Table 2). The overall vegetation responded dramatically to fertilization by doubling the biomass yield. The results showed that in fertilized plots we obtained a total biomass of 6.3 t ha⁻¹ (dry weight) whereas in unfertilized plots it was only of 3.2 t ha⁻¹ (Table 2) thus showing a highly significant difference ($P < 0.01$) between fertilized and unfertilized plots. There were strong differences in Ni phytoextraction yield (Table 3) between fertilized plots and unfertilized plots. The Ni

phytoextraction yield was 22.6 kg Ni ha⁻¹ in the fertilized plots, whilst it was 1.7 kg Ni ha⁻¹ in unfertilized plots with a highly significant difference ($P < 0.001$). In total phytoextraction yield the main contributor was *A. murale*. In 2006, after herbicide treatments were included to allow for the full development of *A. murale*, we obtained a biomass of *A. murale* of 3.7 t ha⁻¹ (dry weight) in FH plots while the biomass in NFNH plots was only of 0.25 t ha⁻¹. The herbicide treatment seemed to efficiently control the population of the main competitor to *A. murale*, i.e. *C. gryllus*. The biomass production of each of the three main species, *A. murale*, *C. gryllus* and *T. nigriscens* in fertilized plots increased respectively 14.8-, 2.0- and 2.4-fold in comparison to the unfertilized plots. The response of *A. murale* was therefore much stronger than any of the other plants. The yield of Ni phytoextraction in 2006 was 29.5 kg Ni ha⁻¹ in the fertilized and herbicide treated plot compared to 2 kg Ni ha⁻¹ in the unfertilized with no herbicide plots. These differences were highly significant ($P < 0.01$). In the third year (2007) of our experiment when we have changed the regime of fertilization, but mainly the date of harvest, *A. murale* responded dramatically reaching a biomass production in fertilized and herbicide treated plots of 6 t ha⁻¹ (dry weight), whereas in unfertilized with no herbicide plots (NFNH) it was only 0.53 t ha⁻¹. The results showed that in fertilized with no herbicide plots (FNH), the community structure had changed in comparison with the two previous years. *Lolium perenne* and *Dasypyrum villosum* were then new contributors to the biomass production. Nevertheless, the same other species were present and their contribution were higher (Table 3). The contribution (in %) of each species in the biomass production in fertilized and unfertilized treatments with herbicide were roughly the same (75 % for *A. murale* and from 4 to 8 % for the other species). The biomass production in fertilized plots in comparison with unfertilized plots increased respectively 9.6-fold for *A. murale* and 1.2-fold for *C. gryllus* (Poaceae) and *T. nigriscens* (Fabaceae); *Aegilops geniculata* and *Dasypyrum villosum* (Poaceae) were two new species that appeared in plots in 2007. The Ni phytoextraction yield of *A. murale* in 2007 was 69 kg Ni ha⁻¹ in the fertilized and herbicide treated plot (FH), whilst it was 6.9 kg Ni ha⁻¹ in unfertilized and no herbicide plots (FNHN) with a highly significant difference ($P < 0.001$). In 2007, plants were harvested before leaves started to decay, which means at the flowering mid-stage.

Table 3. Biomass production and phytoextraction yield (per ha) of the main species growing on each treatment. Values for each species within a plot are given as mean values $\pm$ standard deviation for each treatment. For biomass and phytoextraction yield of *A murale*, different letters indicate statistical difference.(ANOVA and Newman– Keuls Test).

Years	Species	Plots	Biomass (t ha ⁻¹)	Ni yield (kg ha ⁻¹)
2005	<i>A. murale</i>	F	2.56 $\pm$ 7a	22.60 $\pm$ 4.4a
	<i>Ch. gryllus</i>		3.43 $\pm$ 0.35	2.17 $\pm$ 0.15
	<i>T. nigriscens</i>		0.30 $\pm$ 0.20	0.17 $\pm$ 0.12
	Total		6.3	24.9
	<i>A. murale</i>	NF	0.20 $\pm$ 0.44b	1.67 $\pm$ 0.12b
	<i>Ch. gryllus</i>		2.53 $\pm$ 0.32	0.83 $\pm$ 0.49
	<i>T. nigriscens</i>		0.53 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.30
	Total		3.3	3.1
2006	<i>A. murale</i>	FH	3.7 $\pm$ 1.06a	29.5 $\pm$ 8.6a
	<i>T. nigriscens</i>		0.075 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.04
	Other species		0.38 $\pm$ 0.16	0.31 $\pm$ 0.13
	Total		4.2	29.9
	<i>A. murale</i>	FNH	2.16 $\pm$ 1.42a	18.35 $\pm$ 11.4a
	<i>Ch. gryllus</i>		0.966 $\pm$ 0.45	0.81 $\pm$ 0.43
	<i>T. nigriscens</i>		0.025 $\pm$ 0.014	0.0059 $\pm$ 0.004
	Total		3.2	19.1
	<i>A. murale</i>	NFH	1.1 $\pm$ 0.3b	8.9 $\pm$ 4.5b
	<i>T. nigriscens</i>		0.04 $\pm$ 0.02	0.013 $\pm$ 0.003
	Other species		0.19 $\pm$ 0.06	0.080 $\pm$ 0.014
	Total		1.3	9.0
	<i>A. murale</i>	NFNH	0.25 $\pm$ 0.05c	2 $\pm$ 0.34c
	<i>Ch. gryllus</i>		0.47 $\pm$ 0.16	0.17 $\pm$ 0.011
	<i>T. nigriscens</i>		0.031 $\pm$ 0.026	0.002 $\pm$ 0.001
	Total		0.8	2.2
2007	<i>A. murale</i>	FH	6.00 $\pm$ 0.02 a	69.0 $\pm$ 5,2 a
	<i>T. nigriscens</i>		0.48 $\pm$ 0.18	0.24 $\pm$ 0.17
	Other species		0.25 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.1
	Total		6.7	69.4
	<i>A. murale</i>	FNH	5.1 $\pm$ 0.6a	67 $\pm$ 14a
	<i>Ch. gryllus</i>		0.55 $\pm$ 0.17	0.022 $\pm$ 0.004
	<i>T. nigriscens</i>		0.33 $\pm$ 0.05	0.097 $\pm$ 0.011
	<i>L. perenne</i>		0.35 $\pm$ 0.20	0.1 $\pm$ 0.09
	<i>D. villosum</i>		0.30 $\pm$ 0.21	0.004 $\pm$ 0.005
	Other species		0.12 $\pm$ 0.06	0.063 $\pm$ 0.03
	Total		6.7	67.3
	<i>A. murale</i>	NFH	1.66 $\pm$ 0.11b	22 $\pm$ 5.3b
	<i>T. nigriscens</i>		0.68 $\pm$ 0.41	0.18 $\pm$ 0.11
	Other species		0.17 $\pm$ 0.1	0.07 $\pm$ 0.03
	Total		2.5	22.3
	<i>A. murale</i>	NFNH	0.53 $\pm$ 0.15c	6.9 $\pm$ 1.7c
	<i>Ch. gryllus</i>		0.46 $\pm$ 0.16	0.086 $\pm$ 0.048
	<i>T. nigriscens</i>		0.266 $\pm$ 0.15	0.018 $\pm$ 0.018
	<i>A. geniculata</i>		0.25 $\pm$ 0.07	0.002 $\pm$ 0.001
	<i>D. villosum</i>		0.166 $\pm$ 0.02	0.003 $\pm$ 0.002
	Other species		0.22 $\pm$ 0.28	0.07 $\pm$ 0.06
	Total		1.9	7.1
2008	<i>A. murale</i>	FH	4.6 $\pm$ 1.0	55 $\pm$ 11
	<i>A. murale</i>	NFNH	0.38 $\pm$ 0.02	4.3 $\pm$ 0.7

In 2008, split-N fertilization, irrigation at three times and the herbicide treatment maintained the biomass production of *A. murale* at a similar level as during the previous year, except that flowering did not occur. So, in FH plots the biomass production was 4.6 t and Ni phytoextraction yield was 55 kg Ni ha⁻¹, whilst they were 0.4 t and 4.3 kg Ni ha⁻¹ in the FNHN plots with a highly significant difference ($p < 0.05$).

Plant responses to serpentine soils

The chemical analyses performed on plant bulk shoots showed different responses to the presence of trace metals and nutrients in the selected soil (Tables 4 and 5). There were differences for nitrogen concentration. The mean N concentration in *A. murale* in the second year was 1.0 % in unfertilized plots and 1.6 % in fertilized plots. *C. gryllus* had the lowest value 0.8 %, whilst *T. nigriscens* had the highest value (1.7 %). Phosphorous concentrations were 0.23 % in unfertilized plots and 0.31 % in fertilized plots for *A. murale*, whilst *C. gryllus* had 0.22 % in fertilized plots and 0.17 %, in unfertilized plots whilst *T. nigriscens* had the highest value 0.32% in fertilized plots and 0.28 in unfertilized plots. Mg:Ca ratio in *A. murale* was lower than 1 (0.5-0.7), but in other species was higher than 1. Highest Ni values in plants were recorded for *A. murale* which was the dominant species on the site. The mean Ni content in the above ground part of *A. murale* was 9,129 mg Ni kg⁻¹ for fertilized plots and 8,483 mg Ni kg⁻¹ for unfertilized plots in June 28th 2005, 7,887 mg Ni kg⁻¹ for FH plots and 7,210 mg Ni kg⁻¹ for FNHN plots in June 28th 2006, 11,508 mg Ni kg⁻¹ for FH plots and 13,044 mg Ni kg⁻¹ for FNHN plots in June 14th 2007, 12,040 mg Ni kg⁻¹ for FH plots and 11,420 mg Ni kg⁻¹ for FNHN plots in July 2008. The fertilization had no significant effect in Ni concentration in plant tissues.

Table 4. Concentrations of Ni, Co, Fe, Ca, Mg, Mn, Zn in the dominant species collected in the experimental site of Pojska in 2007. Results are given as mean values $\pm$ standard deviation.

Plots	Species	Ni	Co	Fe	Mn	Zn	Ca	Mg	Mg/Ca	N	P
					mg kg ⁻¹					%	
FH	<i>Alyssum murale</i>	11508 $\pm$ 558	6.0 $\pm$ 1.8	210 $\pm$ 109	18.4 $\pm$ 4.7	152 $\pm$ 6.9	8718 $\pm$ 1662	6077 $\pm$ 1006	0.7	1,6 $\pm$ 0,36	0,194 $\pm$ 0,02
	<i>Trifolium nigricens</i>	493.9 $\pm$ 176	0.51 $\pm$ 0.11	275 $\pm$ 62	17.6 $\pm$ 1.4	119 $\pm$ 4.6	6532.5 $\pm$ 244	8467.8 $\pm$ 1062	1.3	1.7	0,32 $\pm$ 0,05
	Other species	587.7 $\pm$ 105	0.58 $\pm$ 0.14	656 $\pm$ 253	18.2 $\pm$ 2.3	79 $\pm$ 3.3	3635 $\pm$ 325	6075 $\pm$ 768	1.6	ND	ND
FNH	<i>Alyssum murale</i>	13049 $\pm$ 2151	7.3 $\pm$ 1.1	278 $\pm$ 240	21.2 $\pm$ 2.9	161 $\pm$ 22	11455 $\pm$ 428	6262 $\pm$ 401	0.5	1 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,01
	<i>Gryssopogon gryllus</i>	53.4 $\pm$ 28.1	0.39 $\pm$ 0.43	143 $\pm$ 15	22.2 $\pm$ 0.24	78 $\pm$ 0.57	2008.5 $\pm$ 46	3947 $\pm$ 118	1;9	0.8	0,23 $\pm$ 0,06
	<i>Trifolium nigricens</i>	303.7 $\pm$ 13.9	0.64 $\pm$ 0.31	703 $\pm$ 424	20.3 $\pm$ 3.4	86 $\pm$ 11	8609 $\pm$ 1131	7489 $\pm$ 624	0.9	1.7	0,27 $\pm$ 0,01
	<i>Lolium perenne</i>	255.3 $\pm$ 134	0.54 $\pm$ 0.51	515.7 $\pm$ 380	24.9 $\pm$ 1.54	109 $\pm$ 49	2314.6 $\pm$ 513	4409 $\pm$ 305	1.9	ND	ND
	<i>Dasypyrum villosum</i>	10.21 $\pm$ 10	0.28 $\pm$ 0.07	196 $\pm$ 105	21.9 $\pm$ 5.8	71 $\pm$ 10	1394 $\pm$ 589	2974 $\pm$ 1238	2.0	ND	ND
	Other species	617.6 $\pm$ 46	1.22 $\pm$ 0.58	586 $\pm$ 672	22.2 $\pm$ 2.7	105 $\pm$ 20	6344.7 $\pm$ 789	6949 $\pm$ 2170	1.0	ND	ND
NFH	<i>Alyssum murale</i>	14062 $\pm$ 1031	4.2 $\pm$ 0.7	203 $\pm$ 75	12.2 $\pm$ 0.3	165 $\pm$ 6.4	10866 $\pm$ 1118	5354 $\pm$ 797	0.5	1,02 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,03
	<i>Trifolium nigricens.</i>	302.5 $\pm$ 127.69	1.1 $\pm$ 1.3	760 $\pm$ 748	23.9 $\pm$ 14.4	89 $\pm$ 084	7410.6 $\pm$ 368	8477 $\pm$ 474	1.1	1.5	0,35 $\pm$ 0,02
	Other species	544.2 $\pm$ 2.3	0.86 $\pm$ 0.53	291 $\pm$ 139	43 $\pm$ 44	111 $\pm$ 10	4980 $\pm$ 984	6625 $\pm$ 10066	1.3	ND	ND
NFNH	<i>Alyssum murale</i>	13044 $\pm$ 2284	4.9 $\pm$ 1	614 $\pm$ 275	20.7 $\pm$ 8	163 $\pm$ 24	11293 $\pm$ 647	6081 $\pm$ 247	0.5	1 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,14
	<i>Chrysopogon gryllus</i>	187 $\pm$ 234	0.29 $\pm$ 0.26	482 $\pm$ 203	28 $\pm$ 5.8	76 $\pm$ 16	2937 $\pm$ 459	3871.9 $\pm$ 265	1.3	0.6	0,17 $\pm$ 0,02
	<i>Trifolium nigricens Viv.</i>	66.4 $\pm$ 49	1.6 $\pm$ 1.6	1173 $\pm$ 1430	29.3 $\pm$ 14	83 $\pm$ 1.6	6675.7 $\pm$ 348	7678 $\pm$ 2246	1.1	1.5	0,28 $\pm$ 0,0
	<i>Aegilops geniculata</i>	6.2 $\pm$ 0.6	0.09 $\pm$ 0.03	225 $\pm$ 179	15.6 $\pm$ 0.9	74 $\pm$ 8.5	1200 $\pm$ 465	2212 $\pm$ 937	1.8	ND	ND
	<i>Dasypyrum villosum</i>	15 $\pm$ 6.6	0.28 $\pm$ 0.013	172 $\pm$ 33	20.4 $\pm$ 1	69.9 $\pm$ 5.6	1115 $\pm$ 394	2640 $\pm$ 472	2.3	ND	ND
	Other species	279	1.2	849	19	85	4655	4426	0.9	ND	ND

Table 5. Concentrations of Ni, Co, Fe, Mn, Ca and Mg in harvested shoots of the species collected in experimental site of Pojska.

Species	Ni	Co	Fe	Ca	Mg	Mn	Zn	Mg:Ca
	mg kg ⁻¹							
<i>Lolium perenne</i>	255	0.54	515	2314	4409	24	109.0	1.9
<i>Aegilops geniculata</i>	6.2	0.09	225	1200	2212	16	74.0	1.8
<i>Dasypyrum villosum</i>	15	0.28	172	1115	2640	20	62.0	2.6
<i>Poa trivialis</i>	229	0.31	1105	2268	2872	19	57.0	1.3
<i>Centaurea solstitialis</i>	643	1.43	1590	5505	6724	22	97.4	1.2
<i>Minuartia hybrida</i>	670	1.57	543	5298	8703	29	59.3	1.6
<i>Lotus corniculatus</i>	404	0.70	1075	4667	7780	25	83.4	1.6
<i>Consolida regalis</i>	32	0.49	142	4627	10969	15	84.0	2.4
<i>Plantago lanceolata</i>	69	0.35	408	3457	6973	8	75.7	2.0
<i>Petrorhagia prolifera</i>	208	1.60	1314	4895	8584	17	117.1	1.7
<i>Tropogon pratesis</i>	25	4.30	525	2755	7636	7	127.8	2.7
<i>Bromus racemosus</i>	60	5.80	271	2148	2794	20	113.2	1.3
<i>Vicia villosa</i>	140	0.96	534	5850	7565	12	132.2	1.3

During plant growth, the Ni concentrations in *A. murale* changed according to the development stage and plant organs (Figure 6). The highest Ni contents in *A. murale* grown naturally was found at mid-flowering stage, and the general ranking of metals concentrations in plant organs was the following: leaves > flowers > siliques > stems > roots. Most plants on serpentinitic soils of Pojska showed slightly elevated Ni concentrations in comparison with those on other soil types about 5-100 mg kg⁻¹, rather than 0.5-10 mg kg⁻¹. In some species in our site Ni content was 187- 670 mg kg⁻¹, while samples of the non-serpentinitic substrata contain the expected very low Ni concentrations (Reeves, 1992). Ca contents are higher than Ni in vegetation and it went lower in flowering time (Fig. 6). Mg concentration in plant shoots is higher in germination stage, it is high in vegetation stage but lower than Ca. After flowering stage, the concentrations of all the elements decreased in shoots. Nickel (2%) and Ca (1.8%) accumulation occurred in leaves of *A. murale*. In other taxa present in experimental site Ca contents were lower than Mg contents, inverse of *A. murale*. Cobalt concentration in shoots tissues varied from 0.29 to 4.9 mg kg⁻¹. Higher contents were observed in *A. murale* leaves (18.6 mg kg⁻¹). Concerning Mn, its contents were higher in leaves, but no Mn accumulation as reported by Broadhurst et al. (2004) was observed. Fe contents were higher in roots of *A. murale* than in other parts, probably as a result of colloidal Fe fixation on roots. For Ni concentration in shoots of *A. murale*, at the same sampling dates, we have small differences between perennial plant stands and plants cultivated for the first year (Fig. 7).

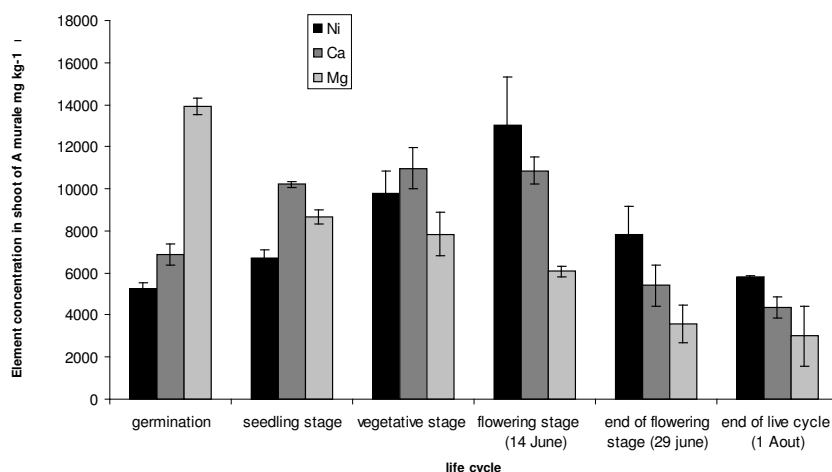


Figure 6. Ni, Ca, Mg extraction according to the plant development stage

Table 6. Ni extraction according to *A. murale* organs. Results are given as mean values $\pm$ standard deviation.

Plant organ	Ni	Co	Mn	Fe mg kg ⁻¹	Mg	Ca	Zn
				1664 $\pm$			33 $\pm$ 2.4
Root	2720 $\pm$ 404	2,25 $\pm$ 0,49	19 $\pm$ 9	511	2000 $\pm$ 500	3500 $\pm$ 600	
Stem	3536 $\pm$ 857	0.55 $\pm$ 0.05	5 $\pm$ 0.9	132 $\pm$ 68	1534 $\pm$ 365	2160 $\pm$ 320	59 $\pm$ 14
Silik	12141 $\pm$ 2850	5.9 $\pm$ 1.9	26 $\pm$ 1.5	243 $\pm$ 80	6182 $\pm$ 350	7886 $\pm$ 763	166 $\pm$ 25
Flower	14437 $\pm$ 67	9.4 $\pm$ 1	38 $\pm$ 3.9	487 $\pm$ 27	7112 $\pm$ 22	12082 $\pm$ 88	219 $\pm$ 11
Leaves	20892 $\pm$ 4412	18.6 $\pm$ 2.6	50 $\pm$ 21	520 $\pm$ 299	9946 $\pm$ 419	18593 $\pm$ 1948	235 $\pm$ 40

Table 7. TC values of Ni, Co, Fe, Mg, Ca, Zn in main parts of plant.

Tc	Ni	Co	Mn	Fe	Mg	Ca	Zn
Root	0.86	0.01	0.009	0.2	0.033	1.16	0.25
Stem	1.12	0.002	0.002	0.013	0.025	0.72	0.43
Silik	3.85	0.03	0.012	0.024	0.10	2.62	1.27
Flower	4.6	0.05	0.018	0.048	0.13	4	1.68
Leaves	6.6	0.09	0.02	0.052	0.16	6.2	1.8

Transfer coefficient (TC) was computed by dividing of total element content in plant tissues by total soil content (Table 7). They confirmed a different mobility of trace elements due to a wide range value among all elements measured. TC in parts of *A. murale* was between 0.86-6.6 for Ni and 1.16-6.2 for Ca. Ca were taken up higher than Ni in the roots of *A. murale*. Other elements were taken up lesser. Mean Fe contents in leaves were lower than in roots. TC for leaves did not reach 1 for Mg and was highest for Ni and Ca. It was 1.8 for Zn but very low for Co, Mn, Mg and Fe.

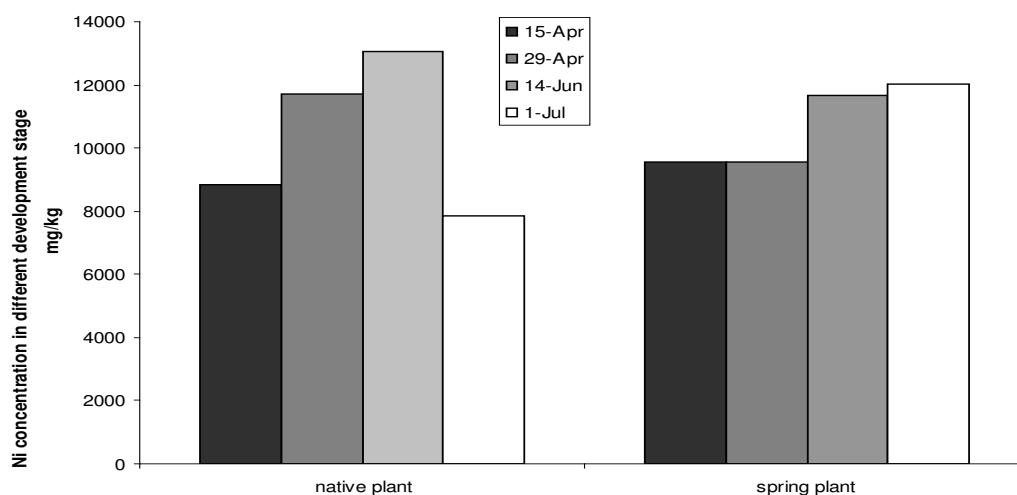


Figure 7. Ni extraction according to the plant development stage in native plant and in the case when *A murale* was cultivated as a spring plant.

Vegetation stages of *A. murale* as spring plant

In 2008 we have cultivated *A. murale* as a spring/winter plant. Seeds were sown in early autumn but indeed germinated in February 2008. The following vegetation stages of this plant were observed.

Stage A: Germination (Cotyledon stage) (beginning of February)

Stage B:

B1: Leaves forming a rosette (end of February – beginning of March)

B2: Beginning of stem elongation (beginning of April)

B3: Formation of n stems (end of April)

Stage C:

C1: Beginning of the formation of floral buds (May 15th)

C2: Floral buds (beginning of June)

Stage D: Beginning of flowering stage (July 8th)

Most of the plants in 2008 did not reach the flowering stage. We explained this because plants were germinating actually in late winter, several months later than naturally. We therefore harvested a spring crop and not a winter crop.

Relations between LAI and biomass production of *A. murale* as a spring crop.

During the vegetation stage, an exponential relation was observed between leaf surface and sum of temperatures and a linear relation between LAI and plant biomass (Figures 8 & 9):

$$\text{Biomass (g m}^{-2}\text{)} = 0.0047 \text{ LAI (cm}^{-2} \text{ m}^{-2}\text{)} + 3.627$$

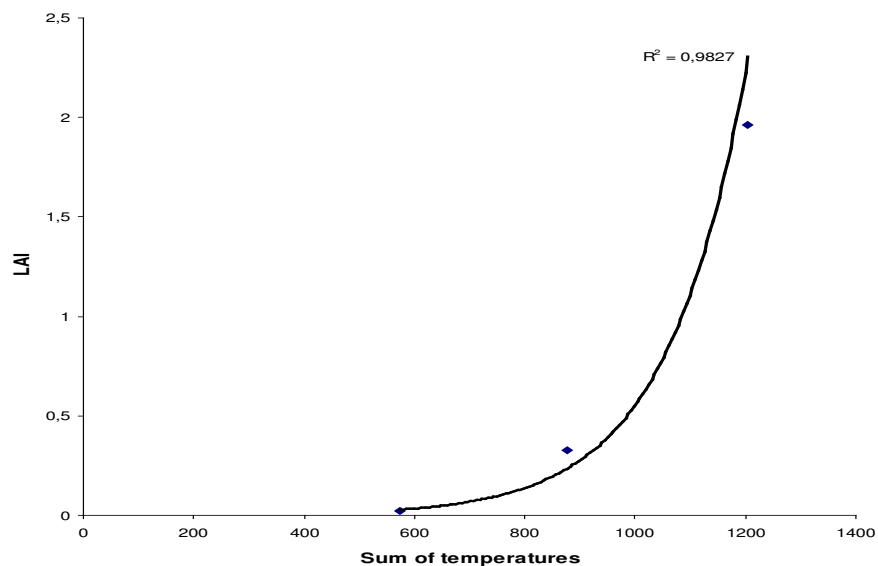


Figure 8. The relationship between LAI in *A. murale* (cm² m⁻²) and sum of temperatures (ΣT°C).

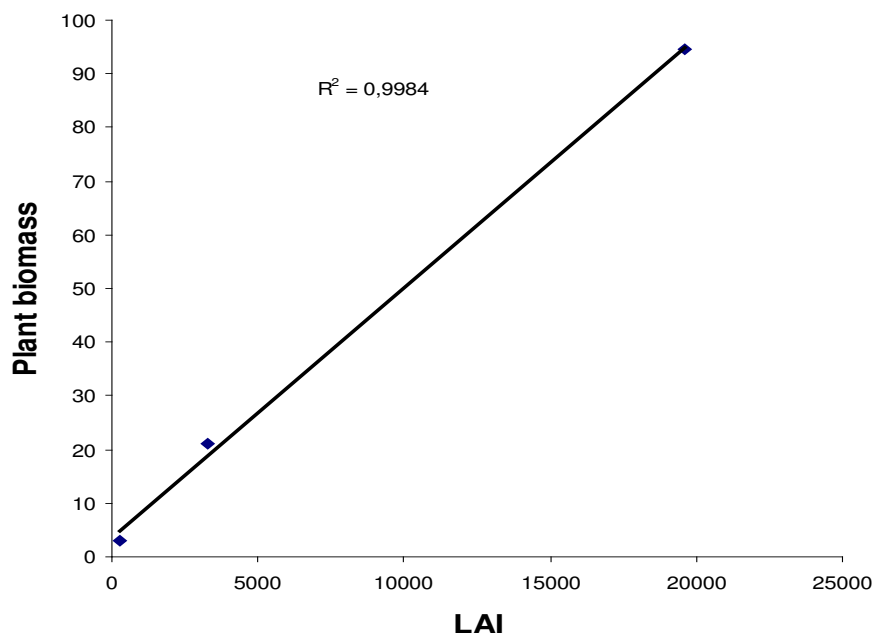


Figure 9. Relationship between LAI (cm² m⁻²) and plant biomass (g m⁻²) in *A. murale*

Discussion

Effect of managements practices on Ni phytoextraction yield

Annual phytoextraction depends on both the bioaccumulation ratio (plant:soil metal concentrations on dry matter basis) and the harvestable yield. After four years of experiment we can say that, the agronomy of producing high yields of phytoextraction crops is central to the success of this technology. According to what was expected on such soils with low nutrients availability, the overall vegetation responded dramatically to fertilization by increasing the biomass yield. Unexpectedly, the contribution of each of the species varied according to fertilisation and *A. murale* was highly favored by fertilisation compared to the two other species with factors of biomass increase extremely high (> 6). *Alyssum murale* has a remarkable ability to obtain soil P, which likely evolved due to the low P and high Fe status of the original status of the serpentine Vertisol. Higher N fertilization increased Ni yield; split N application is best to limit excessive N application while obtaining maximum annual biomass Ni yields (Robinson et al 1997, Li et al. 2003a, Chaney et al 2007). The Vertisol is also very low in Ca and high in Mg, so adding Ca along with fertilization increased the biomass of *A. murale* during the four years.

Another important agronomic management practice is weed control. After two years of fertilization to produce maximum *Alyssum* biomass, other plants competed with *A. murale* for essential plant nutrients and water use that are limited in serpentine soil. The anti-monocots herbicide (FocusTM ultra) allowed to significantly controlling the most significant weed species (*i.e.* grasses) that competed *Alyssum* in fields. The biomass production of *C. gryllus* and *T. nigriscens* decreased in 2006 since we harvested before maturity of *T. nigriscens* (Therophyte) in untreated plots (2005) and the harvest of the experimental site exposed the buds of *C. gryllus* (Hemicryptophyte) to low temperatures in winter. After four years we could say that the relative and net increase in biomass production of *A. murale* was the main reason for increase of phytoextraction yield since the Ni concentration in shoots was not significantly affected by fertilization and herbicide treatment. There were strong differences in biomass production and Ni phytoextraction yield in *A. murale* between 2006 and 2007. In four years of experiment, species showed an increasing pattern in total biomass production in relation to fertilization and harvesting time (the differences were significant $p < 0.05$). The life-forms showing the highest increase after fertilization were for *A. murale* ($p < 0.05$) and in terms of ecological adaptation was therefore a more

competitive species, but other species showed an increasing pattern in biomass production in relation to fertilization, herbicide treatment and harvesting time, but the differences were not significant. So this experiment showed that nutritional stresses represents an important limiting factor for the existence of many species and plant productivity which is in accordance with the findings of Chiarucci et al 1995 in serpentine vegetation of Tuscany. In our experiment we have applied an extensive technology, in which we stimulated natural vegetation stands (perennial) with fertilisation and herbicide treatment. The experiment in serpentine vegetation showed that fertilization could enhance total plant cover and thus community production with slight changes in species richness and composition. Although these communities are mostly composed of different species, only hyperaccumulator plants are able to maintain a higher abundance under fertilization, whilst other species show a decrease of abundance. Fertilization, harvest and herbicide treatments affect plant community structure and productivity. We reached a biomass 6 t ha^{-1} and a phytoextraction yield of 69 kg Ni ha^{-1} which was of course much lower than with an adapted intensive management (Li *et al.* 2003b), but such results could justify that phytomining becomes a serious agricultural cropping system in the ultramafic regions of Albania. *Alyssum murale* was observed with great phytoextraction potential in situations where native vegetation stand is enhanced with simple low-cost agronomic interventions.

Plant nutrition and Ni uptake

TC values are affected by plant species, plant part, and element origin but also by total content of element in soil and element mobility (Tlustoš et al 2006). So Ni and Ca confirmed their mobility and higher content of both elements was found in shoots than in roots. They reached higher values (in shoots) than mean soil contents of both elements. TC values for Ni and Ca in green parts of *A. murale* confirming great capacity of this plant to take up both elements even at high soil concentration and showed an indication of optimal hyperaccumulation conditions due to high availability of Ni. Other elements had a lower mobility or were not preferentially taken up by *A. murale* as was confirmed by TC values and DTPA- extractable elements. *Alyssum murale* has the extreme ability to accumulate higher contents of Ca than of Mg. *Alyssum murale* in whole plant has TC values (metal concentration ratio of plant to soil) up to 6 that shows an indication of optimal hyperaccumulation conditions due to high availability of Ni and a translocation factor (TF, metal concentration ratio of plant shoots to roots) of 4, which shows an indication of the potential for phytoextraction. It was observed that the concentration of Ni in other species

was lower than $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$, so *A. murale* is considered as the only Ni-hyperaccumulator in the site except for the first year (Bani et al., 2007). Concerning the distribution of metals inside the plants: our experiment showed that metal concentration in the plant varies with the organ and the age of this organ (Perronnet et al., 2003). This has consequences on the time of harvest and the parts to be harvested. Since the Ni concentrations were much higher in leaves and flowers than other plant organs, plants will have to be collected when they have more leaves and flower (Li et al. 2003, Keller 2006), because later on, leaves start to decay on the ground and may increase the bioavailable metal pool in soils, as was indicated in the values of Ni DTPA measured after harvesting time (Hammer and Keller 2003, Perronnet et al 2000).

The general trend of metal accumulation in plants was $\text{Ni} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Co}$ and accumulation differences were found to largely depend on plant species. Thus different metal uptake and translocation strategies were suggested in the studied species: exclusion for *Aegilops geniculata*, *Dasypyrum villosum*, *Consolida regalis* and *Tropogon pratensis* whereas tolerance mechanisms for *Centaurea solstitialis*, *Minuartia hybrida*, *Trifolium nigrescens*, *Lotus corniculatus*. Those species can be considered as metal excluder or tolerant plants with ability of growing in soils with a wide range of heavy metal concentrations, mainly immobilized by soil conditions. Thus they accomplished the criteria to be considered for phytostabilization technique in contaminated sites.

Results indicated that maximum Ni phytoextraction by *A. murale* in soil of Pojska may be explained by a higher phytoavailable of Ni than others element that can be accumulated by this plant in other conditions (Broadhurst et al 2008, Bani et al., 2009).

Estimated Economics of Ni phytoextraction

The first point we would like to make is that the hyperaccumulation trait is vital to the success of commercial phytomining of Ni. Phytoextraction efficiency depends both on high concentrations of the target metals in harvestable shoot biomass and on biomass yield. In our field experiment, we measured mean shoot Ni concentration 11.508 g kg^{-1} in dry matter and dry biomass production of *Alyssum murale* Waldst. & Kit. 6 Mg ha^{-1} . So the economic potential of our technology for phytoextraction of Ni can be estimated as follows:

- 60 kg Ni ha⁻¹ (biomass yield of 6 Mg ha⁻¹ with Ni concentration of 11.5 g kg⁻¹);
- \$30 kg⁻¹ Ni (Ni commercial value at this time)
- rental costs are \$150 ha⁻¹ and production costs are \$ 390 ha⁻¹
- 20 % of Ni value to cover cost of metal recovery;
- net value of an annual phytomining crop would be \$ 1116 ha⁻¹

This profit makes Ni phytomining a highly profitable agricultural technology for Ni extraction from Albanian mineralized Vertisols. This figure is valid even with lower values of Ni exchange rate.

Conclusion générale

Les sols ultramafiques hébergent des plantes hyperaccumulatrices qui offrent un très grand intérêt scientifique et technologique. Les relations de ces plantes avec le sol sur lequel elles se développent constituent un enjeu scientifique important dans la mesure où la connaissance des interactions permettrait de mieux comprendre quels sont les facteurs édaphiques qui contrôlent leur développement et surtout l'accumulation du nickel. De plus, la propriété de ces plantes à extraire le Ni des sols ultramafiques les place dans une perspective d'exploitation métallurgique des sols.

La thèse se destinait à répondre à ces deux enjeux. Au plan scientifique, elle se destinait à contribuer à la compréhension de l'écophysiologie de plantes hyperaccumulatrices se développant sur des sols ultramafiques en mettant l'accent tout particulièrement sur l'offre du sol en éléments, i.e. disponibilité du Ni.

Au plan technologique, l'objectif finalisé a été de caractériser et de maîtriser l'agronomie d'un hyperaccumulateur de Ni dans l'optique de proposer un itinéraire technique viable de phytoextraction. Il s'agissait donc de déterminer les conditions pratiques d'une stimulation de la production de biomasse et de Ni par une plante hyperaccumulatrice naturellement présente sur les sites.

Pour répondre à ces questions, la thèse s'est appuyée sur les sols ultramafiques des Balkans qui abritent une flore hyperaccumulatrice très riche et, en particulier, sur la région de Pogradec dans l'Est de l'Albanie, presque exclusivement couverte par ce type de matériaux. Une plante a été choisie, *Alyssum murale*, en fonction de l'extension de sa distribution dans les Balkans et de ses propriétés d'accumulation du Ni et de sa capacité à croître sur des milieux de faible fertilité. La démarche expérimentale a été construite à partir d'observations de terrain, d'analyses au laboratoire, d'essais culturaux en conditions contrôlées et d'essais culturaux en conditions de plein champ.

Les travaux réalisés ont démontré l'importance des conditions édaphiques dans le processus d'accumulation du nickel par *A. murale*. Ils mettent clairement en évidence l'importance de la fertilité chimique du sol, traduite par la disponibilité des éléments. Si la biodisponibilité du Ni est le facteur primordial expliquant l'extraction de l'élément par la plante, d'autres facteurs semblent effectivement prendre une grande importance. En particulier, la plante répond de façon spectaculaire à l'apport d'azote en augmentant la production de biomasse (e.g. de 0,2 t à 2,6 t ha⁻¹ après un apport de 120 kg N ha⁻¹). Le choix de sols où la disponibilité du Ni est tamponnée montre que cette dernière ne limite pas et ce, malgré des

niveaux de prélèvements importants durant quelques années de culture, le prélèvement par *A. murale* lors des cultures suivantes. Mais le résultat le plus original est l'observation de l'inhibition de l'accumulation du Ni dans la plante par la présence de Ca disponible. En effet, il remet en question les hypothèses avancées jusqu'à présent pour justifier l'apparition des processus d'hyperaccumulation de métaux dans le règne végétal.

Dans le **deuxième chapitre**, l'objectif était de caractériser les différentes populations de plantes hyperaccumulatrices existantes dans ces régions des Balkans et de connaître leurs propriétés globales de phytoextraction et de tolérance aux métaux en relation avec les propriétés des sols. Le but final a été de mettre en évidence les meilleures espèces candidates pour la phytoextraction du Ni. Dix sites ont été étudiés sur deux régions en Albanie et huit sites dans le Nord-Ouest de la Grèce. Huit espèces hyperaccumulatrices ont pu être recensées sur ces 18 sites. Les échantillons végétaux et les sols correspondants ont été analysés pour déterminer la composition élémentaire ainsi que les paramètres physico-chimiques des sols susceptibles d'influencer la disponibilité du Ni. Une fois encore, dans les sols, la phase représentée par les oxy-hydroxydes de Fe amorphes s'est révélée essentielle pour expliquer la disponibilité du Ni, à l'exception des sols très argileux. Les concentrations en Ni les plus élevées ont été trouvées dans les feuilles d'*A. murale* (2,0% à Pojska) et d'*A. markgrafii* (1,9 % à Gjegan). Si l'on rapporte les concentrations en Ni dans les feuilles à la disponibilité du Ni dans les sols, *A. markgrafii* est l'espèce la plus efficace parmi les hyperaccumulatrices de Ni. Pour *A. murale*, qui est l'espèce hyperaccumulatrice la plus présente dans les Balkans, il semble que la concentration de Ni dans les feuilles soient négativement affectée par la teneur en Ca des sols indépendamment de la teneur en Ni disponible.

Dans le **troisième chapitre**, l'objectif était de contribuer à la compréhension du fonctionnement des chaînes de sols dans cette région ultramafique des Balkans, et par là-même de comprendre les relations entre le fonctionnement des sols, la fertilité et la disponibilité du Ni dans ces sols et la réponse de plantes hyperaccumulatrices endémiques. Pour cela, une toposéquence représentative a été choisie dans l'Est de l'Albanie (Pojska, Région de Pogradec) sur laquelle, les sols ont été caractérisés et la végétation d'hyperaccumulateurs échantillonnée pour analyse. Les résultats montrent que les sols de pente, bien drainés sont soumis à une altération intense des minéraux primaires de la roche mère (principalement des serpentines) pour aboutir à des sols bruns neutres à légèrement acides, enrichis en Fe et appauvris en Si et en Mg. Les serpentines y sont transformées en

smectites ferrières et en Fe libre. Celles-ci sont évacuées et accumulées dans les glacis de bas de pente et dans les dépressions entourant les massifs de serpentine pour donner naissance à des vertisols ultramafiques. Ces derniers, représentent l'essentiel des terres labourables de ces régions. Enfin, les sols alluviaux, plus jeunes, sont plus proches en composition élémentaire et en minéralogie de la roche mère.

Le Ni est plus disponible dans les sols de pente où il est lié essentiellement aux oxyhydroxydes de Fe amorphes. Il reste assez disponible dans les Vertisols où il est plutôt associé aux smectites magnésiennes. Deux espèces ont été identifiées sur le site. La première, *Th. ochroleucum*, ne pousse que sur les sols de pente tandis que la seconde, *A. murale*, est ubiquiste sur la toposéquence. Les teneurs de Ni dans cette dernière ne répondent pas au niveau de disponibilité chimique du sol. Elles sont supérieures dans les sols de bas de pente et de dépressions (Vertisols et Fluvisols) qui sont aussi les sols cultivés.

Dans les **quatrième et cinquième chapitres**, l'étude de l'écophysiologie d'*A. murale* ainsi que l'effet de traitements agronomiques classiques a été menée grâce à la mise en place de parcelles expérimentales de plein champ sur un Vertisol ultramafique. En essayant de diminuer au maximum les interventions pour s'adapter aux conditions agricoles locales et en contraste avec les travaux déjà effectués aux Etats-Unis, il a été possible à partir du couvert végétal natif de sélectionner l'espèce *A. murale* et en obtenir un rendement conséquent en adaptant des pratiques agronomiques simples. Pour cela, des essais de fertilisation, de contrôle des adventices ainsi que la description des stades phénologiques ainsi que le suivi des éléments dans les plantes en fonction des stades ont été menés à bien. Durant quatre années d'expérience, la disponibilité du Ni a été maintenue voire augmentée, malgré les exportations répétées de Ni par les cultures. La fertilisation optimale a été définie par essais en vases de végétation puis appliquée au champ. L'apport optimal d'azote est de 100 kg ha⁻¹ par an (le fractionnement de l'apport en deux fois peut être pratiqué). L'espèce la plus compétitive et réagissant positivement à la fertilisation comme le fait *A. murale* est une graminée (*Chrysopogon gryllus*) ; elle a pu être maîtrisée par un traitement herbicide anti-monocotylédone classique. Le rendement optimal en stimulant la végétation en place est donc de 6 tonnes de MS d'*A. murale* et de 70 kg Ni ha⁻¹ (2007). Le labour et le semis d'*A. murale*, ne donnent des résultats équivalents que l'année d'après, il est donc conseillé de maintenir des couverts pérennes récoltés régulièrement.

Ce travail a permis de sélectionner parmi une petite dizaine d'espèces hyperaccumulatrices de Ni de la région des Balkans, quelques espèces prometteuses, parmi lesquelles *A. murale*. Cependant, chez les Brassicacées hyperaccumulatrices, il existe d'autres espèces à très fort potentiel de phytoextraction (i.e. *A. lesbiacum* ou *A. corsicum*). En ce qui concerne la définition des conditions édaphiques optimales pour pratiquer la phytoextraction, celle-ci s'applique plutôt aux zones de climat méditerranéen où une telle altération pédogénétique peut être observée. Dans les régions tempérées plus froides, les sols ayant subi moins d'altération pourraient ne pas montrer de tels niveaux de disponibilité du Ni de même que dans les régions tropicales, l'altération plus intense peut conduire à la séquestration du Ni dans des minéraux secondaires stables (e.g. goethite). Enfin, les conclusions de ce travail en terme d'agronomie d'*A. murale* et de phytoextraction sont essentiellement liées à des systèmes extensifs pour lesquels il n'est pas, pour des raisons technico-économiques, question de produire de grandes quantités de semences pour implanter les cultures. En effet, ce travail repose sur la stimulation d'un couvert végétal pérenne existant et spontané. Ceci en fait la force et à la fois la faiblesse, probablement en ce qui concerne le rendement maximal obtenu qui ne semble pas dépasser 100 kg Ni ha⁻¹.

Ce travail a permis d'identifier de nouvelles questions scientifiques. Si le contrôle de la disponibilité du Ni par les phases minérales porteuses permet d'expliquer les phénomènes observés, il ressort que la matière organique des sols semble jouer un rôle complémentaire comme le montre la relation statistique obtenue sur les sols de la toposéquence. Les plantes hyperaccumulatrices doivent contribuer à recycler Ni et Ca en grandes quantités à travers le dépôt de litière. Ces aspects méritent les outils pointus de la biogéochimie (traçage isotopique) pour être élucidés. De même, il semble que l'étude de l'écophysiologie de ces plantes hyperaccumulatrices doive se porter précisément sur la question de la translocation et de la redistribution des éléments dont le Ni et le Ca au cours des stades phénologiques successifs de la plante.

Ces résultats et les conclusions apportées par ce travail permettent de dresser plusieurs perspectives significatives. Pour les aspects les plus fondamentaux, l'étude plus poussée sur la compétition entre le Ca et le Ni qui pourra découler de cette thèse laisse envisager des éléments de réponse au « pourquoi » de l'hyperaccumulation de Ni. Du point de vue de l'agronomie de ces cultures, il serait maintenant souhaitable de tester la culture à une plus grande échelle sur les sols identifiés comme étant parfaitement adaptés (i.e. les Vertisols magnésiens ultramafiques) et de tester la faisabilité de l'utilisation des ressources

génétiques locales. En parallèle, une espèce prometteuse (i.e. *A. markgrafii*) devrait être testée sur ces mêmes sols à fort potentiel sur lesquels nous ne l'avons pas trouvé. Cette dernière étant la plus efficace dans le prélèvement en relation à la disponibilité du Ni dans le sol, elle pourrait sans doute permettre de dépasser les 100 kg Ni ha⁻¹.

La production de Ni par la plante hyperaccumulatrice *A. murale* peut être envisagée selon des procédés agronomiques peu intensifs. Le facteur principal est la fertilisation. En effet, avec cette espèce nous avons démontré la réponse importante de la plante à des niveaux moyens de fertilisation (e.g. azote) et que cette réponse ne s'accompagne pas d'une diminution de la concentration du Ni dans les tissus. Le choix de sols avec des quantités abondantes de phases porteuses où le Ni est disponible et sous des conditions tamponnées s'avère être primordial car le prélèvement de Ni par *A. murale* n'est en aucun cas limité comme le démontre l'évolution de la disponibilité chimique du Ni au cours du temps. Avec une production de biomasse supérieure avec un apport d'engrais de 120 kg N ha⁻¹, le Ni extrait atteint des quantités approchant la centaine de kg par ha, correspondant à un accroissement de l'extraction d'un facteur dix par rapport à un témoin sans engrais. Un second élément important est la date de récolte de la plante. Nous avons démontré qu'il est plus avantageux de récolter la plante au stade floraison qu'au stade maturité, en raison de l'éventuelle chute des feuilles et de la retranslocation du Ni au sein de la plante vers les organes de réserve (e.g. graines). Dans ce cas, l'extraction est supérieure d'un facteur trois.

Les interactions entre la fertilité chimiques des sols (Ca, Mg, N, P, K) et l'absorption de Ni par les plantes hyperaccumulatrices a été mise en évidence dans ce travail. La compétition Ca-Ni pour l'absorption n'avait jusque maintenant pas été soulevée mais il se peut qu'elle soit un frein principal à l'obtention de hauts rendements de phytoextraction sur des sols malgré tout pourvus en Ni biodisponible. C'est là un axe prioritaire de recherche en ce qui concerne l'écophysiologie des Brassicacées hyperaccumulatrices. Le potentiel d'extraction du Ni par la plante n'est probablement pas atteint dans les conditions proposées à l'issue de la thèse. Une des raisons majeures, et initialement prise en compte, est l'utilisation du couvert végétal déjà implanté sur les parcelles expérimentales de manière à promouvoir la culture sans passer par une étape de production significative de semences. Il est donc indispensable de développer des méthodes permettant une meilleure couverture, et la plus monospécifique possible, sans nécessairement faire appel à un semis conventionnel de semences collectées *ex-situ*.

Références bibliographiques

- Aboudrar W., Schwartz C., Benizri E., Morel, J.L. et Boularbah A., 2007 - Soil microbial diversity as affected by the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 9: 41-52.
- AFNOR., 2004 - Evaluation de la qualité des Sols. Vol. 1 & 2. AFNOR. Saint-Denis, France. pp 461 & 486.
- Alexander E.B., 2000 - Reexamination of soil redness-bedrockspecific grafitv relationships. *Soil survey horizon* 41: 24-26.
- Alexander E.B., 1994 - Serpentine soils mapped in California and Southwestern Oregon. *Soil Surv. Horizons* 35, 61–69.
- Alexander, E.B., 2004a - Serpentine soil redness, differences among peridotite and serpentinite materials, Klamath Mountains, California. *International Geology Review*, 46: 754–764.
- Alexander E.B., 2004b - Varieties of ultramafic soil formation, plant cover and productivity. In: Boyd RS, Baker AJM, Proctor J (eds) *Ultramafic rocks: Their soils, vegetation and fauna*. Proceedings of the 4th international conference on serpentine ecology. Science Reviews, St. Albans, Herts, UK, pp 9–17.
- Amir, H. et Pineau, R., 2003 - Relationships between extractable Ni, Co, and other metals and some microbiological characteristics of different ultramafic soils from New Caledonia. *Australian Journal of Soil Research*, 41 (2): 215–228.
- Anderson A.J. et Meyer F.K., 1973 - Heavy metal toxicities: levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plants associated with visual symptoms and variation in growth of an oat crop. *Australian Journal of Agricultural Research*, 24(4): 557-571.

Anonymous. 1992- Advertisement supplement. *Min J* (London) 318(8172):8.

Asher, C.J., 1991 - Beneficial elements, functional nutrients, and possible new essential elements, in: *Micronutrients in Agriculture*, 2nd edition" SSSA Book series, no 4. Soil Science Society of America, Madison, USA. 703-23.

Bailey S.W., 1988 - Chlorites: structures and crystal chemistry. In *Hydrous Phyllosilicates (exclusive of micas)*, Bailey S. W (Ed). *Mineralogy of America, Reviews in mineralogy*, vol 19: 347-403.

Baker A.J.M.et Walker P.L., 1989 - Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity, *Chem. Speciat. Bioavailab.* **1** pp. 7–17.

Baker A.J.M et Walker P.L., 1990 - Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In *Heavy Metal Tolerance in Plants*. Eds. A J Shaw, 155-177. CRC Press, Florida, USA.

Baker A.J.M., R.D. Reeves, et McGrath S.P., 1991 - *In situ* decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal- accumulating plants—a feasibility study. p. 539–544. In R.E. Hinchey and R.F. Olfenbuttel (ed.) *In Situ Bioreclamation*. Butterworth- Heinemann Publishers, Stoneham, MA.

Baker A.J.M et Brooks R.R., 1989 - Terrestrial higher plants which hyperaccumulate chemical elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81–126.

Baker A.J.M., Proctor J. et Reeves R.D., 1992 - The vegetation of Ultramafic (Serpentine) soils. Intercept, Andover, Hampshire, pp 509.

Baker A.J.M., 1981 - Accumulators and Excluders-Strategies in Response of Plants to Heavy Metals, *J. Plant Nutr.*, vol. 3: 643–654.

- Baker A.J.M, McGrath S.P, Sidoli C.M.D et Reeves R.D., 1994 - The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating crops. *Resources Conserv. Recycling* 11, 41–49.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Mullaj, A. et Morel J.L., 2007 - In-situ phytoextraction of nickel by native population of *A. murale* on ultramafic site in Albania. *Plant and Soil* 293: 79-89.
- Bani, A., Echevarria, G., Reeves, R., Sulçe, S., Mullaj, A. et Morel J.L., 2008 - Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania and Greece. Poster in Sixth International Conference on Serpentine Ecology. College of Atlantic. Bar Harbor, ME, USA. 15-20 June.
- Bani A., Echevarria G., Mullaj A., Reeves R., Morel J. L. et Sulçe S., 2009 – Ni hyperaccumulation by *Brassicaceae* in serpentine soils of Albania and NW Greece; *Northeastern Naturalist* (2009) 16 (Special Issue 5):385–404
- Banuelos, G.S., 2006 - Phyto-products may be essential for sustainability and implementation of phytoremediation. *Environ. Pollut.* 144:19–23.
- Barceloux D.G., 1999 - “Nickel”. *J. Toxicol – Clin Toxicol.* 37: 239-258
- Becquer T., Pétard J., Duwig C., Bourdon E., Moreau R. et Herbillon A.J., 2001 - Mineralogical, chemical and charge properties of Geric Ferralsols from New Caledonia, *Geoderma* 103 pp. 291–306.
- Becquer T., Quantin C., Rotte-Capet S., Ghanbaja J., Mustin C. et Herbillon A.J., 2006 - Sources of trace metals in ferralsols in New Caledonia. *European journal of Soil Sciences*, 57: 200-213.
- Becquer T., Le Crann A., Chardot V., Garnier J., Echevarria G., Quantin C. et Martins E. S., 2005- Teores de níquel e cromo dos solos do mocico- máfico-ultramáfico de níquelândia (Goiás). Communication orale, 3^{ème} congrès brésilien de science du sol. 17-22 juillet 2005, Recife –PE, Brésil.

- Bennett F.A., Tyler E.K., Brooks R.R., Gregg P.E.H et Stewart R.B., 1998 - Fertilisation of hyperaccumulators to enhance their potential for phytoremediation and phytomining. *In* Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Ed. R R Brooks. pp. 249–259. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Bollard E.G., 1983 - Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition, in Encyclopedia of plant physiology, New Series° (A. Läuchli and RL Bielecki, eds.): Vol 15B, pp 695-755. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- Brady K.U, Kruckeberg A.R., Bradshaw H.D., 2005 - Evolutionary Ecology of plant adaptation to serpentine soils. 243-66.
- Bremner R.J.M. et Keeney D.R., 1982 - Methods of soil analyses. Part 2, pp. 595-622, pp. 643 693.
- Breemen NV. et Buurman P., 2003 - Soil Formation, Second Edition Kluwer Academic Publisher: 245-255
- Broadhurst C.L., Chaney R.L., Angle J.S., Mangel T.K., Erbe E.F. et Murphy C.A., 2004 - Simultaneous Hyperaccumulation of Nickel, Manganese, and Calcium in *Alyssum* Leaf Trichomes, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38: 5797–5802.
- Broadhurst, C.L., Tappero R.V., Mangel, T.K., Erbe, E.F., Angle, J.S., Sparks, D.L., et Chaney R.L., 2008 - Interaction of nickel and manganese in accumulation and localization in leaves of the Ni hyperaccumulators *Alyssum murale* and *Alyssum corsicum* Plant Soil. 314:35–48.
- Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffre T., 1977 - Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7: 49-57.
- Brooks R.R. et Radrord C.C., 1978 - Nickel accumulation by European species of the genus *Alyssum*. *Proc. Roy. Soc. London B* 200: 217-224.

- Brooks R.R., Morrison, R.S., Reeves, R.D., Dudley, T.R. et Akman Y., 1979 - Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum* Linnaeus (Cruciferae). Proc. Roy. Soc. Lond. B 203: 387–403.
- Brooks R.R., 1987 - In *Serpentine and Its Vegetation*, ed. TR Dudley. Portland, OR: Dioscorides. 454 pp.
- Brooks R.R, et Yang XH., 1984 - Elemental levels and relationships in the endemic serpentine flora of the Great Dyke, Zimbabwe and their significance as controlling factors for this flora. *Taxon* 33: 392–99.
- Brooks R.R et Robinson B.H., 1998 - The potential of use of hyperaccumulators and other plants for phytomining. In *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. Ed. R R Brooks. pp. 327–356. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Brooks R.R, Chambers M.F, Nicks L.J et Robinson B.H., 1998 - Phytomining. *Plant Sci.* 3 (9): 359–362.
- Brooks R.R., 1998 - *Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals (Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining)*, Wallingford: CAB.
- Brown S.L., Chaney R.L., Angle J.S. et Baker A.J.M., 1994 - Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc-contaminated and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, v.23: 1151-1157.
- Boyd R.S. et Jaffré T., 2001 - Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebertia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *S. Afr. J. Sci.* 97:535–38.
- Boyd R.S. et Martens S.N., 1998a - The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology*, 8:1–7.

- Boyd R.S. et Martens S.N., 1998b - Nickel hyperaccumulation of *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): A constitutive trait. *Am. J. Bot.* 85:259–65
- Bonifacio E., Zanini E., Boero V. Et Franchini-Angela M., 1997- Pedogenesis in a soil catena on serpentinite in north-western Italy. *Geoderma*, 75 (1-2): 33–51.
- Burt R., Fillmore M., Wilson M.A., Gross E.R., Langridge R.W. et Lammers D.A., 2001 - Soil properties of selected pedons on ultramafic rock in Klamath mountains, Oregon. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32: 2145-2175.
- Caillaud J., Proust D., Righi D., Martin F., 2004 - Fe-rich clays in a weathering profile developed from serpentinite. *Clays Clay Miner.* 52:779-791.
- Caillaud J., Proust D., Philippe S., Fontaine C. et Fialin M., 2009 - Trace metals distribution from a serpentinite weathering at the scales of the weathering profile and its related weathering microsystems and clay minerals. *Geoderma*. 149:199-208.
- Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S. et Baker A.J.M., 1997 - Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 279-284.
- Chaney R.L., 1983 - Plant uptake of inorganic waste constituents. *In* Land Treatment of Hazardous Wastes. Eds. J F Parr, P B Marsh and J M Kla Noyes. pp. 50–76. Data Corp., Park Ridge, NJ.
- Chaney R.L., Angle J.S., Broadhurst C. L., Peters C. A., Tappero R. V. et Sparks D.L., 2007 - Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J. Environ. Qual.* 36:1429–1443.
- Chaney R.L., Angle J.S., McIntosh M.S., Reeves R.D., Li Y.-M., Brewer E.P., Chen K.-Y., Roseberg R.J., Perner H., Synkowski E.C., Broadhurst C.L., Wang S., et Baker A.J.M., 2005 - Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Z. Naturforsch.* 60C:190–198.

- Chaney R.L., Angle J.S., Baker A.J.M. et Li Y.-M., 1998a - Method for phytomining of nickel, cobalt, and other metals from soil. U.S. Patent 5,711,784. Date issued: 27 Jan. 1998.
- Chaney R.L., Li Y.-M., Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R.D., Brown S.L., Homer F.A., Malik M., Chin M., 1998b - Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. *In* Proc. Symposium on Phytoremediation, Int. Conf. Biogeochemistry of Trace Elements. Eds. G S Bañuelos and N Terry (June 23–26, 1997, Berkeley, CA).
- Chaney R.L., Li Y.-M., Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R.D., Brown S.L., Homer F.A., Malik M. et Chin M., 2000 - Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. p. 131–160. *In* N. Terry and G.S. Bañuelos (ed.) Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chaney, R. L., Chen, K.Y., Li Y.M., Angle J.S. et Baker A.J.M., 2008 - Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. *Plant Soil* 311: 131-140.
- Chardot V., Massoura S.T., Echevarria G., Reeves R.D. et Morel J.L., 2005 - Phytoextraction potential of the nickel hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. *Int. J. Phytoremediation*. 7: 323-335.
- Chardot V., Echevarria G., Gury M., Massoura S.T. and Morel J.L., 2007 - Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). *Plant Soil*, 293: 7-21.
- Chiarucci A. et De Dominicis V., 1995 - Effects of pine plantations on ultramafic vegetation of central Italy. *Isr. J. Plant Sci.* 43: 7-20.
- Coleman R.G. et Jove C., 1991 - Geological origin of serpentinites. *In*: Baker, A.J.M. (Ed.). The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils: Proceedings of the First

International Conference on Serpentine Ecology. Intercept, Andover, Hampshire, UK, pp. 1–17.

Dalton D.A., Evans H.J. et Hanus F.J., 1985 - Stimulation by Nickel of Soil Microbial Urease Activity and Urease and Hydrogenase Activities in Soybeans Grown in a Low- Nickel Soil, *Plant Soil*, vol. 88: 245–258.

Das P.K., Kar M. et Mishra D., 1978 - Nickel Nutrition of Plants: Effect of Nickel on Some Oxidase Activities during Rice (*Oryza sativa* L.) Seed Germination, *Z. Pflanzenphysiol.*, vol. 90: 225–233.

Davis M.A., Boyd R.S., Cane J.H., 2001 - Hosts witching does not circumvent the Ni-based defense of the Ni hyperaccumulator *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae). *S. Afr. J. Sci.* 97: 554–57.

Davis M.A. et Boyd R.S., 2000 - Dynamics of Ni-Based Defense and Organic Defenses in the Ni Hyperaccumulator, *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae), *New Phytol.*, vol. 146: 211–217.

Duchaufou 1972 - Processus de formation des sols (Ph. D). C.R.D.P. Nancy.

Echevarria G., Leclerc-Cessac E., Fardeau J.C et Morel J.L., 1998 - Assessment of phytoavailability of Ni in soils. *J. Environ. Qual.* 27: 1064–1070.

Echevarria G., Massoura T., Sterckeman T. et Morel J.L., 2006 - Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 643-651.

Ehlken S. et Kirchner G., 2002 - Environmental Processes Affecting Plant Root Uptake of Radioactive Trace Elements and Variability of Transfer Factor Data: A Review, *J. Environ. Rad.*, vol. 58: 97–112.

Elliott H.A., Liberati M.R. et Huang, C.P., 1986 - Competitive adsorption of heavy metals by Soils. *J Environ Qual* 15:214-219.

- Frank R., Stonefield K.I., Suda P., Potter J.W., 1982 - Impact of nickel contamination on the production of vegetables on an organic soil, Ontario, Canada, 1980–1981. *Sci Total Environ* 26:41–65.
- Gabbrielli R., Pandolfini T., Vergnano O. et Palandri M.R., 1990 - Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil* 122: 271- 277.
- Gerendas J. et Sattelmacher B., 1999 - Influence of Ni Supply on Growth and Nitrogen Metabolism of *Brassica napus* L. Grown with NH₄NO₃ or Urea as N Source, *Ann. Bot.*, vol. 83: 65–71.
- Gerendas J. et Sattelmacher B., 1997 - Significance of N Source (Urea vs. NH₄NO₃) and Ni Supply for Growth, Urease Activity and Nitrogen Metabolism of Zucchini (*Cucurbita pepo* convar. *giromontiina*), *Plant Soil*, vol. 196: 217–222.
- Gerard E., Echevarria G., Sterckemant T. et Morel J.L., 2001 - Cadmium availability to three plant species varying in Cd accumulation pattern. *Journal of Environmental Quality*, 29 :1117-1123.
- Gries G.E., et Wagner G.J., 1998 - Association of Nickel versus Transport of Cadmium and Calcium in Tonoplast Vesicles of Oat Roots, *Planta*, vol. 204: 390–396.
- Guerinot** M.L., **2000** - The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 190–198 in J. L. **Hall**^{*} and Lorraine E. **Williams** Transition metal transporters *in* plants *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 393: 2601-2613, December 1, **2003**.
- Hammer D., et Keller C., 2003 - Phytoextraction of Cd and Zn with *Thlaspi caerulescens* in field trials, *Soil Use and Management* 19, 144-149.
- Heath S.M., Southworth D. et D’Allura J.A., 1997 - Localization of Nickel in Epidermal Subsidiary Cells of Leaves of *Thlaspi montanum* var *siskiyouense*

(Brassicaceae) Using Energy-Dispersive X-Ray Microanalysis, *Int. J. Plant Sci.* vol. 158: 184–188.

Hseu Z.Y., Tsai H., His H.C. et Chen Y.C., 2007 - Weathering sequences of clay minerals in soil along a serpentinitic toposequence. v. 55; no. 4: 389-401; DOI: 10.1346/CCMN.2007.0550407.

Huang J.W., Chen J., Berti W.R., et Cunningham S.D., 1997 - Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31: 800–805.

Ingle R.A., Fricker M.D. et Smith, J.A.C., 2002 - Evidence for Ni-Proton Antiport Activity at the Vacuolar Membrane of the Hyperaccumulator *Alyssum lesbiacum*, *Proc. 9th New Phytol. Symp. Heavy Metals and Plants from Ecosystems to Biomolecules*, Philadelphia: Univ.Philadelphia, p. 31.

Istok, J.D. et Harward, M.D., 1982 - Influence of soil moisture on smectite formation in soils derived from serpentinite. *Soils Science Soiciety of America Journal*, 46:1106–1108.

Jaffré T., Brooks R.R., Lee J., Reeves RD., 1976 – *Sebertia acuminata*: a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science*, 193: 579-580.

Jenny H., 1980 - *The Soils Resource : Origin and Behavior*. *Ecol. Stud.* 37:256-59, New York: Springer-Verlag. 377pp.

Juste C., Chassin P., Gomes A., Linères M. et Mocquot B., 1995 –Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stationn d’épuration urbaines. *ADEME Editions*, Paris, 209 pp.

Kabata-Pendias A., 1993 - Behavioural properties of traces metals in soils, *Appl. Geochem.* 2: 3–9.

- Kämpf N., Scheinost A.C. et Schulze D.G., 2000 – Oxide minerals, Sumner M.E., ed., Handbook of soil science. CRC Press LLC. Section F, chapitre 3: F125-F168.
- Kaupenjohann M. et Wilcke W., 1995 - Heavy metal release from a serpentine soil using a pH-stat technique. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59:1027–1031.
- Keller C., 2006 - Factors limiting efficiency of phytoextraction at multi-Metal contaminated sites. In: Morel J.L., Echevarria G. and N., Gocharova; *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, Nato Science Series (IV): Earth and environmental sciences - Vol.68:241-266.
- Kersten W.J., Brooks R.R., Reeves R.D., et Jaffre T., 1980 - Nature of Nickel Complexes in *Psychotria douarrei* and Other Nickel-Accumulating Plants, *Phytochemistry*, vol. 19: 1963–1965.
- Kerkeb L. et Kramer U., 2003 - The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*, *Plant Physiol.*, vol. 131: 716–724.
- Kierczak J., Néel C., Bril H. et Puziewicz J., 2007 - Effect of mineralogy and pedoclimatic variations on Ni and Cr distribution in serpentine soils under temperate climate. *Geoderma* 142:165-177.
- Kochian L.V., 2000 - Chapter 23: Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport and utilization. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem and Russell L. Jones, eds. American Society of Plant Physiologists, pp. 1204-1249
- Kramer U, Cotter–Howells J.D., Carnock J.M.; Baker A.J.M. et Smith J.A.C. 1996 - Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, v.379: 635-638.

- Kramer U, Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I.L. et Salt D.E., 2000 - Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, v.122: 1343-1353.
- Kramer U., Smith R.D., Wenzel W.W., Raskin I., et Salt D.E., 1997 - The Role of Metal Transport and Tolerance in Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy, *Plant Physiol.*, vol. 115: 1641–1650.
- Krause W., 1958 - Andere Bodenspezialisten. *Handb. Pflanzenphysiol.* 4: 755-806. In *California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils, and Management Problems*. Berkeley: Univ. Calif. Press. 24 pp.
- Krogstad T., 1983 - Effect of liming and decomposition on chemical composition, ion exchange and heavy metal ion selectivity in sphagnum peat. In: *Scientific Reports of the Agricultural University of Norway*, AAS, Norway, p. 79.
- Kruckeberg A.R., 1950 - An experimental inquiry into the nature of endemism on serpentine soils. PhD thesis. Univ. Calif., Berkeley. 154 pp.
- Kruckeberg AR., 1954. The ecology of serpentine soils: A symposium. III. Plant species in relation to serpentine soils. *Ecology* 35:267–74
- Kruckeberg AR. 1985 - California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils, and Management Problems. Berkeley: Univ. Calif. Press. 180 pp.
- Kruckeberg AR., 2002 - The influences of lithology on plant life. In *Geology and Plant Life: The Effects of Landforms and Rock Type on Plants*, pp. 160–81. Seattle/London: Univ. Wash. Press. 362 pp.
- Kumar P.B.A.N, Dushenkov V, Motto H. et Raskin I., 1995 - Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1232-1238.

- Kukier U., Fauziah Ishak C., Summer M. E et Miller W. P., 2003 - Composition and element solubility of magnetic and non-magnetic fly ash fractions, *Environ. Pollut.*, 123, 255–266.
- Kukier U., Peters C.A., Chaney R.L., Angle J.S. et Roseberg R.J., 2004 - The Effect of pH on Metal Accumulation in Two *Alyssum* Species, *J. Environ. Qual.*, vol. 33: 2090–2102.
- Kupper H., Lombi E., Zhao F.J., Wieshammer G., and McGrath, S.P., 2001 - Cellular Compartmentation of Nickel in the Hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*, *J. Exp. Bot.*, vol. 52: 2291–3000.
- Lasat, M.M., 2002 - Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31:109–120.
- Lee J., Reeves R.D., Brooks R.R. et Jaffre T., 1977 - Isolation and Identification of a Citrate-Complex of Nickel from Nickel-Accumulating Plants, *Phytochemistry*, vol. 16, pp. 1503–1505.
- Lee B.D., Graham R.C., Laurent T.E., Amrhein C., Creasy R.M., 2001- Spatial Distributions of Soil Chemical Conditions in a Serpentinic Wetland and Surrounding Landscape. *Soil Sci Soc Am J.* 65: 1183–1196.
- Lee B.D, Sears K.S, Graham R.C, Amrhein C. et Vali H., 2003 - Secondary mineral genesis from chlorite and serpentine in an ultramafic soil toposequence. *Soil Science Society of America Journal* 67:1309–1317.
- L'Huillier L., Edighoffer S., 1996 - Extractability of Ni and its concentration in cultivated plants in nickel rich ultramafic soil of New Caledonia. *Plant and Soil*, 186: 255-264.
- Li Y.M., Chaney R.L., Brewer E., Roseberg R.J., Angle J.S., Baker A.J.M., Reeves R.D. et Nelkin J., 2003b - Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: Economic and technical considerations. *Plant Soil* 249:107–115.

- Li Y.M., Chaney R.L., Brewer E.P., Angle J.S., et Nelkin J., 2003a - Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 37:1463–1468.
- Li Y-M, Chaney R.L, Angle J.S et Baker A.J.M., 2000 - Phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *In* Bioremediation of Contaminated Soils. Eds. D.L.Wise et al. pp. 837–884. Marcel Dekker, New York. 293: 7-21.
- Li M. Y., R. Chaney, et al. 2003 - Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant Soil* 249: 107-115.
- Lindsay W.L. et Norvell W.A., 1978 - Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42:421–428.
- Lindsay W.L. et Norvell W.A., 1978 - Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci Soc Am J* 42:421–428.
- Lo K.S.L., Yang W.F. et Lin Y.C., 1992 - Effects of organic matter on the specific adsorption of heavy metals by soil. *Toxicol. Environ. Chem.* 34: 139–153.
- Lombini A., Dinelli E., Ferrari. C., et Simoni A., 1998 - Plant-soil relationships in the serpentinite screes of Mt Prinzera (Northern Apennines, Italy). *J Geochem Explor* 64:19–33.
- Lombi E., Zhao F.J., Dunham S.J., Mcgrath S.P., 2001 - Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, v.30, p.1919-1926.
- Main J.L., 1974 - Differential responses to magnesium and calcium by native populations of *Agropyron spicatum*. *Am. J. Bot.* 61:931–37.

- Main J.L., 1981 - Magnesium and calcium nutrition of a serpentine endemic grass. *Am. Midl. Nat.* 105:196–99
- Malpas J. et Robinson P., 2007 - The Origin and Evolution of Oceanic Lithosphere: Introduction, Geoscience Canada, Volume 24 (2), ISSN 0315-0941.
- Manceau A., Liorca S. et Calas G., 1987- Crystal chemistry of cobalt and nickel in lithiophrite and asbolane from New Caledonia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51: 105-113.
- Manceau A., Gorshkov A.I. et Drits V.A., 1992 - Structural chemistry of Mn, Fe, Co and Ni in manganese hydrous oxide: part II. Information from EXAFS spectroscopy and electron and X ray diffraction. *American Mineralogist*, 77: 1144-1157.
- Manceau A., Schlegel M.L., Musso M., Sole V.A., Gauthier C., Petit P.E. et Trolard F., 2000- Crystal chemistry of trace elements in natural and synthetic goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 3643- 3661.
- Manika K., 1994 - Petrologie du massif ophiolitique de Shebeni (Albanie). These, Universite de Paris-Sud.
- Marschner H., 1995 - Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. San Diego: Academic Press., 889p.
- Marschner H. et Römheld V., 1983 - *In vivo* measurement of root-induced pH changes at the soil–root interface: effect of plant species and nitrogen sources. *Zeitschrift für Pflanzenernähr Bodenkunde* 111: 241–251.
- Marcusen H., Holm P.E. et Hansen H.C.B., 2003 – Nickel sorption to goethite and Namontmorillonite in the presence of citrate. International Conference on the biochemistry of Trace Elements, Conference of Proceedings, Suede, pp 64-65.
- Massoura S.T., Echevarria G., Leclerc-Cessac E. et Morel J.L., 2004 - Response of excluder, indicator, and hyperaccumulator plants to nickel availability in soils. *Aust. J. Soil Res.*, 42, 933-938.

- Massoura S.T, Echevarria G., Becquer T., Ghanbaja J., Leclerc- Cessac E. et Morel J.L., 2006 Nickel bearing phases and availability in natural and anthropogenic soils. *Geoderma* 136:28–37.
- Marrs R.H., Proctor J., 1976 - The response of serpentine and nonserpentine *Agrostis stolonifera* L. to magnesium and calcium. *J. Ecol.* 64:953–64.
- Mehra O.P. et Jackson M.L., 1960 - Iron oxides removal from soils and clays by dithionite-citrate systems buffered with sodium bicarbonate. In: Swineford A (ed) *Proceedings of the 7th Nat. Conf. clay minerals*. Pergamon Press, Elmsdorf, NY, pp 317-342
- Mench M., Morel J.L. et Guekert A., 1987 - Metal binding properties of high molecular weight soluble exudates from maize (*Zea mays* L.) roots *Biol Fertil Soils* 3:165-169
- Mench M., Morel J.L. et Guckert A., 1985 - Liaison du cadmium avec la fraction macromoléculaire soluble des exsudats racinaires du maïs (*Zea mays* L.). *C R Acad Sci* 301:379-382.
- Metz V., Amram K. et Ganor J., 2005 - Stoichiometry of smectite dissolution reaction. *Geochimica et cosmochimica Acta*, 69: 1755-1772.
- McBride, M.B., 1989. Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Adv. Soil Sci.* 10, pp. 1–56.
- McGrath, S.P. and Smith, S., 1990 - Chromium and nickel. In *Heavy Metals in Soils*. Ed. B J Alloway. pp. 125–150. Balckie, Glasgow.
- McGrath, S.P., Shen, Z.G. et ZHAO F.J., 1997 - Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant and Soil*, v.188: 153-159.

- McGrath S.P., Zhao F.J., et Lombi E., 2002 - Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.* 75:1–56.
- McGrath S.P., 1995 - Chromium and Nickel. In heavy metals in soils, Alloway B.J. (Ed), London (UK), Blackie academic & Professional. 2nd Ed, pp chapter 7, pp. 152-178.
- McKeague J.J. et Day J.A., 1966 - Dithionite and oxalate extractable Fe and Al as aids in differentiating different classes of soils. *Canadian Journal of Soil Science* 46: 13-22.
- Migula P., Przybylowicz W.J., Mesjasz-Przybylowicz J., Augustyniak M., Nakonieczny M., Glowacka E. et Tarnawska M., 2007 - Micro-PIXE studies of elemental distribution in sap-feeding insects associated with Ni hyperaccumulator, *Berkheya coddii*. *Plant and Soil*, 293: 197-207.
- Millot G., 1971 -G éochimie des altérations. *Bul. Serv. Carte Géol. Als. Lorr.* 24-4.
- Minguzzi, C. et Vergnano O., 1948 - Il contenuto di nichel nelli ceneri di *Alyssum bertlonii* Desv. *Atti della Societa Toscana di Science Naturali*, Mem Ser A 55: 49-77.
- Montargès-Pelletier E., Chardot V., Echevarria G., Michot L., Bauer A. et Morel J.L., 2008 - Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: An X-ray spectroscopic study, *Phytochemistry* 69: 1695-1709.
- Morel J.L., Mench M., Guckert A., 1986 - Measurement of Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2: 29-34.
- Nabais C., Freitas H., Hagemeyer J., Breckle S.W., 1996 - Radial distribution of Ni in stem wood of *Quercus ilex* L. trees growing on serpentine and sandy loam (umbric leptosol) soils of NE-Portugal. *Plant Soil* 183, 181-185.

- Nanda Kumar, P.B.A., H. Dushenkov, H. Motto, and I. Raskin. 1995 - Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29(5):1232–1238.
- Nguyen KHA., 1973 - Recherches sur l'évolution des sols à texture argileuse en conditions tempérées et tropicales. Thèse Univers. De Nancy, CNRS Ao 8033.
- Nicks L. et Chambers M.F., 1995 - Farming for metals. *Mining Environ. Manage.* 3 (3): 15–18.
- Nicks L. et Chambers M.F., 1998 - A pioneering study of the potential of phytomining for nickel. *In* Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Ed. R.R, Brooks. pp. 313–325. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Nyamangara J. et Mzezewa J., 1999 - The effect of long-term sewage sludge application on Zn, Cu, Ni and Pb levels in a clay loam soil under pasture grass in Zimbabwe, *Environ. Exp. Bot.* 73. pp. 199–204.
- O'Hanley D.S., 1996 - Serpentinites: Records of tectonic and petrological history. In: Oxford monographs on geology and geophysics. Oxford University Press, New York, 277 p
- Olson C.G., Thompson M.L. et Wilson M.A., 2000 - Phyllosilicates. In Handbook of soil science, Sumner M.E., (Ed) CRC Press LLC. Section F, chapitre 2, F 77-F123.
- Page N.J., 1968 - Serpentinizations in a sheared serpentinite lens, Tiburon peninsula, California. U. S. Geological Survey Prof. paper 600b, 21B-28B.
- Pédro (G.), 1987 - Current aspects of the mineralogy of clays and soils ». In Proceedings of the 20th Colloquium of the International Potash Institute, Baden bei Wien, Austria. Berne, IPI, p. 11-43.
- Perrier R., 1995 - Les marbres verts du Val d'Aoste, Le Mausolée, n. 704, p. 58-71, avril 1995

- Persans M.W., Yan X., Patnoe J.M., Kramer U., et Salt D.E., 1999 - Molecular Dissection of the Role of Histidine in Nickel Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* (Halacsy), *Plant Physiol.*, vol. 121, pp. 1117–1126.
- Persans, M.W., Nieman, K., and Salt, D.E., 2001 - Functional Activity and Role of Cation-Efflux Family Members in Ni Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98, pp. 9995–10000
- Perronnet, K., Schwartz, C., Gérard, E., and Morel, J.L. 2000 - Availability of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil, *Plant Soil* 227, 257-263.
- Perronnet, K., Schwartz, C., and Morel, J.L. 2003 - Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil, *Plant Soil* 249, 19-25
- Pitteloud C., Powell D.H. et Fischer H.E., 2001 - The hydration structure of the Ni²⁺ ion intercalated in montmorillonite clay: a neutron diffraction with isotopic substitution studi. *Phys. Chem.*, 3: 5567-5574
- Pichi-Sermolli R., 1948 - Flora e Vegetazione delle serpentine e delle altre ofioliti dell'alta valle del Trevere (Toscana). *Webbia* 6: 1-380. In *California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils, and Management Problems*. Berkeley: Univ. Calif. Press. 24 pp.
- Proctor J. 1970 - Magnesium as a toxic element. *Nature* 227:742–43
- Proctor J., 1971 - The plant ecology of serpentine. III. The influence of a high magnesium/calcium ratio and high nickel and chromium levels in some British and Swedish serpentine soils. *J. Ecol.* 59, 827–842.
- Proctor J., et Woodell S.R.J. 1975 - The ecology of serpentine soils. *Adv. Ecol. Res.* 9: 255–365.

- Proctor J., 1999 - Toxins, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends Ecol. Evol.* 14: 334–35.
- Psaras G.K. et Manetas Y., 2001b - Nickel Localization in Seeds of the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi pindicum* Hausskn., *Ann. Bot.*, vol. 88, pp. 513–516.
- Psaras G.K., Constantinidis Th., Cotsopoulos B. et Manetas Y., 2000 - Relative abundance of nickel in the leaf epidermis of eight hyperaccumulators: evidence that the metal is excluded from both guard cells and trichomes. *Annals of Botany* 86: 73-78.
- Puschenreiter M., Wieczorek S., Horak O., Wenzel WW., 2003 - Chemical changes in the rhizosphere of metal hyperaccumulator and excluder *Thlaspi* species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* Volume 166 Issue 5, Pages 579 – 584.
- Quantin C., Becquer T., Rouiller J.H., et Berthelin J., 2001 - Oxide weathering and trace metal release by bacterial reduction in a New Caledonia Ferralsol, *Biogeochemistry* 53 : 323–340.
- Quartacci M.F., Argilla A., Baker A.J.M. et Navari-Izzo F., 2005 - Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard
doi:10.1016/j.chemosphere.09.051.
- Raskin I. et Ensley B.D., 2000 - *Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean up the Environment*, Eds., New York: J. Wiley et Sons, 352 p. ISBN0-47-119254-6.
- Rascio W., 1977 - Metal accumulation by some plants growing on Zn mine deposits. *Oikos* 29: 250-253.
- Reeves R.D., Baker A.J.M. et Brooks R.R. 1995. Abnormal accumulation of trace metals by plants. *Mining Environ. Mgt.*, September: 4 - 8.

- Reeves R.D., Brooks R.R., et Dudley T.R., 1983 - Uptake of nickel by species of *Alyssum*, *Bommuellera* and other genera of Old World tribus Alysseae. *Taxon*; 32: 184-192.
- Reeves R.D., 1992 - The hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In: Baker AJM, Proctor J, Reeves RD, eds. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*. Andover, UK: Intercept Ltd, 253-277.
- Reeves R.D., Baker A.J.M., Borhidi A. et Berazain R., 1996 - Nickel accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytologist* 133: 217-224.
- Reeves R.D., Baker A.J.M. et Kelepertsis A., 1997 - The distribution and biogeochemistry of some serpentine plants of Greece. In: Jaffre T, Reeves RD., Becquer T (eds). *Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols metalliferes*, ORSTOM, Noumea, pp 205-207 Documents Scientifiques et Techniques No. III/2.
- Reeves R.D., Baker A.J.M., Borhidi A. et Berazain R., 1999 - Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* 83: 29-38.
- Reeves R.D., 2002 - Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Morel, J.L., Echevarria, G. and N., Gocharova; *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, Nato Science Series (IV): Earth and environmental sciences - Vol.68: 29.
- Ritter-Studnika H., 1968 - Die Serpentinomorphosen der Flora Bosniens. *Botanische jarb.* 88/ 443-465. In *California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils, and Management Problems*. Berkeley: Univ. Calif. Press. 24 pp.
- Robinson B.H, Chiarucci A., Brooks RR., Petit D., Kirkman J.H, Gregg P.E.H et De Dominicis V., 1997 - The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *J. Geochem. Explor.* 59, 75-86.

- Robinson B.H., Brooks R.R. et Clothier B.E., 1999 - Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: Potential use for phytomining and phytoremediation. *Ann. Bot. (London)* 84:689–694.
- Roberts B.A. et Proctor J., - 1992. The Ecology of Areas with Serpentinized Rocks: A World View. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 421 pp. Rudakova, E.V.,
- Sagner S., Kneer R., Wanner G., Cosson J.-P., Deus- Neumann B., et Zenk M.H., 1998- Hyperaccumulation, Complexation and Distribution of Nickel in *Sebertia acuminata*, *Phytochemistry*, vol. 47: 339–343.
- Salt D.E., Smith R.D. et Raskin I., 1998 - Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:643–668. Utsunomyia, T. 1980. Japanese Patent Application No. 55-72959.
- Salt, D.E., M. Blaylock, P.B.A.N. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet, and I. Raskin, 1995 - Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-475.
- Sauerbeck D.R., et Hein A., 1991 - The nickel uptake from different soils and its prediction by chemical extractions. *Water Air Soil Pollut.* 57–58: 861–871
- Seregin I.V. et Ivanov V.B., 2001 - Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants, *Fiziol. Rast. (Moscow)*, vol. 48, pp. 606–630 (*Russ.J. Plant Physiol.*, Engl. Transl., pp. 523–544.
- Severne B.C., 1974 - Nickel Accumulation by *Hybanthus floribundus*, *Nature*, , vol. 248: 807–808.
- Schwart C., Morel J.L., 1998 - How can agronomical practices improve phytoremediation of heavy metal contaminated soils? In: pp. 609-617, *Proccedings of the 6th*

- Schwartz C., Morel J.L., Saumier S., Whiting, S.N. et Baker, A. J.M., 1999 - Root architecture of the Zn-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localisation in soil. *Plant Soil* 208: 103-115.
- Schwartz C., Echevarria G. et Morel J.L. 2003- Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249: 27-35.
- Schwartz, C., Sirguey C., Peronny S., Reeves R.D., Bourgaud F., Morel, J.L., 2006 - Testing of outstanding individuals of *Thlaspi caerulescens* for cadmium phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation*, 8: 339-357.
- Schwertmann U. et Taylor R.M., 1989 - Iron oxides. In *Minerals in soil environments*, Dixon J. B. & Weed S.B. editions, Soil Science Society of America, Madison, WI, 379-438.
- Stevenson F.J., 1991- Organic matter-micronutrient reactions in soil. In: Mortvedt, J.J., Cox, F.R.; Shumam, L.M.; Welch, R.M. (Ed.) *Micronutrients in agriculture*. Madison: SSSA, p.145-186.
- Shallari S., Schwartz C., Hasko A. et Morel J.L., 1998 - Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci. Total Environ.* 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.
- Skiker S., 2007 - Mesure des paramètres d'absorption du nickel par les racines de *Zea mays* et de l'hyperaccumulateur *Leptoplax emarginata*. Mémoire de Fin d'Etudes.
- Stevanović V., Tan K. et Iatrou G., 2003 - Distribution of the endemic Balkan Flora on serpentine I—obligate serpentine endemics. *Plant Syst Evol* 242:149–170.

- Sterckeman Th., Duquène L., Perrigüey J., Morel, J.L., 2005 - Quantifying the Effect of Rhizosphere Processes on the Availability of Soil Cadmium and Zinc. *Plant and Soil*, Volume 276, Numbers 1-2, pp. 335-345(11).
- Tan K., Mullaj A., Ruci B. et Iatrou G., 1999 - Serpentine endemics in Albania and NW Greece. Presentation of the Conference on Plant Taxonomy. Lisboa 1999. 68.
- Temp G.A., 1991 - Nickel in Plants and Its Toxicity, *Ustoichivost' k tyazhelym metallam dikorastushchikh vidov* (Resistance of Wild Species to Heavy Metals), Alekseeva-Popova, N.V., Ed., Leningrad: Lenuprizdat, pp. 139–146.
- Tlustoš P., Pavliková D., Száková J., Balík J., 2006 – Plant accumulation capacity for potential toxic elements. In: Morel, J.L., Echevarria, G. and N., Gocharova; Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils, Nato Science Series (IV): Earth and environmental sciences - Vol.68:53-84.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Valentine D.H., Walters S.M. et Webb D.A., 1964 - Flora Europaea, vol. 1. Cambridge University Press, 464.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. et Webb D.A., 1968 - Flora Europaea, vol. 2. Cambridge University Press, 455.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. et Webb D.A., 1972 - Flora Europaea, vol. 3. Cambridge University Press, 370.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. et Webb D.A., 1976 - Flora Europaea, vol. 4. Cambridge University Press, 505.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M. et Webb D.A., 1980 - Flora Europaea, vol. 5. Cambridge University Press, 452.

- Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moor D.M., Valentine D.H., Walters S.M., et Webb D.A. eds. 1993 - *Flora Europaea* 1, 2nd edn., Cambridge University Press, Cambridge.
- Uren N.C., 1992 - Forms, reactions and availability of nickel in soils. *Advances in agronomy*, v.48: 141-203.
- Utsunomyia T. 1980 - Japanese Patent Application No. 55-72959. Vlamis J, Jenny H. 1948. Calcium deficiency in serpentine soils as revealed by absorbent technique. *Science* 107:549-51.
- Van Veldhoven P.P., Mannaerts G.P., 1987 - Inorganic phosphate measurements in the nanomolecular range. *Analytical Biochemistry*, 161, 47-48.
- Vlamis J, Jenny H. 1948 - Calcium deficiency in serpentine soils as revealed by absorbent technique. *Science* 107:549-51
- Voskresenskaya N.T. et Coliazo H., 1983 - Kinetics and mechanism of dissolution of some layer silicates in a weathering crust. *Translates from geokhimiya*, 1: 43-53.
- Walker R.B. 1954 - The ecology of serpentine soils: A symposium. II. Factors affecting plant growth on serpentine soils. *Ecology* 35:259-66.
- Walker R.B, Walker H.M, Ashworth P.R. 1955 - Calcium-magnesium nutrition with special reference to serpentine soils. *Plant Physiol.* 30:214-21.
- Walker R.B. 1948 - A study of serpentine soil infertility with special reference to edaphic endemism. PhD thesis. Univ. Calif., Berkeley. 101 pp.
- Walker, T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J.M., 2003 - Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, v.132: 44 – 51.
- Walker C.D., Graham R.D., Madison J.T., Cary E.E. et Welch R.M., 1985 - Effects of Ni Deficiency on Some Nitrogen Metabolites in Cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.), *Plant Physiol.*, vol. 79: 474-479.

- Whittaker R.H., 1954 - The ecology of serpentine soils: A symposium. I. Introduction. *Ecology* 35:258–59
- Welch R.M., 1981 - The Biological Significance of Nickel, *J. Plant Nutr.*, vol. 3, pp. 345–356.
- Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenreiter M. et Horak O., 2003 - Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ. Pollut.* 123, pp. 131–138.
- Wenzel W.W. et Jockwer F., 1999 - Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralized soils of the Austrian Alps. *Environmental Pollution* 104: 145-155.
- Wildman W.E., Jackson M. L. et Whitting L.D., 1968b - Iron- rich montmorillonite formation in soil derived from serpentinite. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32: 787-794.
- 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.
- Zonia, L.E., Stebbins, N.E., and Polacco, J.C., 1995 - Essential Role of Urease in Germination of Nitrogen-Limited *Arabidopsis thaliana* Seeds, *Plant Physiol.*, vol. 107, pp. 1097–1103.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Thierry BECQUER, Directeur de Recherche, IRD - SupAgro, Montpellier

Monsieur Alessandro CHIARUCCI, Professeur, Università degli Studi di Siena, Sienna, Italy

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BANI Aïda

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
NANCY, 54501
VANDOEUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
une thèse intitulée :

"Phytoextraction du Ni dans les sols ultramafiques d'Albanie"

en vue de l'obtention du titre de :

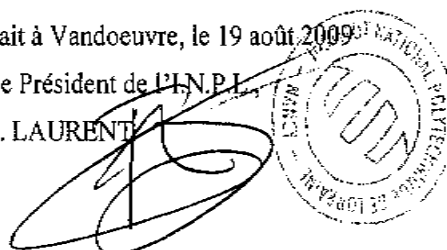
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 19 août 2009

Le Président de l'IN.P.L.

F. LAURENT



Résumé

Phytoextraction du Ni dans les sols ultramafiques d'Albanie

La phytoextraction minière est un procédé de récupération des métaux des sols minéralisés naturels ou pollués à l'aide de plantes hyperaccumulatrices. Elle est une alternative à l'agriculture vivrière des zones ultramafiques. L'objectif de la thèse est le développement d'une technologie de phytoextraction extensive du Ni avec *Alyssum murale* sur les Vertisols ultramafiques. Pour cela, il s'agissait : i) d'identifier les plantes hyperaccumulatrices les plus efficaces dans le prélèvement du Ni et comprendre les relations entre le prélèvement du métal et sa biodisponibilité, ii) de déterminer les types de sols adaptés à la phytoextraction du Ni et iii) de définir et optimiser un itinéraire agronomique adapté pour l'espèce retenue et pour les conditions édaphiques. Dans ce but, des prospections géobotaniques ont été conduites en Albanie et en Grèce. Puis une étude *in situ* des facteurs qui influencent la biodisponibilité du Ni et le comportement des plantes sur une toposéquence ultramafique a été mise en place. Enfin un essai agronomique de quatre années sur un site ultramafique d'Albanie (Pojske) a permis de tester la fertilisation, le contrôle des adventices par herbicide et la date de récolte pour optimiser le rendement d'extraction du Ni. Les résultats montrent que parmi l'ensemble des espèces présentes naturellement sur les serpentines des Balkans, *A. markgrafii* et *A. murale* ont le plus fort taux d'accumulation du Ni. Les Vertisols ultramafiques présentent une disponibilité élevée du Ni favorable à la phytoextraction minière. La biomasse d'*A. murale* est augmentée de 0,2 t ha⁻¹ à 6,0 t ha⁻¹ à partir des traitements agronomiques et le rendement de phytoextraction de Ni par *A. murale* est de 23 à 69 kg ha⁻¹. *Alyssum murale* peut être envisagée comme une culture pérenne et la fertilisation permet d'augmenter la compétitivité de la plante sans affecter les concentrations de Ni dans les parties récoltées.

Mots clés : Phytoextraction *in situ*, Phytoextraction minière, Nickel, Plante hyperaccumulatrice, Biodisponibilité, Serpentine.

Phytomining of Ni in Ultramafic soils of Albania

Phytomining is a process for recovering metals with hyperaccumulating plants from natural or polluted soils. It is an alternative to conventional farming in ultramafic areas. The aim of the thesis is the development of an extensive phytoextraction technology with *Alyssum murale* on ultramafic Vertisols. Therefore, work was conducted to i) identify the most effective Ni hyperaccumulators, and understand the relationship between metal uptake and bioavailability, ii) identify soil types suitable for phytoextraction, and iii) define and optimize agronomic practices adapted to the plant species and the edaphic conditions. Hence, geobotanical surveys were conducted in Albania and Greece. Then an *in situ* study was run on an ultramafic toposequence to assess the factors that influence Ni bioavailability and behavior of plants. Finally a four-year field trial was carried out on an ultramafic site in Albania (Pojske) where fertilization, weed control by herbicide, and harvest date were tested to optimize the efficiency of Ni extraction. The results showed that *A. markgrafii* and *A. murale* exhibit the highest rate of Ni accumulation among all species of Balkan serpentines. The ultramafic Vertisols have a high Ni availability phytoextraction and are favourable for phytomining. *A. murale* biomass increased from 0.2 t ha⁻¹ to 6.0 t ha⁻¹ due to optimization of agronomic treatments, and performance of phytoextraction from 23 to 69 kg ha⁻¹. *Alyssum murale* can be seen as a perennial crop, and fertilization increases the competitiveness of the plant without affecting the Ni concentrations in the harvested parts.

Keywords: In-situ phytoextraction, Hyperaccumulator plant, Nickel, Phytomining, Bioavailability, Serpentine.